



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105483088 B

(45) 授权公告日 2021.05.28

(21) 申请号 201510760532.X

(22) 申请日 2006.10.18

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105483088 A

(43) 申请公布日 2016.04.13

(30) 优先权数据
60/728,131 2005.10.18 US
60/765,993 2006.02.06 US

(62) 分案原申请数据
200680045545.8 2006.10.18

(73) 专利权人 国家犹太健康中心
地址 美国科罗拉多州
专利权人 科罗拉多大学董事会

(72) 发明人 J·卡姆比尔 Y·里费利
S·约翰逊 B·C·特纳

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

代理人 孟凡宏 谢燕军

(51) Int.Cl.
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 5/074 (2010.01)
C12N 5/0789 (2010.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
C12N 5/0797 (2010.01)
C12N 5/09 (2010.01)

(56) 对比文件
CN 1659187 A, 2005.08.24
US 5652122 A, 1997.07.29
US 5652122 A, 1997.07.29
US 2002076787 A1, 2002.06.20

审查员 蔺娜

权利要求书1页 说明书33页
序列表76页 附图14页

(54) 发明名称

条件无限增殖化长期干细胞和制备和使用
所述细胞的方法

(57) 摘要

公开了使干细胞(包括成年干细胞和胚胎干
细胞)条件无限增殖化的方法,由所述方法产生
的细胞,利用所述细胞的治疗和实验室或研究方
法,和利用所述细胞鉴定与细胞分化和发育或治
疗疾病有关的化合物的方法。还公开了一种急性
髓细胞白血病(AML)小鼠模型和与所述小鼠模型
有关的细胞和方法。

1. 一种组合物, 包含:

融合蛋白, 包含能够促进一种或多种体外培养的造血干细胞的细胞增殖和存活的MYC蛋白和Tat蛋白的蛋白转导结构域; 和

包含抑制细胞凋亡的Bcl-2家族成员和所述Tat蛋白的蛋白转导结构域的融合蛋白。

2. 一种用于促进一种或多种体外培养的造血干细胞的一种或多种细胞增殖或细胞存活的方法, 包括:

用以下转导一种或多种造血干细胞:

(i) 第一载体, 其包含编码MYC分子和人雌激素受体的激素结合结构域(MYC-ER)的核酸序列, 和第二载体, 其包含编码Bcl-2的核酸序列;

(ii) 第一载体, 其包含编码MYC-ER的核酸序列; 和第二载体, 其包含编码hTERT的核酸序列;

(iii) 第一载体, 其包含编码Notch-1的细胞内部分的ER调节的活性元件的核酸序列(ICN-1-ER), 和第二载体, 其包含编码hTERT的核酸序列; 或

(iv) 第一载体, 其包含编码MYC-ER的核酸序列, 和第二载体, 其包含编码ICN-1-ER的核酸序列; 和

在培养基中培养所述一种或多种造血干细胞;

其中一种或多种造血干细胞的一种或多种存活或增殖较之相应的非转导造血干细胞是增加的。

3. 一种用于促进一种或多种体外培养的造血干细胞的一种或多种细胞增殖或细胞存活的方法, 包括:

向一种或多种造血干细胞提供权利要求1的组合物,

其中所述MYC蛋白是MYC-ER并且所述Bcl-2家族成员是Bcl-2; 和

在培养基中培养所述一种或多种造血干细胞;

其中一种或多种造血干细胞的一种或多种存活或增殖较之不暴露于所述组合物的相应造血干细胞是增加的。

条件无限增殖化长期干细胞和制备和使用所述细胞的方法

[0001] 本申请是申请日为2006年10月18日、申请号为200680045545.8、发明名称为“条件无限增殖化长期干细胞和制备和使用所述细胞的方法”的发明专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明一般地涉及条件无限增殖化长期干细胞,制备所述细胞的方法,和使用所述细胞的方法,包括治疗方法和药物发现方法。

[0003] 发明背景

[0004] 控制不同血细胞的骨髓输出的能力已经成为多种疾病的治疗的一种重要工具。对于血液恶性肿瘤的一些最好的新疗法基于促使白血病细胞在转化事件之前分化为所定向的谱系的化合物的研制。一个这样的例子是急性早幼粒细胞白血病。在用三氧化二砷治疗患者后,推动恶性细胞沿骨髓单核细胞途径,导致这些肿瘤的缓解。另外一个例子是促进在受照射个体中移植的骨髓干细胞(长期重建性造血干细胞,或1t-HSC)的成功移植。全身施用已知特异性诱导红血细胞发育(促红细胞生成素,或Epo)或骨髓细胞发育(粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子,或GM-CSF)的细胞因子可以促进分化的血细胞的出现。最后,使用“动员(mobilization)”法大大简化了从供体中收获1t-HSC,在该方法中,通过全身施用被称为G-CSF的细胞因子,诱导这些细胞从它们正常所处的骨髓部位移动到外周血中。然后可从外周血中收获干细胞,从而避免了疼痛和复杂的骨髓活检组织的采集。所有这些方法都依赖于计划和控制1t-HSC的生物学行为的能力。

[0005] 相应地,骨髓(干细胞)移植是一种无价的治疗工具,用于已经经历了放射和/或化疗(例如,癌症患者,或已经暴露于高水平放射)的个体的血液和免疫重建,并且也是治疗免疫缺陷和血液恶性肿瘤的一种重要方法。另外,骨髓移植将是一种对抗衰老对免疫系统和其他细胞和组织的不利影响的非常有用的疗法。预计干细胞移植每年可使超过35000名儿童和成人受益。

[0006] 骨髓移植的工作原理是产生所有血细胞类型的放射敏感性1t-HSC的置换。最近的研究显示骨髓移植可能对于治疗心脏疾病有价值。尽管这种效果的基础是未知的,但是这一发现和其他发现提高了造血干细胞(1t-HSC)可被重新编程产生其他组织的可能性。如果是事实,则1t-HSC可具有更广泛的应用,并且提供了一种替代有争议的胚胎干细胞治疗的方法。

[0007] 骨髓移植临床应用所面临的主要障碍首先是适当组织相容性骨髓供体的鉴定。这通常通过登记有超过6百万潜在供体的机构来完成。选择的供体必须经历诱导干细胞动员进入血液以及随后4到5天的白细胞清除以分离稀少1t-HSC的严格处理。这些细胞移植之后必须仔细监视和处理受者,以使由过路淋巴细胞引起的移植物抗宿主反应最小化。

[0008] 在历史上低频率的相关细胞群体使得难以对造血谱系发展受损的分子基础进行阐明,这阻止了对信号传导和下游反应的生化分析。实际上,这是所有血细胞生成研究中的一个主要的限制性因素。另外,长期造血干细胞(LT-HSC)的有限的可获得性也是治疗人类的许多类型癌症和几种免疫缺陷中的一个主要障碍。据本发明人所知,目前还没有可获得

的类似1t-HSC自发产生的并且可在体外分化为正常谱系、或可使致死性照射的小鼠或亚致死性照射的人类重建的细胞系,也没有记载任何方法可以预期产生所述细胞系。而且,目前没有持续扩增1t-HSC的可行的技术,以致于在每次需要时需要从供体中获得这些细胞。

[0009] 也迫切需要治疗血液恶性肿瘤和免疫缺陷的其他方法,和提高移植1t-HSC输出的新的细胞因子。另外,目前还没有用于靶标鉴定和药物发现的合适的平台。缺失的因素是代表造血谱系的不同发展阶段的细胞系。最理想地,所述细胞应该保持在特定谱系中进一步分化的能力。对于基因产品的鉴定,因此对于与细胞发育、增殖和存活的调节有关的新的可药用目标来说,这些细胞系是重要的。另外,在新药开发中,所述细胞系对于用于功能缺失研究的小分子和shRNA文库以及用于功能增加研究的cDNA文库的筛选是重要的。

[0010] 在本领域中目前的药物发现的障碍包括:(a)从特定发展阶段分离足够数量的细胞;(b)细胞在体外增殖一段足够长的时间;和(c)利用条件致癌基因筛选可影响白血病细胞而不影响正常HSC或祖细胞的药物的能力。

[0011] 因此,在本领域中特别需要这样一种方法,该方法产生可以广泛扩增、冷冻并在需要时随时再次使用的1t-HSC细胞系,而不需要后续地从供体中收获。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明的一个实施方式涉及一种生产条件无限增殖化成年干细胞的方法。该方法包括下列步骤:(a)获得扩增的成年干细胞的群体;(b)用包含促进细胞存活和增殖的原癌基因或其生物活性片段或同源物的核酸分子转染所述干细胞,其中所述原癌基因是可诱导的;(c)用编码抑制该细胞的细胞凋亡的蛋白质的核酸分子转染所述干细胞;和(d)在干细胞生长因子组合的存在下并且在使原癌基因保持活性的条件下扩增被转染细胞,以生产条件无限增殖化成年干细胞。在该实施方式的一个方面,(b)和/或(c)的核酸分子包含在一种整合载体中。在一个方面,利用选自下组的病毒或病毒载体将(b)和/或(c)的核酸分子转染入细胞中:逆转录病毒载体、慢病毒载体、细小病毒、痘苗病毒、冠状病毒、嵌杯样病毒、乳头瘤病毒、黄病毒、正粘病毒(orthomixovirus)、披膜病毒、小RNA病毒、腺病毒载体、修饰和减毒的疱疹病毒。在一个方面,用直接电穿孔将(b)和/或(c)的核酸分子转染入细胞中。在一个方面,(b)和/或(c)的核酸分子包含在一种包含编码药物敏感蛋白的核酸序列的载体中。在一个方面,(b)和/或(c)的核酸分子包含在一种载体中,该载体在(b)或(c)的核酸分子的侧翼包含编码重组酶的识别底物序列的核酸序列。

[0014] 在一个方面,该实施方式包括以下附加步骤:(e)去除使原癌基因保持活性的(d)的条件;和(f)在包含诱导细胞分化的生长因子的培养基中培养(e)的细胞。这种方法可进一步包括:(g)给(f)的细胞施加使原癌基因保持活性的(d)的条件,以生产处于细胞分化中间阶段的条件无限增殖化细胞。

[0015] 本发明的另一实施方式涉及一种生产条件无限增殖化成年干细胞的方法,包括:(a)获得扩增的成年干细胞群体;(b)在下列物质存在下培养所述干细胞:(1)干细胞生长因子的组合;(2)第一Tat-融合蛋白,其中Tat与由促进细胞存活和增殖的原癌基因或其生物活性片段或同源物编码的蛋白质融合;和(3)第二Tat-融合蛋白,其中Tat与抑制干细胞的细胞凋亡的蛋白质融合。

[0016] 本发明的另一实施方式涉及生产条件无限增殖化胚胎干细胞的方法,包括:(a)获得扩增的胚胎干细胞群体;(b)用包含促进细胞存活和增殖的原癌基因或其生物活性片段

或同源物的核酸分子转染所述干细胞,其中所述原癌基因是可诱导的;(c)用编码抑制该细胞的细胞凋亡的蛋白质的核酸分子转染所述干细胞;和(d)在干细胞生长因子组合的存在下并且在使原癌基因保持活性的条件下扩增被转染细胞,以生产条件无限增殖化胚胎干细胞。

[0017] 本发明的另一实施方式涉及生产条件无限增殖化干细胞的方法,包括:(a)获得扩增的干细胞群体;(b)在下列物质存在下培养所述干细胞:(1)干细胞生长因子的组合;(2)由促进细胞存活和增殖的原癌基因或其生物活性片段或同源物编码的蛋白质;和(3)抑制干细胞的细胞凋亡的蛋白质。利用任何适当的递送系统将(2)和(3)的蛋白质递送进干细胞中,递送技术包括但不限于:Tat融合、适体(apptamer)技术、或CHARIOT™技术。

[0018] 本发明的另一实施方式涉及一种生产条件无限增殖化干细胞的方法,包括:(a)获得扩增的干细胞群体;(b)将由促进细胞存活和增殖的原癌基因或其生物活性片段或同源物编码的蛋白质或其编码核酸分子递送进该细胞中,其中该原癌基因是可诱导的;(c)通过将抑制该细胞的细胞凋亡的蛋白质、编码抑制该细胞的细胞凋亡的蛋白质的核酸分子、或抑制该细胞中的促凋亡蛋白的核酸分子或蛋白质递送进细胞中,抑制所述干细胞的细胞凋亡;和(d)在干细胞生长因子组合的存在下并且在使该原癌基因保持活性的条件下扩增所述细胞,以生产条件无限增殖化成年干细胞。

[0019] 在上述任何实施方式中,原癌基因可选自,但不限于:MYC-ER和ICN-1-ER。在任何上述实施方式中,抑制细胞凋亡的蛋白质可选自,但不限于抑制细胞凋亡的Bcl-2家族的成员,例如Bcl-2、Bcl-X、Bcl-w、BclXL、Mcl-1、Dad-1或hTERT。当原癌基因为MYC-ER或ICN-1-ER时,使原癌基因保持活性的条件可包括他莫昔芬或其激动剂的存在。在一个方面,用下列物质转染或递送(作为蛋白质)所述细胞:MYC-ER和Bcl-2;MYC-ER和hTERT;ICN-1-ER和Bcl-2;ICN-1-ER和hTERT;或MYC-ER和ICN-1-ER。

[0020] 在上述任何实施方式中,扩增步骤可在介质中进行,所述介质包括但不限于:(1)白介素-6(IL-6)、IL-3和干细胞因子(SCF);(2)包含干细胞因子(SCF)、血小板生成素(TPO)、胰岛素样生长因子2(IGF-2)和成纤维细胞生长因子1(FGF-1)的无血清培养基。

[0021] 在任何上述实施方式中,成年干细胞包括但不限于:造血干细胞、肠干细胞、成骨细胞干细胞、间充质干细胞、神经干细胞、上皮干细胞、心肌细胞祖干细胞、皮肤干细胞、骨骼肌干细胞、和肝干细胞。在一个方面,间充质干细胞可选自肺间充质干细胞和骨髓基质细胞。在一个方面,上皮干细胞选自:肺上皮干细胞、乳房上皮干细胞、血管上皮干细胞和肠上皮干细胞。在一个方面,皮肤干细胞选自:表皮干细胞和囊泡干细胞(毛囊干细胞)。在一个方面,神经细胞选自神经元多巴胺能干细胞和运动神经元干细胞。在一个方面,干细胞来自新鲜的或冷藏的脐带血。在一个方面,干细胞是从正常人或粒细胞集落刺激因子(G-CSF)治疗患者的外周血中获得的造血祖细胞。

[0022] 在上述任何实施方式中,该方法可进一步包括遗传修饰干细胞以矫正细胞中的遗传缺陷,遗传修饰干细胞以沉默化基因表达,和/或遗传修饰干细胞以过量表达基因。

[0023] 在上述任何实施方式中,该方法可进一步包括保存细胞。在一个方面,该方法进一步包括从保存物中回收细胞并培养细胞。

[0024] 本发明的另一实施方式涉及通过上述或本文别处描述的任何方法生产的细胞。

[0025] 本发明的另一实施方式涉及一种给个体提供成年干细胞或其分化细胞的方法,包

括：(a) 提供一种通过上述或本文别处描述的任何方法生产的条件无限增殖化成年干细胞的来源；(b) 去除使 (a) 的干细胞条件无限增殖化的条件，和 (c) 将所述干细胞或其分化细胞施用于个体。在一个方案中，预先从 (c) 的个体中获得细胞。在一个方案中，从先前冷冻的所述细胞的贮存液中获得细胞。在一个方面，从个体中新鲜地获得细胞，并用上述或本文别处描述的任何方法进行条件无限增殖化。在一个方面，所述个体患有癌症。在另一方面，该个体患有白血病。在另一方面，该个体患有免疫缺陷病。在另一方面，该个体患有贫血障碍。在另一方面，该个体正经历整形外科手术。在另一方面，该个体正经历选择性整容外科手术。在另一方面，该个体正经历移植外科手术。在一个方面，该个体需要干细胞或其分化细胞，选自：造血干细胞、肠干细胞、成骨细胞干细胞、间充质干细胞、神经干细胞、上皮干细胞、心肌细胞祖干细胞、皮肤干细胞、骨骼肌干细胞、和肝干细胞。在另一方面，该个体需要提高的免疫细胞功能。在另一方面，该个体具有一种可被干细胞矫正的遗传缺陷。

[0026] 本发明的另一实施方式涉及一种鉴定调节谱系定向和/或细胞分化和发育的化合物的方法，包括：(a) 接触通过上述或本文别处描述的任何方法生产的成年干细胞；和 (b) 检测 (a) 的干细胞中至少一种基因型或表型特征，与没有化合物时相比，其中在化合物存在下检测到特征的差异显示该化合物影响干细胞的特性。

[0027] 本发明的另一实施方式涉及一种研究谱系定向和/或细胞分化和发育的方法，包括评价通过上述或本文别处描述的任何方法生产的成年干细胞或其分化细胞，以检测该细胞的至少一种基因型或表型特征。

[0028] 本发明的另一实施方式涉及通过上述或本文别处描述的任何方法生产的细胞在治疗其中干细胞移植是有益的疾病或病症的药物中的用途。

[0029] 本发明的另一实施方式涉及一种急性髓细胞白血病 (AML) 的小鼠模型，包括用一种方法产生的小鼠，所述方法包括：(a) 致死性照射小鼠；(b) 将通过上述或本文别处描述的任何方法生产的条件无限增殖化长期干细胞和来自 Rag^{-/-} 小鼠的完整骨髓细胞转移入该小鼠中；和 (c) 定期注射他莫昔芬或其激动剂到小鼠中直到小鼠发展出 AML 的临床体征。在一个方案中，该细胞用 MYC-ER 和 Bcl-2 转染或被递送了这些物质 (作为蛋白质)。

[0030] 本发明的另一实施方式涉及从上述 AML 小鼠模型中获得的肿瘤细胞。

[0031] 本发明的另一实施方式涉及 AML 小鼠模型在人蛋白质特异性候选药物的临床前试验中、在鉴定、发展和/或测试用于诊断、研究或治疗 AML 的化合物中、或在鉴定、发展和/或测试用于诊断、研究或治疗 AML 的靶标中的用途。

附图说明

[0032] 图1是显示转导细胞的骨髓移植和在体内用40HT活化MYC功能后的死亡曲线的图。

[0033] 图2是显示在体外转导后，源于年轻和老年小鼠的HSC的散射特征和GFP表达水平的散布图。点图代表与IL-3、IL-6和SCF培养3天后HSC的前向 (FSC) 和侧向 (SSC) 散射特征的流式细胞分析数据。这两个标准与细胞大小 (FSC) 和粒度 (SSC) 相关。

[0034] 图3是显示源于受照射受体的细胞系的表型比较的散布图，该受体用BCL-2、MYC-ER和EGFP-转导的来自年老 (>60% ID⁻ 所有组成成分) 和年轻3-83μδ转基因小鼠的造血干细胞重建。显示了在开始培养3 (年轻) 和3 (衰老) 个月后代代表性克隆的表型。

[0035] 图4是显示在撤除他莫昔芬后，衰老LT-HSC系 (ABM46) 在体外自发分化的散布图

(干细胞和B谱系标记物表达通过流式细胞术分析)。

[0036] 图5是显示在过继转移入受照射的年轻受体6周后,对源于Lt-HSC系的造血细胞区室的分析的散布图。该图中显示了来自三只小鼠的数据,一只小鼠接受了衰老HSC系ABM42,两只小鼠接受了衰老HSC系ABM46。

[0037] 图6是显示在用ABM42和ABM46细胞系重建的小鼠中B-细胞区室的发育受到影响的散布图。该图中显示了来自三只小鼠的数据,一只小鼠接受了衰老HSC系ABM42,两只小鼠接受了衰老HSC系ABM46。

[0038] 图7是显示在用ABM42和ABM46细胞系重建的小鼠中T-细胞发育的散布图。该图中显示了来自三只小鼠的数据,一只小鼠接受了衰老HSC系ABM42,两只小鼠接受了衰老HSC系ABM46。

[0039] 图8是显示细胞系的表型比较的散布图和图,所述细胞系源于从用BCL-2和MYC-ER逆转录病毒转导并且在体外连续培养中保持超过90天的年轻C57/BL6小鼠中获得的HSC。各图显示了对于病毒表达标记物(GFP和Thy1.1)以及四种确定小鼠中长期HSC所需的标记物Sca-1、c-kit、CD34和Flk-2的表达的流式细胞分析结果。四种细胞系包含保持lt-HSC表型(Sca-1+、c-kit+、CD34-、flk-2-)的亚群。

[0040] 图9是显示源自从年轻C57/BL6小鼠中获得的HSC的细胞系的表型比较的散布图和图,所述小鼠被不同癌基因组合逆转录病毒转导并且保持体外连续培养超过90天(pMIG-MYC和pMIT-Bcl-2(上图)、pMIG-MYC.ER和pMIG-hTERT(中图)和pMIG-ICN.1.ER和pMIT-Bcl-2(下图))。

[0041] 图10是显示源自从年轻C57/BL6小鼠中获得的HSC的细胞系的表型比较的散布图和图,所述小鼠被不同癌基因组合逆转录病毒转导并且保持体外连续培养超过90天(pMIG-ICN.1.ER和pMIT-Bcl-2(上图)、pMIG-ICN.1和pMIT-Bcl-2(第二行的图)、或pMIG-ICN.1和pMIG-Bcl-2(第三行的图)、或pMIG-hTERT和pMIT-Bcl-2(下图))。

[0042] 图11是显示源自从年轻C57/BL6小鼠中获得的HSC的细胞系的表型比较的散布图和图,所述小鼠被不同癌基因组合逆转录病毒转导并且保持体外连续培养超过90天(pMIG-MYC和pMIG-ICN.1(上图)、pMIG-MYC.ER和pMIG-ICN.1(中图)、或pMIG-ICN.1.ER和pMIG-MYC(下图))。

[0043] 图12是显示源自从年轻C57/BL6小鼠中获得的HSC的细胞系的T细胞和B细胞区室的体内重建的散布图,所述小鼠被不同癌基因组合逆转录病毒转导并且保持体外连续培养超过90天。

[0044] 图13是显示重组酶的识别底物序列(RSS)的应用的示意图,用于确保在移植前从本发明的条件无限增殖化长期干细胞中切除重组DNA。

[0045] 图14是显示检测自本发明条件无限增殖化长期干细胞分化的NK和红细胞谱系细胞的图。

[0046] 发明详述

[0047] 本发明提供了一种解决方案,该方案解决了能够产生、保持和操作源于长期干细胞(特别是长期造血干细胞(Lt-HSCs))的稳定细胞系的问题,所述细胞在置于适当条件下时可产生正常由这些细胞产生的所有细胞谱系。本发明一般的涉及产生条件无限增殖化长期干细胞的方法,和用所述方法产生的干细胞,和利用所述干细胞的方法。更特别地,利用

长期造血干细胞作为一种示例性干细胞群体,发明人已经建立了一种产生条件无限增殖化(例如,可逆地无限增殖化或在当除去所述条件时为可逆的特定条件下无限增殖化)干细胞的有效的方法,所述干细胞能够在体外和体内分化为正常细胞谱系,并且能够重建需要所述细胞的患者。实际上,本发明可消除对骨髓供体的需要,因为本发明提供了在操作(例如,化疗、放疗,等等)之前从患者中收获干细胞、扩增所述细胞和将它们返回患者的能力。而且,所述干细胞可如需要或期望的那样广泛扩增、保存(例如,冷冻),然后恢复和再次扩增、操作、和/或重复利用。例如,可操作所述干细胞以矫正遗传缺陷或给患者提供益处(治疗性或预防性益处),或分化为一种期望的细胞类型。最后,所述细胞可用于多种实验中,用于鉴定与细胞发育、增殖和存活的调节有关的新靶标,和鉴定和开发用于改善或治疗将受益于细胞发育、增殖和/存活的调节的疾病和病症的药物。

[0048] 发明人已经发展了允许长期干细胞条件(在此例如长期造血干细胞(1t-HSC))无限增殖化的新技术。得到的细胞系可在体外无限地指数扩增(繁殖)和/或冷冻保存(储存),并且具有拯救受到致死性照射的小鼠和重建所述动物中的所有血细胞谱系的能力。而且,发明人已经能够在体外通过抑制转化性癌基因的功能而产生分化的血细胞。在此描述的所述细胞和产生它们的方法将允许产生不携带重组DNA的可移植的人干细胞,因此不会给受体带来长期风险。本发明的这些条件无限增殖化1t-HSC可被稳定化在它们的成熟表型,和建立其中在癌基因再激活后保持成熟表型的细胞系。例如,发明人已经能够发展 $CD4^+ \alpha\beta^+$ T细胞,以及树突细胞系。

[0049] 本技术在应用于临床条件时相对于骨髓移植具有下述优点:

[0050] 1. 需要非常少的1t-HSC建立克隆;

[0051] 2. 克隆代表了一种可更新的资源,所述资源可被无限地储存,并且可快速获得;

[0052] 3. 这种治疗的成本应该比传统的骨髓移植更低;

[0053] 4. 使用1t-HSC克隆可以缓解移植抗宿主疾病的威胁,和相关的费用;

[0054] 5. 至少在一些情况中,本技术可以缓解对骨髓供体的需要。

[0055] 另外,本发明提供了条件转化的长期干细胞例如1t-HSC细胞在产生代表分化的谱系(例如,分化的造血谱系,包括造血谱系发育的中间阶段)的细胞中的应用。例如,除了无数的治疗和预防应用以外,这些细胞系将允许鉴定可诱导恶性细胞分化、阻止其生长、或诱导细胞凋亡的新的化合物。这些细胞还将允许筛选新的引导干细胞沿特定途径分化的细胞因子和生长因子。所述细胞系并不存在,并且对于药物发现是重要的。

[0056] 更具体地,为了克服在本领域中关于来源于成人的干细胞(虽然如下所述,本发明并不限于来源于成人的干细胞)长期群体的提供和利用的限制,本发明已经发展了产生代表早期造血干细胞祖细胞的条件转化细胞系的新方法。在此处描述和例示的本技术的一个具体的非限制性例子中,该策略包括来自5-氟尿嘧啶(5-FU)处理的3-83 $\mu\delta$ 小鼠的骨髓干细胞的转染(例如,通过逆转录病毒转导)。本发明人使用具有编码Bcl-2和绿色荧光蛋白(GFP)(作为报告基因)和MYC-ER和GFP(也作为报告基因)的插入物的pMSCV双顺反子(bisstronic)逆转录病毒载体。选择MYC是因为它在淋巴细胞中具有代替细胞因子产生的存活和增殖信号的能力。通过限制目标细胞,发明人假设将形成干细胞肿瘤。重要的是,在此情况中MYC-ER功能依赖于他莫昔芬,通过从动物或培养物中去除他莫昔芬允许MYC功能终止和转化。在用MYC-ER转导的细胞中,产生融合蛋白,但是融合蛋白保持在细胞质中直到

暴露于他莫昔芬。选择Bcl-2是因为它具有抑制细胞凋亡的能力,所述细胞凋亡通常由于暴露于MYC信号而发生,并且更特别地,当通过从细胞中去除他莫昔芬而使MYC“失活”或移除时发生。这种基因类型新组合(如下面更详细讨论的那样,本发明不限于这些特定的基因)是成功产生本发明的条件无限增殖化干细胞的部分原因,并且如下文所述,可容易地扩展到其他类似的基因组合上。

[0057] 上述转导的干细胞的受体产生肿瘤(在40HT的存在下),收获来自骨髓、脾和淋巴结的肿瘤细胞并置于具有他莫昔芬和一种干细胞生长因子混合物的培养物中。发明人已经发现,在没有适当的干细胞生长因子组合时,本方法生产的干细胞将停止生长并且在很短的时间内死亡。因此,在用上述基因组合转染细胞后使用干细胞生长因子“混合物”(即,适当的或适合的干细胞生长因子的组合)是本发明方法的第二个重要方面。这种混合物具有促进并保持干细胞生长的一般特性,不限于特定的生长因子的组合,选择所述因子的参数在下面进行更详细的讨论。

[0058] 本发明方法产生的干细胞可在培养物中扩增,并且同质地是(例如)scal阳性的,是内皮糖蛋白和ckit阳性的,和CD34、Flt3、B220、CD19和mIgM阴性的,这指示了1t-HSC的表型,这是本领域公知的。这些细胞可被冷冻(冷藏保存,或储存),然后在冷冻后容易地复苏和培养。重要的是,这些复苏的细胞在表型上是同质的,并且显示1t-HSC的表型(例如,均质的GFP亮细胞是Scal、内皮糖蛋白和ckit阳性的,CD34、Flt3、B220、CD19和mIgM阴性的)。这种表型很好地对应于在小鼠中提供所有长期重建的长期再生多能性干细胞的公开的特征(Reya等人,2003,Nature 423:409-14)。

[0059] 发明人已经进一步发展了本方法,以使其可以完全在体外完成(如上所述,起始步骤部分在体内进行)。发明人也证实了具有与上述类似特征的其他基因组合也导致1t-HSC的条件无限增殖化。而且,细胞系可通过移去他莫昔芬并提供适当的生长因子在体外分化为造血谱系,在他莫昔芬被阻止的受体动物中体内分化为所有造血谱系。另外,细胞可分化为发育的中间水平,该中间水平具有稳定的表型并保持在应用或移去适当的信号(在此描述的)后沿着它们的定向途径进一步分化的能力。所述细胞对于多种治疗应用是无价的。所有这些实验在下文和实施例中详细描述。

[0060] 本发明的方法和细胞系不仅提供了一种详细研究与成年干细胞向不同细胞谱系定向相关的分子、生化和细胞事件、以及研究干细胞向不同细胞谱系的分化和发育的机会,还提供了独特的治疗和药物发现工具。

[0061] 例如,本发明的干细胞系提供了可扩增干细胞的独特来源,其可用于多种移植、治疗和预防策略,包括治疗癌症,特别是放射治疗的癌症。例如,在目前对于白血病的治疗中,获得骨髓供体的限制和所述供体提供干细胞的限制严重限制了在放射治疗后重建患者的选择。本发明通过提供一种方法解决了这一问题,该方法用于产生可持续扩增和可更新的自体干细胞或组织相容性干细胞供应,所述细胞可根据需要储存或恢复。所述技术可最终免除对骨髓供体的需要。另外,多种免疫缺陷病和贫血疾病(例如,再生障碍性贫血或溶血性贫血)也将大大从本技术中受益,因为本发明提供了根据个体需要再生个体的造血细胞的能力。而且,衰老过程与造血室的几种重要改变有关,尤其包括越来越不能实现产生性的免疫应答。来源于衰老小鼠的造血干细胞已经显示具有较高水平的对于DNA修复问题的mRNA。这可能最后影响它们自我更新、进行分化、进行增殖、和响应于骨髓细胞因子存活的

能力。因此,衰老的个体也可从本发明中受益,因为可提供健康造血细胞的持续供应以矫正或缓解所述缺陷。

[0062] 本发明的技术不限于骨髓干细胞,而是可应用于实际上任何类型的干细胞,并且可延伸到来源于成人的细胞之外,扩展到胚胎干细胞。

[0063] 在一个实施例中,本发明的另一种应用涉及持续可扩增和可更新的毛囊干细胞的生产。源于该谱系的条件无限增殖化干细胞的发育可用于烧伤患者的整形手术中,用于任何经历化疗和/或放射治疗导致头发生长不可逆损失的患者,还可用于经历了影响颅骨的任何外科手术后的患者。而且,所述细胞可用于选择性方法中,所述方法包括诱导被遗传性秃发症影响的个体的头发生长。类似地,本发明的干细胞应用于皮肤对于烧伤患者的伤口愈合和治疗、以及对于创伤和其他患者的整形外科手术、以及选择性外科手术(包括但不限于整容外科手术)是无价的。另外可对所述细胞进行遗传操纵以矫正年轻和衰老个体的先天或后天遗传缺陷。本领域技术人员将理解,基于本公开内容,可从本发明在多种其他干细胞群体的应用中获得益处,这些干细胞包括但不限于来源于肺、乳房和肠上皮的干细胞,和来源于神经和心脏组织的干细胞,仅以这些为例。其他干细胞类型在本文其它部分提到。

[0064] 另外,本发明给个体提供了在个体的一生中根据需要获得自体干细胞和其分化细胞的可扩增供应的独特机会。例如,已知当机体衰老时,免疫功能和免疫记忆恶化。但是,利用本发明提供的技术,将有可能利用能够分化为造血谱系所有细胞的新的自体干细胞再生个体,从而给衰老个体提供“年轻的”免疫系统。另外,如果需要(例如,在个体发展了癌症或免疫缺陷疾病或对于实际上任何类型的新生自体细胞有其他需要的事件中),用本发明方法产生的干细胞可在个体的一生中作为治疗方案的一部分储存和利用。

[0065] 本发明还提供了基因治疗的独特机会。具体地,通过以下方法现在可以矫正基因缺陷或者可以将有益的基因修饰导入体细胞中:操作利用本发明方法进行条件无限增殖化及扩增的从个体中获得的自体干细胞。然后可将所述干细胞再导入它们的来源个体中。

[0066] 通过本发明方法产生的干细胞也可用于多种药物发现实验中。因为现在可以生产实际上无限供应的易于储存、恢复、扩增和操作的同质的干细胞,所述干细胞可在试验中作为干细胞使用或分化为多种细胞谱系使用,用于测试多种化合物对细胞分化、基因表达和细胞过程的影响。所述细胞可在与化合物接触之前被操作,例如通过遗传操作。来自于具有遗传缺陷的个体的干细胞可用所述实验进行评价,以鉴定治疗性化合物(例如,癌症治疗剂)和评价基因替代疗法。实际上,本发明的技术提供了一种针对特定个体的细胞以鉴定药物候选物和治疗候选物和“适合”个体细胞的策略的机会。所述实验的一个例子在下面有更详细的描述。

[0067] 关于在本发明之前对于谱系定向和细胞分化和发育的研究和发现,无法获得和不能产生足够数量的期望的细胞群体来进行期望的实验严重阻碍了所述研究。例如,为了鉴定或筛选在特定祖细胞系分化中的中间产物,必须获得足够数量的细胞来提供有意义的和可重复的结果。祖细胞系也应保持在已经定向的谱系中进一步分化的能力,因此产生了这些目前还不存在的新工具,也没有关于产生这些细胞所需要的技术的其他描述。利用本发明之前可获得的技术,这是不可能的。本发明通过提供可扩增的和基本上无限供应的可用于多种实验的同质干细胞解决了这一问题。这一技术将大大提高细胞分化和发现领域的研究能力。

[0068] 如上所述,本发明的条件无限增殖化1t-HSC的方法可适用于来源于其他组织的其他干细胞。例如,如果需要,通过改变基因传递和生长因子,本发明可应用于如下所述的多种不同的干细胞。所述细胞也可在体外扩增,并在癌基因灭活后继续分化,如此处对于造血干细胞所述。这些细胞然后可用于治疗用途,包括组织修复和组织再生/工程化。相应地,可通过在此描述的或本领域技术人员根据本公开内容认为适合的任何方法(包括多种病毒介导的方法),将MYC-ER和Bcl-2基因的组合或在此描述的任何其他组合转染入细胞中,所述细胞包括但不限于:间充质干细胞(包括但不限于肺间充质细胞,骨髓基质细胞),神经干细胞(包括但不限于神经元多巴胺能干细胞和运动神经元干细胞),上皮干细胞(包括但不限于肺上皮干细胞、乳房上皮干细胞、和肠上皮干细胞),心肌细胞祖干细胞,皮肤干细胞(包括但不限于表皮干细胞和囊干细胞),骨骼肌干细胞,内皮干细胞(例如,肺内皮干细胞),和肝干细胞,以产生可在体外扩增并且在癌基因灭活后继续分化的条件无限增殖化细胞系。除了所述细胞系的治疗潜力以外,这些细胞系可进一步在体外(或离体)修饰,以矫正先天的遗传缺陷,以及用于研究早期谱系定向和分化的分子基础。这些细胞可能是潜在相关的治疗目标的新资源,这些细胞系也可用于筛选防止或诱导分化的小分子,和鉴定用于多种治疗(包括但不限于,癌症治疗和免疫缺陷治疗)的新的化合物和分子靶标。

[0069] 一般定义

[0070] 根据本发明,本文提到分离的核酸分子是指已经从其自然环境中分离出的核酸分子(即,已经进行了人工操作),其自然环境是在其中天然发现该核酸分子的基因组或染色体。因此,“分离的”并不必然反映核酸分子被纯化的程度,而是表示该分子不包括在其中天然发现该核酸分子的全基因组或全染色体。分离的核酸分子可包括基因。包括基因的分离的核酸分子不是包括所述基因的染色体的片段,而是包括与该基因相关的编码区和调节区,但没有在相同染色体上天然发现的其他基因。分离的核酸分子还可包括特定的核酸分子序列,该序列的侧面(即,在该序列的5'和/或3'端)为在天然状态下通常不在该特定核酸序列侧面的其他核酸(即,异源序列)。分离的核酸分子可包括DNA、RNA(例如mRNA)、或DNA或RNA的衍生物(例如,cDNA、siRNA、shRNA)。尽管“核酸分子”主要指物理的核酸分子,“核酸序列”主要指核酸分子上的核苷酸序列,但是这两个词可互换使用,特别是对于能够编码蛋白质或蛋白质结构域的核酸分子或核酸序列来说。

[0071] 优选地,本发明的分离的核酸分子利用重组DNA技术(例如,聚合酶链反应(PCR)扩增、克隆)或化学合成法来生产。分离的核酸分子包括天然核酸分子和其同源物,包括但不限于天然等位变体和修饰的核酸分子,其中已插入、缺失、置换和/或倒置核苷酸,以使所述修饰提供期望的效果(例如,如在此描述的,提供可诱导的原癌基因)。

[0072] 核酸分子同源物可利用多种本领域技术人员已知的方法生产(见例如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Labs Press(1989))。例如,可利用多种技术修饰核酸分子,包括但不限于经典的诱变技术和重组DNA技术,例如定点诱变,用于诱导突变的核酸分子的化学处理,核酸片段的限制性酶切,核酸片段的连接,核酸序列的所选区域的PCR扩增和/或诱变,寡核苷酸混合物的合成和混合组的连接以“建立”核酸分子及其组合的混合物。可通过对由核酸编码的蛋白质的功能进行筛选和/或通过野生型基因杂交,从修饰的核酸混合物中选择核酸分子同源物。

[0073] 本发明的核酸分子或多核苷酸的最小的大小是足以编码用于本发明的蛋白质的

大小,该蛋白质例如是由原癌基因编码的蛋白质或其功能片段(即,具有全长蛋白质的生物学活性并足以用于本发明的方法的部分),或抗细胞凋亡蛋白质或其功能片段(即,具有全长蛋白质的生物学活性并足以用于本发明的方法的部分)。其他的可用于本发明的核酸分子可包括具有足以形成探针或寡核苷酸引物的最小大小的核酸分子,所述探针或引物能够与编码天然蛋白质的核酸分子的互补序列形成稳定的杂合体(即,在中度、高度或极高严格条件下),其长度一般至少为5个核苷酸,优选范围是5到大约50或大约500个核苷酸或更长,包括在全部数字增量之间的任何长度(例如,5、6、7、8、9、10、...33、34、...256、257、...500)。除了实用性的限制之外,对于本发明的核酸分子的最大大小没有限制,核酸分子可包括足以用于本发明在此描述的任何实施方式的序列。

[0074] 如此处所用的,严格杂交条件指标准杂交条件,在这种条件下,核酸分子用于鉴定类似的核酸分子。所述标准条件在(例如)Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Labs Press,1989中公开。Sambrook等人(如上)全文引入本文作为参考(特别见,第9.31-9.62页)。另外,例如Meinkoth等人,1984,Anal.Biochem.138,267-284公开了为获得允许不同核苷酸错配程度的杂交而计算适当的杂交和清洗条件的公式;Meinkoth等人(如上)全文引入本文作为参考。

[0075] 更特别地,此处所指的中度严格杂交和清洗条件指允许分离与用于杂交反应的探针的核酸分子具有至少大约70%核酸序列同一性的核酸分子的条件(即,允许大约30%或更少的核苷酸错配的条件)。此处所指的高度严格杂交和清洗条件指允许分离与用于杂交反应的探针的核酸分子具有至少大约80%核酸序列同一性的核酸分子的条件(即,允许大约20%或更少的核苷酸错配的条件)。此处所述的极高度严格杂交和清洗条件指允许分离与用于杂交反应的探针的核酸分子具有至少大约90%核酸序列同一性的核酸分子的条件(即,允许大约10%或更少的核苷酸错配的条件)。如上所述,本领域技术人员可利用Meinkoth等人(如上)中的公式计算获得特定核苷酸错配水平所需的适当杂交和清洗条件。所述条件将根据是形成DNA:RNA杂合体还是形成DNA:DNA杂合体而改变。计算的DNA:DNA杂合体的解链温度比DNA:RNA杂合体低10°C。在特定的实施方式中,用于DNA:DNA杂合体的严格杂交条件包括在6X SSC (0.9M Na⁺)的离子强度下、在大约20°C到大约35°C之间(较低的严格度)杂交、更优选在大约28°C到大约40°C之间(更严格)、更优选在大约35°C到大约45°C之间(甚至更严格)的温度下杂交,并使用适当的清洗条件。在特别的实施方式中,DNA:RNA杂合体的严格杂交条件包括在6X SSC (0.9M Na⁺)的离子强度下、在大约30°C到45°C之间(较低的严格度)、更优选在大约38°C到大约50°C之间(更严格)、更优选在大约45°C到大约55°C之间(甚至更严格)的温度下杂交,并使用类似的严格清洗条件。这些数值是基于对具有大于大约100个核苷酸、0%甲酰胺和大约40%的G+C含量的分子的解链温度的计算。或者,T_m可如Sambrook等人(同上)第9.31到9.62页所述根据经验计算。通常清洗条件应该尽可能严格,并且应该适合于选择的杂交条件。例如,杂交条件可包括盐和温度条件的组合,该温度大约比计算的特定杂合体的T_m低大约20-25°C,清洗条件一般包括盐和温度条件的组合,该温度大约比计算的特定杂合体的T_m低大约12-20°C。适用于DNA:DNA杂合体的杂交条件的一个例子包括在6X SSC (50%甲酰胺)中在大约42°C下杂交2-24小时,然后是包括在室温下在大约2X SSC中一次或多次清洗的清洗步骤,紧接着在更高的温度和更低的离子强度下再进行清洗(例如,在大约37°C下在大约0.1X-0.5X SSC中至少清洗一次,紧接着在大

约68°C下在大约0.1X-0.5X SSC中至少清洗一次)。

[0076] 在本发明的一个实施方式中,可生产任何此处描述的氨基酸序列,包括所述序列的截短形式(片段或部分)和同源物,其在给定氨基酸序列的C-和/或N-末端每侧具有从至少一个到大约20个附加的异源氨基酸。得到的蛋白质或多肽可被称为“基本由给定的氨基酸序列组成”。根据本发明,如果利用给定氨基酸序列的来源生物体的标准密码子将天然存在的序列中的所述核苷酸进行翻译,异源氨基酸是在给定氨基酸序列侧翼未天然发现的(即,在体内未天然发现)序列,或者在存在于该基因中时,是不被位于编码给定氨基酸序列的天然存在的核酸序列侧翼的核苷酸所编码的序列。类似地,“基本由.....组成”,当在此用于核酸序列时,是指编码给定氨基酸序列的核酸序列,在编码给定氨基酸序列的核酸序列的5'和/或3'末端的侧翼可以有至少一个到大约60个另外的异源核苷酸。如在天然基因中存在,异源核苷酸在编码给定氨基酸序列的核酸序列侧翼未被天然发现(即,在体内未天然发现)。

[0077] 根据本发明,重组载体(通常称为重组核酸分子,特别是当它包含根据本发明的目标核酸序列时)是一种工程化的(即,人工生产的)核酸分子,其被用作操作选择的核酸序列和将所述核酸序列导入宿主细胞的工具。重组载体因此适用于对选择的核酸序列的克隆、测序和/或其他操作,例如通过表达选择的核酸序列和/或将其递送入宿主细胞中。所述载体典型地包含异源核酸序列,即,天然地或通常发现不与待克隆或递送的核酸序列相邻的核酸序列,虽然载体也可包含调节性核酸序列(例如,启动子、非翻译区),该调节性核酸序列被天然发现与本发明的核酸分子相邻,或可用于表达本发明的核酸分子(下面更详细地讨论)。载体可以是RNA或DNA,原核的或真核的,典型地是质粒或病毒载体。载体可作为染色体外元件(例如,质粒)保持或可被整合入宿主细胞的染色体中。完整的载体可保持在宿主细胞内适当位置,或在某种条件下,质粒DNA可被除去,留下本发明的核酸分子。在其他条件下,将载体设计为在选择的时间从宿主细胞的基因组上切除(移去)(下面更详细地讨论)。整合的核酸分子可在染色体启动子的控制下,在天然或质粒启动子的控制下,或在几种启动子组合的控制下。核酸分子的单个或多个拷贝可被整合入染色体中。本发明的重组载体可包含至少一个选择性标记。

[0078] 根据本发明,“有效连接”指以一种方式将核酸分子与表达控制序列(例如,转录控制序列和/或翻译控制序列)连接,使该分子在转染(例如,转化、转导、转染、缀合或导致)入宿主细胞中时可以表达。转录控制序列是控制转录的启动、延伸或终止的序列。特别重要的转录控制序列是控制转录启动的序列,例如启动子、增强子、操纵子和阻遏子序列。适合的转录控制序列包括可在该重组核酸分子待导入的宿主细胞或生物体内起作用的任何转录控制序列。

[0079] 根据本发明,术语“转染”是指将外源核酸分子(即,重组核酸分子)插入细胞内的任何方法。术语“转导”是一种特定类型的转染,其中遗传物质从一种来源转移到另一种来源,例如通过病毒(例如,逆转录病毒)或转导噬菌体。当该术语用于指核酸分子导入微生物细胞例如细菌和酵母中时,术语“转化”可与“转染”互换使用。在微生物系统中,术语“转化”用于描述由于微生物获得外源核酸而导致的遗传改变,并且与“转染”基本上同义。但是,在动物细胞中,转化有第二种含义,可指细胞在(例如)成为癌性之后在培养中的生长性质改变。因此,为避免混淆,“转染”在此优选用于外源核酸向动物细胞中的导入。因此,术语“转

染”在此一般包括动物细胞的转染或转导,和微生物细胞的转化或转导,这些术语涉及外源核酸向细胞内的导入。转染技术包括但不限于转化、转导、粒子轰击、扩散、主动转运、超声浴、电穿孔术、显微注射法、脂质转染法、吸附、感染和原生质融合。

[0080] 如此处所用,本发明中提到的分离蛋白质或多肽包括全长蛋白质、融合蛋白、嵌合蛋白或所述蛋白质的任何片段(截短形式、部分)或同源物。更特别地,根据本发明的分离的蛋白是从其天然环境中分离出(即,已经进行了人工操作)的蛋白质(包括多肽或肽),可包括但不限于纯化的蛋白质、部分纯化的蛋白质、重组产生的蛋白质、膜结合蛋白质、和与其他蛋白质相关的分离的蛋白质。因此,“分离的”不反映蛋白质被纯化的程度。优选地,本发明的分离蛋白是重组生产的。另外,作为特定蛋白质(Bcl-2)的例子,“人Bcl-2蛋白”或“源于”人Bcl-2蛋白的蛋白质是指来自人(Homo sapiens)的Bcl-2蛋白质(包括天然存在的Bcl-2蛋白质的同源物或部分)或指根据天然存在的人Bcl-2蛋白质的结构(例如,序列)和(也许)功能的知识以其他方式生产的Bcl-2蛋白。换句话说,人Bcl-2蛋白包括具有与天然存在的人Bcl-2蛋白基本类似的结构和功能或为此处描述的天然存在的人Bcl-2蛋白的生物活性(即,具有生物活性)同源物的任何Bcl-2蛋白。因此,人Bcl-2蛋白可包括纯化的、部分纯化的、重组的、突变的/修饰的和合成的蛋白质。根据本发明,术语“修饰”和“突变”可互换使用,特别是对于此处描述的蛋白质的氨基酸序列(或核酸序列)的修饰/突变。

[0081] 如此处所用的术语“同源物”是指由于对天然存在的蛋白质或肽的修饰(包括小修饰)而与天然存在的蛋白质或肽(即,“原型”或“野生型”蛋白质)不同,但保持了天然存在形式的基本蛋白质和侧链结构的蛋白质或肽。所述改变包括但不限于:一个或几个(即,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)氨基酸侧链的改变;一个或几个氨基酸的改变,包括缺失(例如,蛋白质或截短形式的蛋白质或肽)、插入和/或置换;一个或几个原子的立体化学的改变;和/或小的衍生化,包括但不限于:甲基化、糖基化、磷酸化、乙酰化、肉豆蔻酰化、异戊烯化、棕榈酰化、酰胺化和/或添加糖基磷脂酰肌醇。同源物可具有与天然存在的蛋白质或肽相比提高的、降低的或基本类似的性质。同源物可包括蛋白质的激动剂或蛋白质的拮抗剂。

[0082] 同源物可以是天然等位变异或天然突变的结果。编码蛋白质的核酸的天然存在的等位变体是基本上存在于与编码所述蛋白质的基因相同的基因组位点处的基因,但由于例如突变或重组引起的天然变异,具有类似的但不相同的序列。等位变体典型地编码与所对比的基因编码的蛋白质具有类似活性的蛋白质。一组等位变体可编码相同的蛋白质,但由于遗传密码的简并性而具有不同的核酸序列。等位变体也可包含在基因的5'或3'非翻译区(例如,在调节控制区)的改变。等位变体对于本领域技术人员是公知的。

[0083] 同源物可利用本领域已知的生产蛋白质的技术生产,包括但不限于对分离的天然存在的蛋白质的直接修饰、直接的蛋白质合成、或对编码蛋白质的核酸序列的修饰,例如,利用经典的或重组DNA技术实现随机或靶向诱变。

[0084] 在一个实施方式种,给定蛋白质的同源物包含一种氨基酸序列、基本由该序列组成、或由该序列组成,所述氨基酸序列与参考蛋白质的氨基酸序列至少大约45%、或至少大约50%、或至少大约55%、或至少大约60%、或至少大约65%、或至少大约70%、或至少大约75%、或至少大约80%、或至少大约85%、或至少大约90%、或至少大约95%相同、或至少大约95%相同、或至少大约96%相同、或至少大约97%相同、或至少大约98%相同、或至少大约99%相同(或在45%到99%之间的全部整数增量的任何百分同一性)。在一个实施方式

中,同源物包含一种氨基酸序列、基本上由该氨基酸序列组成、或由该氨基酸序列组成,所述氨基酸序列与参考蛋白质的天然存在的氨基酸序列少于100%相同,小于大约99%相同,小于大约98%相同,小于大约97%相同,小于大约96%相同,小于大约95%相同,等等,以1%的增量,直到小于大约70%相同。

[0085] 如此处所用,除非另外说明,百分(%)同一性是指对同源性的评价,其通过下述方法进行:(1)具有标准缺省参数的BLAST 2.0 Basic BLAST同源性检索,其使用blastp进行氨基酸检索,使用blastn进行核酸检索,其中默认对低复杂性区域过滤查询序列(描述于Altschul,S.F.,Madden,T.L.,Schaaffer,A.A.,Zhang,J.,Zhang,Z.,Miller,W.&Lipman,DJ.(1997)“Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs.”Nucleic Acids Res.25:3389-3402,全文在此引入作为参考);(2)BLAST 2比对(使用下述的参数);(3)和/或具有标准缺省参数的PSI-BLAST(位点特异性迭代BLAST)。应该注意到,由于在BLAST 2.0 BASIC BLAST和BLAST 2之间的标准参数有一些区别,两种特定序列可能利用BLAST 2程序确定为具有显著同源性,而在BLAST 2.0 BASIC BLAST中使用一种序列作为查询序列进行检索可能不能鉴定出极其匹配的第二序列。另外,PSI-BLAST提供了一种自动的、易于使用的“分布图”检索模式,其是一种寻找序列同源物的灵敏方法。该程序首先进行缺口BLAST数据库检索。PSI-BLAST程序使用来自任何显著比对的信息,所述信息被返回以构建一种位点特异性评分矩阵,其替代用于下一轮数据库检索的查询序列。因此,可以理解百分同一性可以利用这些程序中的任何一种来确定。

[0086] 两种特定序列可利用如Tatusova和Madden,(1999)，“Blast 2 sequences-a new tool for comparing protein and nucleotide sequences”,FEMS Microbiol Lett.174:247-250所述的BLAST 2程序进行相互比对,该文献在此全文引入作为参考。BLAST 2序列比对以blastp或blastn进行,利用BLAST 2.0算法在两个序列之间进行缺口BLAST检索(BLAST 2.0),允许在获得的比对中引入缺口(gaps)(缺失和插入)。在此为了清楚起见,利用下述的标准缺省参数进行BLAST 2序列比对:

[0087] 对于blastn,使用0 BLOSUM62矩阵:

[0088] 匹配赠分=1

[0089] 错配罚分=-2

[0090] 开放缺口(5)和延伸缺口(2)罚分

[0091] 缺口x_下降(50)期望(10)字长(11)过滤(开)

[0092] 对于blastp,使用0 BLOSUM62矩阵:

[0093] 开放缺口(11)和延伸缺口(1)罚分

[0094] 缺口x_下降(50)期望(10)字长(3)过滤(开)

[0095] 根据本发明,分离的蛋白质,包括其生物活性同源物或片段,具有野生型或天然蛋白质的至少一种生物活性特征。一般地,蛋白质的生物活性或生物作用指归因于蛋白质的天然存在形式的蛋白质抽表现出的或执行的任何功能,其在体内(即,在蛋白质的天然生理环境中)或在体外(即,在实验室条件下)测量或观察。导致蛋白质表达降低或蛋白质活性降低的修饰、活动或相互作用可被称为蛋白质的失活(完全或部分)、下调、作用降低、或作用或活性降低。类似地,导致蛋白质表达升高或蛋白活性升高的修饰、活动或相互作用可被称为蛋白质的扩增、过量生产、活化、增强、上调或作用增强。

[0096] 本发明的条件无限增殖化方法

[0097] 本发明的一个实施方式涉及生产条件无限增殖化成年干细胞、优选长期干细胞的方法。该方法一般包括下述步骤：(a) 获得扩增的成年干细胞群体；(b) 用包含促进细胞存活和增殖的原癌基因的载体转染(转导)干细胞，其中原癌基因是可调节的(可诱导、可控制)；(c) 用编码抑制细胞凋亡的蛋白质的载体转染干细胞；和(d) 在干细胞生长因子组合的存在下并在使原癌基因为活性的条件下扩增转染的细胞。在一个实施方式中，载体是一种整合载体。通过这种方法生产的细胞可被培养、扩增、储存、恢复、用于治疗方法中、用于研究和发现方法中、遗传操作、通过消除使原癌基因保持活性的条件来诱导分化，和/或用于此处所述的或基于该公开内容对于本领域技术人员显而易见的任何其他方法。步骤(b)和(c)可以任何顺序执行。

[0098] 根据本发明，“条件无限增殖化”是指以一种可逆的方式无限增殖化的细胞(例如，能够以依赖于细胞因子的方式无限生长而不分化，同时保持在适当条件下分化为大量不同谱系的能力和潜能)，所述细胞在一组特定的条件下被无限增殖化，当条件被消除或改变(或增加其他条件)时，细胞不再无限增殖并且可分化为其他细胞型。“条件无限增殖化”可与“可逆无限增殖化”可互换使用。例如，关于本发明的方法，当将干细胞置于允许原癌基因活化的条件下时(例如，在MYC-ER的例子中的他莫昔芬或其激动剂)，促进细胞存活和增殖的可调节原癌基因的存在使细胞保持无限增殖化的表型。换句话说，细胞在培养物中无限地生长和扩增，并且在这些特定条件下保持未分化的状态。当这些条件被消除(例如，在MYC-ER的例子中除去他莫昔芬)时，干细胞不再无限增殖并且可根据适当的环境(例如，适当的生长因子组合)分化为多种细胞谱系。

[0099] 如此处所用的“干细胞”是指本领域一般理解的术语。例如，干细胞，不管它们的来源如何，是能够长时间自我分裂和更新的细胞，是非特化的(非分化的)，并且可产生(分化为)特定的细胞类型(即，它们是多种不同特定细胞类型的祖细胞或前体细胞)。“长期”，当与干细胞联用时，是指干细胞在长时间内(例如，数月，例如至少3个月，到几年)根据干细胞的特定类型通过分裂为相同的非特定细胞类型而自我更新的能力。如此处所述，源于不同动物种类的多种长期干细胞例如长期造血干细胞(lt-HSC)的表型特征是本领域已知的。例如，鼠lt-HSC可根据下列细胞表面标志物表型的存在而被鉴定： $c-kit^+$ 、 $Sca-1^+$ 、 $CD34^-$ 、 $f1k2^-$ (见实施例)。成年干细胞包括可获自任何非胚胎组织或来源的干细胞，并且典型地产生它们所处的组织的细胞类型。术语“成年干细胞”可与术语“体干细胞”互换使用。胚胎干细胞是从任何胚胎组织或来源获得的干细胞。

[0100] 在本发明的一个实施方式中，用于本发明的干细胞可包括获自任何来源的任何成年干细胞。在本发明的另一实施方式中，干细胞可包括胚胎干细胞。本发明中有用的干细胞包括但不限于：造血干细胞，间充质干细胞(包括但不限于，肺间充质干细胞，骨髓基质细胞)，神经干细胞，上皮干细胞(包括但不限于肺上皮干细胞、乳房上皮干细胞、血管上皮干细胞、和肠上皮干细胞)，肠干细胞，心肌细胞祖干细胞，皮肤干细胞(包括但不限于表皮干细胞和囊泡干细胞(毛囊干细胞))，骨骼肌干细胞，成骨细胞前体干细胞，和肝干细胞。

[0101] 造血干细胞产生所有类型的血细胞，包括但不限于红细胞(红血球)、B淋巴细胞、T淋巴细胞、自然杀伤细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、和血小板。

[0102] 间充质干细胞(包括骨髓基质细胞)产生多种细胞类型,包括但不限于骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肺细胞,和其他种类的结缔组织细胞,例如腱中的结缔组织细胞。

[0103] 脑中的神经干细胞产生三种主要的细胞类型:神经细胞(神经元)和两类肺神经元细胞:星形胶质细胞和少突胶质细胞。

[0104] 不同组织的内层(lining)的上皮干细胞产生形成组织上皮的几种细胞类型。

[0105] 皮肤干细胞存在于表皮的底层和毛囊的底部。表皮干细胞产生角质化细胞,其迁移到皮肤表面形成保护层,囊泡干细胞可产生毛囊和表皮。本领域技术人员也熟知其他来源的成年干细胞。

[0106] 胚胎干细胞可产生身体的所有组织和细胞。

[0107] 获得所述干细胞和提供起始培养条件例如液体培养基或半固体培养基的方法是本领域已知的。开始时通过将干细胞来源与一种在组织源或培养物中扩增或富集所述细胞的适当试剂接触,在体内或在体外扩增细胞。例如,在造血干细胞的例子中,供体个体可用富集造血干细胞和促进所述细胞增殖而不分化的试剂例如5-氟尿嘧啶处理。其他适合于扩增期望的干细胞类型的试剂是本领域公知的。可选地,并且优选地,成年干细胞从组织来源中分离,然后在体外通过暴露于适当试剂而扩增或富集。例如,对于造血干细胞,生产成年造血祖细胞的扩增培养物的方法在Van Parijs等人,(1999;Immunity,11,763-70)中描述。通过获得动物的细胞样品的任何适当方法从个体中获得细胞,包括但不限于体液(例如,血液)的骨髓收集、收集脐带血、组织穿刺和组织解剖,特别包括但不限于皮肤、肠、角膜、脊髓、脑组织、头皮、胃、乳房、肺(例如,包括灌洗和支气管检查)、骨髓、羊水、胎盘和卵黄囊的细针抽吸物的任何活组织检查。

[0108] 在一个实施方式中,用于本发明的细胞也可获自新鲜的或冷冻保藏(储存)的脐带血、可源于胚胎干细胞(ES)体外定向分化的造血祖细胞群、从正常或粒细胞集落刺激因子(G-CSF)治疗的患者的外周血获得的造血干细胞(HSC),所述患者已被诱导将其1t-HSCs动员到外周循环中。

[0109] 一旦获得扩增的干细胞群体(可以获得、提供或产生),即用以下物质连续(以任何顺序)或同时转染细胞:(1)包含促进细胞存活和增殖的原癌基因的载体,其中原癌基因是可调节的(可诱导,可控制),和(2)编码抑制细胞的细胞凋亡的蛋白质的载体。优选地,所述载体是整合性载体,此处定义为具有整合入细胞基因组的能力的任何载体(例如,逆转录病毒载体)。在下面对多种载体和转染方法进行更详细的描述。所述原癌基因是可调节的(可诱导或可控制),因此可以根据需要活化和灭活该原癌基因(即,开启或关闭),以使干细胞保持无限增殖状态或使其分化为期望的细胞类型。可以选择或设计原癌基因,以用任何适当的方法进行调节,包括响应于任何条件,例如化合物或试剂、温度或任何其他适当条件的存在或不存在。作为例子,此处描述的原癌基因MYC-ER(雌激素受体(ER)-调节的MYC)和ICN-1-ER(Notch-1的ER-调节的细胞内部分)在他莫昔芬存在下都是可诱导的。应该注意到所述基因也可被工程化以响应于其他二聚化药物,例如FK1012、改变形式的雷帕霉素,或可从包含四环素响应元件的载体中表达。后一种情况调节蛋白质的表达,不调节细胞中存在的多肽的功能。这一平台技术的其他类似修饰对于本领域技术人员是显而易见的。

[0110] 在本发明的方法中有用的原癌基因是促进细胞存活和增殖的任何原癌基因。优选的用于本发明的方法的原癌基因包括但不限于MYC、ICN-1、hTERT(人端粒酶的逆转录酶成

分)、MYC、S-MYC、L-MYC、Akt (十四烷基化的)。另外,其他适用的基因和本发明的方法或修饰基因以获得期望的结果的方法包括但不限于使用下游信号效应物例如丙酮酸脱氢酶激酶1 (PDK-1);雷帕霉素的哺乳动物靶标 (mTOR);shRNA引起的磷酸酶和张力蛋白同源物 (PTEN)的丧失;Bcl-3、细胞周期蛋白D1、细胞周期蛋白D3、Bcl-10、Bcl-6、BCR-ABL (与ABL融合的断裂点簇集区)及其各种突变形式、stat5和stat3的组成型活性形式、AML1-ETO (急性髓细胞白血病1和矮小相关转录因子1的融合物)、MLL-ENL (混合谱系白血病和十一十九白血病 (eleven nineteen leukemia))、Hox基因、活化形式的白介素-3 (IL-3) 受体 β 链、和其他细胞因子受体链 (表皮生长因子受体 (EGFR)、c-kit、血小板来源的生长因子受体 (PDGFR)等),以及wnt (所有哺乳动物形式)、 β -联蛋白、sbh蛋白 (shh-1和所有哺乳动物形式)、bmi-1和c-jun (所有哺乳动物形式)。并且,本发明包括shRNA诱导 (或抑制) 细胞周期蛋白激酶抑制剂的丧失,包括但不限于pi 6、pi 9、p21和p27。在一个实施方式中,本发明包括任何或所述原癌基因 (例如,MYC-ER或ICN-1-ER) 或其他基因的可调节同源物的应用。实施例描述了使用MYC-ER或ICN-1-ER利用本发明的方法成功地生产条件无限增殖化1t-HSC。

[0111] 编码人MYC的核酸序列在此处表示为SEQ ID NO:1,其编码此处表示为SEQ ID NO:2的氨基酸序列。编码hTERT的核酸序列在此处表示为SEQ ID NO:3,其编码此处表示为SEQ ID NO:4的氨基酸序列。编码人ICN-1的核酸序列在此处表示为SEQ ID NO:11,其编码此处表示为SEQ ID NO:12的氨基酸序列。ICN-1是Notch-1的一部分,具体地,是Notch-1的氨基酸1757-2555 (见Aster等人, *Mol Cell Biol.* 2000 Oct;20 (20):7505-15,在此全文引入作为参考)。MYC-ER的核苷酸和氨基酸序列是本领域已知的,并且MYC-ER蛋白在Soloman等人, *Oncogene.* 1995Nov 2;11 (9):1893-7中描述,在此全文引入作为参考。ICN-1-ER是本发明人创造的,编码此蛋白质的核酸序列在此处表示为SEQ ID NO:13,其编码SEQ ID NO:14表示的氨基酸序列。

[0112] 类似地,一种优选的抗细胞凋亡基因是Bcl-2,尽管本发明也包括其他编码抑制细胞凋亡并且特别在原癌基因在干细胞中失活时维持细胞存活的蛋白质的基因。编码Bcl-2 α 的核酸序列在此处表示为SEQ ID NO:5,其编码SEQ ID NO:6的氨基酸序列。Bcl-2 β 在此处表示为SEQ ID NO:7,其编码SEQ ID NO:8的氨基酸序列。“抗细胞凋亡”基因在此处被定义为编码甚至在能够诱导细胞凋亡的条件的存在下仍能够抑制 (减少、阻止、降低) 细胞中与细胞凋亡相关的过程或促进 (提高、增强、刺激、允许) 细胞存活的蛋白质的任何基因。与细胞凋亡相关的蛋白质,和编码所述蛋白质的基因,是本领域公知的。所述其他基因包括但不限于可能在成年干细胞的条件下起重要作用的Bcl-2家族中的任何基因。这些基因包括但不限于Bcl-2家族的其他促存活成员,例如,Bcl-X、Bcl-w、BclXL、Mcl-1、Dad-1、或hTERT (人端粒酶的逆转录酶成分,已经显示其抑制增殖)。所述基因在被调节的癌基因存在下异常过量表达,如本文的实施例中描述的Bcl-2那样。另外,本发明的这一方面包括对促凋亡bcl-2家族的BH3-only成员 (例如,Bim、PUMA、NOXA、Bax、Bak、BclXS、Bad、Bar等) 进行shRNA介导的基因下调 (knockdown) (或利用任何其他方法的破坏或抑制),以及破坏胱天蛋白酶3,9,10、MLL-1 (和所有哺乳动物形式)、Enl-1 (无胚乳-1 (Endospermless-1)) 和所有哺乳动物形式、Apaf-1和其他形成凋亡体一部分的成分。

[0113] 上述每个基因的核酸序列或其编码区是本领域已知的并且是公众可获得的,包括人基因。类似地,由这些基因编码的蛋白质的氨基酸序列是本领域已知并且公众可获得的。

[0114] 本发明人已经利用本发明的方法并利用原癌基因和抗细胞凋亡基因的不同组合制备了几种不同的长期条件无限增殖化干细胞,包括下述组合:MYC-ER和Bcl-2;MYC-ER和hTERT(人端粒酶的逆转录酶成分);ICN-1-ER和Bcl-2;ICN-1-ER和hTERT;和MYC-ER和ICN-1-ER。

[0115] 应注意对于用于本方法的原癌基因或编码抗细胞凋亡蛋白的基因,不需要在此处描述的构建体中使用整个基因,因为本发明包括该基因的任何部分或编码期望的功能蛋白质产物、其功能部分或其功能同源物的核酸序列(例如,cDNA)。相应地,此处提到的用于转染干细胞的基因或转基因被理解为示例性的,并且包括任何编码完整基因的核酸分子、基因的全部编码区、或基因的部分或其同源物的应用,只要所述核酸序列编码适于本发明应用的功能性蛋白质即可。

[0116] 在本发明的一个实施方式中,本方法另外包括针对编码促凋亡蛋白的RNA的shRNA或siRNA的应用,所述促凋亡蛋白例如为Bcl-2家族的促细胞凋亡成员,即BH3-only类型的成员(Bim、Bax、Bak、Puma、Noxa,等等)。预期在被调节的癌基因的背景中破坏促细胞凋亡基因将导致某些干细胞群的更有效的无限增殖化。RNA干扰(RNAi)是双链RNA和(在哺乳动物系统中)短干扰RNA(siRNA)或短发夹RNA(shRNA)用于抑制互补基因的表达或使其沉默化的过程。在目标细胞中,siRNA是未缠绕的并且与RNA诱导的沉默复合物(RISC)结合,RISC随后被引导到与siRNA互补的mRNA序列上,由此RISC剪切mRNA。shRNA在载体中被转染入目标细胞中,在那里它被转录,然后被DICER酶加工形成siRNA样分子,该分子活化RISC,然后RISC与siRNA一起被引导到与shRNA互补的mRNA序列上,由此RISC剪切mRNA。

[0117] 可用任何适当的转染细胞特别是哺乳动物细胞的方法,包括利用多种技术的组合,用包含原癌基因和编码抗细胞凋亡蛋白的载体转染干细胞。本发明人已经发现在产生此处所述的长期条件无限增殖化干细胞的表达基因(或构建体)之间有特别的协同作用。实施例已经证实了逆转录载体的应用,其他方法包括但不限于使用慢病毒载体、细小病毒、痘苗病毒、冠状病毒、嵌杯样病毒、乳头瘤病毒、黄病毒、正粘病毒、披膜病毒、小RNA病毒、腺病毒载体、修饰的和减毒的疱疹病毒。任何所述病毒可进一步用特定的表面表达的分子修饰,所述分子将它们靶向于HSC或其他干细胞,例如膜结合的SCF,或其他干细胞特异性生长因子配体。转染哺乳动物细胞的其他方法包括但不限于对哺乳动物表达载体进行直接电穿孔,例如利用NUCLEOFECTOR™技术(AMAXA Biosystems)。这种技术是用于大多数初级细胞和难转染的细胞系的高效非病毒基因转移方法,其是对于长期已知的电穿孔方法的改进,基于利用电流和溶液的细胞类型特定组合将聚阴离子大分子直接转移到细胞核中。另外,适当的转染方法可包括本领域已知的任何细菌、酵母或其他人工基因递送方法。

[0118] 在适当的生长因子的存在下扩增转染的干细胞或培养干细胞和外源融合蛋白(例如,在以下所述该方法的变化形式中描述的Tat-融合蛋白)的步骤可包括使用任何适当的培养条件,包括在此特别描述的条件。适当的干细胞生长因子的组合可包括任何允许本发明的转染(例如,转导)细胞在培养中生长、存活和增殖的干细胞因子。虽然在此描述了特定的组合,并且虽然这是本方法的一个重要步骤,但这一组合可以简单地描述为提供适合干细胞生长、增殖和存活的生长因子的任何组合,并且包括本领域已知的任何组合。因此,本发明不限于特定的组合。一种优选的生长因子组合包括:白介素-6(IL-6)、IL-3和干细胞因子(SCF)。另外一种优选的生长因子组合包括在无血清培养基中的干细胞因子(SCF)、血小

板生成素(TPO)、胰岛素样生长因子2(IGF-2)和成纤维细胞生长因子1(FGF-1)。这后一种组合最近由Zhang和Lodich(2005; Murine hematopoietic stem cells change their surface phenotype during ex vivo expansion, Blood 105, 4314-20)描述。预期用编码此处所述的组合蛋白质(例如,如实施例中描述的MYC-ER和Bcl-2)的核酸分子转染的干细胞在生长因子混合物中也被条件无限增殖化,如同在上述例子中描述的混合物(使用IL-3、IL-6和SCF)一样。其他用于本发明的生长因子包括但不限于血管生成素样蛋白(例如, Angptl2、Angptl3、Angptl5、Angptl7等)、增殖蛋白-2(PLF2)、糖原合酶激酶-3抑制剂、wnt和Notch信号途径诱导剂、Flt3L和相关细胞因子、成纤维细胞生长因子2(FGF2)和相关细胞因子、wnt-1和wnt途径的其他活化剂、sbh蛋白(shh-1)和该途径的其他活化剂。其他合适的生长因子组合适用本发明的方法,并且对于本领域技术人员来说是显而易见的。实际上,利用本发明方法产生的细胞系可容易地用于筛选能够用于在体外在中性或定向条件下扩增长期干细胞或其衍生的任何祖细胞的其他细胞因子和生长因子。

[0119] 根据本发明,适合培养动物细胞的培养基可包括为培养动物细胞、特别是哺乳动物细胞而开发的任何可获得的培养基,或可用动物细胞生长必需的适当成分例如可同化的碳、氮和微量营养素在实验室中制备的培养基。所述培养基包括基础培养基,其是适于动物细胞生长的任何基础培养基,包括但不限于Iscove改良的Dulbecco培养基(IMDM)、Dulbecco改良的Eagles培养基(DMEM)、 α MEM(Gibco)、RPMI 1640、或任何其他适合的商业上可获得的培养基。基础培养基中加入了可同化的碳源、氮源和微量营养素源,包括但不限于,血清源、生长因子、氨基酸、抗生素、维生素、还原剂和/或糖源。应注意包含基础培养基和动物细胞生长需要的许多附加成分的完全培养基是商业上可获得的,并且一些培养基可用于特定类型的细胞培养。另外,许多无血清培养基是可获得的,并且可能特别适于根据本发明的干细胞的培养。

[0120] 细胞和组合物

[0121] 本发明的另一实施方式涉及根据此处所述的本发明的方法生产的细胞、细胞系或细胞群体。本发明还包括包含所述细胞、细胞系或细胞群体的组合物。用于治疗方法时,所述组合物可包含药学上可接受的载体,包括药学上可接受的赋形剂和/或递送载体,用于将细胞、细胞系或细胞群体递送给患者。如此处所用的药学上可接受的载体是指适于将在本发明的方法中有用的治疗组合物递送到适当的体内部位的任何物质。

[0122] 为生产中间发育阶段的细胞谱系而对本发明方法的修改

[0123] 本发明的另一实施方式涉及修改此处所述的新方法以生产捕获造血谱系的中间发育阶段的细胞系。根据本发明,发育或分化的“中间”阶段指细胞发育或分化的多能阶段,其位于产生“中间”细胞的干细胞发育或分化阶段的下游,但位于细胞分化的终点或端点的上游。例如,前B细胞是造血干细胞的中间阶段,其仍然可分化为成熟B细胞。本领域技术人员可理解发育或分化的中间阶段。

[0124] 更特别地,对于许多治疗和发现或研究应用,以及细胞系的保存,期望细胞系具有一种稳定的表型并且当转染细胞的癌基因被关闭时保持沿着其定向途径进一步分化的能力。相应地,本发明包括生产没有完全分化(没有最终分化)、而是处于分化中间阶段的细胞的附加步骤。在该实施方式的一种非限制性例子中,在去除保持原癌基因或其他促进细胞存活和增殖的基因的活性的条件(例如,在他莫昔芬依赖性原癌基因的例子中的4-OHT)后,

或通过应用关闭(失活)原癌基因/癌基因的适当条件,利用上述方法生产的长期干细胞在体外随机分化。这一步骤可在使培养物保持在中性细胞因子生长条件(例如,IL-3、IL-6和SCF)下的同时进行,或者通过将能够特异性引导向某种谱系分化的细胞因子(例如,对于淋巴谱系的IL-7和Notch配体,对于树突细胞的GM-CSF和IL-4,对于骨髓单核细胞的G-CSF,等等)替换为对于分化为中性的细胞因子(不引导或驱动细胞的分化)而进行。一旦培养物开始显示与特定谱系一致的分化标记物,再次给培养基施加活化原癌基因的条件(例如,4-OHT)或使培养基暴露于以其他方式再活化原癌基因的条件,以稳定表型和产生具有稳定的中间分化表型的细胞系。

[0125] 以本方法为例,本发明人通过从培养基中除去4-OHT并在分化后再添加4OHT,已经在体外由ABM42细胞(通过本发明的方法生产的1t-HSC,见实施例)产生了CD4⁺, $\alpha\beta$ T细胞。本发明人还通过在GM-CSF、IL-4和FLT3L中培养ABM46细胞(见实施例)、然后在分化后将培养物放回存在4-OHT的条件下而产生了树突细胞系。

[0126] 另一种生产所述细胞系的方法包括将ct1t-HSC细胞导入小鼠中,以允许在注射4-OHT之后在体内分化,并且阻滞或稳定表型。该方法在实施例8中详细描述。简言之,例如,将通过本方法产生的1t-HSC注射到无免疫应答的动物(例如,无免疫应答的小鼠)中。利用注射活化剂(例如,4-OHT)再活化1t-HSC中的癌基因,然后收集细胞,然后在体外培养细胞以使该细胞分化,然后根据需要保存或使用。这种方法,和如上所述的其他方法,可用于鼠和人ct1t-HSC细胞系,例如利用NOD/SCID小鼠作为受体,或新生Rag-1^{-/-}小鼠,将对其进行肝内注射。

[0127] 本发明的方法对胚胎干细胞的应用

[0128] 本发明的另一实施方式涉及将条件无限增殖化干细胞的方法应用于胚胎干细胞(ES)。所述方法可用于产生更容易源自ES细胞的细胞系,例如神经元谱系细胞,包括神经元干细胞。

[0129] 在本实施方式中,本发明的方法,包括用原癌基因和抑制细胞凋亡的基因(例如,MYC-ER和Bcl-2)转导细胞(在此例中,ES细胞),可应用于ES细胞以进一步控制这些细胞的定向分化。在此实施方式中,所述细胞可用于产生转基因小鼠,例如,并且另外,任何ES细胞和其衍生的相关祖细胞群体可通过暴露于活化剂而进行原癌基因的活化,因此可以产生新的条件转化的干细胞系(不同组织类型)或对于感兴趣的组织类型的成熟细胞系。另外,转导的ES细胞在体外的定向分化也可用于如上所述捕获分化的中间状态。以此方式使用ES细胞或来源于ES的细胞提供了一种在不同疾病背景下用于药物发现和目标鉴定的新平台。

[0130] 例如,神经元干细胞可应用于本发明的该实施方式中,以及利用本发明的方法使ES细胞定向分化为神经元途径中。来自于海马的神经元干细胞的分离和转导已经在以前对于小鼠进行了描述。神经球(neurosphere)的培养条件使这些细胞能够增殖,导致它们对于本发明的病毒介导的基因(例如,MYC-ER和Bcl-2)转导是易感的,从而产生条件转化的神经元干细胞系。移植后它们在体外和在体内的分化可根据病毒编码的报告基因和先前确定的神经元分化的标记物进行监测。另外,在条件转化的神经干细胞移植后给小鼠施用活化剂(例如,4-OHT)可导致神经恶性肿瘤的发展(成神经细胞瘤、成胶质细胞瘤,等等)。这些肿瘤将提供一种临床前研究和靶标鉴定的新方法。

[0131] 已被例如MYC-ER和Bcl-2转导的ES细胞的定向分化可在先前确定的生长培养基以

及细胞因子的存在下进行。在培养过程中任何时间添加活化剂(例如,4-OHT)将使细胞能够稳定在一种中间表型,并且导致仍然保持进一步分化能力的细胞系的产生。例如,通常通过添加视黄酸和FGF8来实现来自ES细胞的多巴胺能神经元的产生。这种类型的神经元对于修复在阿尔茨海默氏病患者中观察到的脑损伤是理想的。但是,完全分化的神经元细胞的移植可能阻碍它们成功的移植和植入。定向于多巴胺能神经元途径、但在移植后仍保持进一步分化能力的条件转化的细胞,如本文所预计的,可大大提高植入和成功移植的机会。对于来自ES细胞的运动神经元的产生,可建议一种类似的方案,即向培养物中添加视黄酸和sbh蛋白激动剂。这些神经元细胞可帮助修复脊髓损伤。再次,完全分化的细胞将不用于本实施方式中,而是使用保持分化能力的定向祖细胞(通过本发明方法产生)。

[0132] 用于去除转基因的条件无限增殖化方法的变化或修改

[0133] 在本发明的一个实施方式中,为了避免将包含例如此处描述的转基因(例如,MYC-ER)的干细胞引入人和/或小鼠中的风险,设计重组构建体,以使这些DNA片段可被切除。这一实施方式可利用任何适当的方法实现:首先,根据本发明方法建立长期干细胞,然后将细胞(或患者)暴露于重组DNA将被去除、切除或完全沉默化的条件下。

[0134] 例如,在本发明的一个方案中,使用一种细菌重组酶方法。在本发明的这一方案中,优选地使用两种不同的重组酶以允许控制两种基因中的哪一种在任何时间点被切除。所述重组酶的两个例子是Cre和Flp重组酶,它们是本领域公知的。简言之,将一种重组酶的识别底物序列(RSS's)导入逆转录病毒构建体中,使它们位于癌基因以及报告基因(例如,GFP或Thy1.1)的开放阅读框的侧面。在此例子中,细胞在包含Tat-Cre融合蛋白(即,与Cre融合的HIV或其他逆转录病毒Tat蛋白)的培养基中培养。这种重组蛋白以前已经被描述并且显示能够被动进入细胞,并且介导基因组DNA的依赖于loxP位点的重组。其他的基因(核酸分子)切除方法也是本领域技术人员公知的,并且能够容易地应用于本发明中。实施例5和13说明了本发明的这一实施方式。

[0135] 在本发明的另一实施方式中,为提供另一种避免将包含例如此处描述的转基因的干细胞引入人和/或其他动物(例如,小鼠)中的风险的方法,而不是用原癌基因或抗细胞凋亡蛋白的重组构建体的组合转染干细胞,利用Tat-融合蛋白进行本发明,作为一种使蛋白质进入细胞内部而不必将转基因引入细胞中的方法。例如,编码tat-原癌基因或tat-抗细胞凋亡基因(例如,Tat-MYC-ER或Tat-Bcl-2)的重组构建体可用于使干细胞条件无限增殖化。在发明的本实施方式中,目标干细胞在适当的培养条件下、在包含纯化的由选择的特定基因组合(例如,MYC-ER和Bcl-2)编码的重组Tat-融合蛋白的培养基中培养。在本发明的本实施方式中,原癌基因的产物或类似基因的产物可以为可诱导的,如上面的实施方式一样。可选地,或另外,可以只通过提供或从培养物中去除蛋白质而调节蛋白质的作用。尽管用本方法产生的细胞系将继续依赖于外源Tat-融合蛋白的添加,但是它们中将不会导入特定的外源核苷酸序列。预期不含外源癌基因序列可以改善本发明方法的临床使用。人免疫缺陷病毒-1(HIV-1)Tat是Tat蛋白的一个例子,其他逆转录病毒Tat蛋白是本领域公知的。作为一种非限制性的例子,编码HIV-1 Tat的核酸序列在此处表示为SEQ ID NO:9,其编码此处表示为SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0136] 在另一实施方式中,为提供另一种避免将包含例如此处描述的转基因的干细胞引入人和/或其他动物(例如,小鼠)中的风险的方法,而不是用原癌基因或抗细胞凋亡蛋白的

重组构建体的组合转染干细胞,通过利用适体技术将蛋白质(例如,MYC和Bcl-2)引入细胞中而实施本发明。适体是根据它们以高亲和力和特异性结合预定的特定目标分子的能力而从随机化组合核酸文库中选择的合成核酸的短链(通常是RNA,也可以是DNA)。适体具有一种确定的三维结构,并且能够区别在结构上具有极小差别的化合物。相应地,适体可与用于本发明的蛋白质或编码蛋白质的非整合性cDNA连接,例如,用于将蛋白质或DNA递送到细胞中。另外,适体可容易地用于将siRNA递送到细胞中,例如,当根据本发明破坏促凋亡蛋白时。适体技术例如在Davidson,2006,Nature Biotechnol.24(8):951-952;和McNamara等人,2006,Nature Biotechnol.24(8):1005-1015中描述。此外,预期不含外源癌基因序列可改善本发明方法的临床使用。

[0137] 在另一实施方式中,为提供另一种避免将包含例如此处所述的转基因的干细胞引入人和/或其他动物(例如,小鼠)中的风险的方法,而不是用原癌基因或抗细胞凋亡蛋白的重组构建体的组合转染干细胞,通过利用CHARIOT™技术(Krackeler Scientific,Inc.,Albany,NY)将原癌基因和/或抗细胞凋亡蛋白引入细胞内实施本发明。利用这种技术,在CHARIOT™肽和目标蛋白质之间形成了非共价键。这防止了蛋白质降解并在转染过程中保持其自然性质。在递送到细胞中后,复合体解离并且CHARIOT™被转运到细胞核中,而被递送的蛋白质具有生物活性并且自由进入它的细胞目标中。有效的递送可在存在或不存在血清的情况下发生,并且不依赖于内体途径,内体途径可在细胞内化过程中修饰大分子。该递送系统也绕开了转录-翻译过程。因此,本发明中有用的蛋白质可被递送到细胞中并且释放,以使细胞无限增殖化,而不需要将原癌基因或癌基因导入到细胞中。如上所述,预期不含外源致癌基因序列可以改善本发明方法的临床使用。

[0138] 作为通过在此描述的多种病毒途径控制原癌基因插入到宿主细胞基因组中的可能性并由此避免转化事件的另一种替代(或另外的)方法,可将药物敏感性(药物易感性)盒引入将要使用的病毒构建体中,使其将在每种被转导的细胞和其分化的子代中表达。药物敏感盒或药物易感盒是一种编码蛋白质的核酸序列,所述蛋白质使细胞对于特定药物的存在易感或敏感,以致在暴露于药物后,细胞活性被抑制并且优选地经历细胞凋亡。对于其中特定血细胞群体的水平在没有明显原因(例如,感染、创伤、应激,等等)的情况下增长的患者,可以给予一段时间的已引入对其敏感性的药物,以除去这些细胞并且缓解任何可能的附加并发症,所述并发症涉及其中遗传插入可能已经无意中引起致癌突变的细胞。相应地,作为一种非限制性例子,可以将编码HPRT的cDNA的盒引入本发明方法使用的构建体中,以使转导的细胞对于6-硫代鸟嘌呤易感。另一非限制性例子是来自单纯疱疹病毒家族成员(HSV-TK)的胸苷激酶cDNA的引入,以使转导的细胞对于相关抑制剂例如更昔洛韦、阿昔洛韦和任何相关衍生物易感。另外,任何其他这样的药物敏感性盒以及它们相关的激动剂在本文中都是有用的。

[0139] 根据本发明将核酸或蛋白质引入到细胞中的其他方法对于本领域技术人员来说是显而易见的。本发明优选那些最小化或消除了将重组DNA引入到宿主细胞基因组中的风险的方法,上面描述了许多这样的例子。

[0140] 本发明的条件无限增殖化细胞的使用方法

[0141] 本发明的另一实施方式包括通过本发明方法产生的任何干细胞群体,包括混合群体和克隆群体,以及本发明的干细胞在此处描述的任何方法中的应用,包括分化为期望的

细胞类型, 和任何移植、细胞替换、疾病治疗、遗传工程、药物发现、和此处描述的细胞发育和分化研究的方法。

[0142] 由于现在可以生产实际上无限供应的易于保存、恢复、扩增和操作的均质干细胞, 所述干细胞可用作干细胞或分化为不同细胞谱系并在试验中用于检测不同化合物对细胞分化、基因表达和/细胞过程的影响。因此, 本方法的一个实施方式涉及一种鉴定影响细胞分化、基因表达和/细胞过程的化合物的方法。该方法一般包括以下步骤: 使通过本发明的方法生产的干细胞与测试化合物接触, 并测定特定结果, 特别是期望的结果, 例如基因表达、生物学活性、细胞分化、细胞生长、细胞增殖等等(见下文), 与不存在该化合物的结果进行比较, 以确定该测试化合物对于干细胞是否具有期望的效果。该方法可用于测试细胞分化、细胞活性或基因表达的实际上任何方面。在一个方面, 干细胞在与化合物接触之前被操作, 例如, 进行遗传操作。例如, 为了鉴定治疗化合物(例如, 癌症治疗剂) 和评价基因取代治疗, 可利用所述试验评价来自具有遗传缺陷的个体的干细胞。实际上, 本发明的技术提供了针对特定个体的细胞以鉴定药物候选物和治疗候选物和“适合”个体细胞的策略的机会。而且, 如上所述, 所述试验还可用于鉴定适于在培养物中保持本发明的干细胞的其他生长因子或培养条件。所述试验的一个例子在实施例7中进行了详细的描述, 尽管本发明不限于该试验。

[0143] 本发明的另一实施方式涉及一种研究细胞谱系定向和/或来自干细胞的细胞分化和发育的方法, 其一般包括培养本发明的条件无限增殖化干细胞, 和在不同条件下和在存在及不存在可影响细胞谱系定向或分化的化合物或试剂的情况下评价所述细胞的与细胞发育和分化有关的遗传和生物标记物。如上所述, 在本发明之前, 由于无法获得以及不能产生足够数量的期望的细胞群体来进行期望的试验, 严重阻碍了这样的研究。例如, 为了鉴定或筛选特定组细胞系分化的中间体, 必须获得足够数量的细胞才能提供有意义的和可再现的结果。利用本发明之前可获得的技术, 这是不可能的。但是, 本发明通过提供可扩增的和基本上无限供应的可用于多种试验的均质干细胞解决了这一问题。这一技术将大大提高在细胞分化和发现领域的研究能力。在一个方案中, 使本发明的条件无限增殖化干细胞扩增, 然后将其一部分在不存在使细胞保持条件无限增殖化状态的条件(例如, 根据此处所述的示例性的方法, 不存在他莫昔芬) 的情况下培养。可评价细胞在基因表达、细胞表面标记物、生物分子分泌或任何其他基因型或表型标记物方面的改变, 以研究细胞分化和谱系定向的过程。可向培养物中加入生长因子或其他因子, 例如, 以驱使沿着特定细胞谱系途径分化, 并且可以在存在或不存在这些因子的情况下评价细胞的变化。此外, 可以利用细胞评价影响(调节) 细胞分化和发育的培养条件、体内条件、因子和试剂。

[0144] 在本发明任何试验中检测细胞基因型或表型特征改变的多种方法是本领域已知的。可用于测定或检测基因序列或表达的方法的例子包括但不限于: 多聚酶链反应(PCR)、逆转录酶-PCR(RT-PCR)、原位PCR、定量PCR(q-PCR)、原位杂交、Southern印迹法、Northern印记法、序列分析、微阵列分析、报告基因的检测、或其他DNA/RNA杂交平台。测定蛋白质水平的方法包括但不限于: Western印迹法、免疫印迹法、酶联免疫吸附试验(ELISA)、放射免疫试验(RIA)、免疫沉淀法、表面等离子体共振、化学发光、荧光偏振、磷光、免疫组织化学分析、基质辅助激光解吸/电离飞行时间(MALDI-TOF) 质谱法、微细胞分析法、微阵列、显微镜检查、荧光激活细胞分选(FACS)、流式细胞术、和基于蛋白质性质的试验, 包括但不限于DNA

结合、配体结合、与其他蛋白质配偶体相互作用、细胞信号传导、酶活性、和可溶性因子或蛋白质的分泌。

[0145] 在药物筛选试验中,术语“测试化合物”,“假定的抑制化合物”或“假定的调节化合物”是指在特定过程中具有未知的或先前未意识到的调节活性的化合物。同样,鉴定化合物的方法中的术语“鉴定”意为包括所有的化合物,其用于特定目的(例如,调节细胞分化)的化合物的可用性通过本发明的方法确定,优选在存在和不存在所述化合物的情况下确定。利用本发明的方法筛选的化合物包括已知的有机化合物,例如抗体、肽文库的产物、和化学组合文库的产物。化合物也可利用合理的药物设计来鉴定。所述方法对于本领域技术人员来说是已知的,并且可包括使用三维成像软件程序。例如,可用于设计或选择在本发明中有用的模拟物或其他治疗化合物的多种药物设计方法在Maulik等人,1997,Molecular Biotechnology:Therapeutic Applications and Strategies,Wiley-Liss,Inc.中公开,其全文在此引入作为参考。

[0146] 在任何上述的试验中,本发明的细胞、细胞裂解物、核酸分子或蛋白质暴露于或接触假定的调节化合物(例如通过混合)的条件,是任何适当的培养或测定条件,其可包括使用有效的培养基,在该培养基中可以培养细胞(例如,如上所述)或者可以在存在及不存在假定的调节化合物的情况下评价细胞裂解物。本发明的细胞可在多种容器中培养,包括但不限于,组织培养瓶、试管、微量滴定皿和培养皿。培养在适合细胞的温度、pH和二氧化碳含量下进行。所述培养条件也在本领域技术人员的能力范围内,特别适合培养本发明的无限增殖化干细胞的条件在本文别处进行了详细描述。细胞与假定调节化合物在一定条件下接触,所述条件考虑每个接触容器中的细胞数目、对细胞应用的假定调节化合物的浓度、假定调节化合物与细胞的孵育时间、和给细胞应用的化合物的浓度。有效方案的确定可以由本领域技术人员根据例如容器大小、容器中液体的体积、已知适于培养在试验中使用的特定细胞类型的条件、和所测试的假定调节化合物的化学组成(即,大小、电荷,等等)等变量来实现。

[0147] 在本发明的一个实施方式中,本发明的细胞和方法对于旨在评价来源于人脐带血的ct1t-HSC、CD34+细胞、或分离自外周血的成年CD34+细胞的多能性的方法是有用的。所述方法在实施例11中描述。

[0148] 本发明的另一种实施方式涉及ct1t-HSC细胞系作为产生急性髓细胞白血病(AML)的新模型的平台的应用。更特别地,本发明人已经利用本发明的ct1t-HSC产生了一种急性髓细胞白血病的小鼠模型。这是由类似于HSC的细胞(基于它们的表面标记物表达)组成的白血病。为产生促进小鼠中的白血病的ct1t-HSC,将 10^3 - 10^5 个ct1t-HSC与 10^5 个Rag-1^{-/-}全骨髓细胞一起转移入受到致死性照射的受体小鼠中。小鼠每周给予4-OHT以保持癌基因活性,并且监视与白血病相关的临床指征,这是本领域已知的。从这些动物中回收肿瘤,并且可在缺乏4-OHT的培养物中增殖。这些细胞保持了它们的HSC样表型,表明它们的增殖、存活和阻滞的分化不再强烈依赖MYC的高活性。白血病细胞系在再次移植给受照射的受体小鼠后也引起疾病。这些工具为研究AML和相关疾病的生物学和探索新的治疗途径提供了新平台。而且,将ct1t-HSC细胞系引入到用4-OHT治疗的小鼠中将为治疗提供一种良好的内部阳性对照:撤除4-OHT。体内肿瘤建立之后产生的次级细胞系也可用于理解AML的药物抗性形式的相关治疗目标。

[0149] 本发明的其他实施方式涉及通过本发明方法产生的干细胞以及由这些干细胞分化的细胞在多种治疗和健康相关方法中的应用。这些方法一般包括以下步骤：获得通过本发明方法产生的条件无限增殖化干细胞的群体、培养物或细胞系，去除使所述细胞条件无限增殖化的条件，然后在一种治疗方案中使用该细胞。例如，可将该细胞直接施用于需要该细胞的个体，或者可使细胞在体外分化为期望的细胞类型，然后施用于个体。另外，在去除使细胞无限增殖化的条件之前或紧接着之后，可在体外遗传修饰细胞，以表达或沉默化一种基因或多种基因，作为在受控环境下的基因治疗新方法。细胞然后可作为干细胞施用于个体，或者首先在体外分化为期望的细胞谱系。

[0150] 为获得干细胞，在一个实施方式中，从待治疗的个体获得干细胞，然后根据本发明的方法进行条件无限增殖化。这些细胞可被广泛地扩增、保存（例如，冷冻或冷藏保存），然后根据需要恢复并再次扩增、操作和/或重复使用。在另一实施方式中，通过获取以前保存的来自待治疗个体的条件无限增殖化干细胞的来源而获得干细胞。在另一实施方式中，从以前产生的一组人干细胞系中获得干细胞，按照目前用于鉴定“匹配”供体的标准，该组人干细胞系覆盖了该群体中高百分比的部分。在一个实施方式中，细胞获自新鲜的或冷藏保存的脐带血、可由ES细胞体外定向分化产生的造血祖细胞群体、从正常患者或G-CSF治疗的患者的外周血获得的HSC，G-CSF治疗的患者已经被诱导使其1t-HSC动员到外周循环中。干细胞的其他来源对于本领域技术人员是显而易见的。根据本文前面描述的方法培养细胞，并可在适当时间去除控制无限增殖化的条件。另外，在将细胞给予个体之前，可以操作细胞以切除负责条件无限增殖化的基因或构建体（即，原癌基因和/或抗细胞凋亡编码基因），或者如果利用可溶性融合蛋白在培养基中保持细胞，如以上对于Tat-融合蛋白所述，则可从培养物中逐渐或立即去除这些融合蛋白。

[0151] 因此，本发明包括向个体（可包括任何动物）中递送通过本发明的方法产生的干细胞（包括包含所述干细胞的组合物），或由这些细胞分化的细胞。由于这些方法中使用的干细胞是在体外产生的，即使干细胞最初是从患者中分离的，整个细胞施用过程也基本上是一种离体（*ex vivo*）施用方案。离体施用是指在患者之外进行部分调节步骤，这样产生来自个体的条件无限增殖化干细胞（除基本正常的干细胞之外，可包括产生遗传修饰的干细胞），并将所述细胞或由所述细胞分化的细胞返回到患者中。可通过任何适当的施用方法，将根据本发明产生的干细胞或由这些细胞分化的细胞返回到个体中，或施用于个体。所述施用可以是全身施用、粘膜施用和/或邻近目标部位的位置施用。优选的施用途径对于本领域技术人员来说是显而易见的，取决于所预防或治疗的疾病的类型或施用原因。优选的施用方法包括但不限于静脉内施用、腹膜内施用、肌肉内施用、结节内（intranodal）施用、冠状动脉内施用、动脉内施用（例如，施用于颈动脉中）、皮下施用、经皮递送、气管内施用、皮下施用、关节内施用、心室内施用、脊柱内施用、肺部施用、导管渗透、和直接注射入组织中（例如，肝脏插管）。

[0152] 细胞可与载体或药学上可接受的赋形剂一起施用。载体典型地是提高治疗组合物在被治疗个体中的半衰期的化合物。适合的载体包括但不限于多聚控释制剂、生物可降解植入物、脂质体、油、酯和乙二醇。如此处所用的药学上可接受的赋形剂指任何适于将通过本发明的方法产生的细胞递送到适当的体内部位的物质。优选的药学上可接受赋形剂能够使细胞保持一种形式，在细胞到达体内目标组织或部位后，细胞能够以有益于个体的方式

发挥作用。

[0153] 根据本发明,有效的施用方案包括适当的剂量参数和施用模式,其导致有效数量的功能细胞递送到患者中以提供对于患者的短期或长期的益处。有效的剂量参数可利用本领域中对于特定病症或疾病的方法标准来确定。所述方法包括,例如,确定存活率、副作用(即,毒性)和疾病的发展或退化。

[0154] 根据本发明的干细胞或其分化细胞的适当单剂量是在一段适当的时期内施用一次或多次时能够给患者提供有益数量的细胞的剂量。例如,本发明的干细胞的一种优选的单剂量是每个个体每次施用大约 0.5×10^4 到大约 5.5×10^8 、或从大约 0.5×10^5 到大约 5.5×10^7 、或从大约 0.5×10^6 到大约 5.5×10^{10} 个干细胞,从大约 1×10^8 到大约 5.5×10^{10} 的剂量是更优选的。本发明包括在 0.5×10^4 到大约 5.5×10^{10} 之间以 10^2 个细胞的增量增加的任何剂量。更高或更低的剂量是本领域技术人员已知的,取决于待施用的干细胞或分化细胞的类型,还取决于施用途径。本领域技术人员知道,给动物施用的剂量取决于疾病或病症的程度和个体患者对治疗的反应。因此,在本发明的范围内适当的剂量包括治疗特定疾病所需要的任何剂量。

[0155] 如此处所用的词语“防止疾病”指减轻疾病的症状、减少疾病的发生、和/或降低疾病的严重性。保护动物(个体、受试者)是指当施用于动物时,根据本发明生产的细胞防止疾病发生和/或治疗或缓解疾病症状、体征或病因的能力。同样,防止动物的疾病包括防止疾病发生(预防性治疗)和治疗患有某种疾病或经历疾病的起始症状的动物(治疗性治疗)。术语“疾病”指相对于哺乳动物的正常健康状态的任何偏离,包括出现疾病症状的状态,以及发生偏离(例如,感染、基因突变、遗传缺陷,等等)但尚未表现出症状的情况。

[0156] 如上所述,可以给个体施用本发明的干细胞以治疗或预防多种疾病。例如,本发明的干细胞系提供了可扩增的干细胞的独特来源,可用于多种移植和治疗策略,包括癌症的治疗,特别是,放射治疗的癌症。另外,多种免疫缺陷障碍和贫血障碍(例如,再生障碍性贫血或溶血性贫血)也将该技术中大大受益,因为本发明提供了根据个体需要再生个体的造血细胞的能力。本发明的另一应用涉及持续可扩增和可更新的毛囊干细胞的产生,其用于,例如,烧伤患者的整形手术,用于任何经历化疗和/或放射治疗导致头发生长不可逆损失的患者,以及进行了任何影响颅骨的外科手术或在包括在被遗传型秃顶影响的个体中诱导头发生长的选择性处理中的患者。类似地,本发明干细胞对于皮肤的应用对于以下治疗是无价的:烧伤患者的创伤愈合和治疗,以及创伤和其他患者的整形外科手术,以及选择性外科手术,包括但不限于整容外科手术。所述细胞可另外进行遗传操作以矫正年轻和年老个体中的先天或后天遗传缺陷。本领域技术人员将理解,基于本公开内容,对多种其他干细胞群体使用本发明可以获得益处,所述细胞群体包括但不限于来源于肺、乳房和肠上皮的干细胞和来源于神经和心脏组织的干细胞,仅举这几个例子。

[0157] 另外,如上所述,本发明给个体提供了在个体一生中根据需要获得可扩增的自体干细胞和其分化细胞供应的独特机会。本方法产生的所述干细胞可以保存,并在个体一生中在需要时(例如,在个体发生癌症或免疫缺陷疾病时)作为治疗方案的一部分使用。

[0158] 通过以下方法,现在可以矫正遗传缺陷或将有益的基因修饰导入体细胞中:操作利用本发明方法条件无限增殖化并且扩增的从个体中获得的自体干细胞。然后可将干细胞再引入到它们的来源个体中。

[0159] 本发明的其他应用包括使用干细胞系修复由于COPD、IPE、气肿、哮喘和吸烟而发生的肺损伤。另外,所述细胞可用于治疗心脏中的血管损伤,并且有助于致死性照射后的自身免疫疾病(例如,SLE、糖尿病、RA)。

[0160] 在本发明的方法中,可根据本发明方法产生的细胞和包含这些细胞的组合物施用于任何动物,包括脊椎动物纲、哺乳动物纲的任何成员,包括但不限于,灵长类、啮齿类、家畜和驯养宠物。优选的待治疗的哺乳动物是人。

[0161] 本发明的不同方面在下面的实施例和附图中进行了更详细的描述。但是,本发明不限于这些实施例和对发明的举例说明。

实施例

[0162] 实施例1

[0163] 下述实施例描述了使长期造血干细胞(Lt-HSC)可逆无限增殖化的方法的发展。

[0164] 在历史上低频率的相关细胞群体使得难以对造血谱系发展受损的分子基础进行阐明,这阻止了对信号传导和下游反应的生化分析。实际上,这是所有血细胞生成研究中的一个主要的限制性因素。另外,LT-HSC的有限的可获得性也是治疗人类的许多类型癌症和几种免疫缺陷中的一个主要障碍。

[0165] 在克服该限制的努力中,本发明人发展了一种产生条件转化的细胞系的方法,所述细胞系代表早期造血干细胞祖细胞。最初的策略包括来自5FU治疗的年轻和免疫学衰老3-83小鼠的骨髓干细胞的逆转录病毒转导。本发明人使用具有编码Bcl-2和GFP及MYC-ER和GFP的插入的pMSCV双顺反子逆转录病毒载体[Van Parijs, L., Y. Refaeli, A. K. Abbas, 和 D. Baltimore. (1999) Autoimmunity as a consequence of retrovirus-mediated expression of C-FLIP in lymphocytes. *Immunity*, 11, 763-70]。选择这些基因是因为本发明人知道MYC具有取代淋巴细胞中来源于细胞因子的存活和增殖信号的能力。通过限制靶细胞,发明人设想可以形成干细胞肿瘤。重要的是,在此情况下MYC-ER功能依赖于他莫昔芬,通过从动物或培养物中除去他莫昔芬使MYC功能和转化终止。在用MYC-ER转导的细胞中,产生融合蛋白,但其保持在细胞质中直到暴露于他莫昔芬。

[0166] 更具体地,用两种逆转录病毒(编码MYC-ER和Bcl-2)转导来自5FU治疗的小鼠的干细胞群体,并将其转移入受到致死性照射(1200拉德)的受体小鼠中。十天后,开始每周腹腔内注射1mg/小鼠的在油中乳化的4-羟泰米芬(4OHT),以活化MYC功能(图1)。在四周内,年轻的(而不是年老的)转导干细胞的受体发展出肿瘤。从骨髓、脾和淋巴结中收获肿瘤,并在体外在不添加细胞因子的情况下与他莫昔芬一起培养。这些细胞生长大约10天,然后停止生长,并且细胞最终死亡,发明人怀疑细胞正在分化并且认为这可能是由于细胞生长需要细胞因子。参见图1,曲线代表了移植后死亡率的动力学和体内MYC功能的活化。小鼠均死于白血病。虽然MYC的过量表达可代替细胞因子-依赖的增殖和存活功能,但看起来并不涉及来源于细胞因子的分化信号。

[0167] 当患病时,使小鼠安乐死,收获脾和淋巴结细胞并置于具有他莫昔芬和干细胞生长因子混合物(IL-6、IL-3和干细胞因子(SCF))的培养物中。平行地,通过流式细胞术分析细胞(图2)。参见图2,点图代表了在与IL-3、IL-6和SCF培养三天之后HSC的前向(FSC)和侧向(SSC)散射特性的流式细胞分析数据。这两个标准与细胞大小(FSC)和粒度(SSC)有关。这

两个群体有类似的分布。柱状图代表了在每种细胞群体中表达的GFP水平。这反映了用编码MYC-ER和Bcl-2的cDNA的逆转录病毒进行体外逆转录病毒转导的效率。

[0168] 在所有情况中,离体GFP+细胞 $>90\%$ Sca-1⁺并且谱系标记物阴性。培养几天后,细胞开始生长并且冷冻大约400个系用于后续研究。增殖之后,这些细胞保持EGFP的表达并且一致地为SCA1阳性和CD34、Flk2和谱系标记物阴性(图3)。在来源于年轻小鼠的标记物和来源于年老小鼠的标记物之间,标记物表达的唯一差别是年轻小鼠中c-kit的表达提高。不被理论所束缚,本发明人相信这可能是由于在分析标记物之前年老细胞系在c-kit配体中的培养时间较长(3个月相对于3周)。最终,发明人发现了这些细胞系可在冷冻后容易地恢复并保持它们最初的表型。重要的是,这些细胞系在表型上是同质的并且显示出提供小鼠中所有长期重建的lt-HSC的表型(Reya, T., Duncan, A.W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D.C, Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., 和 Weissman, LL. (2003). A role for Wnt signaling in self-renewal of hematopoietic stem cells. Nature 423, 409-14)。

[0169] 最近,发明人融化了10个如上所述生产的来源于骨髓的细胞系,通过在细胞因子混合物和40HT中培养能够容易地恢复10个细胞系中的9个。发明人对这些肿瘤进行了表型确定,结果非常有希望。具体来说,基于前向和90°光散射,每个细胞系包含两种不同的细胞群体。这9个细胞系仅仅在这些群体的比例上有差异。这些群体中细胞大小较大的均是GFP发光和Scal、内皮糖蛋白和ckit阳性,但为Flt3、B220、CD19和mIgM阴性。CD34⁻也显示为阴性,尽管这需要证实(图3)。这种表型完全对应于长期再生多能性干细胞公开的特征(Reya等人,上文)。发明人在最近从白血病获得的细胞系上观察到相同的起始表型,所述白血病是从获自年轻供体小鼠的转导HSC发展而来的(图3)。

[0170] 为了测试这些细胞分化的能力,在分析表型标记物之前,使用他莫昔芬及不使用他莫昔芬并且在IL-3、IL-6和SCF的存在下培养代表性的细胞系以终止MYC-ER功能7天。如图4所示,显著比例的细胞获得B谱系标记物,包括B220(~12%)、CD 19(~10%)和mIgM(-10%)。另外,发明人已经能够通过从培养物中去除40HT在体外产生下述谱系:CD4+ab T-细胞,骨髓细胞(Mac-1+), ter-119+红系祖细胞, NK1.1表达细胞,嗜中性粒细胞(Gr-1+细胞)。进一步的试验将评价这些细胞产生其他谱系的能力,以及改变细胞因子方案对分化的影响。虽然没有进行比较,但本发明人预期,与年老动物相比,年轻动物的分化在B细胞生产中更有效。据本发明人所知,这是可在体外被诱导分化的条件无限增殖化造血干细胞的第一个例子。

[0171] 实施例2

[0172] 下面的实施例描述了向致死性照射的受体中过继转移LT-HSC细胞系的结果。

[0173] 如果实施例1所述的HSC细胞系是分析年老动物中缺陷B细胞淋巴细胞生成的基础的适当对象,它们应该在体内再现缺陷。发明人已经通过将LT-HSC细胞系过继转移入致死性照射的受体中开始解决这一问题。在开始的试验中,来自年老动物的细胞系($>60\%$ ID)与RAG2^{-/-}骨髓一起转移,并且受体不用他莫昔芬处理以使MYC-ER沉默化。六周后收获受体的骨髓和脾细胞,并且分析GFP+细胞(源于HSC系的GFP标记细胞)的恢复和表型(图5)。

[0174] 在来自图5中表示的三个小鼠的数据中,一个小鼠接受衰老HSC系ABM42,两只小鼠接受衰老HSC系ABM46。根据转移的细胞系,淋巴散射门中30到70%的细胞是GFP⁺。如图5所示,检测的两种细胞系(ABM46和ABM42)都产生B(CD19⁺)和T(TCR⁺, CD4⁺, CD8⁺)细胞、巨噬细

胞(CD11b⁺)和粒细胞(GR1⁺)。这些谱系的比例存在一定的受体间差异。但是,重要的是,两种测试细胞系产生成熟CD4和CD8单阳性T细胞(图7),但B细胞发育没有超过祖细胞阶段(图6)。虽然B220⁺,CD19⁺细胞发育,但是它们没有发展到mIg⁺阶段。这完全是根据实验结果预测的结果,所述实验包括利用来自免疫学老年小鼠的BM HSC的自重建和继承性重建(Johnson,S.A.,S.J.Rozzo和J.C.Cambier, Aging-dependent exclusion of antigen-inexperienced cells from the peripheral B cell repertoire. J Immunol, 2002.168(10):p.5014-23)。换句话说,当来自免疫学老年小鼠的完整骨髓用于移植时,可观察到相同的发育阻滞。

[0175] 本发明人已经发现,这一系统可进一步采取一个步骤,成功地由原始HSC系的过继受体的骨髓重建LT-HSC系(数据未显示)。这只需通过在干细胞细胞因子加他莫昔芬中培养骨髓细胞以再活化MYC来完成。这些细胞正在生长并显示原始的表型。

[0176] 实施例3

[0177] 下列实施例描述了一种利用完全在体外进行的方法使HSC可逆地无限增殖化的方法。

[0178] 除了此前描述的产生条件无限增殖化长期HSC细胞系的方法以外,本发明人已经能够完全在体外进行这一程序。上述方法依赖于将转导的HSC引入小鼠中,并且在体内诱导它们的转化。在体外进行这一程序的优点是本方法的每一方面都在受控的环境下进行。

[0179] 本方法首先包括用5-氟尿嘧啶(5-FU)处理供体小鼠以富集HSC并且诱导这些细胞增殖。收集来自小鼠胫骨和股骨的5FU富集的造血干细胞,然后以每孔 $1.8-2.0 \times 10^6$ 细胞的密度置于24孔组织培养板上的DMEM培养基中,该培养基包含15%的热灭活的胎牛血清和IL-3、IL-6和SCF。对细胞进行三轮旋转感染(spin infection),以用编码MYC-ER和Bcl-2的逆转录病毒载体转导细胞。简言之,用pMIG-MYC.ER或pMIT-Bcl2转染细胞。收集包含病毒的上清液,并补充4 μ g/ml的1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物(polybrene)和10mM的HEPES,并且通过0.45 μ m的滤器。两种不同的病毒上清液以1:1的比例混合并且添加到孔中。然后以2000rpm离心细胞1小时。在每次旋转感染的最后替换病毒上清液。最后一轮感染24小时之后,通过流式细胞分析确定转导水平以确定转导效率。转导的细胞然后在包含IL-3、IL-6、SCF和10nM 4OHT的DMEM培养基中孵育。培养基每3天更换一次,特别强调保证细胞因子和4OHT的新鲜供应。根据需要,细胞缓慢通过。

[0180] 利用这种体外方法,发明人已经能够产生具有下列基因组合的条件无限增殖化细胞系:MYC-ER和Bcl-2;MYC-ER和hTERT(人端粒酶的逆转录酶成分);ICN-1-ER(Notch-1的细胞内部分的ER-调节的活性成分)和Bcl-2;ICN-1-ER和hTERT;以及MYC-ER和ICN-1-ER。图8-11所示的数据显示大多数这些细胞系的起始特征。他们产生了由c-kit⁺,Sca-1⁺,CD34⁻,flk2⁻细胞组成的细胞系,这是与正常长期造血干细胞表现的表型一致的表型。图8-11所示的数据来自于对逆转录病毒编码的报告基因(GFP和thy1.1)以及干细胞的四种标记物:c-kit、sca-1、CD34和flk-2的流式细胞术分析。图8-11所示的细胞系已经在测定表型之前培养了5周。至此这些细胞已经在连续培养中扩增并分开超过35天。

[0181] 参见图8,此图显示了源于从年轻C57/BL6小鼠中获得的HSC的细胞系的表型比较,所述细胞系用BCL-2和MYC-ER逆转录病毒转导并且在体外连续培养中保持超过90天。显示的是典型克隆在90天持续培养后3(年轻的)个月时的表型。

[0182] 参见图9,此图显示了源于从年轻C57/BL6小鼠中获得的HSC的细胞系的表型比较,所述细胞系用不同的癌基因组合逆转录病毒转导并且在体外连续培养中保持超过90天。5FU富集的HSC用pMIG-MYC和pMIT-Bcl-2(上图)、pMIG-MYC.ER和pMIG-hTERT(中图)或pMIG-ICN.1.ER和pMIT-Bcl-2逆转录病毒转导。细胞保持在补充了15%的胎牛血清和IL-6、IL-3和SCF混合物的DMEM中。显示的是典型克隆在90天连续培养后3(年轻的)个月时的表型。该图显示了对于病毒表达标记物(GFP和Thy1.1)以及四种定义小鼠的长期HSC所需的标记物(Sca-1、c-kit、CD34和Flk-2)的表达的流式细胞术分析结果。这四种细胞系包含保持1t-HSC的表型的亚群(Sca-1⁺、c-kit⁺、CD34⁻、flk-2⁻)。

[0183] 参见图10,此图显示了源于从年轻C57/BL6小鼠中获得的HSC的细胞系的表型比较,所述细胞系用癌基因的不同组合逆转录病毒转导并且在体外连续培养中保持超过90天。5FU富集的HSC用pMIG-ICN.1.ER和pMIT-Bcl-2(上图)、pMIG-ICN.1和pMIT-Bcl-2(第二行的图)、或pMIG-ICN.1和pMIG-Bcl-2(第三行的图)、或pMIG-hTERT和pMIT-Bcl-2(下图)逆转录病毒转导。这些细胞保持在补充了15%的胎牛血清和IL-6、IL-3和SCF混合物的DMEM中。显示的是典型克隆在90天连续培养后3(年轻的)个月时的表型。该图显示了对于病毒表达标记物(GFP和Thy1.1)以及四种定义小鼠的长期HSC所需的标记物(Sca-1、c-kit、CD34和Flk-2)的表达的流式细胞术分析结果。这四种细胞系包含保持1t-HSC的表型的亚群(Sca-1⁺、c-kit⁺、CD34⁻、flk-2⁻)。

[0184] 参见图11,此图显示了源于从年轻C57/BL6小鼠中获得的HSC的细胞系的表型比较,所述细胞系用癌基因的不同组合逆转录病毒转导并且在体外连续培养中保持超过90天。5FU富集的HSC用pMIG-MYC和pMIG-ICN.1(上图)、pMIG-MYC.ER和pMIG-ICN.1(中图)或pMIG-ICN.1.ER和pMIG-MYC逆转录病毒转导。这些细胞保持在补充了15%的胎牛血清和IL-6、IL-3和SCF混合物的DMEM中。显示的是典型克隆在90天连续培养后3(年轻的)个月时的表型。该图显示了对于病毒表达标记物(GFP和Thy1.1)以及四种定义小鼠的长期HSC所需的标记物(Sca-1、c-kit、CD34和Flk-2)的表达的流式细胞术分析结果。这四种细胞系包含保持1t-HSC的表型的亚群(Sca-1⁺、c-kit⁺、CD34⁻、flk-2⁻)。

[0185] 这些细胞系也被用于体内重建细胞区室。参见图12,此图显示了由源于从年轻C57/BL6小鼠中获得的HSC的细胞系在体内重建T细胞和B细胞区室的结果,所述细胞系用癌基因的不同组合逆转录病毒转导并且在体外连续培养中保持超过90天。简言之,5FU富集的HSC用pMIG-ICN.1-ER和pMIG-hTERT(上图)、pMIG-MYC.ER和pMIG-hTERT(中图)或pMIG-MYC-ER和pMIT-Bcl-2(下图)逆转录病毒转导。这些细胞系保持在补充了15%的胎牛血清和IL-6、IL-3和SCF混合物的DMEM中。利用来自Rag2^{-/-}小鼠的骨髓干细胞和体外产生的LT-HSC系重建受到致死性照射的年轻C57/BL6小鼠。六周后,收获骨髓,并用一组特定谱系标记物染色。成熟CD4和B220阳性/GFP阳性细胞的发育可容易地观察到。来自四个代表性小鼠的数据显示在此图中。在每个组中,大约30%的小鼠保持GFP标记物。

[0186] 实施例4

[0187] 下面的实施例描述了用于使来源于人脐带血和骨髓的HCS在体外可逆无限增殖化的方法的延伸。

[0188] 本技术的另外一个应用是通过它们的条件无限增殖化能够在体外扩增人长期造血干细胞。发明人因此将前面实施例描述的体外方法作了一些改变用于人细胞。首先,逆转

录病毒优选地用双嗜性被膜包装,以保证人细胞的有效转导。另外,细胞源是按照发明人机构的审查委员会(Institutional Review Boards)的所有规定和制度,从脐带血库匿名获得的人脐带血。产生的细胞将表达报告基因,其最终可用于通过高速细胞分选法分离纯的群体。发明人已经注意到许多由鼠1t-HSC细胞系产生的成熟细胞丧失了表面标记物的表达,这可能是由于谱系确定和分化后逆转录病毒基因组的甲基化作用。发明人期望在人细胞中看见类似的表现,在这种情况下,可根据这些细胞中报告基因的存在,结合细胞群体的细胞表面标记物,来监测1t-HSC及其在移植受体中的分布。

[0189] 实施例5

[0190] 下面的实施例描述了一种从条件无限增殖化HSC细胞中连续切除编码MYC-ER和Bcl-2的DNA片段的方法。

[0191] 为了避免将包含编码MYC-ER和Bcl-2的转基因的HSC引入人和/或小鼠中的风险,将利用细菌重组酶方法切除这两个DNA片段。为了允许控制两个基因中的哪一个在任何时间点切除,使用两种不同的重组酶。所述重组酶的两个例子是Cre和Flp重组酶。简言之,将一种重组酶的识别底物序列(RSS)导入逆转录病毒构建体中,以使它们位于癌基因的开放阅读框的侧面,并且导入报告基因(GFP或Thy1.1)。在此例中,细胞在包含Tat-Cre融合蛋白的培养基中孵育。重组蛋白先前已被描述并且显示能够被动进入细胞,并介导基因组DNA的依赖于loxP位点的重组。

[0192] 这种方法将允许获得大量能产生许多HSC用于体外和体内分化的条件。首先,给细胞逐渐停止它们在条件转化过程中已经适应的高水平的增殖和存活信号。第二,使细胞重新适应依赖正常细胞因子行使其自身稳定功能和分化。第三,报告基因表达的连续丧失将允许确定每个被研究基因的缺失状态和程度。相应地,表达两种报告基因(GFP和Thy1.1)的细胞包含两种序列(分别为MYC和Bcl-2),表达Thy1.1而不表达GFP的细胞已经成功缺失了MYC编码序列,但仍含有Bcl-2基因,最后,不表达GFP或Thy1.1的细胞已经缺失了这两种等位基因。图13以示意表的形式显示了这种方法。

[0193] 另外,通过从表达人MYC转基因的小鼠株获得5FU富集的BM-HSC在小鼠中测试本方法,所述MYC转基因可通过去除四环素和含有被称为tTA(四环素反式作用蛋白)的细菌蛋白质而诱导。人MYC cDNA被克隆到四环素调节转录元件(TRE)的下游。TRE-MYC小鼠用5FU处理,并用于收获BM-HSC。这些细胞在体外用表达Bcl-2和tTA的逆转录病毒(pMIT-Bcl2和pMIG-tTA)转导。细胞在多西环素的连续存在下培养,以使MYC转基因保持沉默化。一旦对细胞进行流式细胞术分析,它们可移植回小鼠中,所述小鼠将不给予包含多西环素的饮食(这是通常在体内使用的四环素的一种更稳定的形式)。

[0194] 一旦产生1t-HSC细胞系,则检测在多西环素存在下体外培养它们的效果,平行地用在不含4OHT的情况下培养的包含MYC-ER的细胞系进行试验。用western印迹法和细胞内染色法全程监测MYC的蛋白质水平。

[0195] 实施例6

[0196] 下面的实施例描述了从液体组织培养基中去除4OHT后许多造血谱系的体外产生。

[0197] 传统的用于确定HSC的潜能的方法涉及使用具有确定细胞因子的半固体培养基(甲基纤维素)来增强HSC向特定谱系的分化。发明人对于确定利用本发明方法在体外产生的细胞群体的多能性感兴趣。为了检查这种组织,将此处描述的ABM42和ABM46细胞系保持

在包含IL-3、IL-6和SCF、但不含40HT的培养基中。除了发明人能够在重建小鼠中检测的谱系(即,淋巴、骨髓和粒细胞谱系)之外,也可检测表达NK1.1或ter-119的GFP+细胞(图14)。NK1.1细胞可以是NK-细胞,或NK-T细胞。Ter-119表达细胞属于红细胞谱系。这些发现显示了这些细胞系能够产生正常造血系统的所有成分并且这些细胞对于产生大量用于被动治疗的特定成分是有用的。另外,它们对于研究血细胞生成中的早期事件和鉴定用于治疗性干预遗传病症或引起正常化疗的并发症或甚至是感染疾病的新疗法具有极大的应用和重要性。

[0198] 实施例7

[0199] 下面的实施例描述了一种高通量筛选诱导或抑制条件转化的长期HSC分化的小分子或生物剂的方法。

[0200] 下面是一种筛选诱导或抑制HSC分化的小分子或生物剂的一般方法。以前,无法获得大量的干细胞这一事实阻碍了这些类型的大规模筛选。由于本发明人目前具有使长期HSC无限增殖化的能力,现在可以进行这样的技术了。

[0201] 例如,一种这样的方法是已由Schneider等人修改的骨髓分化读出(read-out)(Schneider,T.和Issekutz,A.C.(1996) Quantitation of eosinophil and neutrophil infiltration into rat lung by basic assays for eosinophil peroxidase and myeloperoxidase. Application in a Brown Norway rat model of allergic pulmonary inflammation. J Immunol Methods 198,1-14)。简言之,将条件转化的长期HSC以不同浓度的细胞数(通常为 2×10^4 - 5×10^4 细胞/孔)置于96孔平底板中。在添加40HT以使细胞保持未分化状态或不添加40HT以诱导分化的完全培养基(DMEM+15%热灭活的胎牛血清,1×青霉素/链霉素,1×L-谷氨酰胺和1×非必需氨基酸,补充了IL-3、IL-6和SCF)中进行筛选。这些条件已经显示产生Mac-1+细胞,与骨髓分化模式一致。可以添加另外的细胞因子以引导沿特定途径分化,尽管该系统也可用于筛选一组细胞因子的特定功能。在此例中,加入没有补充IL-3、IL-6和SCF、而是补充了将要测试或用于引导分化的给定细胞因子(例如,CSF-1、G-CSF、GM-CSF、EPO、TEPO,等等)的完全培养基。

[0202] 如果需要并且根据待测试的试剂或分子而确定,用96孔板滴定小分子、生物剂或阳性对照物质(例如,三氧化二砷),并与1t-HSC孵育24到72小时或更长时间。孵育后,细胞用PBS清洗并且重悬浮于PBS中在-80℃下过夜储存以裂解细胞。然后在室温下融化细胞,将培养板在3,000rpm下离心10分钟。然后将上清液转移入新的96孔板中并与四甲基联苯胺(TMB)混合40分钟。反应用4N H_2SO_4 终止,在450nm下读取O.D。这种类型的高通量试验可用于测试小分子或生物剂诱导或阻止条件转化的长期HSC分化为广泛种类的细胞类型的能力。这些筛选的结果然后可进一步测试诱导或抑制HSC体内分化的能力。这种测试形式的变化对于本领域技术人员是显而易见的,并包括在本发明中。

[0203] 实施例8

[0204] 下面的实施例描述了本发明的方法产生中间造血谱系细胞系的用途。

[0205] 下面的方案可用于在将条件无限增殖化1t-HSC细胞系移植入致死性照射的小鼠中后诱导代表造血谱系发育中间阶段的细胞系的发育。首先,将根据本发明方法产生的 10^3 - 10^5 条件转化的1t-HSC细胞系转移入几组受到致死性照射的受体小鼠中。移植体还可包括 10^5 Rag-1^{-/-}作为载体,以确保受照射小鼠在开始时存活。给小鼠每周腹腔内注射1mg他莫

昔芬,以使来源于条件转化的1t-HSC细胞系的部分分化的细胞无限增殖化。注射在开始移植3天至1周后开始或在移植后8天开始,直到小鼠已被条件转化的1t-HSC细胞系完全重建。用他莫昔芬治疗3天后,或当它们显示出与白血病相关的临床症状时,从来自小鼠的脾和骨髓细胞中收集细胞。细胞在具有4-OHT的标准骨髓培养条件(DMEM,15%胎牛血清,青霉素/链霉素,L-谷氨酰胺,非必需氨基酸,IL-3、IL-6和SCF)下培养,或在其他细胞因子和用于其他造血细胞类型的介质的存在下培养。将细胞系冷冻和/或扩增,细胞系也是通过有限稀释克隆的并且通过原病毒整合的PCR扩增确定的单细胞,冷冻,然后通过流式细胞术表征其表面标记物的表达。这些类型的方法用于鼠和人ct1t-HSC细胞系,利用NOD/SCID小鼠作为受体,或使用新生Rag-1^{-/-}小鼠,将对其进行肝内注射。

[0206] 实施例9

[0207] 下述实施例描述了使用本发明的方法和采用体外产生成熟D4+αβT细胞的方案发展代表T细胞发育中间阶段的细胞系。

[0208] 在本试验中,将根据本发明方法产生的条件无限增殖化的1t-HSC细胞系在正常细胞因子混合物的存在下接种于培养板,其中补充了IL-7并且不含他莫昔芬。在表达jagged(一种Notch-1配体)的OP-9基质细胞层上建立平行培养。在为了监测T细胞发育的指征而开始培养之后,每48小时对T细胞谱系标记物进行细胞染色。将显示T-谱系定向和发育指征的孔转换为包含他莫昔芬的培养基,以稳定表型和建立细胞系。如实施例8所述将得到的细胞系扩增、克隆和表征。为了确定它们的T细胞受体所有成分的使用,将T细胞系针对各个TCR-Vβ等位基因进行特异性染色。适当时,将一些成熟T-细胞系或代表祖细胞群体的细胞系移植入Rag-1^{-/-}小鼠中,以评价它们遵循体内正常耐受和自身稳定的机制的能力,以及它们进一步体内分化的能力。最后,在体外和体内评价它们对抗原刺激应答的能力。

[0209] 实施例10

[0210] 下面的实施例描述了使用本发明方法和采用用于使HSC定向分化为骨髓细胞谱系的方案发展中间发育细胞系和髓细胞白血病模型。

[0211] 在本试验中,将根据本发明方法产生的条件无限增殖化的1t-HSC细胞系在正常细胞因子混合物的存在下接种于培养板,其中补充了G-CSF并且不含他莫昔芬。在为了监测骨髓发育的指征而开始培养之后,每48小时对骨髓谱系标记物进行细胞染色。将显示骨髓谱系定向和发育指征的孔转换为包含他莫昔芬的培养基,以稳定表型和建立细胞系。如实施例8所述将得到的细胞系扩增、克隆和表征。将一些得到的细胞系移植回小鼠中以监测它们再生Op/Op小鼠(天然缺乏巨噬细胞的突变小鼠)的能力。还将这些细胞系移植入将始终保持在他莫昔芬条件下的野生型小鼠中,以确定这些细胞系是否还将产生类似于人AML、CML和APL的髓细胞白血病。这些新的肿瘤提供了用于临床前治疗的新模型。

[0212] 实施例11

[0213] 下面的实施例描述了人成年ct1t-HSC细胞系的产生以及利用NOD/SCID或RAG^{-/-}异种移植模型在体内检测它们的多能性。

[0214] 在此试验中,用编码MYC-ER、Bcl-2和GFP(用于以后检测移植的细胞)的逆转录病毒载体在体外转导CD34+细胞(来自被动员的血或脐带血),所述病毒载体利用双嗜性被膜包裹(根据本发明的方法)。如上面利用鼠HSC所述,通过在4OHT和生长因子存在下体外增殖来选择1t-HSC。所选细胞的多能性通过以下方法评价:将1t-HSC系移植入亚致死性照射的

NOD/SCID或NOD/SCID/ β -2M^{-/-}或Rag-1^{-/-}或Rag-2^{-/-}小鼠中,在6-12周后通过免疫荧光流式细胞术分析所有血细胞谱系。更特别地,在利用本发明方法产生ct1t-HSC细胞系之后,可利用两种不同的和补充的方法检查它们的多能性。在第一种方法中,将不同数量的克隆ct1t-HSC细胞系引入亚致死性照射的NOD/SCID小鼠或NOD/SCID/ β -2M^{-/-}小鼠中。在此例中,在小鼠实施亚致死照射方案(0.3Gy)之后,静脉内转移来源于人ct1t-HSC细胞系的 10^3 - 10^5 细胞。在移植12周之后分析小鼠的重建。第二,通过直接注射将来源于人ct1t-HSC细胞系的 10^3 - 10^5 细胞引入新生Rag-1^{-/-}或Rag-2^{-/-}小鼠的肝中。还在移植6-12周后分析这些异种植物的适当的重建。

[0215] 实施例12

[0216] 下面的实施例描述了在移植后利用条件法消除ct1t-HSC的MYC和Bcl-2表达。

[0217] 在此试验中,重新改造用于转化干细胞的病毒(病毒载体),使其在MYC-ER、Bcl-2和GFP开放阅读框(ORFS)侧翼包含两个loxP位点。当细胞被移植时,用Cre或CRE-TAT融合蛋白的调节形式删除癌基因编码序列,从而消除受体中由插入片段引起恶性肿瘤的风险。该方法首先在小鼠中发展,然后应用于人1t-HSC。

[0218] 在第二种方法中,利用来自TRE-MYC小鼠的1t-HSC产生具有编码Bcl-2或rtTA的逆转录病毒的细胞系。将其移植入小鼠中。给小鼠饲以多西环素,以消除MYC的表达。可以使用从TRE-MYC xTRE-Bcl-2双基因(bigenic)小鼠获得的1t-HSC,其可利用pMIG-rtTA逆转录病毒转导以消除MYC和Bcl-2的表达。

[0219] 实施例13

[0220] 下面的实施例描述了利用HIV-1 Tat与MYC和/或Bcl-2的融合蛋白在不对1t-HSC进行遗传修饰的情况下获得条件转化。

[0221] 利用已经建立的方案产生和纯化MYC-Tat和Bcl-2融合蛋白。通过处理细胞检测融合蛋白,其中可容易地测定过量表达的Bcl-2(例如,活化的T细胞,B-细胞淋巴瘤细胞系,其具有对BCMA-Fc的抗性,等等)或MYC(例如,无反应性B-细胞,幼稚T细胞,活化的T细胞)的效果。利用MYC-Tat和Bcl-2-Tat蛋白的组合使1t-HSC在移植之前增殖。这种方法在小鼠系统中容易地发展并测试,然后应用于人。

[0222] 美国临时专利申请NO.60/728,131和美国临时专利申请No.60/765,993的全部公开内容在此引入作为参考。

[0223] 尽管本发明的多个实施方式已经详细描述,但是这些实施方式的修饰和改变对于本领域技术人员来说是显而易见的。然而,应该清楚的理解,所述修饰和改变在本发明的范围内,如下面权利要求中阐明的那样。

SEQUENCE LISTING

<110> 国家犹太健康中心
科罗拉多大学董事会

<120> 条件无限增殖化长期干细胞和制备和使用所述细胞的方法

<130> 2879-117-PCT

<150> 60/728,131
<151> 2005-10-18

<150> 60/765,993
<151> 2006-02-06

<160> 14

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 2377
<212> DNA
<213> 人

[0001]

<400> 1
 acccccgagc tgtgctgctc gcggccgcca ccgccgggcc ccggccgtcc ctggctcccc 60
 tcctgcctcg agaagggcag ggcttctcag aggcttgccg ggaaaaagaa cggagggagg 120
 gatcgcgctg agtataaaag ccggttttcg gggctttatc taactcgctg tagtaattcc 180
 agcgagagggc agagggagcg agcgggcccgc cggctagggt ggaagagccg ggcgagcaga 240
 gctgcgctgc gggcgtcctg ggaagggaga tccggagcga atagggggct tgcctctgg 300
 cccagccctc ccgctgatcc cccagccagc ggtccgcaac cttgccgca tccacgaaac 360
 ttgcccata gcagcgggcg ggcactttgc actggaactt acaacacccg agcaaggacg 420
 cgactctccc gacgcgggga ggctattctg cccatttggg gacacttccc cgccgctgcc 480
 aggacccgct tctctgaaag gctctcctg cagctgctta gacgctggat tttttcggg 540
 tagtggaaaa ccagcagcct cccgcgacga tgcccctcaa cgtagcttc accaacagga 600

	actatgacct cgactacgac tcggtgcagc cgtatttcta ctgcgacgag gaggagaact	660
	tctaccagca gcagcagcag agcgagctgc agccccggc gccagcgag gatatctgga	720
	agaaattcga gctgctgcc accccgccc tgtcccctag ccgccgctcc gggctctgct	780
	cgccctcta cgttgcgctc acacccttct cccttcgggg agacaacgac ggcggtggcg	840
	ggagcttctc cacggccgac cagctggaga tggtgaccga gctgctggga ggagacatgg	900
	tgaaccagag ttcatctgc gaccggacg acgagacctt catcaaaaac atcatcatcc	960
	aggactgtat gtggagcggc ttctggccg ccgccaagct cgtctcagag aagctggcct	1020
	cctaccaggc tgcgcaaaa gacagcggca gcccgaaacc gcccgcgcc cacagcgtct	1080
	gctccacctc cagctgtac ctgcaggatc tgagcggcg cgctcagag tgcacgacc	1140
	cctcgggtgt cttcccctac ccttcaacg acagcagctc gcccaagtcc tgcgctcgc	1200
	aagactccag cgccttctct ccgtcctcgg attctctgct ctctcagc gagtctccc	1260
[0002]	cgcagggcag ccccagccc ctggtgctcc atgaggagc accgcccacc accagcagcg	1320
	actctgagga ggaacaagaa gatgaggaag aaatcgatgt tgtttctgtg gaaaagaggc	1380
	aggctcctgg caaaaggta gagtctggat caccttctgc tggaggccac agcaaacctc	1440
	ctcacagccc actggtcctc aagaggtgcc acgtctcac acatcagcac aactacgag	1500
	cgctccctc cactcgaag gactatcctg ctccaagag ggtcaagtg gacagtgtca	1560
	gagtctgag acagatcagc aacaaccgaa aatgcaccag cccaggtcc tcggacaccg	1620
	aggagaatgt caagaggcga acacacaacg tcttgagcg ccagaggagg aacgagctaa	1680
	aacggagctt tttgccctg cgtgaccaga tcccggagt ggaaaacaat gaaaaggccc	1740
	ccaaggtagt taccctaaa aaagccacag catacatcct gtccgtcaa gcagaggagc	1800
	aaaagctcat ttctgaagag gacttgttc ggaacgacg agaacagtg aacacaaac	1860
	ttgaacagct acggaactct tgtcgtaag gaaaagtaag gaaaacgatt ccttcaaca	1920

gaaatgtcct gagcaatcac ctatgaactt gttcaaag catgatcaaa tgcaacctca 1980

caacctggc tgagtcttga gactgaaaga tttagccata atgtaaactg cctcaaattg 2040

gactttgggc ataaaagaac tttttatgc ttaccatctt ttttttct ttaacagatt 2100

tgtatttaag aattgtttt aaaaaattt aagattaca caatgtttct ctgtaaatat 2160

tgccattaaa tgtaaataac ttaataaaa cgtttatagc agttacacag aanttcaatc 2220

ctagtatata gtacctagta ttataggtac tataaacctt aattttttt atttaagtac 2280

atthtgcttt ttaaagttga ttttttcta ttgttttag aaaaaataaa ataactggca 2340

aatatatcat tgagccaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 2377

[0003]

<210> 2
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 2

Met Asp Phe Phe Arg Val Val Glu Asn Gln Gln Pro Pro Ala Thr Met
 1 5 10 15

Pro Leu Asn Val Ser Phe Thr Asn Arg Asn Tyr Asp Leu Asp Tyr Asp
 20 25 30

Ser Val Gln Pro Tyr Phe Tyr Cys Asp Glu Glu Glu Asn Phe Tyr Gln
 35 40 45

Gln Gln Gln Gln Ser Glu Leu Gln Pro Pro Ala Pro Ser Glu Asp Ile
 50 55 60

Trp Lys Lys Phe Glu Leu Leu Pro Thr Pro Pro Leu Ser Pro Ser Arg
 65 70 75 80

	Arg Ser Gly Leu Cys Ser Pro Ser Tyr Val Ala Val Thr Pro Phe Ser			
	85	90	95	
	Leu Arg Gly Asp Asn Asp Gly Gly Gly Gly Ser Phe Ser Thr Ala Asp			
	100	105	110	
	Gln Leu Glu Met Val Thr Glu Leu Leu Gly Gly Asp Met Val Asn Gln			
	115	120	125	
	Ser Phe Ile Cys Asp Pro Asp Asp Glu Thr Phe Ile Lys Asn Ile Ile			
	130	135	140	
	Ile Gln Asp Cys Met Trp Ser Gly Phe Ser Ala Ala Ala Lys Leu Val			
	145	150	155	160
[0004]	Ser Glu Lys Leu Ala Ser Tyr Gln Ala Ala Arg Lys Asp Ser Gly Ser			
	165	170	175	
	Pro Asn Pro Ala Arg Gly His Ser Val Cys Ser Thr Ser Ser Leu Tyr			
	180	185	190	
	Leu Gln Asp Leu Ser Ala Ala Ala Ser Glu Cys Ile Asp Pro Ser Val			
	195	200	205	
	Val Phe Pro Tyr Pro Leu Asn Asp Ser Ser Ser Pro Lys Ser Cys Ala			
	210	215	220	
	Ser Gln Asp Ser Ser Ala Phe Ser Pro Ser Ser Asp Ser Leu Leu Ser			
	225	230	235	240
	Ser Thr Glu Ser Ser Pro Gln Gly Ser Pro Glu Pro Leu Val Leu His			
	245	250	255	

	Glu Glu Thr Pro Pro Thr Thr Ser Ser Asp Ser Glu Glu Glu Gln Glu			
	260	265	270	
	Asp Glu Glu Glu Ile Asp Val Val Ser Val Glu Lys Arg Gln Ala Pro			
	275	280	285	
	Gly Lys Arg Ser Glu Ser Gly Ser Pro Ser Ala Gly Gly His Ser Lys			
	290	295	300	
	Pro Pro His Ser Pro Leu Val Leu Lys Arg Cys His Val Ser Thr His			
	305	310	315	320
	Gln His Asn Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Thr Arg Lys Asp Tyr Pro Ala			
	325	330	335	
[0005]	Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp Ser Val Arg Val Leu Arg Gln Ile Ser			
	340	345	350	
	Asn Asn Arg Lys Cys Thr Ser Pro Arg Ser Ser Asp Thr Glu Glu Asn			
	355	360	365	
	Val Lys Arg Arg Thr His Asn Val Leu Glu Arg Gln Arg Arg Asn Glu			
	370	375	380	
	Leu Lys Arg Ser Phe Phe Ala Leu Arg Asp Gln Ile Pro Glu Leu Glu			
	385	390	395	400
	Asn Asn Glu Lys Ala Pro Lys Val Val Ile Leu Lys Lys Ala Thr Ala			
	405	410	415	
	Tyr Ile Leu Ser Val Gln Ala Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu			
	420	425	430	

Asp Leu Leu Arg Lys Arg Arg Glu Gln Leu Lys His Lys Leu Glu Gln
 435 440 445

Leu Arg Asn Ser Cys Ala
 450

<210> 3
 <211> 51552
 <212> DNA
 <213> 人

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (31450)..(31450)
 <223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 3

[0006]

acttgagccc aagagttcaa ggctacggtg agccatgatt gcaacaccac acgccagcct 60
 tggtgacaga atgagaccct gtctcaaaaa aaaaaaaaaa aattgaaata atataaagca 120
 tcttctctgg ccacagtgga acaaaaccag aaatcaacaa caagaggaat ttgaaaact 180
 atacaaacac atgaaaatta aacaatatac ttctgaatga ccagtgagtc aatgaagaaa 240
 ttaaaaagga aattgaaaaa ttatttaag caaatgataa cggaacata accttcaaa 300
 acccagggta tacagcaaaa gcagtgctaa gaaggaagtt tatagctata agcagctaca 360
 tcaaaaaagt agaaaagcca ggcgcagtg ctcatgcctg taatcccagc actttgggag 420
 gccaaggcgg gcagatcgcc tgaggtcagg agttcgagac cagcctgacc aacacagaga 480
 aaccttgtcg ctactaaaaa taaaaatta gctgggcatg gtggcacatg cctgtaatcc 540
 cagctactcg ggaggctgag gcaggataac cgcttgaacc caggaggtgg aggttgcggt 600
 gagccgggat tgcgccattg gactccagcc tgggtaacaa gagtgaacc ctgtctcaag 660
 aaaaaaaaaa aagtagaaaa acttaaaaat acaacctaata gatgcacctt aaagaactag 720

	aaaagcaaga gcaactaaa cctaaaattg gtaaaagaaa agaaataata aagatcagag	780
	cagaaataaa tgaactgaa agataacaat acaaaagatc acaaaaatta aaagttggtt	840
	tttgaaaag ataaacaaaa ttgacaaacc ttgcccaga ctaagaaaa aggaaagaag	900
	acctaaataa ataaagtcag agatgaaaa agagacatta caactgatac cacagaaatt	960
	caaaggatca ctagggcta ctatgagcaa ctgtacacta ataaattgaa aaacctgaa	1020
	aaaatagata aattcctaga tgcatacaac ctaccaagat tgaacctga agaaatcaa	1080
	agcccaaaca gaccaataac aataatggga ttaaagccat aataaaaagt ctctagcaa	1140
	agagaagccc aggaccaat ggcttcctg ctggatttta ccaatcattt aaagaagaat	1200
	gaattccaat cctactcaaa ctattctgaa aaatagagga aagaatactt ccaaactcat	1260
	tctacatggc cagtattacc ctgattcaa aaccagacaa aaacacatca aaaacaaaca	1320
	aaaaaaaa cagaaagaaa gaaaactaca ggccaatatc cctgatgaat actgatacaa	1380
[0007]	aatcctcaa caaaacta gcaaaccaa ttaacaaca ccttcgaaag atcattcatt	1440
	gtgatcaagt gggatttatt ccagggatgg aaggatggtt caacatagc aaatcaatca	1500
	atgtgataca tcatccaac aaaatgaagt acaaaaacta tatgattatt tcactttatg	1560
	cagaaaaagc attgataaa attctgcacc ctcatgata aaaaccctca aaaaccagg	1620
	tatacaagaa acatacaggc caggcacagt ggctcacacc tgcgatcca gactctggg	1680
	aggccaaggt gggatgattg ctgggccca ggagtttgag actagcctgg gcaacaaaat	1740
	gagacctggt ctacaaaaa ctttttaaa aaattagcca ggcatgatgg catatgcctg	1800
	tagtcccagc tagtctggag gctgaggtgg gagaatcact taagcctagg aggtcgaggc	1860
	tgcagtgagc catgaacatg tcaactgtact ccagcctaga caacagaaca agacccact	1920
	gaataagaag aaggagaagg agaagggaga agggagggag aaggaggag gaggagaagg	1980
	aggaggtgga ggagaagtgg aaggggaagg ggaagggaaa gaggaagaag aagaaacata	2040

	tttcaacata ataaaagccc tatatgacag accgaggtag tattatgagg aaaaactgaa	2100
	agcctttct ctaagatctg gaaaatgaca agggccact ttcaccactg tgattcaaca	2160
	tagtactaga agtcctagct agagcaatca gataagagaa agaaataaaa ggcacccaaa	2220
	ctggaaagga agaagtcaaa ttatcctgtt tgcagatgat atgatcttat atctggaaaa	2280
	gacttaagac accactaaaa aactattaga gctgaaattt ggtacagcag gatacaaaat	2340
	caatgtacaa aaatcagtag tatttctata ttccaacagc aaacaatctg aaaaagaac	2400
	caaaaaagca gctacaaata aaattaaaca gctaggaatt aaccaaagaa gtgaaagatc	2460
	tctacaatga aaactataaa atgttgataa aagaaattga agagggcaca aaaaaagaaa	2520
	agatattcca tgttcataga ttggaagaat aaatactgtt aaaatgtcca tactacccaa	2580
	agcaatttac aaattcaatg caatccctat taaaatacta atgacgttct tcacagaat	2640
	agaagaaaca attctaagat ttgtacagaa ccacaaaaga cccagaatag ccaaagctat	2700
[0008]	cctgaccaa aagaacaaaa ctggaagcat cacattacct gacttcaat tatactacaa	2760
	agctatagta acccaaacta catggtactg gcataaaaac agatgagaca tggaccagag	2820
	gaacagaata gagaatccag aaacaaatcc atgcatctac agtgaactca ttttgacaa	2880
	aggcgccaag aacatacttt ggggaaaaga taatctcttc aataaatggt gctggaggaa	2940
	ctggatatcc atatgcaaaa taacaatact agaactctgt ctctccat atacaaaagc	3000
	aatcaaaat ggatgaaagg cttaaacta aaacctcaa ctttgcaact actaaaagaa	3060
	aacaccggag aaactctca ggacattgga gtgggcaaag acttcttgag taattcctg	3120
	caggcacagg caaccaaagc aaaaacagac aaatgggatc atatcaagtt aaaaagctc	3180
	tgcccagcaa aggaacaat caacaagag aagagacaac ccacagaatg ggagaatata	3240
	tttgcaact attcatctaa caaggaatta ataaccagta tatataagga gctcaaaacta	3300
	ctctataaga aaaacaccta ataagctgat tttcaaaaat aagcaaaaaga tctgggtaga	3360

	catttctcaa aataagtcac acaaatggca aacaggcatc tgaatgtg ctcaacacca	3420
	ctgatcatca gagaaatgca aatcaaaact actatgagag atcatctcat cccagttaa	3480
	atggctttta ttcaaaagac aggcaataac aatgccagt gaggatgtgg ataaaaggaa	3540
	acccttgac actgttggtg ggaatggaaa ttgctaccac tatggagaac agtttgaaag	3600
	ttctcaaaa aactaaaaat aaagctacca tacagcaatc ccattgctag gtatatact	3660
	caaaaaagg aatcagtgtg tcaacaagct atctccactc ccacatttac tgcagcactg	3720
	ttcatagcag ccaaggttg gaagcaacct cagtgtccat caacagacga atggaaaaag	3780
	aaaatgtgtg gcacatacac aatggagtac tacgcagcca taaaaaagaa tgagtcctg	3840
	tcagttgcaa cagcatgggg ggcaactgtc agtatgttaa gtgaaataag ccaggcacag	3900
	aaagacaaa ttttcatgtt ctcccttact tggggagca aaaattaaaa caattgacat	3960
	agaaatagag gagaatgtg gttctagagg ggtgggggac aggtgacta gagtcaaca	4020
[0009]	taattattg tatgttttaa aataactaaa agagtataat tgggtgttt gtaacacaaa	4080
	gaaaggataa atgcttgaag gtgacagata cccatttac cctgatgtga ttattacaca	4140
	ttgatgcct gtatcaaat atctcatgta tgctatagat ataaacccta ctatataaa	4200
	aattaaaatt ttaatggcca ggcacggtg ctcatgtccg taatccagc acttgggag	4260
	gccgaggcgg gtggatcacc tgaggtcagg agtttgaac cagtctggcc accatgatga	4320
	aacctgtct ctactaaaga taaaaaatt agccaggcgt ggtggacat acctgtagc	4380
	ccaactactc aggaggctga gacaggagaa ttgctgaac ctgggaggcg gaggttcag	4440
	tgagccgaga tcatgccact gcactgcagc ctgggtgaca gagcaagact ccatctcaa	4500
	acaaaaacaa aaaaaagaag attaaaattg taattttat gtaccgtata aatatatact	4560
	ctactatatt agaagttaa aattaaaaca attataaag gtaattaacc acttaacta	4620
	aaataagaac aatgtatgtg gggtttctag ctctgaaga agtaaaagtt atggccacga	4680

	tggcagaaat gtgaggaggg aacagtggaa gttactgttg ttagacgctc atactctctg	4740
	taagtgactt aattttaacc aaagacaggc tgggagaagt taaagaggca ttctataagc	4800
	cctaaaacaa ctgctaataa tggatgaaagg taatctctat taattaccaa taattacaga	4860
	tatctctaaa atcgagctgc agaattggca cgtctgatca caccgtctc tcattcacgg	4920
	tgctttttt cttgtgtgct tggagatttt cgattgtgtg ttcgtgttg gttaaactta	4980
	atctgtatga atcctgaaac gaaaaatggt ggtgatttc tccagaagaa ttagagtacc	5040
	tggcaggaag caggtggctc tgtggacctg agccactca atcttcaagg gtctctggcc	5100
	aagaccagg tgcaaggcag aggctgatg acccgaggac aggaaagctc ggatgggaag	5160
	ggcgatgag aagcctgcct cgttggtgag cagcgcata agtgcctta ttacgcttt	5220
	gcaaagattg ctctggatac catctggaaa aggcggccag cgggaatgca aggagtca	5280
	agcctctgc tcaaaccag gccagcagct atggcgcca cccggcgctg tgccagaggg	5340
[0010]	agaggagtca aggacactcg aagtatggt taaatcttt tttcacctga agcagtgacc	5400
	aagtgattt ctgagggaa cttgagttg gtgccttct taaaacagaa agtcatggaa	5460
	gcaccttct caaggaaaa ccagacgcc gctctcggt cattacctc tttctctct	5520
	ccctcttg ccctcgcgt tctgatcgg gacagagtga ccccggtgga gcttctcga	5580
	gcccgtctg aggacctct tgcaaagggc tccacagacc cccgcctgg agagaggagt	5640
	ctgagcctgg ctaataaca aactgggatg tggctggggg cggacagcga cggcgggatt	5700
	caaagacta attcatgag taaattcaac cttccacat ccgaatgat ttggattta	5760
	tcttaattt ttctaaatt tcatcaata acattcagga ctgcagaaat ccaaaggcgt	5820
	aaaacaggaa ctgagctatg ttgccaagg tccaaggact taataacat gttcagaggg	5880
	attttcgcc ctaagtactt ttattggtt ttcataaggt ggcttaggt gcaagggaaa	5940
	gtacacagg agaggcctgg gcggcagggc tatgagcacg gcagggccac cggggagaga	6000

	gtccccggcc tgggaggctg acagcaggac cactgaccgt cctccctggg agctgccaca	6060
	ttgggcaacg cgaaggcggc cacgctgcgt gtgactcagg acccataacc ggcttctgg	6120
	gcccaccac actaaccag gaagtcacgg agctctgaac ccgtggaaac gaacatgacc	6180
	cttgctgcc tgcttccctg ggtgggtcaa ggtaatgaa gtggtgtgca ggaaatggcc	6240
	atgtaaatta cagactctg ctgatgggga ccgttcctc catcattatt catctcacc	6300
	ccaaggact gaatgattcc agcaacttct tcgggtgtga caagccatga caaaactcag	6360
	tacaaacacc actcttttac taggccaca gagcacggsc cacaccctg atatattaag	6420
	agtccaggag agatgaggct gcttcagcc accaggctgg ggtgacaaca gcggctgaac	6480
	agtctgtcc tctagactag tagaccctgg caggcactcc cccagattct agggcctggt	6540
	tgctgctcc cgaggggcc atctgccctg gagactcagc ctgggggtcc aactgaggc	6600
	cagccctgc tccacacct ccgcctccag gcctcagctt ctccagcagc ttctaaacc	6660
[0011]	ctgggtgggc cgtgtccag cgctactgc tcacctgtcc cactgtgtct tgtctcagc	6720
	acgtagctcg cacggttct cctcacatgg ggtgtctgtc tcctccca aactcacat	6780
	gcgtgaagg gaggagattc tgcgcctccc agactggctc ctctgacct gaacctggt	6840
	cgtagccccc gatgcaggtt cctggcgtcc ggctgcacgc tgacctcat ttccaggcgc	6900
	tccccgtctc ctgcatctg ccggggcctg ccggtgtgtt cttctgttc tgtctcctt	6960
	tccacgtcca gctgcgtgtg tctctgccc ctagggtctc ggggtttta taggcatagg	7020
	acggggcgt ggtggccag ggcgctctg ggaaatgcaa ctttggtg tgaaagtagg	7080
	agtgcctgtc ctcacctagg tccacgggca caggcctggg gatggagccc ccgccagga	7140
	cccgccttc tctgccagc actttctgc cccctcct ctggaacaca gagggcagt	7200
	ttcacaagc actaagcatc ctctccaa aagaccagc attggcacc ctggacatt	7260
	gccccacgc cctgggaatt cagtgacta cgcacatcat gtacacactc ccgtccacga	7320

	ccgacccccg ctgttttatt ttaatagcta caaagcaggg aaatccctgc taaaatgtcc	7380
	ttaacaaac tggtaaaca aacgggtcca tccgcacggt ggacagttcc tcacagtga	7440
	gaggaacatg ccgtttataa agcctgcagg catctcaagg gaattacgct gagtcaaac	7500
	tgccacctcc atgggatacg tacgcaacat gctcaaaaag aaagaatttc accccatggc	7560
	aggggagtgg ttaggggggt taaggacggt gggggcggca gctgggggct actgcacgca	7620
	cctttacta aagccagttt cctggttctg atggtattgg ctcaattatg ggagactaac	7680
	cataggggag tgggatggg ggaacccgga ggctgtcca tctttgcat gcccgagtgt	7740
	cctgggcagg ataatgctct agagatgcc acgtcctgat tccccaaac ctgtggacag	7800
	aaccgcccc gccccagggc cttgcaggt gtgatctcc tgaggacct gaggtctggg	7860
	atcctcggg actacctgca ggcccgaata gtaatccagg ggttctggga agaggcggc	7920
	aggagggtca gaggggggca gcctcaggac gatggaggca gtcagtctga ggctgaaaag	7980
[0012]	ggagggaggg cctcagccc aggcctgcaa ggcctccag aagctgaaa aagcgggaa	8040
	gggacctcc acggagcctg cagcaggaag gcacggctgg cccttagccc accagggccc	8100
	atcgtggacc tccggctcc gtgcatagg agggcactcg cgctgcctt ctagatgaa	8160
	gtgtgtggg atttcagaa gcaacaggaa acctatcac tgtaatcta ggattattc	8220
	aaaacaaagg ttacagaaa catccaagga cagggtgaa gtgcctccgg gcaaggcag	8280
	ggcaggcacg agtgatttta ttagctatt ttttttatt tacttactt ctgagacaga	8340
	gttatgctct tgtgcccag gctggagtgc agcggcatga tcttgctca ctgcaacctc	8400
	cgctcctgg gttcaagcaa ttctctgcc tcagcctccc aagtagctgg gatttcaggc	8460
	gtgcaccacc acaccggct aattttgtat ttttagtaga gatgggcttt caccatgtg	8520
	gtcaagctga tctcaaatc ctgacctcag gtgatccgcc cacctcagcc tccaaagt	8580
	ctgggattac aggcattgac cactgcacct ggctattta accattttaa aacttcctg	8640

	ggctcaagtc acaccactg gtaaggagtt catggagttc aattcccct ttactcagga	8700
	gttacctcc ttgatattt tctgtaattc ttcgtagact ggggatacac cgtctctga	8760
	catattcaca gtttctgtga ccacctgtta tcccatggga cccactgcag gggcagctgg	8820
	gaggctgcag gcttcaggtc ccagtgggtg tgccatctgc cagtagaaac ctgatgtaga	8880
	atcagggcgc aagtgtggac actgtcctga atctcaatgt ctcagtgtgt gctgaaacat	8940
	gtagaaatta aagtccatcc ctctactct actgggattg agccccctcc ctatcccc	9000
	ccaggggcag aggagttcct ctactcctg tggaggaagg aatgatactt tgttatttt	9060
	cactgctggt actgaatcca ctgttcatt tgttggttg tttgtttgt tttgagaggc	9120
	ggtttcactc ttgttctca ggctggaggg agtgcaatgg cgcatcttg gcttactgca	9180
	gcctctgctt cccaggttca agtgattctc ctgctccgc ctcccattg gctgggatta	9240
[0013]	caggcaccg ccacatgcc cagctaattt tttgtattt tagtagagac gggggtgggt	9300
	ggggttacc atgttgcca ggctggtctc gaacttctga cctcagatga tccacctgcc	9360
	tctgcctctt aaagtctgg gattacaggt gtgagccacc atgccagct cagaatttac	9420
	tctgtttaga aacatctggg tctgaggtag gaagctcacc cactcaagt gttgtggtgt	9480
	ttaagccaa tgatagaatt ttttattgt ttttagaaca ctctgatgt tttactgt	9540
	gatgactaag acatcatcag ctttcaaag acacactaac tgcaccata atactgggt	9600
	gtcttctggg taccagcaat ctctattgaa tgccgggagg cgttcctcg ccatgcacat	9660
	ggtgtaatt actccagcat aatcttctgc ttccattct tctctccct cttttaa	9720
	tgtttttct atgttgctt ctctgcagag aaccagtga agctacaact taactttgt	9780
	tggaacaaat tttcaaacc gccccttgc ctagtgga gagacaattc acaaacacag	9840
	cccttaaaa aggcttagg atcactaagg ggattctag aagagcgacc tgtaactcta	9900
	agtatttaca agacaggct aacctccagc gagcgtgaca gccagggag ggtgagggc	9960

ctgttcaaat gctagctcca taaataaagc aatttctcc ggcagtttct gaaagtagga 10020

aaggttacat ttaaggttgc gttgttagc attcagtggt ttgccacct cagctacagc 10080

atccctgcaa ggctcggga gaccagaag tttctgccc ccttagatcc aaacttgagc 10140

aaccggagt ctgattcct gggaagtct cagctgtct gcggttgc cggggccca 10200

ggtctggagg ggaccagtgg ccgtgtgct tctactgctg ggctggaagt cggcctct 10260

agctctgcag tccgaggctt ggagccaggt gcctggacc cgagctgcc ctccaccctg 10320

tgcggcgagg atgtaccag atgttgctt catctgccag acagagtgc gggggccagg 10380

gtcaaggccg ttgtggctgg tgtgaggcgc ccggtgcgc gccagcagga ggcctggct 10440

ccatttcca cccttctc acgggaccgc cccggtgggt gattaacaga tttgggtgg 10500

ttgtctatg gtgggacc ctcgccctt gagaacctgc aaagagaaat gacggcctg 10560

[0014] tgtaaggag cccaagtcgc ggggaagtgt tcagggagg cactccggga ggtcccgcgt 10620

gcccgtccag ggagcaatgc gtctcgggt tcgtcccag ccgctctac ggcctcct 10680

cctcccctc acgtccgca ttcgtggtgc ccggagccc acgccccgc tccggacctg 10740

gaggcagccc tgggtctcc gatcaggcca gggccaaag ggtcggcca cgcacctgt 10800

cccaggcct ccacatcatg gccctcctt cgggttacc cacagcctag gccgattca 10860

cctctctcg ctggggcctt cgctggcgt cctgaccct gggagcgcga gggcgcgcg 10920

ggcggggaag cgcggcccag accccgggt ccgccggag cagctgcct gtcggggcca 10980

ggcgggctc ccagtggatt cgcgggcaca gacgccagg accgctcc ccactggcg 11040

gagggactgg ggaccgggc accctctg cccttacc ttccagctcc gcctctccg 11100

cgcgacccc gcccgtccc gaccctccc ggtccccg cccagcccc tccggcctt 11160

cccagccct cccttctt tccgggccc gcctctcc tcggcgcg agttcaggc 11220

agcgtcgt cctgctgc acgtgggaag cctggccc gccacccc gcgatccgc 11280

cgctcccc ctgccgagcc gtgcgctccc tgctgcgag cactaccgc gaggtgctgc 11340

cgctggccac gttcgtgcgg cgcctggggc cccagggctg gcggctggtg cagcgcgggg 11400

accggcggc ttccgcgcg ctggtggccc agtcctggt gtgcgtgccc tgggacgcac 11460

ggccgcccc cgccgcccc tcctccgcc agtgggcct cccggggtc ggcgtccggc 11520

tggggtgag ggccggggg gggaaccagc gacatgcgga gagcagcga ggcgactcag 11580

ggcgttccc ccgaggtgt cctgcctgaa ggagctggtg gccgagtc tcagaggct 11640

gtcgcgagc ggccgaaga acgtgctggc cttcgcttc gcctgctgg acggggccc 11700

cgggggccc cccgagcct tcaccaccag cgtgcgagc tacctgcca acacggtgac 11760

cgacgactg cgggggagc gggcgtggg gctgctgctg cgccgctgg gcgacgact 11820

gctggttac ctgctggcac gctgcgct cttgtgctg gtggctcca gctgcgcta 11880

ccaggtgct ggcccgccg tgtaccagct cggcgtgcc actcaggccc ggccccgcc 11940

[0015] acacgtagt ggacccgaa ggcgtctgg atgcgaacgg gcctggaacc atagctcag 12000

ggaggccggg gtccccctg gcctgccag cccgggtgc aggaggcgc ggggcagtgc 12060

cagccgaagt ctgccgttc ccaagaggcc caggcgtggc gctgcccctg agccggagc 12120

gaccccgtt ggcaggggt cctgggcca cccgggagg acgctggac cgagtaccg 12180

tggttctgt gtggtgtcac ctgccagacc cgccgaaga gccacctt tggagggtc 12240

gctctgctg acgcccact cccaccatc cgtggccgc cagcaccag caggcccc 12300

atccacatc gggccaccac gtcctggga cagcctgt ccccgtgt acgccgagc 12360

caagcattc ctctactct caggcgaca ggagcagctg cgccctct ctctactcag 12420

ctctctgag cccagcctga ctggcctc gaggctcgt gagaccatct ttctgggtc 12480

caggccctg atccagga ctccccag gttgcccc ctgcccagc gctactggca 12540

aatgcccct ctgttctg agctgctg gaaccagc cagtcccct acgggtgct 12600

cctcaagacg cactgccccg tgcgagctgc ggtcacccca gcagccggtg tctgtgcccc 12660

ggagaagccc cagggctctg tggcgcccc cgaggaggag gacacagacc cccgtcgct 12720

ggtgcagctg ctccgccagc acagcagccc ctggcaggtg tacggcttcg tgcgggctg 12780

cctgcgccgg ctggtgcccc caggcctctg gggctccagg cacaacgaac gccgttct 12840

caggaacacc aagaagtca tctcctggg gaagcatgcc aagctctgc tgcaggagct 12900

gacgtggaag atgagcgtgc gggactgctg ttggtgctgc aggagcccag gtgaggaggt 12960

ggtggccgtc gagggccag gccccagagc tgaatgcagt aggggctcag aaaagggggc 13020

aggcagagcc ctggtctcc tgtctcatc gtcacgtggg cacacgtggc ttttctca 13080

ggacgtcgag tggacacggt gatctctcc tctgctcc ctctgtcca gttgcataa 13140

acttacgagg ttcacctca cgttttagt gacacggtt tccaggcgc cgaggccaga 13200

gcagtgaaca gaggaggctg ggcgcggcag tggagccggg ttgccgcaa tggggagaag 13260

[0016] tgtctggaag cacagacgt ctggcgaggg tgcctgcagg ttacctataa tctcttcgc 13320

aatttcaagg gtgggaatga gaggtgggga cgagaacccc ctcttctgg ggggtggagg 13380

taagggttt gcaggtgcac gtggtcagcc aatatgcagg tttgtgtta agatttaatt 13440

gtgtgtgac ggccaggtgc ggtggctcac gccgtaatc ccagcactt gggaagctga 13500

ggcaggtgga tcacctgagg tcaggagtgt gagaccagcc tgaccaacat ggtgaaaccc 13560

tatctgtact aaaaatacaa aaattagctg ggcattgttg tgtgtcctg taatcccagc 13620

tactgggag gctgaggcag gagaatcact tgaaccagc aggcggaggc tgcagtgagc 13680

tgagatttg ccattgtact ccagcctggg cgacaagagt gaaactctgt ctttaaaaa 13740

aaaaagtgt cgttgattgt gccaggacag ggtagaggga gggagataag actgttctcc 13800

agcacagatc ctgtccat ctttaggtat gaagagggcc acatgggagc agaggacagc 13860

agatggctcc acctgctgag gaaggacag ttttggggg tttcagggg atggtgctgc 13920

tgggccctgc cgtgtcccca ccctgtttt ctggattga tgttgaggaa cctccgctcc 13980
 agcccccttt tggctcccag tgctcccagg ccctaccgtg gcagctagaa gaagtcccga 14040
 tttcaccccc tccccacaaa ctccaagac atgtaagact tccggccatg cagacaagga 14100
 gggtgacctt ctggggctc ttttttct tttttctt ttatggtgc aaaagtcata 14160
 taacatgaga ttggcactcc taacaccgtt ttctgtgtac agtcagaat tgctaactcg 14220
 gcggtgttta cagcagggtg ctgaaatgc tgcgtctgc gtgactggaa gtcctacc 14280
 atgaacggc agctgcctca cacctgtgc ggctcagggt gaccacgcc agtcagataa 14340
 gcgtcatgca acccagttt gcttttgg ctccagctc cttcgtgag gagagttga 14400
 gttctctgat caggactctg cctgtcattg ctgttctg acttcagatg aggtcacaat 14460
 ctgccctgg cttatgcagg gagtgaggcg tggccccgg gtgtccctgt cacgtcagg 14520
 gtgagtgagg cgtgtcccc aggtgtccct gtcacgtga gggtagtga ggcgcggccc 14580
 [0017] ccgggtgcc ctgtcccgtg cagcgtgatt gagggtggc cccgggtgt ccctgtcacg 14640
 tgtagggtga gtgaggcgc atccccgggt gtcctgtca cgttagggt gagtgaggcg 14700
 tggccccgg gtgtccctgt cccgtgcagg gtgagtgagg cactgtcccc ggggtccct 14760
 gtcacgtca gggtagtga ggcgcggcc cgggtgcc ctctcagggt tagggtgagt 14820
 gaggcgcggc cccagggtgt ccctgtcac gtagggtga gtgaggcacc gtcctgggt 14880
 gtccctcca ggtatagggt gagtgaggca ctgtccccg gtgtccctgt cacgtcagg 14940
 gtgagtgagg cgcggcccc ggggtccct ctcagggtca gggtagtga ggcgtgtcc 15000
 ctgggtgcc ctgtctctg tagggtgagt gaggctctgt cccagggt cttggcgtt 15060
 tgctcactg agcttctcc tgaatgtt ctcttctat agccacagct gcgccggtg 15120
 cccattgct gggtagatgg tgcaggcga gtgctgtcc ccaagcctat ctttctgat 15180
 gctcggctct tcttgtcac ctctccgtc catttgcta cggggacag ggactcagg 15240

ctctgcctc ccgctgccca ggactgcag ccacagcttc aggtccgctt gcctctgttg 15300

ggcctggctt gctaccacg tgcccaccac atgcatgctg ccaatactcc tctcccagct 15360

tgtctcatgc cgaggctgga ctctgggctg cctgtgtctg ctgccacgtg ttgctggaga 15420

catcccagaa agggttctct gtgcctgaa ggaaagcaag tcaccccagc cccctcactt 15480

gtcctgtttt ctccaagct gccctctgc ttggcccctt tgggtgggtg gcaacgcttg 15540

tcaccttatt ctgggacct gccgctcatt gcttaggctg ggctctgcct ccagtcgccc 15600

cctcacatgg attgacgtcc agccacaggt tggagtgtct ctgtctgtct cctgctctga 15660

gaccacgtg gagggccggt gtctccgca gccttcgtca gacttcctc ttgggtctta 15720

gtttgaatt tcactgattt acctctgacg tttctatctc tccattgtat gctttttctt 15780

ggtttattct ttattcctt tttagcttc ttagtttagt catgccttc cctctaagtg 15840

ctgccttacc tgcacctgt gttttgatgt gaagtaatct caacatcagc cactttcaag 15900

[0018] tgttctaaa atactcaaa gtgtaatac ttctttaag tattcttatt ctgtgatttt 15960

ttcttttg cagcgtgtgt ttgacgtga aatcattttg atatcagtga ctttaagta 16020

ttcttagct tattctgtga ttctttgag cagtgagta ttgaacct gtttatgttc 16080

aagatatga gtagtcaag atacgtagag tattttaagt tatcattta ttattgattt 16140

ctaactcagt tgtgtagtg tctgtataat accaattatt tgaagtttg ggagccttgc 16200

tttgatct agtgtgtgca tggttccag aactgtccat tgtaaattg acatcctgtc 16260

aatagtgggc atgcatgttc actatatcca gcttattaag gtccagtga aagcttctgt 16320

ctccttctag atgcatgaaa ttccaagaag gagccatag tccctcacct ggggatggg 16380

tctgttcatt tcttctggt tggtagcatt tatgtgaggc attgttaggt gcatgcacgt 16440

ggtagaattt ttatcttct gatgagtga tctttggag acttctatgt ctctagtaat 16500

ctagtaattc ttttttaaa ttgctcttag tactgccaca ctgggcttct tttgattagt 16560

atttcctgc tgtgtctgtt ttctgccttt aatttatata tatatatata ttttttttt 16620

ttttgagaca gagtcttggc ctgtcgccca gggtagtgc agtggtgtga tcacaggta 16680

gtgtaacttt taccttctgg cctgagccgt cctctcact cagcctcctg agtagctgga 16740

actgcagaca cgcaccgcta cacctggcta attttaaat tttttctgga gacagggtct 16800

tgctgtgtg cccaggctgg tctcaaactc ttggactcaa gggatccatc tacctcggt 16860

tcccaaagtg ctgaattaca ggcatgagcc accatgtctg gcctaatttt caacactttt 16920

atattcttat agtgtgggta tgcctgtta acagcatgta ggtgaatttc caatccagtc 16980

tgacagtctg tgtttaactg gataacctga tttattttca ttttttgc actagagacc 17040

cgctgtgtc actctgattc tccactgcc tgttgcatgt cctcgttccc ttgtttctca 17100

ccacctctg ggttgccatg tgcgtttcct gccgagtgtg tgtgatcct ctcgttgct 17160

cctggtcact gggcatttgc tttatttct ctttgcttag tgttaccctc tgatcttttt 17220

[0019] attgtcttg tttgctttg tttattgaga cagtctcact ctgtcaccca ggctggagtg 17280

taatggcaca atctcggctc actgcaacct ctgcctcctc ggttcaagca gttctcattc 17340

ctcaacctca tgagtagctg ggattacagg cgcccaccac cagcctggc taatttttgt 17400

attttagta gagataggct ttaccatgt tggccaggct ggtctcaaac tctgacctc 17460

aagtgatctg cccgccttgg cctcccacag tgctgggatt acaggtgcaa gccaccgtgc 17520

ccggcatacc ttgatctttt aaaatgaagt ctgaaacatt gctacccttg tctgagcaa 17580

taagaccctt agtgatattt agctctggcc acccccagc ctgtgtgctg tttccctgc 17640

tgacttagtt ctatctcagg catcttgaca cccccacaag ctaagcatta ttaatattgt 17700

ttccgtgtt gagtgtttct gtagctttgc ccccgccctg cttttcctcc tttgttccc 17760

gtctgtctt tgctcaggc ccgccgtctg gggctccctt cctgtcctt tgcgtggtc 17820

ttctgtctg ttattgctgg taaacccag ctttacctgt gctggcctcc atggcatcta 17880

gcgacgtccg gggacctctg cttatgatgc acagatgaag atgtggagac tcacgaggag 17940
 ggcggtcatc ttggcccgtg agtgtctgga gcaccacgtg gccagcgttc ctagccagt 18000
 gagtgcagc aacgtccgct cggcctgggt tcagcctgga aaaccccagg catgtcgggg 18060
 tctggtgct cgcgggtgc gagttgaaa tcgcaaac ctgcggtgtg gcgccagctc 18120
 tgacggtgct gcctggcggg ggagtgtctg cttcctcct tctgcttggg aaccaggaca 18180
 aaggatgagg ctccgagccg ttgtcggca acaggagcat gacgtgagcc atgtggataa 18240
 ttttaaatt tctaggctgg gcggtggc tcagcctgt aatcccagca ctttgggagg 18300
 ccaaggcggg tggatcacga ggtcaggagg tcgagacat cctggccaac atgatgaac 18360
 cccatctgta ctaaaacac aaaaattagc tgggcgtggt ggcggtgcc tgtaatcca 18420
 gctactcggg aggctgaggc aggagaattg cttgaacctg ggagttgaa gttgcagtga 18480
 gccgacattg caccactgca ctccagcctg gcaacacagc gagactctgt ctcaaaaaa 18540
 [0020] aaaaaaaaa aaaaaaaaa aattctagta gccacattaa aaaagtaaaa aagaaaaggt 18600
 gaaattaatg taataataga tttactgaa gccagcatg tccacacctc atcatttag 18660
 ggtgtattg gtgggagcat cactcacagg acattgaca tttttgagc tttgtctgcg 18720
 ggatcccgtg ttaggtccc gtgcgtggcc atctcggcct ggacctgctg ggcttccat 18780
 ggccatggct gttgtaccag atggtgcagg tccgggatga ggtgccagg ccctcagtga 18840
 gctggatgtg cagtgtccg atggtgcag tctgggatga ggtgccagg ccctgctgtg 18900
 agctggatgt gtggtgtctg gatggtgcag gtcaggggtg aggtctccag gcctcgtg 18960
 agctggaggt atggagtccg gatgatgcag gtccggggtg aggtgccag gcctgctgt 19020
 gagctggatg tgtggtgtct ggatggtgca ggtcaggggt gaggtctcca ggcctcgtg 19080
 aagctggagg tatggagtcc ggatgatgca ggtccggggt gaggtgccca ggcctgctg 19140
 tgagctggat gtgtggtgtc tggatggtgc aggtctgggg tgaggtcacc aggcctcgcg 19200

	gtgagctggg tgtgcggtgt ctggatggg caggtctgga gtgaggtcgc cagacggtgc	19260
	cagaccatgc ggtgagctgg atatgcggtg tccgatggg gcaggtctgg ggtgaggtg	19320
	ccaggccctg ctgtgagttg gatgtggggt gtccgatgc tgcaggtccg gtgtgaggtc	19380
	accaggccct gctgtgagct ggatgtgtgg tgtctggatg gtgcaggtct ggggtgaagg	19440
	tcgccaggcc cctgcttggt agctggatgt gtggtgtctg gatggtcag gtctggagtg	19500
	aggctgccag gccctcgggt agctggatgt gcagtgtcca gatggtcag gtccggggtg	19560
	aggctgccag accctcgggt gagctggatg tgcggtgtct ggatggtcga ggtctggagt	19620
	gaggtgccca gccctcgggt gagctggatg tatggagtcc ggatggtgcc ggtccggggt	19680
	gaggtgccca gaccctgctg tgagctggat gtgcggtgtc tggatggtac agtctggag	19740
	tgaggtgcc agaccctgct gtgagctgga tatcgggtgt ccgatgggtg caggtcaggg	19800
	gtgaggtctc caggccctcg gtgagctgga ggtatggagt ccgatgatg caggtccggg	19860
[0021]	gtgaggtcgc caggccctcg tgtgaactgg atgtcggcg tctggatggg gcaggtctgg	19920
	ggtgtggtcg ccaggccctc ggtgagctgg aggtatggag tccgatgat gcaggtccgg	19980
	ggtgaggtcg ccaggccctg ctgtgagctg gatgtcggc gtctggatgg tgcaggtctg	20040
	gggtgtggtc gccaggccct cggtgagctg gaggtatgga gtccgatga tgcaggtccg	20100
	gggtgaggtt gccaggccct gctgtgagct ggatgtgctg tatccgatg gtgcaggtccg	20160
	gggtgaggtc gccaggccct gctgtgagct ggatgtgctg tatccgatg gtgcaggtct	20220
	gggtgaggt caccaggccc tgcggtgagc tggttgtcgc gtgtccggtt gctcaggtc	20280
	cggggtgagt tcgccaggcc ctcggtgagc tggatgtcgc gtgtcccgtt gtccgatgg	20340
	tgcaggtcca ggtgaggtc gctaggccct tgggtggctg gatgtccgt gtccgatgg	20400
	tgcaggtctg ggtgaggtc gccaggccct tgggtgagct gatgtcgggt gctcatgg	20460
	tgcaggtctg ggtgaggtc gccaggccct tgggtggctg gatgtgtgt gtccgatgg	20520

	tgagggtccg gcgtgaggtc gccaggccct gctgtgagct ggatgtcgg tgctggatg	20580
	gtgcagggtcc ggggtgagg agccaaggcc ttcggtgagc tggatgtgg gtgtccgat	20640
	ggtgcaggtc cggggtgagg tcgccaggcc ctgcggttag ctggatatgc ggtgtccga	20700
	tggtgcaggc cggggtgag gtcaccaggc cctgcggtta gctggatgtg cggtgtctgg	20760
	atggtgcagg tccggggtga ggtcggcagg ccctgctgtg agctggatgt gctgtatccg	20820
	gatggtgcag gtccggggtg aggtcggcag gccctgcagt gagctggatg tgctgtatcc	20880
	ggatggtgca ggtctggcgt gaggtcgcca ggcctgcgg ttagctggat atcggtgtc	20940
	ggatggtgca ggtccggggt gaggtcacca ggcctgcgg ttagctggat gtgcggtgtc	21000
	cggatggtgc aggtctgggg tgaggctgcc aggccctgct gtgagctgga tgtgtgtat	21060
	ccgatgggtg cagggtccggg gtgaggctgc caggccctgc ggtgagctgg atgtgtgtg	21120
	tccgatggt gcaggctggt cgtgaggctg ccaggccctg cggtgagctg gatgtgcagt	21180
[0022]	gtacggatgg tgcagggtcc ggggtgaggtc gccaggccct gcggtgggct gtatgtgtg	21240
	tgctggatg gtgcagggtcc ggggtgagtt cgccaggccc tgcggtgagc tggatgtgtg	21300
	gtgtctggat gctgcaggtc cggggtgagt tcgccaggcc ctgcggtgagc tggatatgcg	21360
	gtgtccccgt gtccaatgg tgcagggtcca ggggtgagtc gccaggccct tgggtggctg	21420
	gatgtcccgt gtccggatgg tgcaggctg ggggtgagtc gccaggccct tgggtgagctg	21480
	gatgtcgggt gtccggatgg tgcagggtcc ggggtgagtc accaggccct cggtgatctg	21540
	gatgtggcat gtccttctg ttaaggggt tggctgtgtt ccggcccgag agcaccgtct	21600
	gcgtgaggag atcctggcca agttcctgca ctggctgatg agtgtgtacg tcgtcgagct	21660
	gctcaggctt ttctttatg tcacggagac cacgttcaa aagaacaggc tcttttcta	21720
	ccggaagagt gtctggagca agttgcaaag cattggaatc aggtactgta tccccagcc	21780
	aggcctctgc ttctgaagt cctggaacac cagcccggcc tcagcatgcg cctgtctca	21840

	cttgctgtg cttccctggc tgtgacgctc tgggctggga gccaggggcc ccgtcacagg	21900
	cctggccaa gtggattctg tgcaaggctc tgactgcctg gagctcacgt tctctactt	21960
	gtaaaatcag gaggttgtgc caagtgtct ctagggttg taaagcagaa gggatttaa	22020
	ttagatgaa aactaccac tagcctcctt gccttccct gggatgtgg tctgattctc	22080
	tctctttt tttttctt tttgatgg agtctcactc tttgcccag gctggagtgc	22140
	agtggcataa tcttgctca ctgcaacctc cacctcctgg gttaagcga ttcaccagcc	22200
	tcagcctct aagtagctgg gattacaggc acctgccacc acgcttgct aattttgta	22260
	cttttaggag agacggggtt tcaccatgtt ggccaggctg gtctgaact catgacctca	22320
	ggtgatccac ccacctggc ctccaaaagt gctgggtta caggctaagc caccgtgcc	22380
	agccccgat tctttttaa ttcagtctg tctgatgaa tctcaatct attgattta	22440
[0023]	ggtcatgaga ggataaatc ccaccactt ggcgactcac tgcaggagc acctgtcag	22500
	ggagcacctg gggataggag agttcacca tgagctaact tctaggtggc tgcattgaa	22560
	tggctgtgag atttgtctg caatgtcgg ctgatgagag tgtgagattg tgacagattc	22620
	aagctggatt tgcacagtg agggacggga gcgctgtct gggagatgcc agcctggctg	22680
	agcccaggcc atgtattag ctctccgtg tcccggcag gctgacttg gagggctta	22740
	gtcagaagat cagggttcc ccagctccc tgacactcg agtcctggg gggccttg	22800
	acccccatg ccccaaatca ggatgtctg agaggagct ggcagcagac ctctcagag	22860
	gtaacacagc ctctgggctg gggacccga ctgtgtctg gggcatttc ctgcatctg	22920
	ggggagggtc agggcttcc ctgtggaac aagtaatac acaatgcacc ttacttagac	22980
	tttacacgta ttaatggg tgccaccaa catggtcatt tgaccagtat tttgaaaga	23040
	athtaattgg ggtgaccga aggagcagac agacgtgtg gtcccaaga tgctcctgt	23100
	cactactggg actgtgttc tgctggggg gcctggagg ccctcctcc ctggacagg	23160

	taccgtgctt ttttactct gctgggcctg cggcctgcgg tcagggcacc agctccggag	23220
	cacccgcggc ccagtgctc acggagtgc aggctgtcag ccacagatgc ccaggtccag	23280
	gtgtggccgc tccagcccc gtgccccat ggggtggttt gggggaaaag gccaaaggca	23340
	gagtgctcag gagactggtg ggctcatgag agctgattct gtccttggc tgagctgccc	23400
	tgagcagcct ctccccct ctccatctga agggatgtgg ctctttctac ctgggggtcc	23460
	tgctggggc cagccttggg ctaccccagt ggctgtacca gagggacagg catcctgtgt	23520
	ggaggggcat gggttcacgt ggccccagat gcagcctggg accaggctcc ctggtgctga	23580
	tggtgggaca gtcaccctgg gggttgaccg ccggactggg cgtccccagg gttgactata	23640
	ggaccaggtg tccaggtgcc ctgcaagtag aggggctctc agaggcgtct ggctggcatg	23700
	ggtgacgtg gccccggca tggccttcag cgtgtgctgc cgtgggtgcc ctgagccctc	23760
	actgagtcgg tgggggcttg tggcttccc tgagcttccc cctagtctgt tgtctggctg	23820
[0024]	agcaagcctc ctgaggggct ctctattgca gacagcactt gaagagggtg cagctgcggg	23880
	agctgtcggg agcagaggtc aggcagcatc gggaagccag gcccgcctg ctgacgtcca	23940
	gactccgctt catccccag cctgacgggc tgcggccgat tgtgaacatg gactacgtcg	24000
	tgggagccag aacgttccgc agagaaaaga ggggtgctgt gctttggtt aactccttt	24060
	ttaaacagaa gtgcgttga gccccacatt tggatcagc ttagatgaag gccccggagg	24120
	aggggccacg ggacacagcc agggccatgg cacggcgcca acccattgt gcgcacagtg	24180
	aggtggccga ggtgccggtg cctccagaaa agcagcgtgg ggggttaggg ggagctcctg	24240
	gggcaggac aggctctgag gaccacaaga agcagccggg ccagggcctg gatgcagcac	24300
	gccccaggt cctggatccg tgcctgctg tggtcgcag cctccgtgcg cttccgctta	24360
	cggggcccgg ggaccaggcc acgactcca ggagcccacc gggctctgag gatcctggac	24420
	cttccccac ggctcctgca cccaccct gtggctgcgg tggctcggt gacccctca	24480

tctgaggaga gtgtggggtg aggtggacag aggtgtggca tgaggatccc gtgtgcaaca	24540
cacatgcggc caggaacccg ttcaaacag ggtctgagga agctgggagg ggttctaggt	24600
cccgggtctg gttggctggg gacactgggg aggggctgct tctcccctgg gtcctatgg	24660
tggggtgggc acttgccgg atccacttc ctgactgtct cccatgctgt ccccgccagg	24720
ccgagcgtct cacctcgagg gtgaaggcac tgttcagcgt gctcaactac gagcgggcgc	24780
ggcccccgg cctcctgggc gcctctgtgc tggcctgga cgatatccac aggcctggc	24840
gcaccttctg gctcgtgtg cgggccagg acccggcc tgagctgtac tttgcaagg	24900
tgggtgccgg ggacccccgt gagcagcctt gctggacctt gggagtggct gcctgattg	24960
cacctcatgt tgggtggagg aggtactcct ggtgggccc cagggagtgc aggtgacct	25020
gtcactgttg aggacacacc tggcacctag ggtggaggcc ttcagccttt cctgcagcac	25080
atggggccga ctgtgaccc tgactgccc ggctcctatt cccaaggagg gtcccactgg	25140
[0025] attccagttt ccgtcagaga aggaaccgca acggctcagc caccaggccc cggtccttg	25200
caccccagtc ctgagccagg ggtctcctgt cctgaggctc agagagggga cacagcccgc	25260
cctgcccttg gggctggag tgggtggggt cagagagaga gtgggggaca ccgccaggcc	25320
aggccctgag ggcagagggt atgtctgagt ttctcgtgg cactgtcag tctctgcc	25380
tccactcaca caggtgatg tgacgggcgc gtacgacacc atccccagg acaggctcac	25440
ggaggtcadc gccagcatca tcaaaccaca gaacacgtac tgcgtcgtc ggtatgccgt	25500
ggtccagaag gcccccattg ggcacgtccg caaggcctc aagagccacg taagttcac	25560
gtgtgatagt cgtgtccagg atgtgtgtct ctgggatag aatgtgtcta gaatcagtc	25620
gtgtctgta tgcgtttctg tgggtggagg acttccatga ttacacatc tgtgatatgc	25680
gtgtgtggca cgtgtgtgc gtggtgatg tatctgtggc gtgcatatt gtggtgtg	25740
tgtgtgtggc acgtgtgtgt ccatggtgtg tgtcctgtg gtgtgatgt gtgtgtgtct	25800

	gtgacacgtg catgttcatg ctgtgtgctg catgtctgtg atgtgcctat ttgtggtgtg	25860
	tgtgtgcatg tgtccgtgac atatgcgtgt ctatggcatg ggtgtgtgtg gcccttggc	25920
	cttactcctt cctcctccag gcatggtccg caccattgtc ctcacgtctt cgggtgctgg	25980
	ttggggagc tccacattca gggcctcac ttctagcatg ggtgccctg tcctgtcaca	26040
	gggctgggcc ttggagactg taagccaggt ttgagaggag agtagggatg ctggtgtac	26100
	cttctggac ccctggcacc cccaggacc cagtctggcc tatgccggt ccatgagata	26160
	taggaaggct gattcaggcc tcgctcccc ggacacactc ctcccagagc ggccggggc	26220
	cttggggctc ggcaggggtg aaaggggcc tggccttggg ttcccacca gtggtcatga	26280
	gcacgtgga ggggtaagcc ctcaaagtc tgccaggccg ggggtcagag gtgaagaagt	26340
	atccctggag cttcggctg gggagaggca catgtggaaa cccacaagga cctctttctc	26400
[0026]	tgacttctg agcttgtggg attggtttc atgtgtggga taggtggga tctgtggat	26460
	tggttttat gagtgggta acacagagtt caaggcgagc tttctctg tagtgggtct	26520
	gcaggtgctc caacagcttt attgaggaga ccatatctc cttgaacta tggctgggt	26580
	tatagtaagt caggggtgtg gaggcctccc ctgggctccc tgttctgtt cttcactct	26640
	ggggtcgtg ggtgcctgct gtgtgtgtg gccggtggc agggctcca ggcctcctg	26700
	tgttcattg cctggatgtg gccctggcta cgctccgtc ttggaattc cctgcgagt	26760
	ggaggcttc tttcttctt ttttcttc tttttttt ttttgataa cagagtctg	26820
	ctctttttg cccaggctgg agtggtttg cgtgatctg gctcactgca acctgtgctt	26880
	cctgagtca agcaattctc ttgcctcagc ctccaagta gctggaatta taggcgcca	26940
	ccaccatgct gactaatttt tgtaattta gtagagacga gtttctcca tgtggccag	27000
	gctgtctcg aactcctgac ctcaggtgat cctccacct cggcctcca aagtgtggg	27060
	atgacagtg tgaaccgcc cgccggccg agactcgctt cctgcagctt cgtgagatc	27120

tgacgcgata gctgcctgca gccttggtgc tgacaacctc cgttttcctt ctccaggtct 27180

cgctaggggt cttccattt catgactctc ttacagaag agtttcacgt gtgctgatt 27240

cccggctgtt tcctgcgtaa ttggtgtctg ctgtttatcg atggcctcct tccatttct 27300

ttaggctttg tttattgtg ttttccggc tcctgaagg aaaagttcg attatgatg 27360

ttgaacttt cttttctaaa caagcatctg aagttgccgt tttccctcta aagcaggat 27420

cccaggccc ctggctgtgg agtggcaccg gtctggggcc tgtaggaac ccggcgaca 27480

gcgggaggct aggtgggggt tggggagcca gcgttcccgc ctgagcccc ccctctcag 27540

atcagcagtg gcatgcggtg ctgagggcg cacacacct actgagaact gtgcgtgaga 27600

gggtctaga ttctgtctc cttatgggaa tctaatacct gatgatctga ggtggaaccg 27660

ttgtctcca aaaccatccc cttcccact gctgtcctgt ggaaaaatcg tcttcacga 27720

aaccagtccc tggaccaca atggtgggg accctgtgct aaagacctgc ttcagcagcc 27780

[0027] tctcgtcagt gttgatata tggcttttct gtgttgagtc cagaataatt acggatttct 27840

gtgatgctt cggccgacct cagacctatg ggctatttgt gggcgtgtg cctgctcctg 27900

ggttgggaag ggtgcaggcc ccatgtacct tcctgttact gcctccagg ttggttctca 27960

gggtgaatc gtactcgatg tggtttagc ccacggcct gccgccagct cctgggggct 28020

ggggaacatg ctgaagcaca gagtaccctg gcgcgtctt tgatgcctca caagctcgag 28080

gcctcctgtg tccgtttag tgtgtgtcac gtgcctgctc acatcctgtc ttggggacgc 28140

aggggcttag caggtcccgt agtaaagac aagcgtcctg ggggagtctg cagaatagga 28200

ggtgggggtg ccggtctctc tcccgcgtct tcagactctt ctctgcctg tgctgtggct 28260

gcacctgcat cctgcaatc cctccagcac tgggctggag aggcccggga gctcgagtgc 28320

cacttgcc acgtgactgt ggatggcagt cggcacggg ggtctgatgt gtggtgactg 28380

tggatggcgg ttggtcacag gggctgatg tgtggtgact tggatggcg gtcgtgggt 28440

	ctgatgtggt gactgtggat ggcggctcgtg gggctctgatg tgtggtgact gtggatggcg	28500
	gtcgtggggt ctgatgtggt gactgtggat ggcggctcgtg gggctctgatg tgggtactgt	28560
	ggatggcggg cgtggggctct gatgtggtga ctgtggatgg cagtcgtggg gtctgatgtg	28620
	tgggtactgt ggatggcggg cgtggggctct gatgtggtga ctgtggatgg cagtcgtggg	28680
	gtctgatgtg tgggtactgt ggatggcggg cgtggggctct gatgtggtg gactgtggat	28740
	ggcggctcgtg gggctctgatg tgtggtgact gtggatggcg gtcgtggggt ctgatgtgtg	28800
	gtgactgtgg atggcggctc tggggctcga tgtggtgact gtggatggcg gtcgtggggt	28860
	ctgatgtgtg gtgactgtgg atgggtgatcg gtcacagggg tctgatgtgt ggtgactgtg	28920
	gatggcggtc gtggggctctg atgtgtggtg actgtggatg gtgatcggtc acaggggtct	28980
	gatgtgtggt gactgtggat ggcggctcgtg gggctctgatg tgtggtgact gtggatggcg	29040
	gttggtcccg ggggtctgat gtgtggtgac tgtggatggc gatcgggtcac aggggtctga	29100
[0028]	tgtgtggtga ctgtggatgg cggtcgtggg gtctgatgtg tgggtactgt ggatggcggg	29160
	cgtggggctct gatgtgtggt gactgtggat ggcggctcgtg gggctctgatg tgggtactgt	29220
	ggatggcggg cgtggggctct gatgtggtga ctgtggatgg cggtcgtggg gtctgatgtg	29280
	tgggtactgt ggatggcggg tggccccggg ggtctgatgt gtggtgactg tggatggcgg	29340
	tcgtggggtc tgatgtggtg actgtggatg gcagtcgtgg ggtctgatgt gtggtgactg	29400
	tggatggcgg tcgtggggtc tgatgtggtg tgacttgga tggcggctct ggggtctgat	29460
	gtgtggtgac tgtggatggc ggtcgtgggg tctgatgtgt ggtgactgtg gatggcggtc	29520
	gtggggctctg atgtggtgac tgtggatggc ggtcgtgggg tctgatgtgt ggtgactgtg	29580
	gatggtgatc ggtcacaggg gtctgatgtg tgggtactgt ggatggcggg cgtggggctct	29640
	gatgtgtggt gactgtggat ggcggctcgtg gggctctgatg tgggtactgt ggatggcggg	29700
	cgtggggctct gatgtgtggt gactgtggat ggcggctcgtg gggctctgatg tgtggtgact	29760

gtggatggca gtcggtcaca ggggtctgat gtgtggtgac tgggatggc ggtcgtgggg 29820
 tctgatgtgt ggtgactgtg gatggcggtc gtggggtctg atgtgtggtg actgtggatg 29880
 gcggtcgtgg ggtctgatgt gtggtgactg tggatggcgg tcgtggggtc tgatgtggtg 29940
 actgtggatg gtgatcggtc acaggggtct gatgtgtggt agctgcaggt ggagtcccag 30000
 gtgtgtctgt agctactttg cgtcctcggc cccccggccc ccgtttcca aacagaagct 30060
 tcccaggcgc tctctgggct tcatcccgc atcgggcttg gccgcaggtc cacactctct 30120
 gatcgaaga aacaagtgcc cagctctggc cggggcaggc cacatttgtg gctcatgccc 30180
 tctcctctgc cggcaggctc ctacctgac agacctccag ccgtacatgc gacagttcgt 30240
 ggctcacctg caggagacca gcccgtgag ggatgccgtc gtcacgagc aggtctgggc 30300
 actgccctgc agggttgggc acggactccc agcagtgggt cctcccctgg gcaatcactg 30360
 ggctcatgac cggacagact gttggcctg gggggcagtg gggggaatga gctgtgatgg 30420
 [0029] gggcatgatg agctgtgtgc cttggcgaaa tctgagctgg gccatgccag gctgcgacag 30480
 ctgctgatt caggcacctg ctacgtttg actgcgaggc ctctctccag ttccgactg 30540
 cttttgtca tgatttgcta aatgtcttct ctgccagttt tgatcttgag gccaaaggaa 30600
 aggtgtcccc ctctttagg agggcaggcc atgtttgagc cgtgtcctgc ccagctggcc 30660
 cctcagtgt gggctgagg ccaaaggaaa cgtgtcccc ttctaggag gacgggacct 30720
 gtttgagcca cggccgctg agcgggcctc tcagtgtggt gtctgtccac gtggccctgt 30780
 gggcctttg agatgtggtc tgtccactg gccctgtggt tctttgcaga tgcctgtag 30840
 cacttgctg gctctagggg acagtgtgt ccaccgatg aggctcagag acctctgggc 30900
 gaatttcctt ggctcccagg gtgggggtgg aggtggcctg ggctgctggg acccagacct 30960
 tgtccccgc agctgggcag caactcctgg atcacatag ccatccgggc cacggtgggc 31020
 tgttgggtg tgagcccagc tggaccaca ggtggcccag aggagacgtt ctgtgcaca 31080

cactctgcct aagcccatgt gtgtctgcag agactcggcc cggccagccc acgatggccc 31140

tgattccag cccagccccg cacttcatca caaacactga ccccaaaagg gacggagggt 31200

cttggccacg tggctctgcc tgtctcagca cccaccggct cactcccatg tgtctcccgt 31260

ctgctttcgc agagctctc cctgaatgag gccagcagtg gcctcttca cgtcttcta 31320

cgcttcatgt gccaccacgc cgtgcgcatc aggggcaagt gaggcagtg gccagtgcc 31380

attgccctgc ggggtgctgg gcgggctggc agggcttctg ctacctctc tcctgccct 31440

tccccactgn cttctgccc ggggccacca gagtctctt ttctggcccc cgccccctc 31500

ggctctggg ctgcaggctc ccgaggcccc gaaacatgg ctggcttgc ggcagccgga 31560

gcgagcagg tgccacacga ggcctgaaa tggcaagcgg ggtgtggagt tgctctgcg 31620

tggaggacga ggggcggggg gtgtgtctgg gtcaggttg cgcgagcgt ttgagcctgc 31680

agcttgcag ctccaagta ctactgacgc tggacaccg gctctcacac gcttctatct 31740

[0030] ctctccccg atacaaaagg atttatccg attctattc ctgtccctgt cgttgaccc 31800

cccgagggc gcggctctt ctctctgta ctagattcc catctgaaa gtgcggggtt 31860

gaccgttag ttgtctctc tcggggggcc tgtgtggcc atggggcagg cggcctggga 31920

gagctgccgt cacacagcca ctgggtgagc cacactcac gtgtagagc cacagtcct 31980

ggtgccacat cacgtctct ggatttaag taaaaccaca cacctcccgg caggcatctg 32040

cctgcgacc tgtgtgtgcc tggggagagt gtagcacgg aggaaattc tgacactca 32100

aggctatcag caaggtcatc cgcagtcagg tggaaactgg aggcctctct ctggatcgt 32160

ctccagcga taaaggactg tgacagctt cggaagctt tatttaaaaa tataactatt 32220

aattattgca ttataagtaa tcactaatg tatcagcaat tataatatt attaaagtat 32280

aattagaat attaatgt acacacgttc tggaaaaaca caaattgcac atggcagcag 32340

agtgaattt ggccgaggga cacgtgtgca catgtgtgta agcggcccc aggccacag 32400

	aattcgctga caaagtcacc tccccagaga agccaccacg ggcctccttc gtggctgta	32460
	atattattaa gatggatcaa gtcacgtacc gtccacgtgt ggcagggctt tggggaatgt	32520
	gaggtgatga ctgcgtcctc atgcctgac agacaggagg tgactgtgtc tgcctgtcc	32580
	ctaggacacg gacaggcccc aagctctagt ccccatcgtg gtccagttg gcctctgaat	32640
	aaaaacgtct tcaaaacctg ttgccccaaa aactaagaac agagagagtt tcccatcca	32700
	tgtgctcaca ggggcgtatc tgcttgcgtt gactcgtgg gctggccgga ctctagagt	32760
	tggtgcgtgt gcttctgtgc aaaaagtca gtcctctgc ccatcactgt gatatctga	32820
	ccagcaagga aagcctcttt tctttcttt ctttttttt tttgagacg gaacgtcact	32880
	ggtgtctgcc tgggcttgag tgcagtggcg cgatctcaac tcaactgcaac ctccgcctcc	32940
	cgggttccag catttctct gcctcagcct cccgagcagc tgagattaca ggcaccacc	33000
	ccctgcgct ggctaatttt tgtattttta gtagagaggg gttttgcca tgttgccag	33060
[0031]	gctgtctcg aactcctgac ctacagtgat ccaccacct cggcctcca aagtgtggg	33120
	attacaggtg tgagccatca cgcccagccg gaaagcctct ttttaagtg accacctata	33180
	gcgctcccg aaaataacag gtctgtttt tgcaagcgtc tcttagcaac	33240
	aggagtggcg tcctgtgggc tctgggatg gctgagggtc gcgtggcagc catgcctct	33300
	gtgtgcacct ttaggtcca cggggctatt ctgctctac tgtttgtctg aaaacgcacc	33360
	ctggcatcc ttgttgag agtttctgct tctcgttgg catgctgaaa ctaggggcaa	33420
	ggtgtatcc gttggcgcgc agcggctaca tgtaggtca tgagtcttc accgtggaca	33480
	aattcctga aaaaaaaaa aggagtccgg ttaagcattc attccgggtc aagtgtctgg	33540
	ttctgtaat aaactctaag atttaagaaa ccttaatgaa agaaaacctt gatgattcag	33600
	agcaaggatg tggcacacc tgtggctgga tctgtttcag ccgccagc gcatggtgag	33660
	agtggggagc agggattgt ttgtcagagg tctcatctgg tatgtttctg aggtgtttgc	33720

	cggctgaatg gtagacgtgt cgtttgtgtg tatgaggttc tgtgtctgtg tgtggctcgg	33780
	tttgagtga cgcatgtcca gcacatgccc tgcccgtctc tcacctgtgt cttcccgcc	33840
	caggtcctac gtccagtgcc aggggatccc gcagggtccc atcctctcca cgctgctctg	33900
	cagcctgtgc tacggcgaca tggagaacaa gctgtttgcg gggattcggc gggacgggtg	33960
	aggcctctc tccccaggg gggcttgggt gggggtgat ttgctttga tgcattcagt	34020
	gttaatattc ctggtctct ggagaccatg actgctctgt cttgaggaac cagacaaggt	34080
	tgcagcccct tcttggtatg aagccgcacg ggaggggttg cacagcctga ggactgcggg	34140
	ctccacgcag gctctgtcca gggccatgt ccagaggcct cagggtcag caggcgggag	34200
	ggccgctgcc ctgcatgatg agcatgtgaa ttcaacaccg aggaagcaca ccagcttctg	34260
	tcacgtcacc caggttccgt tagggtcctt ggggagatgg ggctggtgca gcctgaggcc	34320
	ccacatctcc cagcaggccc tcgacaggtg gcctggactg ggcgcctctt cagcccattg	34380
[0032]	cccatccac ttgcatgggg tctacacca aggacgcaca cacctaaata tcgtgccaac	34440
	ctaattggt tcaactcagc tggctttat tgacagcagt tactttttt ttttaatac	34500
	tttaagtct aggttacatg tgcacgacgt gcaggttagt tacatatgta tacatgtgcc	34560
	atgttggtg gctgcacca ttaactcatc attacatta ggtatatctc ctaatgctat	34620
	ccctccccc tcccccatc ccatgacagg ccctggtgtg tgatgtccc caccctgtgt	34680
	ccaagtgtc tcattgttca gttccacct gtgagtgaga acatgtggtg tttggtttc	34740
	tttcttgca atagtttct cagagtgatg gttccagct tcgtcatgt ccctacaaag	34800
	gacatgaact catcctttt tatgactgca tagtattccg tgggtatat gtccacatt	34860
	ttctaatcc agtctatcat cgatggacat ttgggttgg tgcaagtctt tgctactgtg	34920
	aatagtccg caataaacat acgtgtgcat gtgtctttat agcagcatga ttataatcc	34980
	ttgggtata taccagtaa tgggatggct gggcaaatg gtatttctag ttctagatcc	35040

ttgaggaatc accacactgt cttccacaat ggttgaacta gtttacactc ccaccaacag 35100

tgtaaaagtg ttctggtgct ggagaggatg tggacagcag ttatTTTTT atgaaaatag 35160

tatcactgaa caagcagaca gttagtgaag gatgcgtcag gaagcctgca ggccacacag 35220

ccatttctct cgaagactcc gggttttcc tgtgcatctt ttgaaactct agctccaatt 35280

atagcatgta cagtggatca aggttcttct tcattaaggt tcaagttcta gattgaaata 35340

agtttatgta acagaaacaa aaatttcttg tacacacaac ttgctctggg attggagga 35400

aagtgcctc gagctggcgg cacactggtc agccctctgg gacaggatac ctctggccca 35460

tgtcatggg gcgctgggct tggcctgag ggtcacacag tgcacatgc ccagcttct 35520

gtggatagga tctgggtctc ggatcatgct gaggaccaca gctgcatgc tggtaaagg 35580

caccacgtgg ctcagagggg gcgaggttcc cagccccagc tttctaccg tcttcagta 35640

ttttcccta agagtctgag aagtggggcc gcgctgatg gccttcgtc gtcttcagct 35700

[0033] ggacacagaat tgcaagct gatgtaaac actgagtact tataatgaat gaggaattgc 35760

tgtagcagtt aactgtagag agctcgtctg ttgaaagaa attaagttt tcatttaac 35820

cgcttgag aatgttactt tatttatggc tegttaaatt gttgacatt cagtcctcg 35880

tagacagata ctacgtaaaa agttaaagt taacctgct gtgtatttc cttattta 35940

ggctgctct gcgttggtg gatgattct tttggtgac acctcacctc acccagcga 36000

aaaccttct caggtgaggc ccgtgccgtg tgtctgtggg gacctcaca gcctgtggc 36060

ttgcagtg agccccctg gtctgccc tggcaccgca gcgtgtctc tgccaagtcc 36120

tctctctg ccggtgctgg atccgcaaga gcagaggcgc ttggcctgc acccagcct 36180

ggggcgag gggcacctc gggagggagt ggtaccgtg caggcctgg tctgcagag 36240

acgcaccag gttacacag tggtagtgc aggcgtgac ctggctcctg ctgctttg 36300

gaaagtcaag agtggcggct cctggggccc cagtgagacc cccaggagct gtgcacagg 36360

	cctgcagggc cgaggcggca gcctcctccc cagggtgcac ctgagcctgc ggagagcagg	36420
	agctgctgag tgagctggcc cacagcgttc gctcgggtca cgttcctgcg tggggttgtt	36480
	tgggatcggg gggagaattt ggatttgctg agtgcctgctg tcttgaacca cggagatggc	36540
	taggagtggg tttcagagtt gatttttgtg aatcaaaacta aaatcaggca caggggacct	36600
	ggcctcagca caggggattg tccaatgtgg tccccctcaa gggcgcccca cagagccggt	36660
	gggcttgttt taaagtgcga ttgacgagg gacgagaaac cttgaaagct gtaaagggaa	36720
	ccctcagaaa atgtggccgc caggggtggt ttcaggtgct ttgctgggct gtgtttgtga	36780
	aaaccattt ggaccgccc tccaagtcca ccctccaggt ccaccctca gggccgcctt	36840
	gggctggggg tatgctggc gttccttgag ccgagcccg gagcacagca ggctgtgcac	36900
	atttaaactc actaagattc actcgggggg agcccaggtc ccaagcaact gagggctcag	36960
[0034]	gagtctgag gctgctgagg ggacagagca gacggggaac gctgcttctg tgtggcaagt	37020
	tcctgaggt gctggccagg gaggtggctc agagtgtatg ttgggtccc accgggggca	37080
	gaactctgtc tctgatgagt cggcagccat gtaacaggaa ggggtggcca cagggagctg	37140
	ggaatgcacc aggggagctg cgcagctggc cgaggtccca gggccaggcc acaggaaggg	37200
	cagggggacg cccggggcca cagcagaggc cgcaggaagg gaaggggatg cccaggccag	37260
	agcagaggct accgggcaca ggggggctcc ctgagctggg tgagcgaggc tcatgactcg	37320
	gcgagggaa ctccttgacg tgaagctgac gactggtgtt gccagctca cagcccagcc	37380
	aggtcccgcg cctgagcagg aactcagaac cctcccctt gtctaaagca cagcagatgc	37440
	cttcagggca tctaggagaa aacaggcaaa gtcgttgaga aacgtcttaa aagaaggtgg	37500
	gatggtggca atttctgtc cagatttag tctgccccg accacagatg agtctataac	37560
	gggattgtgg tgttccatg gggacacatg agatggacca tcacagaggc cactggggct	37620
	gcacctcca tctgagtctt ggctgtccc ggtccaggcc aggttcttgc atgctcacct	37680

acctgtcctg cccgggagac agggaaagca ccccgaagtc tggagcaggg ctgggtccag 37740
 gctcctcaga gctcctgcc ggcccagcac cctgtccaa atcaccactt ctctggggtt 37800
 ttccaaagca ttaacaagg gtgtcaggtt acctctggg tgacggcccc gcatcctggg 37860
 gctgacattg cccctctgcc ttaggacct ggtccgaggt gtcctgagt atggctcgt 37920
 ggtgaacttg cggaagacag tggtaactt ccctgtagaa gacgaggccc tgggtggcac 37980
 ggcttttgtt cagatgccgg cccacggcct attcccctgg tgcggcctgc tgctggatac 38040
 ccggacctg gaggtgcaga gcgactactc caggtgagcg cacctggccg gaagtggagc 38100
 ctgtgcccg ctggggcagg tgctgtgca gggccgttgc gtccacctt gcttccgtt 38160
 ggggcaggcg actgccaatc ccaaagggtc agaggccaca ggggtcccct cgtcccatct 38220
 ggggctgagc agaaatgcat tttctgtgg gagtgagggt gtcacaacg ggagcagttt 38280
 tctgtctat tttgtaaaa ggaatgggt caccagacct gggtgactg aggtgtctt 38340
 [0035] agaaagcagt ctggatcca acccaagacg cccgggccct gctgggcgtg agtctctcaa 38400
 accgaacac aggggccctg ctgggatga gtcctctga acccgagacc ctggggccct 38460
 gctgggcgtg agtctctccg aaccagaga cttcagggcc cttttggcg tgagtctct 38520
 cgctgtgagc cccactcc aaggctcatc cacagtctac aggatgcat gattcatga 38580
 tcacgtgta cccatcaggg gacaggcca tgggtgggg ggggtctcta caaaattctg 38640
 gggctttgt tccccagagc ccgagagctc aaggccccgt ctcaggctca gacacaaatg 38700
 aattgaagat ggacacagat gcagaaatct gtgctgttc tttatgaat aaaaagtatc 38760
 aacattccag gcagggcaag gtggctcaca cctataatcc cagcactttg ggaggccgag 38820
 gtgggtggat cacttgaggc caggagttg aggccaacct aaccaacata gtgaaattcc 38880
 atttctact aaaaaatata aaaattagcc tggcctggtg gcacacgct gtatccccg 38940
 ctatcgggga ggctgaggca ggagaatcat ttgaaccag gaggcagagg ttgagtgag 39000

ccgagatcac accactgcac tccagcctgg gcaacagagt gagacttcat cttaaaaaa 39060

aaaaaaaaag tatcagcatt ccaaaccat agtggacagg tgtttttta ttctgcctt 39120

cgataatatt tactggtgct gtgctagagg ccggaactgg gggtgccttc ctctgaaagg 39180

cacacctca tgggaagaga aataagtgt gaatggtgt taaaccagag gtttaaactg 39240

gggtcctgct gttctgagtt aacagtccag atctggactt tgcctcttc cagaatgctc 39300

cctggggttt gcttcatggg ggagcagcag gtgtggacac cctcgtgatg ggggagcagc 39360

agggtcagac gccctcatga tgggggagtg gcaggtgcag acacccttg gcatggtgcc 39420

cagcatgtcc ctgttcagc tcctccca caaggatgcc ggtctcctgt gctccccaca 39480

gtcctgctt cccttcaca gccttacctg gtctggcct cactggctt tgtctcatg 39540

attccacat ttctgggct cccagcacct cttgcctct cccaggcacc tctcagtgct 39600

tggccatacc agtcagctgt gaactgtcca ctgcttatt tgctcccat gaaatgtatt 39660

[0036] ttttaggaca ggcacccctg gttccagcct ctggcacagc atcagtgaat gttattgaag 39720

gacaaaggac agacaaaca atcaggaaaa tgggttctct ctaaaccat tgcaaagcca 39780

cagaggctag tgcaggatgg gtggcatca ggcatcaga tgtgggtcca atgccagaat 39840

attctgtgct ccaaaggcc acttggcag agtgtgtgct tgcagaggtg gctctaaaag 39900

ctcagcagtg gaggcagtgg ttcgccatac tcagggtgaa ctacatcct ctgtgtctga 39960

agtatacagc agaggctga agggcatctg ggagaagaaa acaggcaaaa tgattaagaa 40020

aagtgaaaa ggaaaagtgg taagatggga attttctgt ccagattta gctcccaaa 40080

ccacagctca gatggtagaa tgtggtcaga actgatggac agaacaatag aacaaaacgg 40140

aagccctatc tctcagaaac gtgtgtaat gtggtatgt gcacagctga tggaaaagag 40200

agtgtgtgtg taatttttt ttctgagaaa actgactgga agcaataag ttgtgtctt 40260

acagcatata ccagagcaga ttctaggtag aagaggagac acatgcaaac aacaccagca 40320

acagaaataa aacaaaagac tcaaagggaa gggagggtgaa cgttccctgg tttggtgtg 40380

gggaaggaca cacaggagg cggatgaaac cagtgaggca acgggcattg ctttcactgc 40440

agagaaactc agcttgctg agccacagtg aaaatggcca ttcctggag cgtttgtgca 40500

cgatgattat ttaagggcc ctgtgaggtc ctgcacattc atcctctcac tttgttctcc 40560

taaccacctg agaggtagag gaggaaaggc tccaggggag cagccgcct tggtcaccca 40620

gctggcaaag ggcattgatg attgcagcct ggcctctgc tccggggccc ttgctctgcc 40680

cgaggacccc acacaagtca gaccatagg ctgagggtga gccggagccc aaggtcgtgt 40740

tgggatggc tgtgaaagaa gaaatggacg tctgatgcac acttgggaag gtcctaccag 40800

cagcgtcaaa gaaatgatg tgaactgac agcgagacc atcctcaaa gaaacgcagc 40860

tgaactgat ggcgagacct gtcccatcc ctcatgctgg ctcttttct gggcttgcca 40920

agagccagca tcaggttgag gcaagctgga aagactttc tggaaagcag cttgtttgca 40980

[0037] tggaaagtct cacaatgtcc tgtgtctcc cagtaattc acttctgaag tgaccagaca 41040

ttatcacggg tcttattac catttccagt gttccaggca gggggactg ccacagcaag 41100

tcacgaacct gcccaaatac agggctaagg agatattatg catcacaaa cttgctctgc 41160

cattaaacat tttcaaaga attttgaag aatgttaat gcacaaaac gtttattca 41220

atgtagcagt gttcaaagct ggatgtaaaa gaacacacc caggagcctg ccgtgaatgt 41280

catgtgtgtt catcttggga catggacata catgggcagt gagggtggt gaggccctgg 41340

aggacatcgg tgggatgcct ccatcctgcc cctctggaga caccatgtgt gccacgtgca 41400

ctcactggag ccctgtttag ctggtgccac ctggctcttc catcctgag attcaaacac 41460

agtgagattc cccacgcca actcagtgtt ctcccacaaa aaacctgagt cacacctgtg 41520

ttcactcgag ggacgcccgg gagccagggc tccacagttt attatgttt tttgctgag 41580

ttatgtgcag atctcatcag ggcagatgat gaggcaciaa acacggcctg gcgaggttg 41640

gatacactca acatcactag ccaggtcctg gtggagtttg gtcattgaga gtctggatgg 41700

catgtagcat ttggagtcca tggagtgagc acccagcccc ctgggctgc agcgcattgc 41760

ccaggcagga caaggaagcg ggaggaaggc aggaggctct ttggagcaag ctttcagga 41820

ggggctggg tgggggag gcacctgtgt ctgacattcc ccctgtgtc tcagctatgc 41880

ccggacctcc atcagagcca gtctcacctt caaccgggc ttcaaggctg ggaggaacat 41940

gcgtcgaaa ctcttgggg tcttgggct gaagtgtcac agcctgttc ttgatttga 42000

ggtgagcagg ctgatgtca gcacagatt cagagttcag gaggtgtgtg cgcaagtatg 42060

tgtgtgtgt tgtggcgcg tgcctgcaag gctgatgtg actggctgca cgtaagagt 42120

cacatgtacg catatacag tgagcacata catgtgtgca tgtgtgtaca tgaaggcatg 42180

gcagtgtgtg cacaggtgtg caagggcaca agtgtgtgca catgcgaatg cacacctgac 42240

atgcatgtgt gttcgtcac agtctgtgg gcattcacgt gaggtgcatg cgttgggtg 42300

[0038] tgcagtgtga gtagcatgtg tgacataac atgtattgag ggtctctgt gttcacccc 42360

ctaggctctc agcaccagtg ccaactccta caggatgaga cgggtccca ggccttggg 42420

ggctgaggct ctgaagctgc agcctgagg gcattgtccc atctgggcat ccgctccac 42480

tcctctct gtgggcttct gtgtccactc ccctctct gtgggcattt acatccactc 42540

cactccctct ctctgtggg catccgctc cactcccct ctctgtggg atctcgctcc 42600

acctcccctc tctgtggca ttgctcca ctccctcc tggctctc ctgtcttggc 42660

cgagcctcg ggagcagcag atgacacaga gtcttgactc gccagggtg gttcagct 42720

gccgggtgag ggccaggccg gatttactg ggaagagga tagttcttg tcaaatgtt 42780

ctctttctt gttccatctg aatgatgat aaagcaaaa gtaaaaactt aaaatcccag 42840

agagtttct accgttctc acttttctt ggcactcta ggtgaacagc ctccagcgg 42900

tgtgaccaa catctacaag atctctctgc tgcaggcgtg caggtgagcc gccaccaagg 42960

ggtgcaggcc cagcctccag ggaccctccg cgctctgctc acctctgacc cggggcttca 43020

ccttgaact cctgggtttt aggggcaagg aatgtcttac gttttcagtg gtgctgctgc 43080

ctgtgcacag ttctgttcgc gtggctctgt gcaaagcacc tgttctccat ctctgggtag 43140

tggtaggagc cggtgtggcc ccagggtcc cactgtgcc tgtgactgg ccgtgggacg 43200

tcatggaggc catcccaggg cagcaggggc atggggtaaa gagatgttta tggggagtct 43260

tagcagagga ggctgggaag gtgtctgaac agtagatggg agatcagatg cccggaggat 43320

ttgggtctc agcaaagagg gccgaggtgg gtgcaggtga gggtcgctgg cccaccccc 43380

gggaaggctc agcagagctg tggctcccca cacagcccgg ccagcacctg tgctctgggc 43440

atggctgtc tcctggaacg ttcctgtcc tggctgtca gggggtgccc ctgccaagaa 43500

tcgacaactt tatcacagag ggaagggcca atctgtggag gccacagggc cagcttctgc 43560

ctggagtcat ggagggtgt ggacaagcc tcggggctgt accaaagggc agtcgggcac 43620

[0039] cacaggcccg ggctccacc tcaacaggcc tcccagcca ctgggagctg aatgccagga 43680

ggccgaagcc ctcgcccac gagggctgag aaggagtgtg agcattgtg ttaccaggg 43740

ccgaggctgc gcgaattacc gtgcacactt gatgtgaaat gaggtcgtc tctatctgg 43800

aaaccagca agggctcac ggagagttt ccattacaag gtcgtacat gaaaatggtt 43860

tttaaccga gtgcttcgc cttcatgctc tggcaggag ggacagacca cagctcatg 43920

ttaccgctt tgaccagct ccagggtctt gggaccaggc tctctcagtt ccagggtcgc 43980

tccggtcag accgcccctc tctctgctt ctctctctgc ctcaaatctt cctcgtttg 44040

catctccctg acgctgcctt gggcctctg gcaagctgct tgactccttt ccgaaacc 44100

ttgggtgtg ctggatacag gtgccactga ggactggagg tgtctgacac tgtggtgac 44160

cccagggtcc agctggcgtg cttggggcct cttgggcca tgatgaggtc agaggagttt 44220

tcccaggtga aaactctgg gaaactcca gggccatgtg acctgccacc tgctcctccc 44280

atattcagct cagtcttgtc ctcatttccc caccagggtc tctagctccg aggagctccc 44340

gtagagggcc tgggctcagg gcagggcggc tgagtttccc cacccatgtg gggacccttg 44400

ggtagtcgct tgattgggta gccctgagga ggccgagatg cgatgggcca cgggcccgtt 44460

ccaaacacag agtcaggcac gtggaaggcc caggaatccc cttccctcga ggcaggagtg 44520

ggagaacgga gagctgggcc ccgatttcac ggcagccagg ctgcagtggg cgaggctgtg 44580

gtggtccacg tggcgtggg ggcggggctt gattcaaac cgctggggct cggccttct 44640

ggcccgtgct ggccgcct ccacacgggc ttgggtgga cgcccgacc tctagcaggt 44700

ggctatttct cccttggaa gagagcccct cacccatgct aggtgttcc ctctgggtc 44760

aggagcgtgg ccgtgtggca acccgggac cttaggctta tttattgtt taaaaacatt 44820

ctggcctgg cttccgtgt tgctaaatgg ggaaaagaca tcccacctca gcagagttac 44880

tgagaggctg aaaccggggt gctggcttga ctggtgtgat ctcaggtcat tccagaagtg 44940

[0040] gctcaggaag tcagtgagac caggtacatg gggggctcag gcagtgggtg agatgaggtg 45000

cacggggggc tcaggcagtg ggtgaggcca ggtacatggg gggctcaggc actgggtgag 45060

atgaggtaca cggggggctc aggagaggg tcagaccagg tacacggggg ctctgatcac 45120

acgcacatat gagcacatgt gcacatgtgc tgttcatgg tagccaggtc tgtcacacc 45180

tgcccaaaag tcccaggaag ctgagaggcc aaagatggag gctgacaggg ctggcgcggt 45240

ggctcacacc tgtagtccca gcacttggg aggccgaggc gagaggatcc cttgagccca 45300

ggagttaag accagcctga gcaacatagt agaaccat ctctatgaaa aataaaaaca 45360

aaaattagct gaacatggtg gtgtgcct gtagttcaa tacttgggag gctgaagtgg 45420

gaggatcact tgagcccagg aggtggaagc tgcaatgagc tgagattgca ccactgtact 45480

gcagcctggg tgacagagtg agagccatc tacaacaaca caaagaagac tgacaaatgc 45540

agtttctgg aaagaacat ttagtaggaa cttaacctac acacagaagc caagtcggtg 45600

tctcgggtgc agtgagatga gatgatgggt cctcacacca tcaccccaga cccagggttt 45660

atgcaccaca ggggcgggtg gctcagaagg gatgctcagg acgttgatat acgatgacat 45720

caagttgtc tgacgaaggg caggattcat gataagtacc tgctgtaca caaggaaca 45780

tggataaact gaaacctta gaggccttc cggaacaggg gctaacaga agccagcatg 45840

ggggctggc atccaggatg gagctgctc agcctccaca tgcgtgtca tacagatgt 45900

gcacagaaac gcagtgtacc tgtgcacaca cagacacgca gctactcga cacacaagca 45960

cacacacaga catgcatgca tgcattcgtg tgtgtcacc tgtgcccag aggaaacca 46020

tgcattgca ttcattcag cacacagga ccggtggcc catgcccaca cccagagca 46080

ccgtctgatt aggaggcctt tcctctgacg ctgtcccca tcctctcagg tttcacgcat 46140

gtgtctgca gctcccattt catcagcaag tttggaaga cccacattt ttctgcgcg 46200

tcattctga cacggcctc ctctgctact ccattctgaa agccaagaac gcaggtatgt 46260

[0041] gcaggtgctt ggctcagtg gcagcagtg ctgctgctg gtgttagtgt gtcaggagac 46320

tgagtgaatc tgggcttagg aagtcttac ccttttcgc atcaggaagt gtttaacc 46380

aaccactgc aggtctgtc gccgccctc tctgggggtg agcagagcac ctgatggaag 46440

ggacaggagc tctctggag ctccatct tcccacttg ctctcctgg ggaagcgtg 46500

ggggcctgg tctctctgt ttcccctg gtgggattg ggggcctgg cctctctgt 46560

ttgccctgt gtgggattg gctgtctcc gtccatgca cttagggcc ttgtcaaac 46620

ccaggccaag ggcttaggag gaggccaggc ccaggctacc caccctct caggagcaga 46680

ggccgctat caccagaca gagccccg cgctctctg cttccagtc accgtctct 46740

gccctggac actttgtca gcatcagga gtttctgat ccgtctgaa ttcaagcat 46800

gtcgaacctg cggtctgag ctaacagct tctactttt gttctttg tttgtggaa 46860

atccacctg gagaagcca agaaaacatt tctgtctga ctctcgggt gcttggtcg 46920

ggacagccag agatggagcc accccgcaga ccgtcgggtg tgggagctt tccggtgtct 46980

cctgggaggg gagctgggct gggcctgtga ctctcagcc tctgtttcc ccagggatg 47040

tcgctggggg ccaagggcgc cgccggcct ctgccctcg aggccgtgca gtggctgtgc 47100

caccaagcat tctgtctca gctgactga caccgtgtca cctacgtgcc actcctgggg 47160

tcactcagga caggcaagtg tgggtggagg ccagtgcggg cccacctgc ccaggggtca 47220

tcctgaac ccctgtgtg ggcgagcag ctcatgct gctgaagtgc agaccccc 47280

ggcctgacc ctggggcct ggagccacgc tggcagcct atgtgattaa acgctggtg 47340

ccccaggcca cggagcctgg cagggtccc aacttctga acccctgct cccatctcag 47400

ggcgatggc tccccagct tgggagcct ctgaccctg acctgtgtcc tctcacagcc 47460

tcttccctgg ctgctgcct gagctcctg ggtcctgagc aagttcttc cccgccccgc 47520

cgctccagc tactgggct gcctgtgtc tcgccccgt ggaggggtg ctgtccctt 47580

[0042] actgaggtc ccaccagcca ggccacagc gtgcaggccc tgcctgccc gccaccaca 47640

cgctcagga gggtggagg atgccacct tggccttct tggaacggag tctgattttg 47700

gccccgagc ccagacgag ctgagtcgga agctcccggg gacgacgctg actgccctgg 47760

aggccgagc caaccggca ctgccctcag acttaagac catcctggac tgatggccac 47820

ccgcccacag ccaggccgag agcagacacc agcagccctg tcacgcccgg ctctacgtcc 47880

caggagggga ggggcggccc acaccaggc ccgaccgct gggagtctga ggcctgagt 47940

agtgttggc cgaggcctg atgtccgct gaaggctgag tgtccgctg agcctgagc 48000

gagtgtccag ccaagggtg agtgtccagc acactgcc tcttacttc cccacaggct 48060

ggcgtcggc tccaccag ggccagctt tctcaccag gagccggct tccactccc 48120

acataggaat agtccatcc cagattgcc attgttacc cctcgcctg cctcctttg 48180

ccttccacc ccaccatca ggtggagacc ctgagaagga ccctgggagc tctggaatt 48240

tggagtgacc aaaggtgtgc cctgtacaca ggcgaggacc ctgcacctgg atgggggtcc 48300

ctgtgggtca aattgggggg aggtgctgtg ggagtaaat actgaatata tgagttttc 48360

agttttgaaa aaaatctcat gtttgaatcc taatgtgcac tgcatagaca ccaactgtatg 48420

caattacaga agcctgtgag tgaacggggg ggtggtcagt gcgggccc atggcctggctg 48480

tgcatttacg gaagtctatg agtgaatggg gttgtggtca gtgcggggccc atggcctggc 48540

tggcctggg aggtttctga tgctgtgagg caggagggga aggaggtag gggatagaca 48600

gtgggagccc ccaccctgga agacataaca gtaagtccag gcccaaggg cagcagggat 48660

gctggggccc cagctggggc ggcggggatg atggagggcc tggccagggt ggcagggatg 48720

atgggggccc cagctggggg ggcagggggt atgggggggg ctggtctggg tggcggggaa 48780

gatggggaag cctggctggg cccctcctc ccctgcctcc cacctgcagc cgtggatccg 48840

gatgtgctc cctggtgcac atcctctggg ccatcagctt tcatggagggt ggggggcagg 48900

[0043] ggcacagcac catcctgtat aaaatccagg attcctcctc ctgaacgccc caactcaggt 48960

tgaaagtcac attccgcctc tggccattct ctaagagta gaccaggatt ctgatctctg 49020

aagggtgggt aggttggggc agtggagggt gtggacacag gaggcttcag ggtggggctg 49080

gtgatgctc ctcatcctc tatcatctc cagtctcctc tctcatctc ttatcatctc 49140

ccagtctcat ctgtctcct cttatctccc agtctcatct gtcacctct taccatctcc 49200

cagtctcctc tctatctc ttatctccta gtctcatcca gacttacctc ccagggcggg 49260

tggcaggctc gcagtggagc tggacatac tccttctca ggcagaagga actggaagga 49320

ttgcagagaa caggaggggc ggctcagagg gacgcagtct tggggtgaag aaacagcccc 49380

tcctcagaag ttggcttggg ccacacgaaa ccgagggccc tgcgtgagtg gctccagagc 49440

ctccagcag gtccctggg gggccttatg gtatggccgg gtctactga gtcaccttg 49500

gacagggctt ctggtttgag tgcagcccgg acgtgcctgg tgtcgggggtg ggggcttatg 49560

gccactggat atggcgcat ttattgctgc tgcttcagag aatgtctgag tgaccgagcc 49620

taatgtgat ggtgggccc agtcacaga ctgtgctgta aatgactct ggtgcctgga 49680

gccccgtat aggagctgtg aggaaggagg ggctcttggc agccggcctg ggggcgcctt 49740

tgccctgcaa actggaagg agcggcccc ggcccgctgg gcggacgacc tcaagtgaga 49800

ggttgacag aacagggcgg ggacttcca ggagcagagg ccgctgctca ggcacacctg 49860

ggttgaatc acagaccaac aggtcaggcc attgtcagc tatccatctt ctacaaagct 49920

ccagattct gtttctccg gtgtttttg ttgaaatctt actcaggatt acttatattt 49980

tttgctaaag tattagacc ttaaaaaagg tattgcttt gatatggctt aactactaa 50040

gcacctact tattgtctg tttttattha ttattattat tattattaga gatggtgtct 50100

actctgtcac ccaggttgtt agtgcagtgg cacagtcag gctcgtgta gccgcaaacc 50160

cccaggctca agtgatcctc cggcctcagc ttcccagagt gctgggatta caggtgtgag 50220

[0044] ccaactgcct tgctggcac ttttaaaaac cactatgtaa ggtcaggctc agtggcttc 50280

acacctgtca tcccagtagt ttgggaagcc gaggcagaag gattgtctga ggccaggagt 50340

ttgagaccag catgggtaac ataggagac cccatctcta caaaaatgc aaaaagtat 50400

ccggcgctgg ggtccagcat ctgtagctcc agctgctcgg gaggctgagt gggaggatcg 50460

cttgagcccg ggaggctag gctgcagtga gctgtgattg taccatcgca ctccagcctg 50520

ggcaacagag tgagaccctg tctcaaaaa aaaaaaaaa aaagaaggag aaggagaaga 50580

gaagaagaag gaagaaggaa agagaagaag aaggaagaag gaagaagaag ggagaaggag 50640

gcctgctagg tgctagtag actgtcaaat ctccagagcaa aatgaaaata acaaagtttt 50700

aaagggaag aaaaaccca gctctttgga cttccttagg cctgaacttc atctcaagca 50760

gcttcctcc acagacaagc gtgtatggag cgagtgagtt caaagcagaa agggaggaga 50820

agcaggcaag ggtggaggct gtgggtgaca ccagccagga cccctgaaag ggagtgggtg 50880

Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro
50 55 60

Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu
65 70 75 80

Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val
85 90 95

Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro
100 105 110

Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr
115 120 125

[0046] Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val
130 135 140

Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val
145 150 155 160

Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr
165 170 175

Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly
180 185 190

Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg
195 200 205

Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg
210 215 220

	Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg		
	225	230	240
	Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp		
		245	255
	Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val		
		260	270
	Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala		
		275	285
	Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His		
		290	300
[0047]	Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro		
	305	310	320
	Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly		
		325	335
	Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro		
		340	350
	Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser		
		355	365
	Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln		
		370	380
	Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His		
	385	390	400

	Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg			
	405	410	415	
	Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln			
	420	425	430	
	Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu			
	435	440	445	
	Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe			
	450	455	460	
	Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser			
	465	470	475	480
[0048]	Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser			
	485	490	495	
	Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met			
	500	505	510	
	Ser Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys			
	515	520	525	
	Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe			
	530	535	540	
	Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser Phe			
	545	550	555	560
	Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Arg Leu Phe Phe Tyr			
	565	570	575	

	Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His			
	580	585	590	
	Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln			
	595	600	605	
	His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile			
	610	615	620	
	Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val			
	625	630	635	640
	Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser			
	645	650	655	
[0049]	Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg			
	660	665	670	
	Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg			
	675	680	685	
	Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro			
	690	695	700	
	Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile			
	705	710	715	720
	Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln			
	725	730	735	
	Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His			
	740	745	750	

	Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp			
	755	760	765	
	Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser			
	770	775	780	
	Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu			
	785	790	795	800
	Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His			
	805	810		815
	Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro			
	820	825		830
[0050]	Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp			
	835	840	845	
	Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu			
	850	855	860	
	Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala			
	865	870	875	880
	Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys			
	885	890		895
	Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu			
	900	905		910
	Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe			
	915	920	925	

	Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser		
	930	935	940
	Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe		
	945	950	955 960
	Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly		
		965	970 975
	Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn		
		980	985 990
	Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln		
		995	1000 1005
[0051]	Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln		
	1010	1015	1020
	Gln Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp		
	1025	1030	1035
	Thr Ala Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly		
	1040	1045	1050
	Met Ser Leu Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu		
	1055	1060	1065
	Ala Val Gln Trp Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr		
	1070	1075	1080
	Arg His Arg Val Thr Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr		
	1085	1090	1095

Ala Gln Thr Gln Leu Ser Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr
 1100 1105 1110

Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys
 1115 1120 1125

Thr Ile Leu Asp
 1130

<210> 5

<211> 6492

<212> DNA

<213> 人

<400> 5

[0052]

tttctgtgaa gcagaagtct gggaatcgat ctggaaatcc tcctaatttt tactccctct 60
 ccccgcgact cctgattcat tgggaagttt caaatcagct ataactggag agtgctgaag 120
 attgatggga tcgttcctt atgcatttgt ttggtttta caaaaaggaa acttgacaga 180
 ggatcatgct gtacttaaaa aatacaacat cacagaggaa gtagactgat attaacaata 240
 ctactaata ataacgtgcc tcatgaaata aagatccgaa aggaattgga ataaaaattt 300
 cctgcatctc atgccaaggg ggaaacacca gaatcaagtg ttcccgctga ttgaagacac 360
 ccctctgcc aagaatgcaa agcacatcca ataaaatagc tggattataa ctctcttct 420
 ttctctgggg gccgtggggt gggagctggg gcgagagggt ccgttgccc ccgttgcttt 480
 tcctctggga aggatggcgc acgctgggag aacagggtac gataaccggg agatagtgat 540
 gaagtacatc cattataagc tgtcgagag gggctacgag tgggatgcgg gagatgtggg 600
 cgccgcccc ccgggggccc ccccgccacc gggcatcttc tcctcccagc ccgggcacac 660
 gccccatcca gccgatccc gggaccgggt cgccaggacc tcgccgtgc agaccccggc 720
 tgccccggc gccgccggg ggcctgcgct cagcccgggt ccacctgtgg tccacctgac 780

	cctccgccag gccggcgacg acttctccc cgcctaccgc cgcgacttcg ccgagatgc	840
	cagccagctg cacctgacgc ccttcaccgc gcggggacgc ttgccacgg tggaggagga	900
	gctcttcagg gacgggggta actgggggag gattgtggcc ttctttgagt tcggtggggt	960
	catgtgtgtg gagagcgtca accgggagat gtcgccctg gtggacaaca tcgccctgtg	1020
	gatgactgag tacctgaacc ggcacctgca cacctggatc caggataacg gaggctggga	1080
	tgcctttgtg gaactgtacg gccccagcat gcggcctctg ttgatttct cctggctgtc	1140
	tctgaagact ctgctcagtt tggccctggt gggagcttgc atcacctgg gtgcctatct	1200
	gggccacaag tgaagtcaac atgcctgccc caaacaata tgcaaaagg tcaactaaagc	1260
	agtagaaata atatgcattg tcagtgatgt accatgaac aaagctgcag gctgtttaag	1320
	aaaaaataac acacataaa acatcacaca cacagacaga cacacacaca cacaacaatt	1380
	aacagtcttc aggcaaaacg tcgaatcagc tattactgc caaaggaaa tatcattat	1440
[0053]	ttttacatt attaagaaaa aaagattat ttatttaaga cagtccatc aaaactcctg	1500
	tctttgaaa tccgaccact aattgccaag caccgcttcg tgtggctcca cctggatgtt	1560
	ctgtgcctgt aaacatagat tcgctttcca tgttgttggc cggatcacca tctgaagagc	1620
	agacggatgg aaaaaggacc tgatcattgg ggaagctggc ttctggctg ctggaggctg	1680
	gggagaaggt gttcattcac ttgcattct ttgccctggg ggctgtgata ttaacagagg	1740
	gagggttct gtggggggaa gtccatgct ccctggcctg aagaagagac tctttgcata	1800
	tgactcacat gatgcatacc tggggggagg aaaagagttg ggaactcag atggacctag	1860
	taccactga gatttcacg ccgaaggaca gcgatgggaa aaatgccctt aatcatagg	1920
	aaagtatatt ttaagctac caattgtcc gagaaaagca ttttagcaat ttatacaata	1980
	tcatccagta ccttaagccc tgattgtga tattcatata ttttgatac gcaccccca	2040
	actccaata ctggctctgt ctgagtaaga aacagaatcc tctggaactt gaggaagtga	2100

	acatttcggt gacttccgca tcaggaaggc tagagttacc cagagcatca ggccgccaca	2160
	agtgctgct ttaggagac cgaagtccgc agaactgcc tgtgtcccag cttggaggcc	2220
	tggctctgga actgagccgg ggcctcact ggcctcctcc agggatgac aacagggcag	2280
	tgtggtctcc gaatgtctgg aagctgatgg agctcagaat tccactgtca agaaagagca	2340
	gtagaggggt gtggctgggc ctgtcacct ggggccctcc aggtaggccc gtttcacgt	2400
	ggagcatggg agccacgacc cttctaaga catgtatcac ttagagggga aggaacagag	2460
	gccctgggcc cttcctatca gaaggacatg gtgaaggctg ggaacgtgag gagaggcaat	2520
	ggccacggcc cattttgct gtagcacatg gcacgttggc tgtgtggcct tggcccact	2580
	gtgagtttaa agcaaggctt taaatgactt tggagagggt cacaaatcct aaaagaagca	2640
	ttgaagtgag gtgtcatgga ttaattgacc cctgtctatg gaattacatg taaaacatta	2700
	tctgtcact gtagtttgg tttattttaa aacctgaca aaaaaagtt ccaggtgtgg	2760
[0054]	aatatggggg ttatctgtac atcctggggc attaaaaaaaaaatcaatgg tggggaacta	2820
	taaagaagta acaaaagaag tgacatcttc agcaaataaa ctaggaaatt ttttttctt	2880
	ccagtttaga atcagccttg aaacattgat ggaataactc tgtggcatta ttgcattata	2940
	taccatttat ctgtattaac tttggaatg actctgttca atgttaatg ctgtggtga	3000
	tatttcgaaa gctgcttaa aaaaatacat gcatctcagc gttttttgt ttttaattgt	3060
	attagttat ggcctataca ctatttga gcaaaggta tcgttttctg tttgagattt	3120
	ttatctcttg atttctcaa agcattctga gaaggtaga taagccctga gtctcagcta	3180
	cctaagaaaa acctggatg cactggccac tgaggagctt tgttcaacc aagtcatgtg	3240
	cattccacg tcaacagaat tgtttattgt gacagttata tctgtgtcc ctttgacctt	3300
	gtttctttaa ggttctctg tcctgggca attccgatt taattcatgg tattcaggat	3360
	tacatgcatg tttggttaaa cccatgagat tcattcagtt aaaaatccag atggcaaag	3420

	accagcagat tcaaatctat ggtggttga ctttagaga gttgcttac gtggcctgtt	3480
	tcaacacaga cccaccaga gccctctgc cctcctccg cgggggcttt ctcattggctg	3540
	tccttcaggg tcttctgaa atgcagtgtt gcttacgctc caccaagaaa gcaggaaacc	3600
	tgtggtatga agccagacct cccggcggg cctcaggaa cagaatgac agaccttga	3660
	atgattctaa ttttaagca aaatattatt ttatgaaagg ttacattgt caaagtgatg	3720
	aatatggaat atccaatct gtgctgctat cctgcaaaa tcatttaat ggagtcagtt	3780
	tgcagtatgc tccacgtgtt aagatcctcc aagctgctt agaagtaaca atgaagaacg	3840
	tggacgtttt taatataaag cctgtttgt cttttgtgt tgttcaaag ggattcacag	3900
	agtattttaa aaatgtatat atattaagag gtcacggggg ctaattgctg gctggctgcc	3960
	tttgctgtg gggttttgt acctggttt aataacagta aatgtgcca gcctcttggc	4020
	cccagaactg tacagtattg tggctgact tgcttaaga gtagttgatg ttgcatttc	4080
[0055]	cttattgtta aaaacatgtt agaagcaatg aatgtatata aaagcctcaa ctagtcattt	4140
	tttctctc ttctttttt tcattatc taattattt gcagttgggc aacagagaac	4200
	catccctatt ttgtattgaa gagggattca catctgcatc ttaactgctc ttatgaatg	4260
	aaaaaacagt cctctgatg tactcctct tacactggcc agggtcagag taaatagag	4320
	tatatgact ttcaaattg gggacaagg ctctaaaaa agcccaaaa ggagaagaac	4380
	atctgagaac ctctcgcc ctccagctc ctgctgac aaatactcc caagagaggc	4440
	cagaatgaca gctgacagg tctatggcca tcgggtcgtc tccgaagatt tggcagggc	4500
	agaaaactct ggcaggctta agatttgaa taaagtcaca gaattaagga agcacctca	4560
	tttagtcaa acaagacgc aacattctct ccacagctca cttacctc tgtgtcaga	4620
	tgtgccttc catttatg tgatcttgt ttattagta aatgctatc atctaaagat	4680
	gtagctctgg cccagtggga aaaattagga agtgattata aatcgagagg agttataata	4740

	atcaagatta aatgtaaata atcagggcaa tccaacaca tgtctagctt tcacctccag	4800
	gatctattga gtgaacagaa ttgcaaatag tctctatttg taattgaact taccctaaaa	4860
	caaatagttt ataaatgta acttaaactc taattaattc caactgtact ttaaggcag	4920
	tggctgtttt tagactttct tacccttat agttagtaat gtacacctac tctatcagag	4980
	aaaaacagga aaggctcga atacaagcca ttctaaggaa attagggagt cagttgaaat	5040
	tctattctga tcttattctg tgggtctttt tgcagcccag acaaatgtgg ttacacactt	5100
	ttaagaaat acaattctac attgtcaagc ttatgaaggt tccaatcaga tctttattgt	5160
	tattcaattt ggatcttca gggatttttt ttttaaatta ttatgggaca aaggacattt	5220
	gttgaggagg tgggaggag gaagaatttt taaatgtaa acattcccaa gtttgatca	5280
	gggagttgga agttttcaga ataaccagaa ctaagggtat gaaggacctg tattggggtc	5340
	gatgtgatgc ctctcggaag aaccttgtgt gacaaatgag aaacattttg aagtttggtg	5400
[0056]	tacgacctt agattccaga gacatcagca tggctcaaag tgcagctccg tttggcagtg	5460
	caatggtata aattcaagc tggatatgct taatgggtat taaacaata aatgtgcagt	5520
	ttaactaac aggatattta atgacaacct tctggttggg agggacatct gtttctaat	5580
	gtttattatg tacaatacag aaaaaattt tataaaatta agcaatgta aactgaattg	5640
	gagagtgata atacaagtc tttagtctta cccagtgaat cattctgttc catgtctttg	5700
	gacaacctg accttggaca atcatgaaat atgcatctca ctggatgcaa agaaaatcag	5760
	atggagcatg aatggtactg taccggttca tctggactgc cccagaaaaa taactcaag	5820
	caaacatcct atcaacaaca aggttgttct gcataccaag ctgagcacag aagatgggaa	5880
	cactggtgga ggatggaag gctcgtcaa tcaagaaaat tctgagacta ttaataaata	5940
	agactgtagt gtagatactg agtaaatcca tgcacctaaa cttttggaa aatctgccgt	6000
	gggccctcca gatagctcat ttcattaagt tttccctcc aaggtagaat ttgcaagagt	6060

gacagtggat tgcatttctt ttggggaagc tttcttttgg tggttttgtt tattatacct 6120
 tcttaagttt tcaaccaagg tttgcttttg ttttgagtta ctggggttat ttttgtttta 6180
 aataaaaaata agtgtaacaat aagtgttttt gtattgaaag cttttgttat caagattttc 6240
 atacttttac cttccatggc tctttttaag attgatactt ttaagaggtg gctgatattc 6300
 tgcaaacactg tacacataaa aaatacggta aggatacttt acatgggtaa ggtaaagtaa 6360
 gtctccagtt ggccaccatt agctataatg gcactttggt tgtgttggtg gaaaaagtca 6420
 cattgccatt aaactttcct tgtctgtcta gtaaatattg tgaagaaaaa taaagtacag 6480
 tgtgagatac tg 6492

[0057]

<210> 6
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 6

Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met
 1 5 10 15

Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala
 20 25 30

Gly Asp Val Gly Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ile
 35 40 45

Phe Ser Ser Gln Pro Gly His Thr Pro His Pro Ala Ala Ser Arg Asp
 50 55 60

Pro Val Ala Arg Thr Ser Pro Leu Gln Thr Pro Ala Ala Pro Gly Ala
 65 70 75 80

Ala Ala Gly Pro Ala Leu Ser Pro Val Pro Pro Val Val His Leu Thr
85 90 95

Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg Tyr Arg Arg Asp Phe
100 105 110

Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly
115 120 125

Arg Phe Ala Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp
130 135 140

Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Glu Phe Gly Gly Val Met Cys Val Glu
145 150 155 160

[0058] Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp
165 170 175

Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn
180 185 190

Gly Gly Trp Asp Ala Phe Val Glu Leu Tyr Gly Pro Ser Met Arg Pro
195 200 205

Leu Phe Asp Phe Ser Trp Leu Ser Leu Lys Thr Leu Leu Ser Leu Ala
210 215 220

Leu Val Gly Ala Cys Ile Thr Leu Gly Ala Tyr Leu Gly His Lys
225 230 235

<210> 7

<211> 1207

<212> DNA

	<213> 人	
	<400> 7	
	tttctgtgaa gcagaagtct gggaatcgat ctggaaatcc tctaatttt tactccctct	60
	ccccgcgact cctgattcat tgggaagttt caaatcagct ataactggag agtgctgaag	120
	attgatggga tcgttgcctt atgcatttgt tttggttta caaaaaggaa acttgacaga	180
	ggatcatgct gtacttaaaa aatacaacat cacagaggaa gtagactgat attaacaata	240
	cttactaata ataacgtcc tcatgaaata aagatccgaa aggaattgga ataaaaattt	300
	cctgcatctc atgccaaggg ggaaacacca gaatcaagtg ttccgcgtga ttgaagacac	360
	ccccctgcc aagaatgcaa agcacatcca ataaaatagc tggattataa ctctcttct	420
	ttctctgggg gccgtggggg gggagctggg gcgagaggtg ccgttgccc ccgttgcttt	480
	tcctctggga aggatggcgc acgctgggag aacagggtac gataaccggg agatagtgat	540
[0059]	gaagtacatc cattataagc tgtcgagag gggctacgag tgggatgcgg gagatgtggg	600
	cgccgcgccc ccgggggccc cccccacc gggcatcttc tctcccagc ccgggcacac	660
	gccccatcca gccgcatccc gggaccgggt cgccaggacc tcgccgtgc agacccggc	720
	tgccccggc gccgcccggg ggcctgcgct cagcccgggt ccacctgtgg tccacctgac	780
	cctcccagc gccggcgacg acttctccc cgctaccgc cgcgacttcg ccgagatgc	840
	cagccagctg cacctgacgc cttcaccgc gcggggacgc ttgccacgg tggaggagga	900
	gctcttcagg gacgggggta actgggggag gattgtggcc ttctttgagt tcggtggggt	960
	catgtgtgtg gagagcgtca accgggagat gtcgccctg gtggacaaca tcgccctgtg	1020
	gatgactgag tacctgaacc ggcacctgca cacctggatc caggataacg gaggctgggt	1080
	aggtgcactt ggtgatgtga gtctgggctg aggccacagg tccgagatgc gggggttga	1140
	gtcggggtgg gctcctgggg caatgggagg ctgtggagcc ggcgaaataa aatcagagtt	1200
	gttgcta	1207

Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Glu Phe Gly Gly Val Met Cys Val Glu
145 150 155 160

Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp
165 170 175

Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn
180 185 190

Gly Gly Trp Val Gly Ala Leu Gly Asp Val Ser Leu Gly
195 200 205

<210> 9

<211> 2594

<212> DNA

<213> 人类免疫缺陷病毒 1

[0061]

<400> 9

atggagccag tagatcctag actagagccc tggaagcatc caggaagtca gcctaaaact 60

gcttgtagca attgctattg taaaaagtgt tgctttcatt gccaaagttg ttccataaca 120

aaagccttag gcatctccta tggcaggaag aagcggagac agcgacgaag agctcatcag 180

aacagtcaga ctcatcaagc ttctctatca aagcagtaag tagtacatgt aatgcaacct 240

ataccaatag tagcaatagt agcattagta gtagcaataa taatagcaat agttgtgtgg 300

tcctatgtaa tcatagaata taggaaaata ttaagacaaa gaaaaataga caggtaatt 360

gatagactaa tagaaagagc agaagacagt ggcaatgaga gtgaaggaga aatatcagca 420

cttgtaggaga tgggggtgga gatggggcac catgctcctt gggatgttga tgatctgtag 480

tgctacagaa aaattgtggg tcacagtcta ttatggggta cctgtgtgga aggaagcaac 540

caccactcta ttttgtgcat cagatgctaa agcatatgat acagaggtac ataatgtttg 600

ggccacacat gcctgtgtac ccacagacc caaccacaa gaagtagtat tggtaaatgt 660

	gacagaaaat ttaacatgt ggaaaaatga catggtagaa cagatgcatg aggatataat	720
	cagtttatgg gatcaaagcc taaagccatg tgtaaaatta acccactct gtgtagttt	780
	aaagtgcact gatttgaaga atgatactaa taccaatagt agtagcggga gaatgataat	840
	ggagaaagga gagataaaaa actgctcttt caatatcagc acaagcataa gagtaaggt	900
	gcagaaagaa tatgcatttt ttataaact tgatataata ccaatagata atgatactac	960
	cagctataag ttgacaagtt gtaacacctc agtcattaca caggcctgtc caaaggtatc	1020
	ctttgagcca attcccatc attattgtgc cccggctggt ttgctgattc taaaatgtaa	1080
	taataagacg ttcaatggaa caggaccatg tacaaatgtc agcacagtac aatgtacaca	1140
	tggaattagg ccagtagtat caactcaact gctgttaaat ggcagtctag cagaagaaga	1200
	ggtagtaatt agatctgtca atttcagga caatgctaaa accataatag tacagctgaa	1260
[0062]	cacatctgta gaaattaatt gtacaagacc caacaacaat acaagaaaaa gaatccgtat	1320
	ccagagagga ccaggagag catttgttac aataggaaaa ataggaaata tgagacaagc	1380
	acattgtaac attagtagag caaaatggaa taacacttta aaacagatag ctagcaaatt	1440
	aagagaacaa tttgaaata ataaaacaat aatctttaag caatcctcag gaggggaccc	1500
	agaaattgta acgcacagtt ttaattgtgg aggggaattt ttctactgta attcaacaca	1560
	actgttaat agtacttgg ttaatgtac ttggagtact gaagggtcaa ataactga	1620
	aggaagtgac acaatcacc tccatgcag aataaaacaa attataaaca tgtggcagaa	1680
	agtaggaaaa gcaatgtatg cccctccat cagtggacaa attagatgtt catcaaatat	1740
	tacagggtc ctattaacaa gagatggtg taatagcaac aatgagtcag agatcttcag	1800
	acctggagga ggagatatga gggacaattg gagaagtga ttatataaat ataaagtagt	1860
	aaaaattgaa ccattaggag tagcaccac caaggcaaag agaagagtgg tgagagaga	1920
	aaaaagagca gtgggaatag gagctttgt ccttgggtc ttgggagcag caggaagcac	1980

tatgggcgca gcctcaatga cgctgacggt acaggccaga caattattgt ctggtatagt 2040

gcagcagcag aacaatttgc tgagggctat tgaggcgcaa cagcatctgt tgcaactcac 2100

agtctggggc atcaagcagc tccaggcaag aatcctggct gtggaaagat acctaaagga 2160

tcaacagctc ctggggattt ggggttgctc tggaaaactc attgcacca ctgctgtgcc 2220

ttggaatgct agttggagta ataaatctct ggaacagatt tggaaacaca cgacctggat 2280

ggagtgggac agagaaatta acaattacac aagcttaata cactccttaa ttgaagaatc 2340

gcaaaaccag caagaaaaga atgaacaaga attattggaa ttagataaat gggcaagttt 2400

gtggaattgg ttaacataa caaattggct gtggtatata aaattattca taatgatagt 2460

aggaggcttg gtaggttaa gaatagtttt tgctgtactt tctatagtga atagagttag 2520

gcagggatat tcaccattat cgtttcagac ccacctcca accccgaggg gacccgacag 2580

gcccgaagga atag 2594

[0063]

<210> 10
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> 人类免疫缺陷病毒 1

<400> 10

Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala His Gln Asn Ser Gln Thr

	50	55	60	
	His Gln Ala Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Pro Arg Gly Asp			
	65	70	75	80
	Pro Thr Gly Pro Lys Glu			
		85		
	<210> 11			
	<211> 2397			
	<212> DNA			
	<213> 人			
	<400> 11			
	ctgtcccga agcggcg gcagcatggc cagctctggt tcctgaggg ctcaaagt			60
	tctgaggcca gcaagaagaa gcggcgggag cccctggcg aggactccgt gggcctcaag			120
[0064]	cccctgaaga acgcttcaga cggtgccctc atggacgaca accagaatga gtggggggac			180
	gaggacctgg agaccaagaa gttccggtc gaggagcccg tggttctgcc tgacctggac			240
	gaccagacag accaccggca gtggactcag cagcacctgg atgccgctga cctgcgcatg			300
	tctgcatgg cccccacacc gcccagggt gaggttgacg cgcactgcat ggacgtcaat			360
	gtccgggcg ctgatggctt cccccctc atgatgcct cctgcagcg gggcggcctg			420
	gagacgggca acagcgagga agaggaggac gcgccggcg tcatctcca ttcatctac			480
	caggcgcca gcctgcaca ccagacagac cgcacggcg agaccgcctt gcacctggcc			540
	gcccgtact cagctctga tgccccaag gcctgctgg aggccagcg agatgccaac			600
	atccaggaca acatggggcg cccccctg catcggctg tgtctgccg cgacaaggt			660
	gtcttcaga tcctgatccg gaaccgagcc acagacctgg atgcccgat gcatgatggc			720
	acgagccac tgatctggc tgcccctg gccgtggagg gcatgctgga ggacctcatc			780
	aactcacag ccgacgtcaa cgccgtagat gacctgggca agtccgcct gcactgggcc			840

	gccgccgtga acaatgtgga tgccgcagtt gtgctcctga agaacggggc taacaaagat	900
	atgcagaaca acagggagga gacaccctg tttctggccg cccgggaggg cagctacgag	960
	accgccaagg tgctgctgga ccactttgcc aaccgggaca tcacggatca tatggaccgc	1020
	ctgccgcgcg acatgcaca ggagcgcag catcacgaca tcgtgaggct gctggacgag	1080
	tacaactgg tgcgcagccc gcagctgcac ggagccccgc tggggggcac gccaccctg	1140
	tcgccccgc tctgctgcc caacggctac ctgggcagcc tcaagcccgg cgtgcagggc	1200
	aagaaggcc gcaagcccag cagcaaaggc ctggcctgtg gaagcaagga ggccaaggac	1260
	ctcaaggcac ggaggaagaa gtcccaggac ggcaagggtc gcctgctgga cagctccggc	1320
	atgctctgc ccgtggactc cctggagtca cccatggct acctgtcaga cgtggcctcg	1380
	ccgccactgc tgcctcccc gttccagcag tctccgtccg tgcccccaa ccactgctt	1440
	gggatgccc acaccacct gggcatcggg cacctgaacg tggcggccaa gcccgagatg	1500
[0065]	gcggcgtgg gtgggggagg ccggctggcc ttgagactg gccaccctg tctctcccac	1560
	ctgcctgtgg cctctggcac cagcaccgtc ctgggctcca gcagcggagg ggcctgaat	1620
	ttcactgtgg gcggtccac cagtttgaat ggtcaatcg agtggtgtc ccggctgcag	1680
	agcggcatgg tgccgaacca atacaacct ctgcggggga gtgtggcacc agccccctg	1740
	agcacacagg cccctccct gcagcatggc atggtaggcc cgctgcacag tagccttct	1800
	gccagcggc tgcccagat gatgagctac caggcctgc ccagcaccg gctggccacc	1860
	cagcctacc tggcagac ccagcaggc cagccacaaa acttacagat gcagcagcag	1920
	aacctgcag cagcaaacat ccagcagcag caaagcctgc agccgccacc accaccacca	1980
	cagccgacc ttggcgtgag ctacagacc agcggccacc tggccggag cttctgagt	2040
	ggagagccga gccaggcaga cgtgcagcca ctgggcccc gcagcctggc ggtgcacact	2100
	attctgccc aggagagccc cgcctgccc acgtcgtgc catcctgct ggtcccacc	2160

gtgaccgcag cccagttcct gacgcccc tgcagcaca gctactcctc gcctgtggac 2220
aacaccccc gccaccagct acaggtgcct gagcacccct tcctacccc gtcccctgag 2280
tcccctgacc agtgggccag ctctgcccc cattccaacg tctccgactg gtccgagggc 2340
gtctccagcc ctcccaccag catgcagtcc cagatgccc gcattccgga ggccttc 2397

<210> 12

<211> 799

<212> PRT

<213> 人

<400> 12

Leu Ser Arg Lys Arg Arg Arg Gln His Gly Gln Leu Trp Phe Pro Glu
1 5 10 15

[0066] Gly Phe Lys Val Ser Glu Ala Ser Lys Lys Lys Arg Arg Glu Pro Leu
20 25 30

Gly Glu Asp Ser Val Gly Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ala Ser Asp Gly
35 40 45

Ala Leu Met Asp Asp Asn Gln Asn Glu Trp Gly Asp Glu Asp Leu Glu
50 55 60

Thr Lys Lys Phe Arg Phe Glu Glu Pro Val Val Leu Pro Asp Leu Asp
65 70 75 80

Asp Gln Thr Asp His Arg Gln Trp Thr Gln Gln His Leu Asp Ala Ala
85 90 95

Asp Leu Arg Met Ser Ala Met Ala Pro Thr Pro Pro Gln Gly Glu Val
100 105 110

	Asp Ala Asp Cys Met Asp Val Asn Val Arg Gly Pro Asp Gly Phe Thr			
	115	120	125	
	Pro Leu Met Ile Ala Ser Cys Ser Gly Gly Gly Leu Glu Thr Gly Asn			
	130	135	140	
	Ser Glu Glu Glu Glu Asp Ala Pro Ala Val Ile Ser Asp Phe Ile Tyr			
	145	150	155	160
	Gln Gly Ala Ser Leu His Asn Gln Thr Asp Arg Thr Gly Glu Thr Ala			
	165	170	175	
	Leu His Leu Ala Ala Arg Tyr Ser Arg Ser Asp Ala Ala Lys Arg Leu			
	180	185	190	
[0067]	Leu Glu Ala Ser Ala Asp Ala Asn Ile Gln Asp Asn Met Gly Arg Thr			
	195	200	205	
	Pro Leu His Ala Ala Val Ser Ala Asp Ala Gln Gly Val Phe Gln Ile			
	210	215	220	
	Leu Ile Arg Asn Arg Ala Thr Asp Leu Asp Ala Arg Met His Asp Gly			
	225	230	235	240
	Thr Thr Pro Leu Ile Leu Ala Ala Arg Leu Ala Val Glu Gly Met Leu			
	245	250	255	
	Glu Asp Leu Ile Asn Ser His Ala Asp Val Asn Ala Val Asp Asp Leu			
	260	265	270	
	Gly Lys Ser Ala Leu His Trp Ala Ala Ala Val Asn Asn Val Asp Ala			
	275	280	285	

	Ala Val Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asn Lys Asp Met Gln Asn Asn		
	290	295	300
	Arg Glu Glu Thr Pro Leu Phe Leu Ala Ala Arg Glu Gly Ser Tyr Glu		
	305	310	315 320
	Thr Ala Lys Val Leu Leu Asp His Phe Ala Asn Arg Asp Ile Thr Asp		
		325	330 335
	His Met Asp Arg Leu Pro Arg Asp Ile Ala Gln Glu Arg Met His His		
		340	345 350
	Asp Ile Val Arg Leu Leu Asp Glu Tyr Asn Leu Val Arg Ser Pro Gln		
		355	360 365
[0068]	Leu His Gly Ala Pro Leu Gly Gly Thr Pro Thr Leu Ser Pro Pro Leu		
		370	375 380
	Cys Ser Pro Asn Gly Tyr Leu Gly Ser Leu Lys Pro Gly Val Gln Gly		
		385	390 395 400
	Lys Lys Val Arg Lys Pro Ser Ser Lys Gly Leu Ala Cys Gly Ser Lys		
		405	410 415
	Glu Ala Lys Asp Leu Lys Ala Arg Arg Lys Lys Ser Gln Asp Gly Lys		
		420	425 430
	Gly Cys Leu Leu Asp Ser Ser Gly Met Leu Ser Pro Val Asp Ser Leu		
		435	440 445
	Glu Ser Pro His Gly Tyr Leu Ser Asp Val Ala Ser Pro Pro Leu Leu		
		450	455 460

	Pro Ser Pro Phe Gln Gln Ser Pro Ser Val Pro Leu Asn His Leu Pro		
	465	470	480
	Gly Met Pro Asp Thr His Leu Gly Ile Gly His Leu Asn Val Ala Ala		
		485	495
	Lys Pro Glu Met Ala Ala Leu Gly Gly Gly Gly Arg Leu Ala Phe Glu		
		500	510
	Thr Gly Pro Pro Arg Leu Ser His Leu Pro Val Ala Ser Gly Thr Ser		
		515	525
	Thr Val Leu Gly Ser Ser Ser Gly Gly Ala Leu Asn Phe Thr Val Gly		
		530	540
[0069]	Gly Ser Thr Ser Leu Asn Gly Gln Cys Glu Trp Leu Ser Arg Leu Gln		
	545	550	560
	Ser Gly Met Val Pro Asn Gln Tyr Asn Pro Leu Arg Gly Ser Val Ala		
		565	575
	Pro Gly Pro Leu Ser Thr Gln Ala Pro Ser Leu Gln His Gly Met Val		
		580	590
	Gly Pro Leu His Ser Ser Leu Ala Ala Ser Ala Leu Ser Gln Met Met		
		595	605
	Ser Tyr Gln Gly Leu Pro Ser Thr Arg Leu Ala Thr Gln Pro His Leu		
		610	620
	Val Gln Thr Gln Gln Val Gln Pro Gln Asn Leu Gln Met Gln Gln Gln		
	625	630	640

Asn Leu Gln Pro Ala Asn Ile Gln Gln Gln Gln Ser Leu Gln Pro Pro
 645 650 655

Pro Pro Pro Pro Gln Pro His Leu Gly Val Ser Ser Ala Ala Ser Gly
 660 665 670

His Leu Gly Arg Ser Phe Leu Ser Gly Glu Pro Ser Gln Ala Asp Val
 675 680 685

Gln Pro Leu Gly Pro Ser Ser Leu Ala Val His Thr Ile Leu Pro Gln
 690 695 700

Glu Ser Pro Ala Leu Pro Thr Ser Leu Pro Ser Ser Leu Val Pro Pro
 705 710 715 720

[0070] Val Thr Ala Ala Gln Phe Leu Thr Pro Pro Ser Gln His Ser Tyr Ser
 725 730 735

Ser Pro Val Asp Asn Thr Pro Ser His Gln Leu Gln Val Pro Glu His
 740 745 750

Pro Phe Leu Thr Pro Ser Pro Glu Ser Pro Asp Gln Trp Ser Ser Ser
 755 760 765

Ser Pro His Ser Asn Val Ser Asp Trp Ser Glu Gly Val Ser Ser Pro
 770 775 780

Pro Thr Ser Met Gln Ser Gln Ile Ala Arg Ile Pro Glu Ala Phe
 785 790 795

<210> 13
 <211> 814
 <212> DNA

	20	25	30	
	Gly Glu Asp Ser Val Gly Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ala Ser Asp Gly			
	35	40	45	
	Ala Leu Met Asp Asp Asn Gln Asn Glu Trp Gly Asp Glu Asp Leu Glu			
	50	55	60	
	Thr Lys Lys Phe Arg Phe Glu Glu Pro Val Val Leu Pro Asp Leu Asp			
	65	70	75	80
	Asp Gln Thr Asp His Arg Gln Trp Thr Gln Gln His Leu Asp Ala Ala			
	85	90	95	
	Asp Leu Arg Met Ser Ala Met Ala Pro Thr Pro Pro Gln Gly Glu Val			
	100	105	110	
[0072]	Asp Ala Asp Cys Met Asp Val Asn Val Arg Gly Pro Asp Gly Phe Thr			
	115	120	125	
	Pro Leu Met Ile Ala Ser Cys Ser Gly Gly Gly Leu Glu Thr Gly Asn			
	130	135	140	
	Ser Glu Glu Glu Glu Asp Ala Pro Ala Val Ile Ser Asp Phe Ile Tyr			
	145	150	155	160
	Gln Gly Ala Ser Leu His Asn Gln Thr Asp Arg Thr Gly Glu Thr Ala			
	165	170	175	
	Leu His Leu Ala Ala Arg Tyr Ser Arg Ser Asp Ala Ala Lys Arg Leu			
	180	185	190	
	Leu Glu Ala Ser Ala Asp Ala Asn Ile Gln Asp Asn Met Gly Arg Thr			

	195	200	205	
	Pro Leu His Ala Ala Val Ser Ala Asp Ala Gln Gly Val Phe Gln Ile			
	210	215	220	
	Leu Ile Arg Asn Arg Ala Thr Asp Leu Asp Ala Arg Met His Asp Gly			
	225	230	235	240
	Thr Thr Pro Leu Ile Leu Ala Ala Arg Leu Ala Val Glu Gly Met Leu			
		245	250	255
	Glu Asp Leu Ile Asn Ser His Ala Asp Val Asn Ala Val Asp Asp Leu			
	260	265	270	
	Gly Lys Ser Ala Leu His Trp Ala Ala Ala Val Asn Asn Val Asp Ala			
	275	280	285	
[0073]	Ala Val Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asn Lys Asp Met Gln Asn Asn			
	290	295	300	
	Arg Glu Glu Thr Pro Leu Phe Leu Ala Ala Arg Glu Gly Ser Tyr Glu			
	305	310	315	320
	Thr Ala Lys Val Leu Leu Asp His Phe Ala Asn Arg Asp Ile Thr Asp			
		325	330	335
	His Met Asp Arg Leu Pro Arg Asp Ile Ala Gln Glu Arg Met His His			
	340	345	350	
	Asp Ile Val Arg Leu Leu Asp Glu Tyr Asn Leu Val Arg Ser Pro Gln			
	355	360	365	
	Leu His Gly Ala Pro Leu Gly Gly Thr Pro Thr Leu Ser Pro Pro Leu			

370	375	380	
Cys Ser Pro Asn Gly Tyr Leu Gly Ser Leu Lys Pro Gly Val Gln Gly			
385	390	395	400
Lys Lys Val Arg Lys Pro Ser Ser Lys Gly Leu Ala Cys Gly Ser Lys			
	405	410	415
Glu Ala Lys Asp Leu Lys Ala Arg Arg Lys Lys Ser Gln Asp Gly Lys			
	420	425	430
Gly Cys Leu Leu Asp Ser Ser Gly Met Leu Ser Pro Val Asp Ser Leu			
	435	440	445
Glu Ser Pro His Gly Tyr Leu Ser Asp Val Ala Ser Pro Pro Leu Leu			
	450	455	460
[0074]			
Pro Ser Pro Phe Gln Gln Ser Pro Ser Val Pro Leu Asn His Leu Pro			
465	470	475	480
Gly Met Pro Asp Thr His Leu Gly Ile Gly His Leu Asn Val Ala Ala			
	485	490	495
Lys Pro Glu Met Ala Ala Leu Gly Gly Gly Gly Arg Leu Ala Phe Glu			
	500	505	510
Thr Gly Pro Pro Arg Leu Ser His Leu Pro Val Ala Ser Gly Thr Ser			
	515	520	525
Thr Val Leu Gly Ser Ser Ser Gly Gly Ala Leu Asn Phe Thr Val Gly			
	530	535	540
Gly Ser Thr Ser Leu Asn Gly Gln Cys Glu Trp Leu Ser Arg Leu Gln			

545	550	555	560
Ser Gly Met Val Pro Asn Gln Tyr Asn Pro Leu Arg Gly Ser Val Ala			
	565	570	575
Pro Gly Pro Leu Ser Thr Gln Ala Pro Ser Leu Gln His Gly Met Val			
	580	585	590
Gly Pro Leu His Ser Ser Leu Ala Ala Ser Ala Leu Ser Gln Met Met			
	595	600	605
Ser Tyr Gln Gly Leu Pro Ser Thr Arg Leu Ala Thr Gln Pro His Leu			
	610	615	620
Val Gln Thr Gln Gln Val Gln Pro Gln Asn Leu Gln Met Gln Gln Gln			
625	630	635	640
[0075]			
Asn Leu Gln Pro Ala Asn Ile Gln Gln Gln Gln Ser Leu Gln Pro Pro			
	645	650	655
Pro Pro Pro Pro Gln Pro His Leu Gly Val Ser Ser Ala Ala Ser Gly			
	660	665	670
His Leu Gly Arg Ser Phe Leu Ser Gly Glu Pro Ser Gln Ala Asp Val			
	675	680	685
Gln Pro Leu Gly Pro Ser Ser Leu Ala Val His Thr Ile Leu Pro Gln			
	690	695	700
Glu Ser Pro Ala Leu Pro Thr Ser Leu Pro Ser Ser Leu Val Pro Pro			
705	710	715	720
Val Thr Ala Ala Gln Phe Leu Thr Pro Pro Ser Gln His Ser Tyr Ser			

725

730

735

Ser Pro Val Asp Asn Thr Pro Ser His Gln Leu Gln Val Pro Glu His

740

745

750

[0076]

Pro Phe Leu Thr Pro Ser Pro Glu Ser Pro Asp Gln Trp Ser Ser Ser

755

760

765

Ser Pro His Ser Asn Val Ser Asp Trp Ser Glu Gly Val Ser Ser Pro

770

775

780

Pro Thr Ser Met Gln Ser Gln Ile Ala Arg Ile Pro Glu Ala Phe

785

790

795

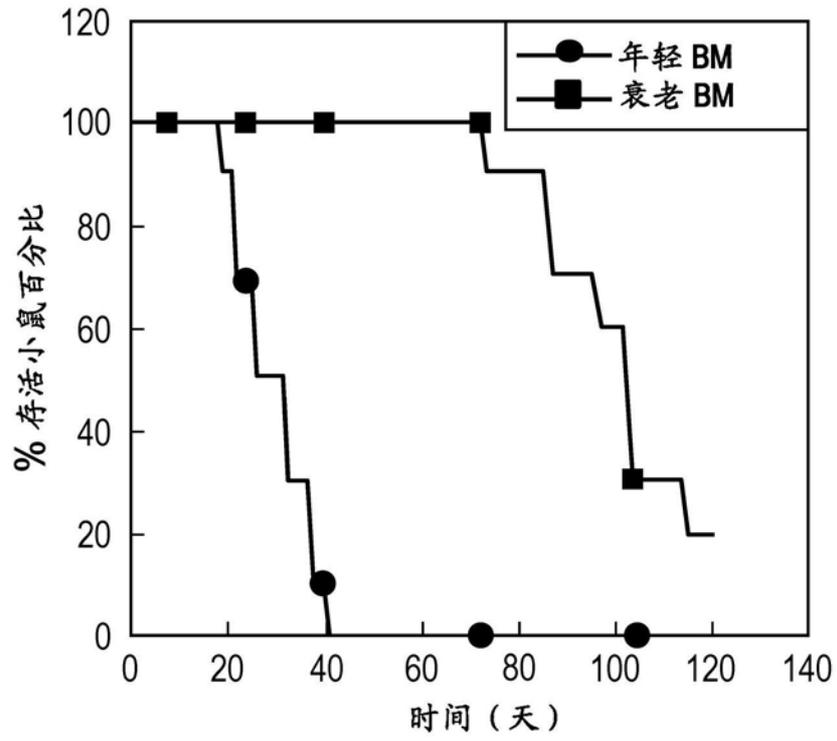


图1

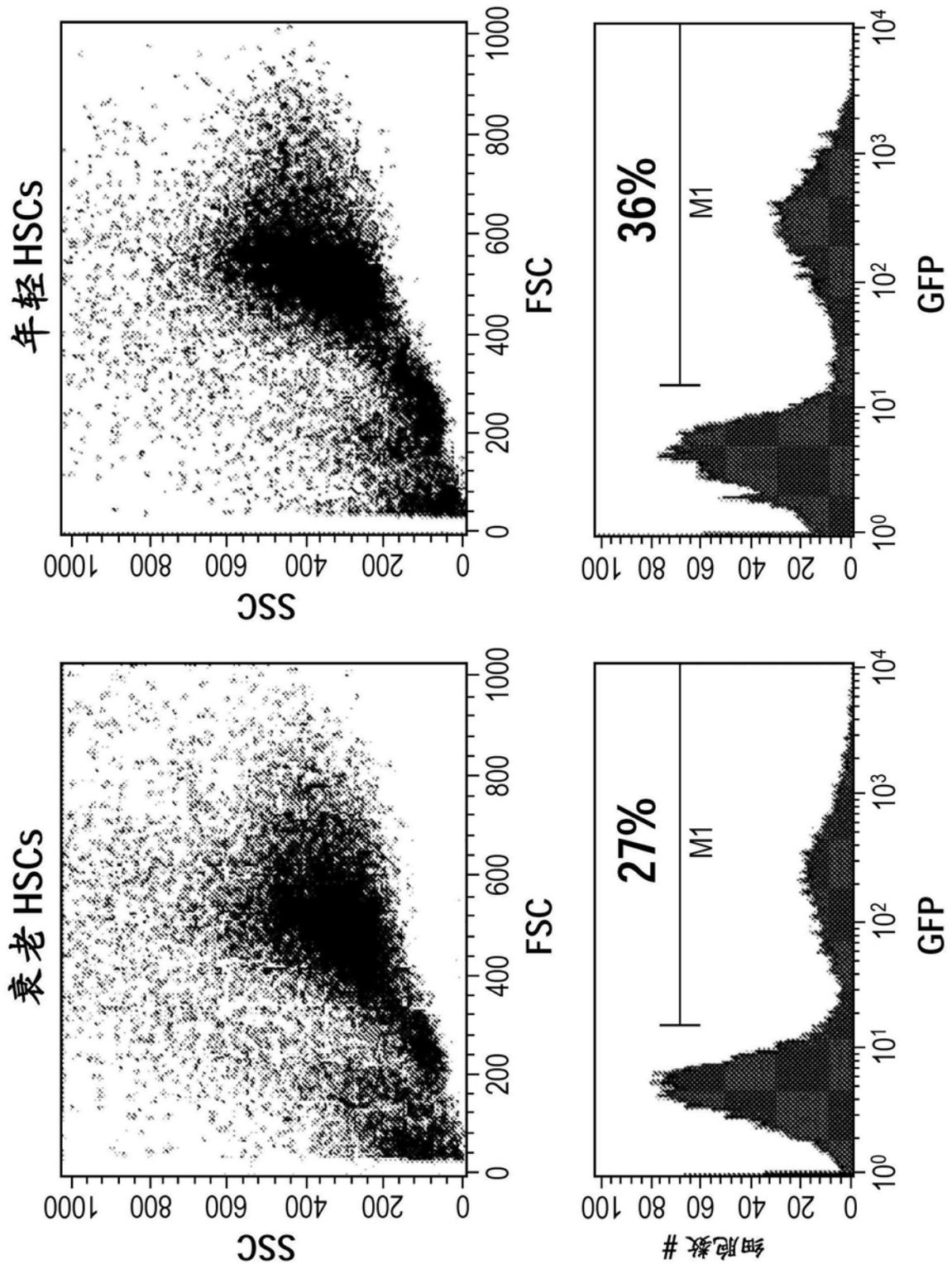


图2

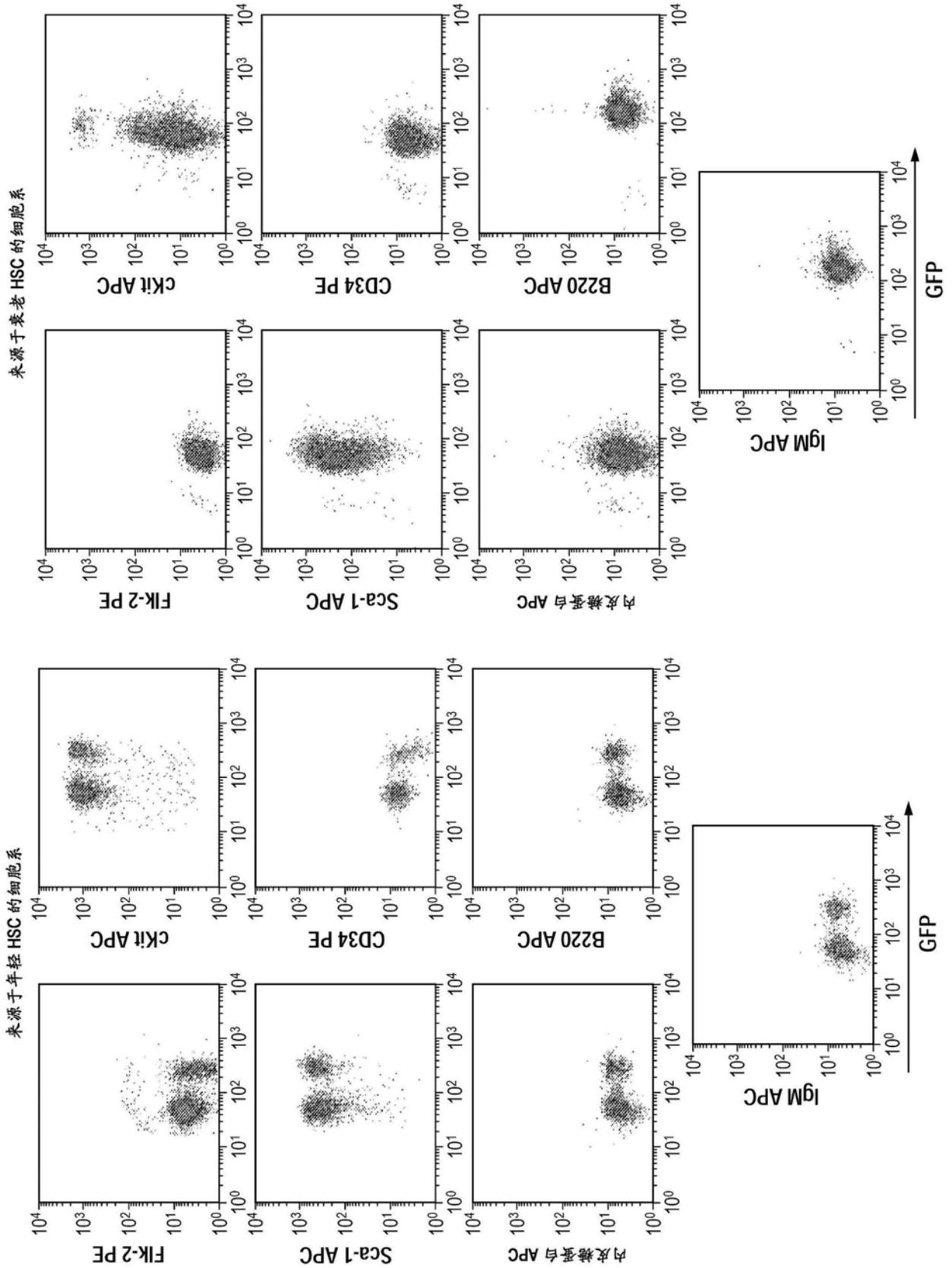


图3

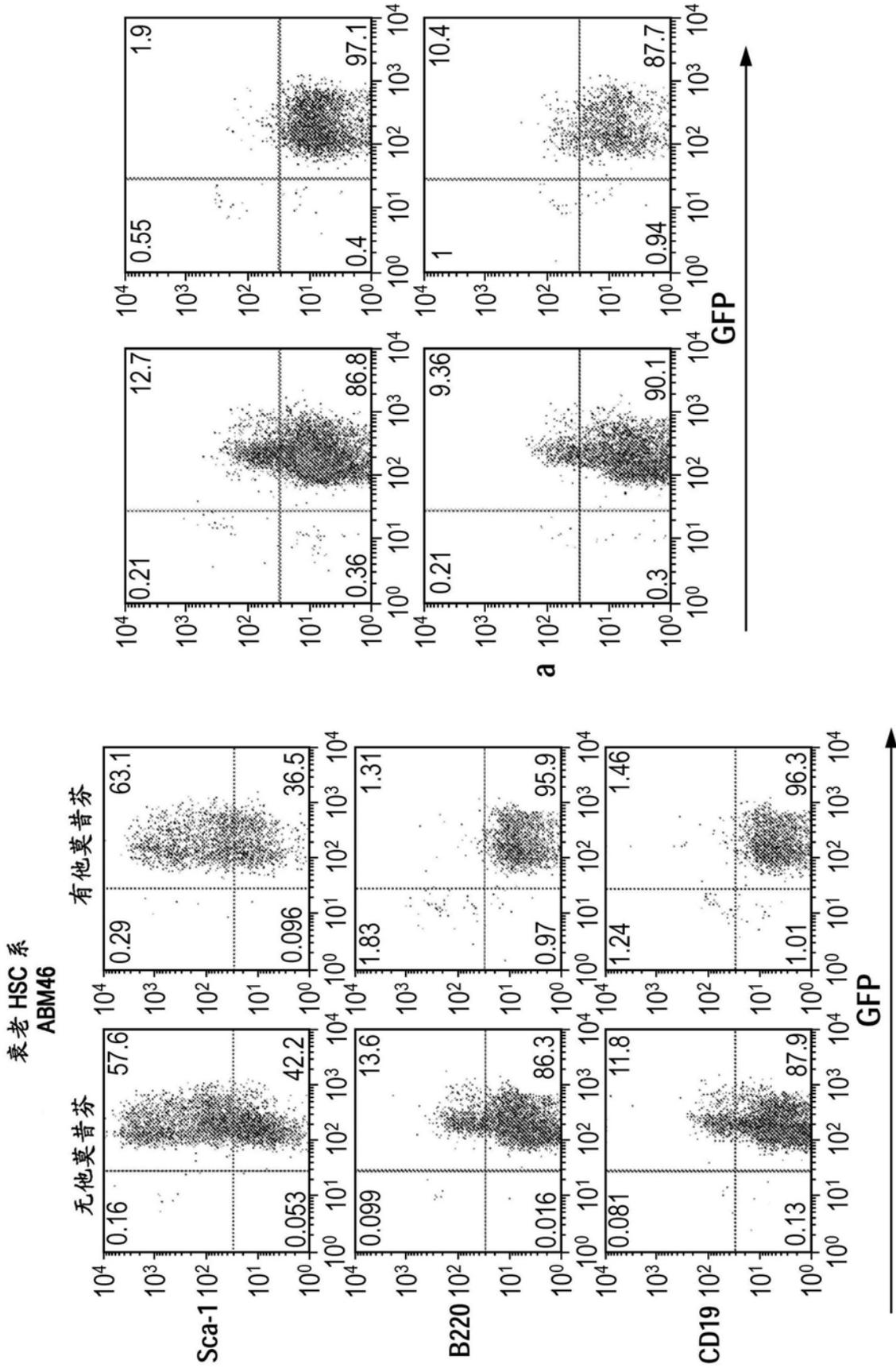


图4

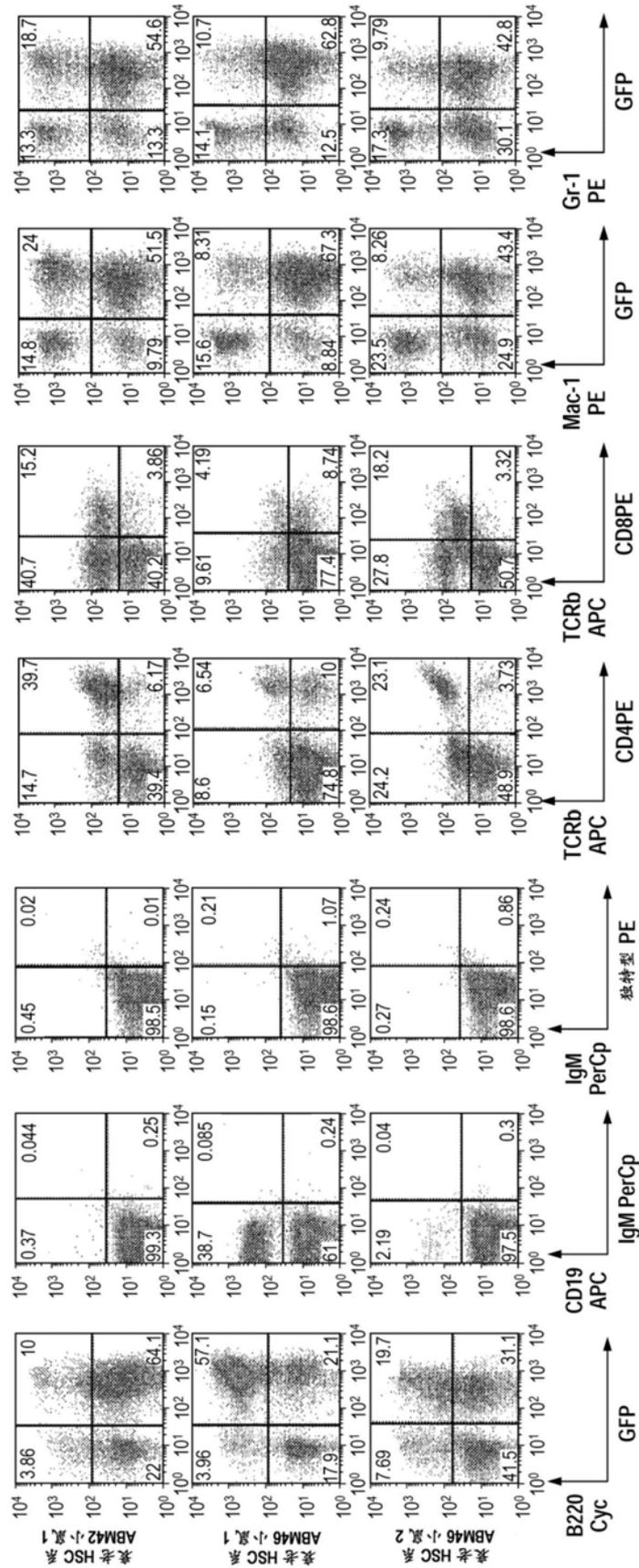


图5

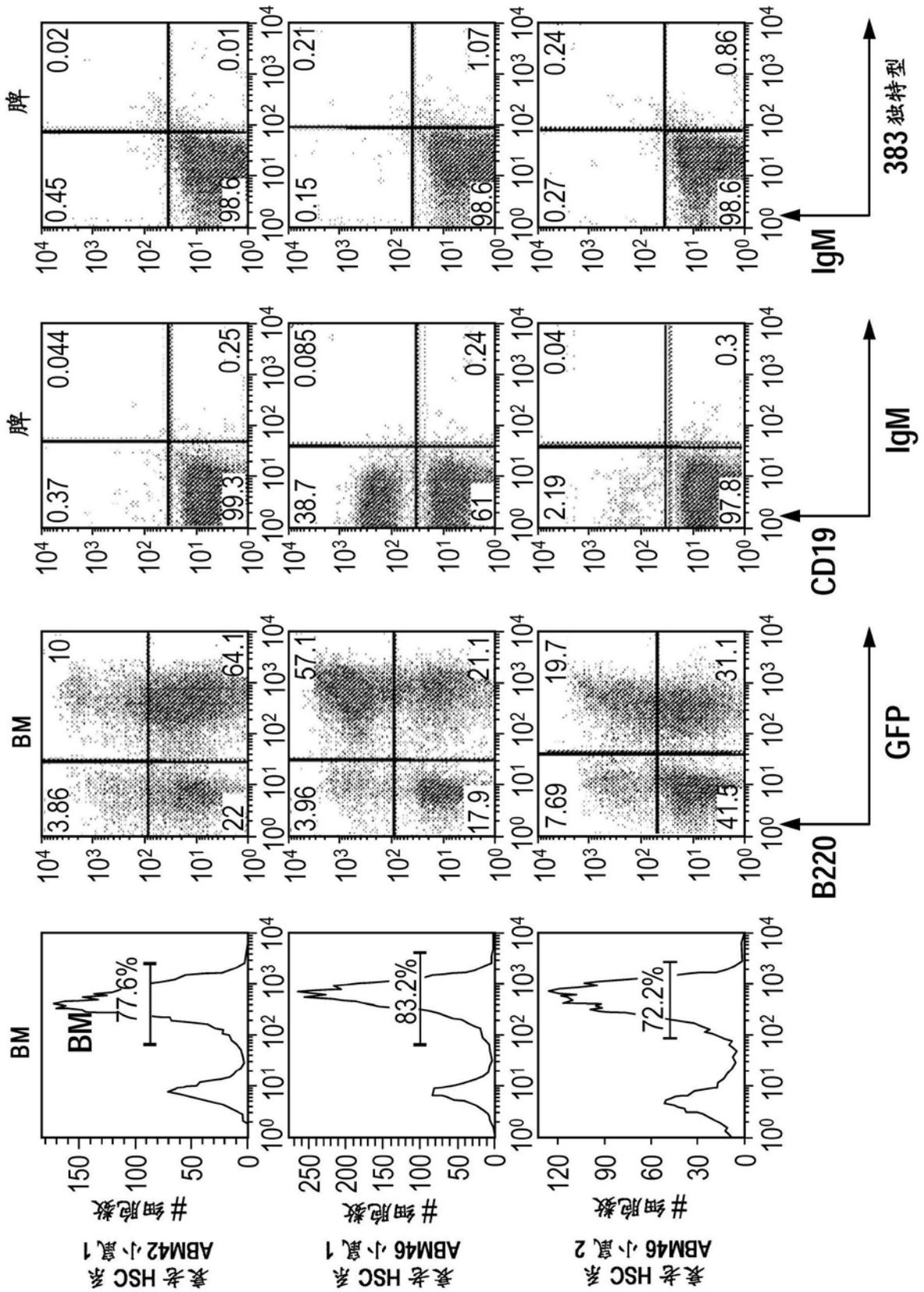


图6

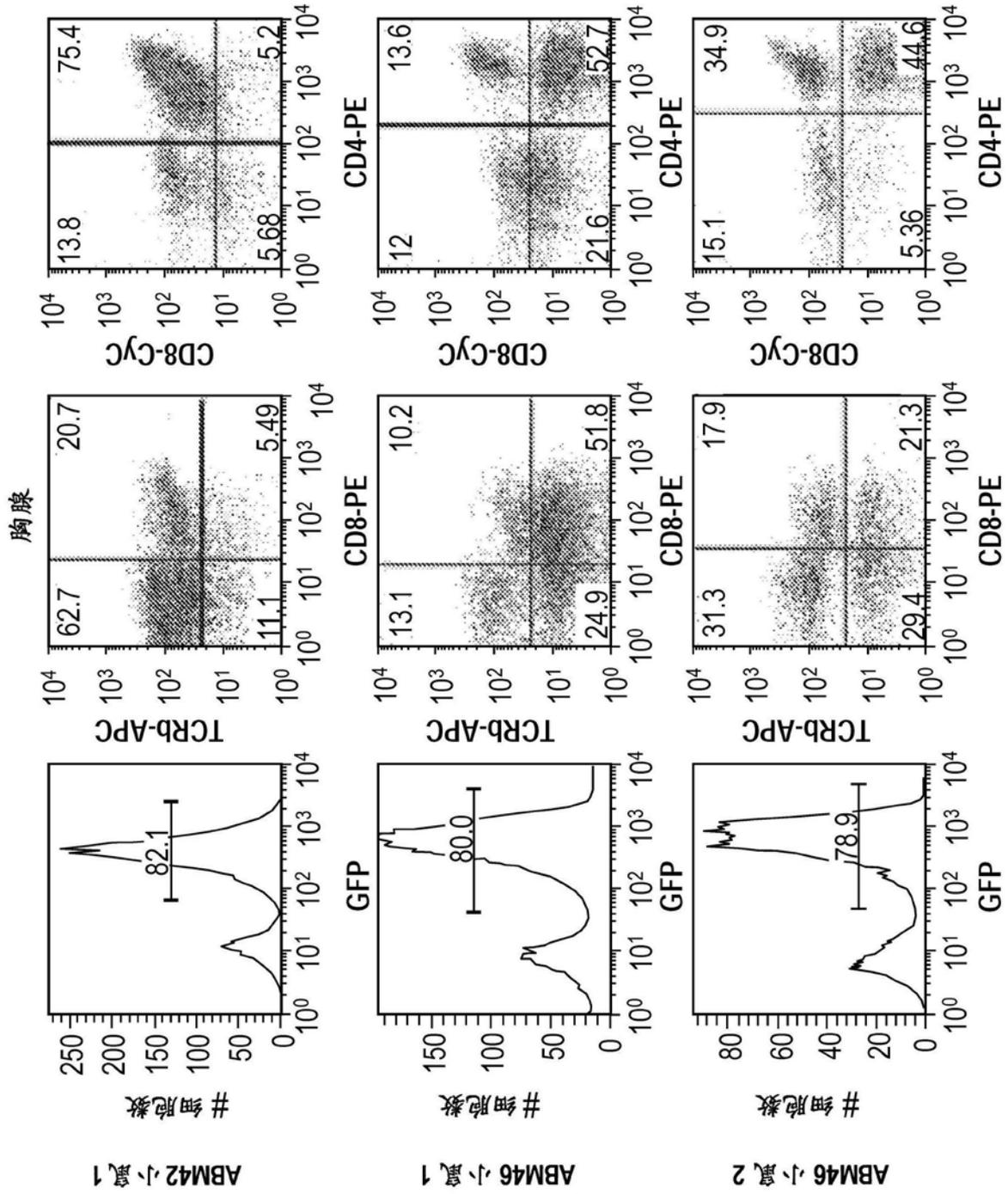


图7

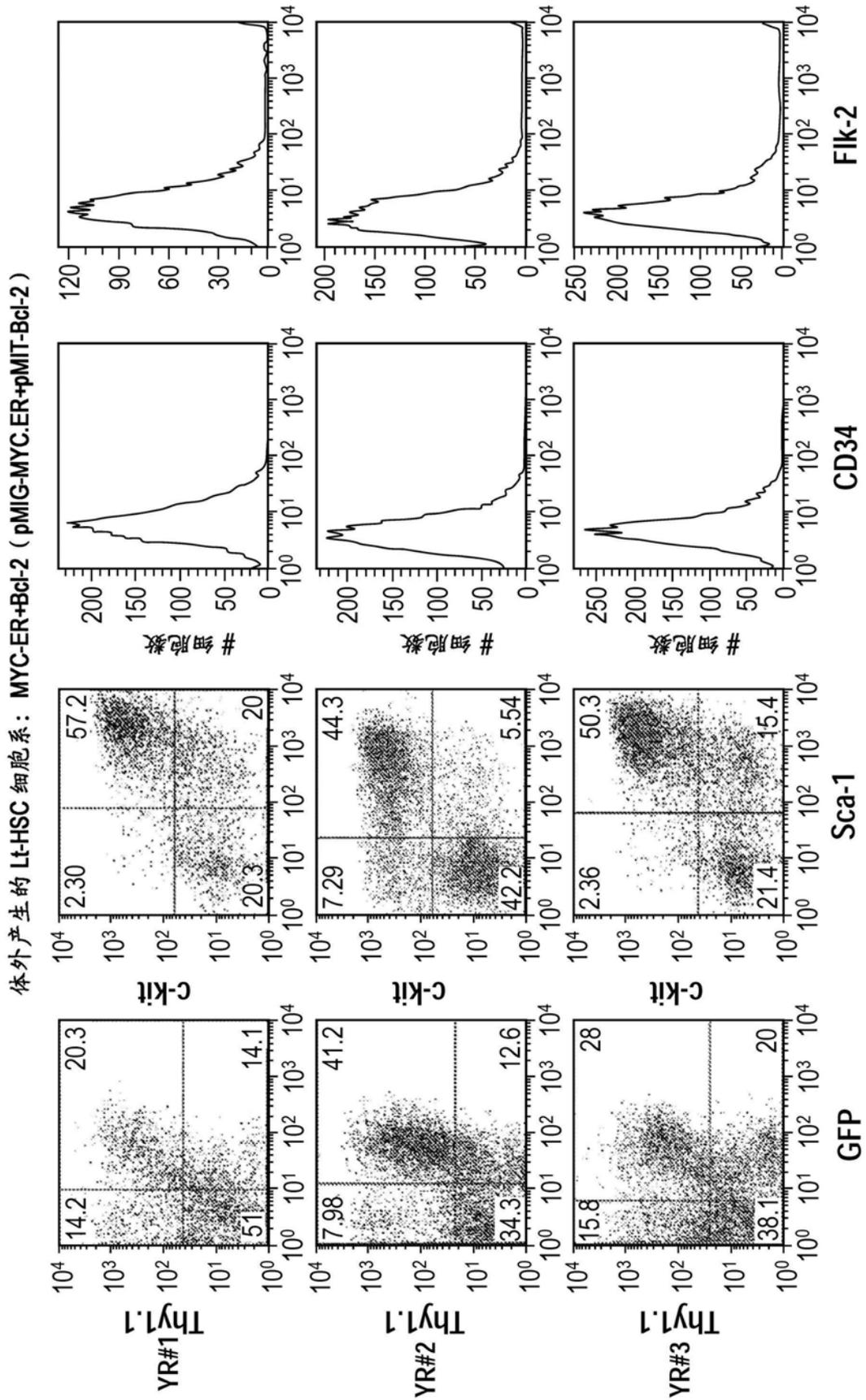


图8

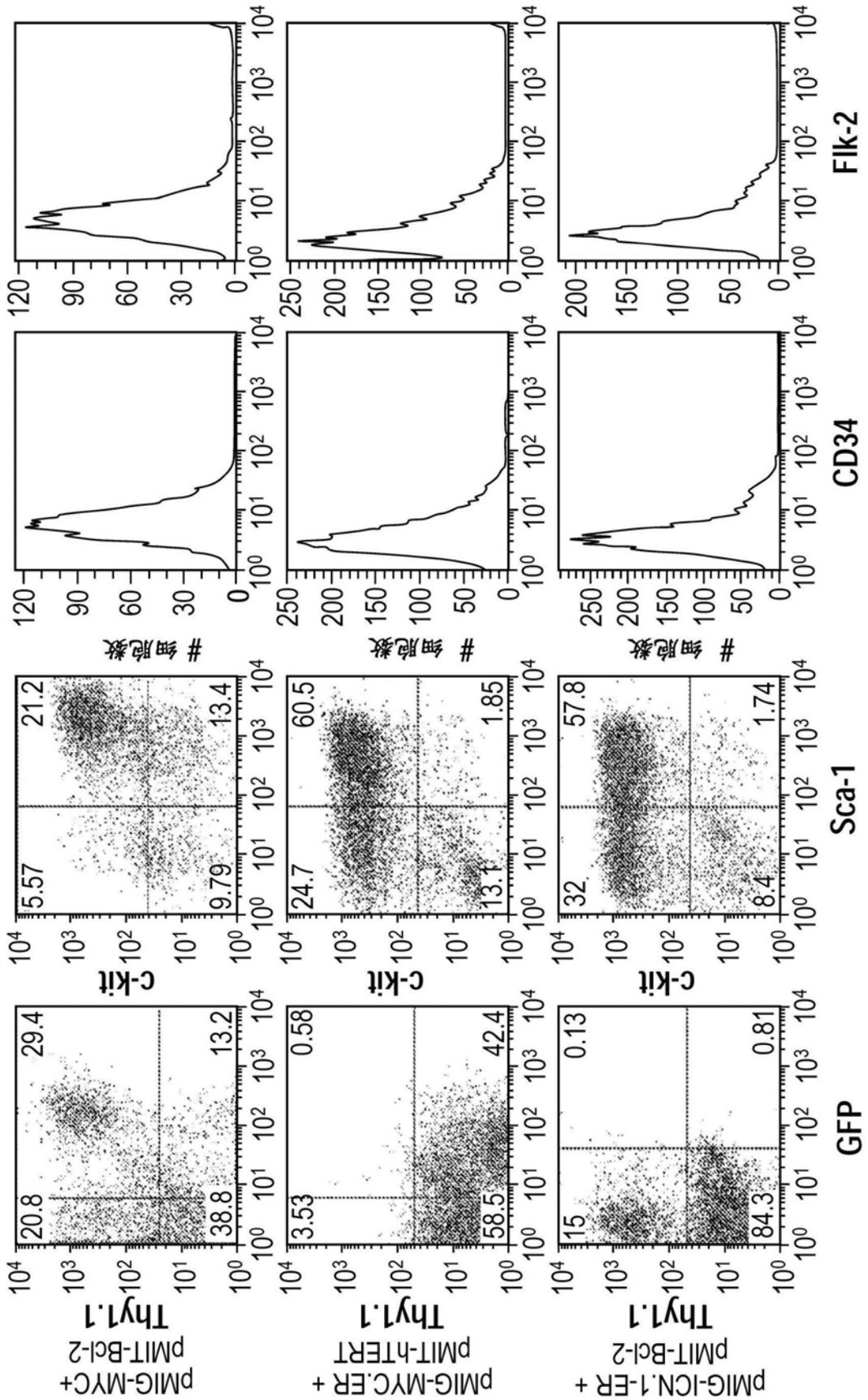


图9

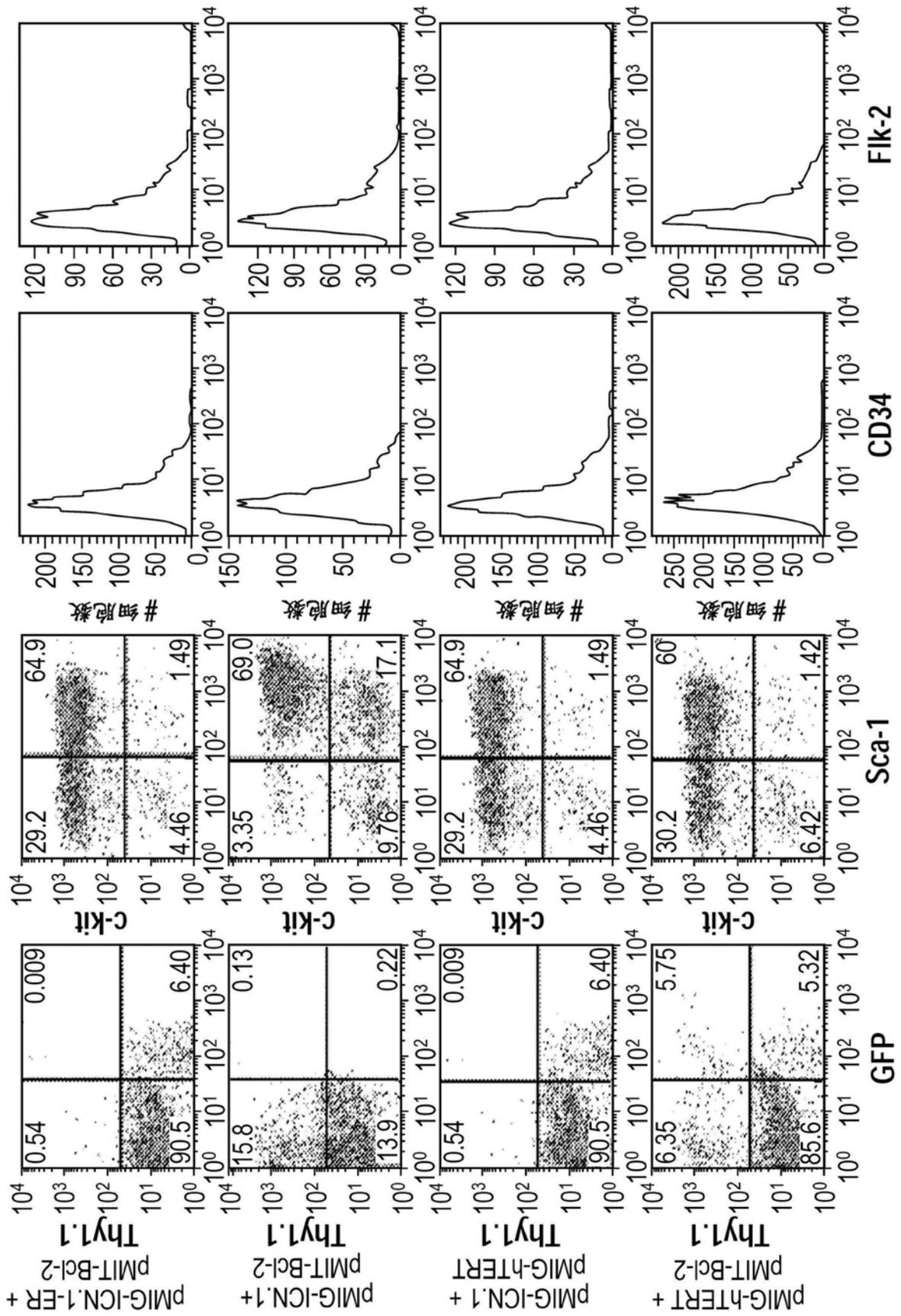


图10

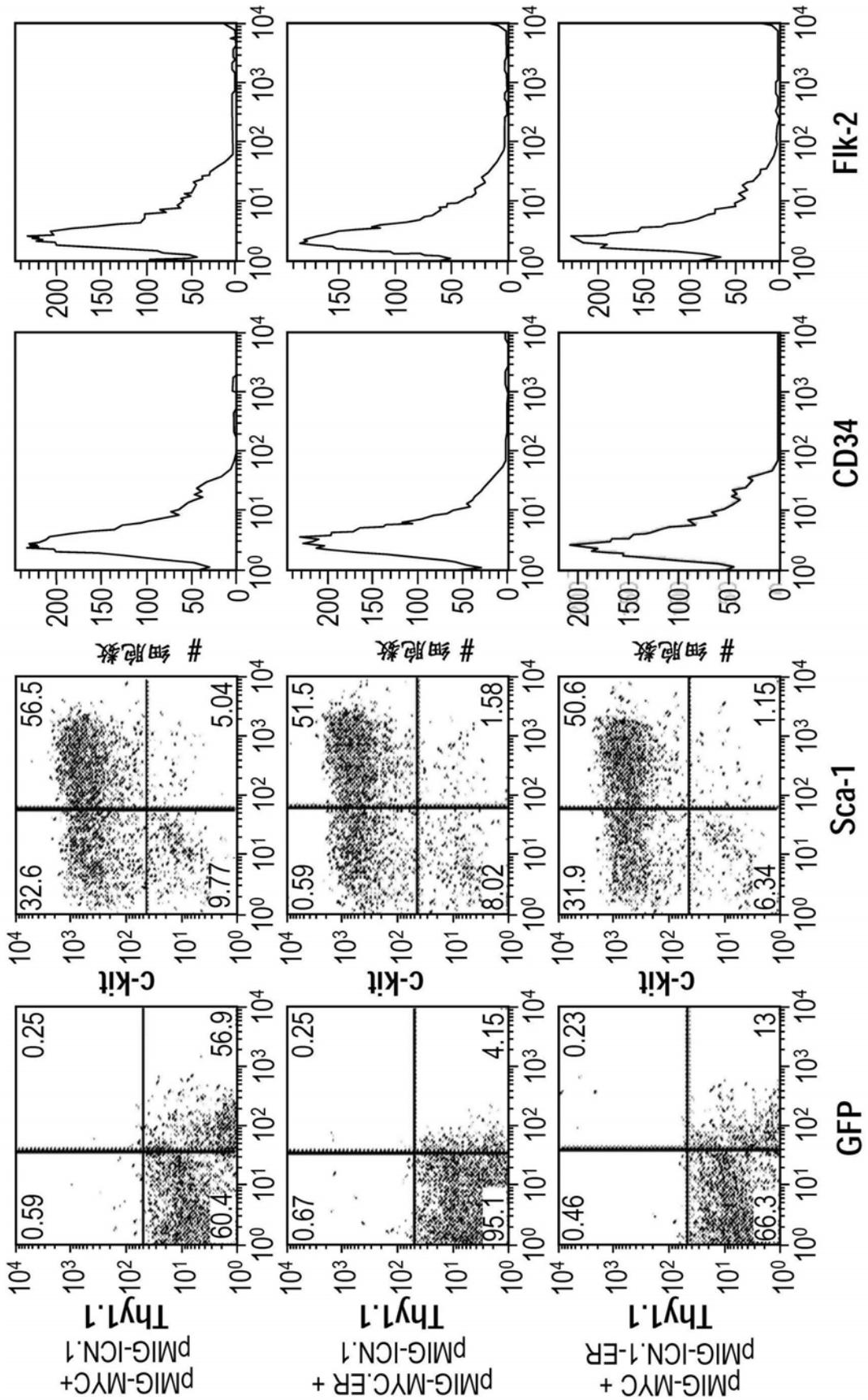


图11

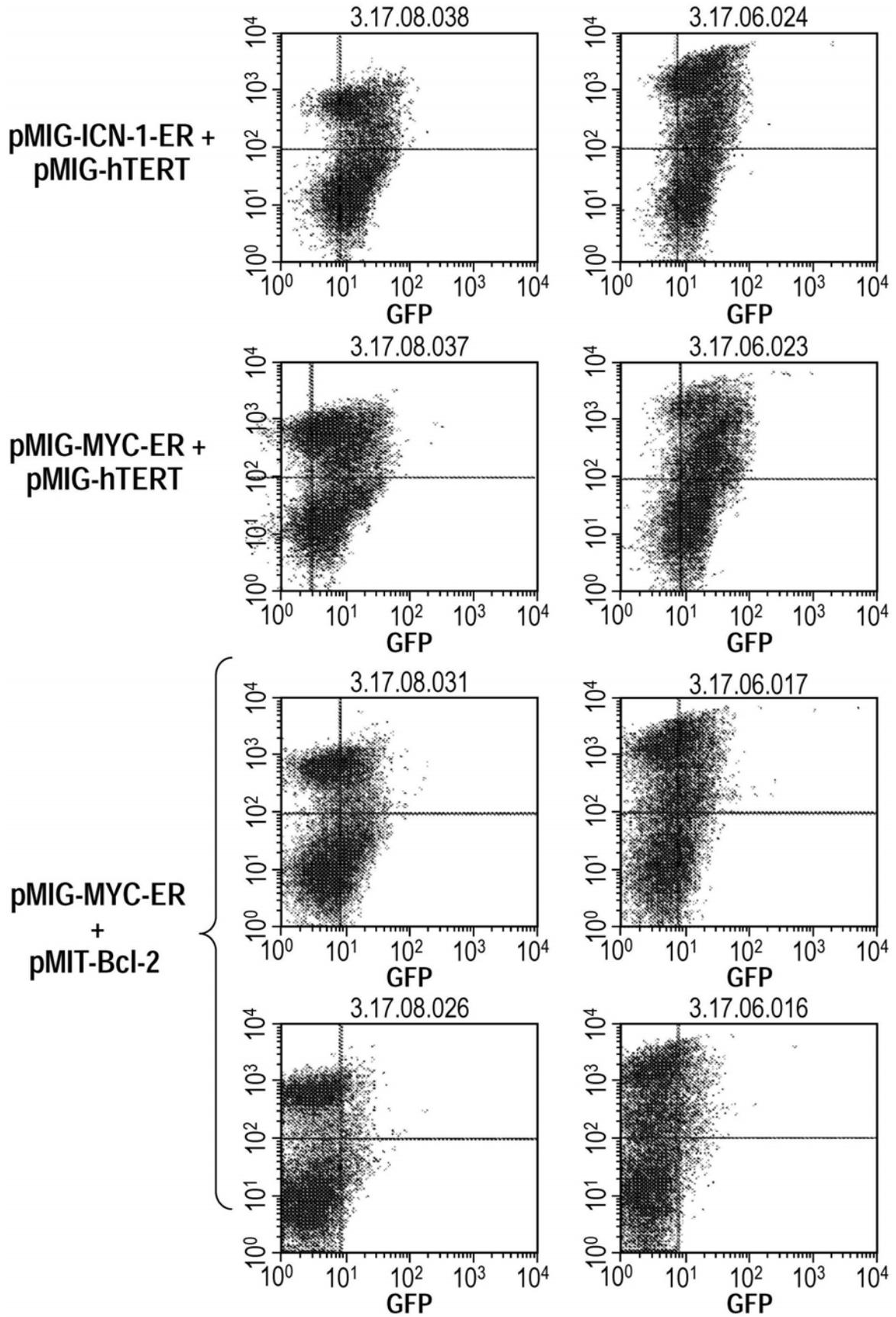


图12

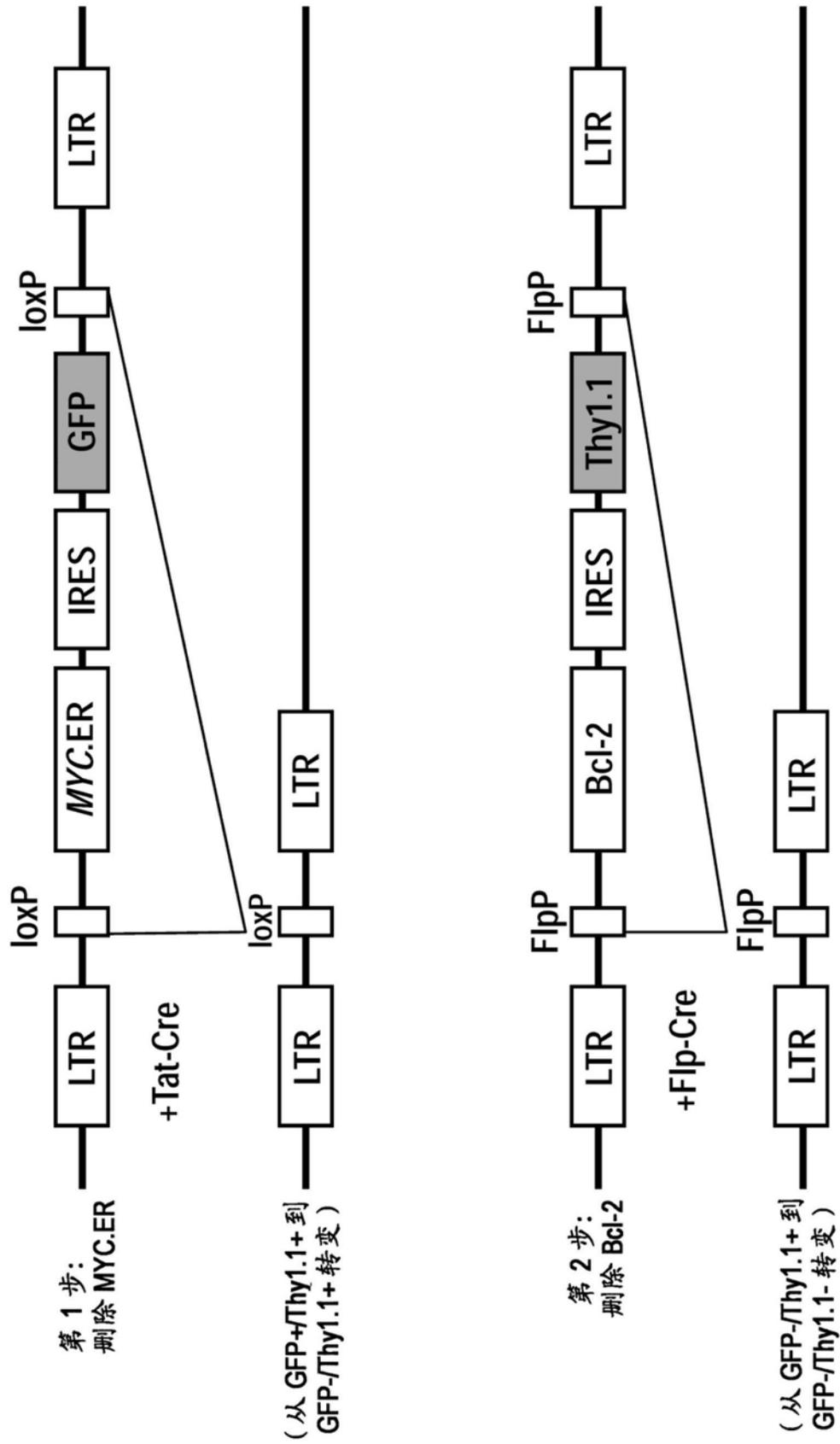


图13

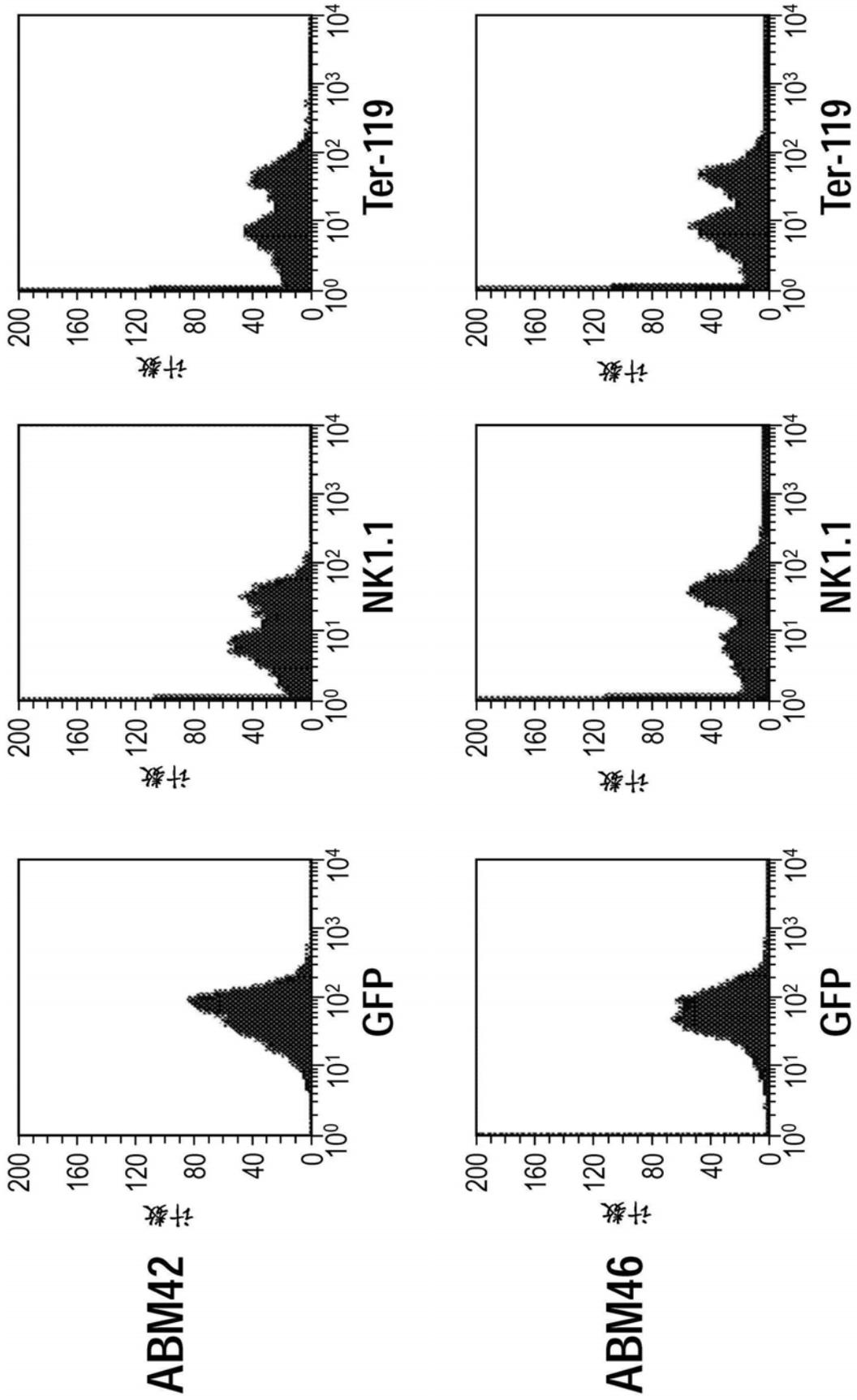


图14