



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114457027 A

(43) 申请公布日 2022.05.10

(21) 申请号 202011190235.3 *C12N 15/85* (2006.01)
(22) 申请日 2020.10.30 *A61K 39/395* (2006.01)
(71) 申请人 未来智人再生医学研究院(广州)有 *A61K 35/545* (2015.01)
限公司 *A61K 35/54* (2015.01)
地址 510000 广东省广州市黄埔区光谱中 *A61K 35/28* (2015.01)
路11号2栋2单元2003房 *A61K 35/30* (2015.01)
申请人 王淋立 *A61P 25/28* (2006.01)

(72) 发明人 王淋立 陈月花 杨建国 莫健

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205
专利代理师 胡辉

(51) Int. Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

权利要求书3页 说明书28页
序列表30页 附图11页

(54) 发明名称

一种表达Amyloid β 抗体的多能干细胞及其
衍生物与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种表达Amyloid β 抗体的多能干细胞及其衍生物与应用,所述多能干细胞或其衍生物的基因组导入有Amyloid β 抗体的表达序列,所述Amyloid β 抗体的重链序列如SEQ ID NO.1所示,轻链序列如SEQ ID NO.2所示。本发明表达Amyloid β 抑制因子的多能干细胞或其衍生物,可用于自体细胞诱导iPSCs或分化成MSCs这类低免疫源性细胞进行运用,其可在体内持续表达Amyloid β 抗体,用于治疗阿尔兹海默症及相关疾病。

1. 一种多能干细胞或其衍生物,其特征在於,所述多能干细胞或其衍生物包含Amyloid β 抗体序列,所述Amyloid β 抗体序列优选插入于所述多能干细胞或其衍生物的基因组中。

2. 一种多能干细胞或其衍生物,其特征在於,所述多能干细胞或其衍生物包含Amyloid β 抗体序列,所述Amyloid β 抗体序列优选插入于所述多能干细胞或其衍生物的基因组中;所述多能干细胞或其衍生物基因组的B2M基因和/或CIITA基因被敲除。

3. 一种多能干细胞或其衍生物,其特征在於,所述多能干细胞或其衍生物包含Amyloid β 抗体序列,所述Amyloid β 抗体序列优选插入于所述多能干细胞或其衍生物的基因组中;所述多能干细胞或其衍生物中还包含免疫兼容分子表达序列,所述免疫兼容分子用于调控多能干细胞或其衍生物中与免疫应答相关的基因的表达;所述免疫兼容分子表达序列优选插入于所述多能干细胞或其衍生物基因组中。

4. 一种多能干细胞或其衍生物,其特征在於,所述多能干细胞或其衍生物包含Amyloid β 抗体序列,所述Amyloid β 抗体序列优选插入于所述多能干细胞或其衍生物的基因组中;所述多能干细胞或其衍生物中还包含免疫兼容分子表达序列,所述免疫兼容分子用于调控多能干细胞或其衍生物中与免疫应答相关的基因的表达;所述免疫兼容分子表达序列优选插入于所述多能干细胞或其衍生物基因组中;

所述多能干细胞或其衍生物中还包含诱导型基因表达系统;所述诱导型基因表达系统优选插入于所述多能干细胞或其衍生物的基因组中。

5. 根据权利要求4所述的多能干细胞或其衍生物,其特征在於,所述诱导型基因表达系统为Tet-Off系统、二聚体诱导表达系统中的至少一种。

6. 根据权利要求3或4所述的多能干细胞或其衍生物,其特征在於,所述免疫兼容分子包括以下的一种或多种:

(I) 免疫耐受相关基因,包括CD47或HLA-G;

(II) HLA-C类分子,包括人群中比例合计超过90%的HLA-C复等位基因,或者超过90%的HLA-C复等位基因与B2M构成的融合蛋白基因;

(III) 靶向所述与免疫应答相关的基因的shRNA和/或shRNA-miR。

7. 根据权利要求3或4所述的多能干细胞或其衍生物,其特征在於,所述与免疫应答相关的基因包括:

(I) 主要组织相容性复合体基因,包括HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRA、HLA-DRB1、HLA-DRB3、HLA-DRB4、HLA-DRB5、HLA-DQA1、HLA-DQB1、HLA-DPA1和HLA-DPB1中的至少一种;

(II) 主要组织相容性复合体相关基因,包括B2M和CIITA中的至少一种。

8. 根据权利要求6所述的多能干细胞或其衍生物,其特征在於,

靶向B2M的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.3~SEQ ID NO.5中的一种;

靶向CIITA的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.6~SEQ ID NO.15中的一种;

靶向HLA-A的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.16~SEQ ID NO.18中的一种;

靶向HLA-B的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.19~SEQ ID NO.24中的一种;

靶向HLA-C的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.25~SEQ ID NO.30中的

一种；

靶向HLA-DRA的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.31~SEQ ID NO.40中的一种；

靶向HLA-DRB1的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.41~SEQ ID NO.45中的一种；

靶向HLA-DRB3的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.46~SEQ ID NO.47中的一种；

靶向HLA-DRB4的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.48~SEQ ID NO.57中的一种；

靶向HLA-DRB5的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.58~SEQ ID NO.66中的一种；

靶向HLA-DQA1的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.67~SEQ ID NO.73中的一种；

靶向HLA-DQB1的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.74~SEQ ID NO.83中的一种；

靶向HLA-DPA1的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.84~SEQ ID NO.93中的一种；

靶向HLA-DPB1的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.94~SEQ ID NO.103中的一种。

9. 根据权利要求3或4所述的多能干细胞或其衍生物,其特征在於,所述多能干细胞或其衍生物的基因组中还导入shRNA加工复合体相关基因、miRNA加工复合体相关基因和抗干扰素效应分子中的至少一种。

10. 根据权利要求9所述的多能干细胞或其衍生物,其特征在於,所述shRNA加工复合体相关基因、miRNA加工复合体相关基因包括Drosha、Ago1、Ago2、Dicer1、Exportin-5、TRBP (TARBP2)、PACT (PRKRA)、DGCR8中的至少一种;所述抗干扰素效应分子优选为靶向PKR、2-5As、IRF-3和IRF-7中至少一种的shRNA和/或shRNA-miR。

11. 根据权利要求10所述的多能干细胞或其衍生物,其特征在於,

靶向PKR的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.104~SEQ ID NO.113中的一种;

靶向2-5As的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.114~SEQ ID NO.143中的一种;

靶向IRF-3的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.144~SEQ ID NO.153中的一种;

靶向IRF-7的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.154~SEQ ID NO.163中的一种。

12. 根据权利要求6或9所述的多能干细胞或其衍生物,其特征在於,

所述shRNA表达框架:自5'到3'依次包括shRNA靶序列、茎环序列、shRNA靶序列的反向互补序列、Poly T;

其中,所述shRNA靶序、茎环序列与所述shRNA靶序列的反向互补序列形成发夹结构;

Poly T为RNA聚合酶III的转录终止子；

shRNA-miR表达框架：使用所述shRNA-miR靶序列替换所述shRNA靶序列得到。

13. 根据权利要求12所述的多能干细胞或其衍生物，其特征在于，所述shRNA表达框架中的茎环序列长度为3~9个碱基；所述Poly T长度为5~6个碱基。

14. 根据权利要求1至4任一所述的多能干细胞或其衍生物，其特征在于，所述Amyloid β 抗体序列、所述免疫兼容分子表达序列或所述诱导型基因表达系统插入于所述多能干细胞或其衍生物基因组的安全位点。

15. 根据权利要求14中所述的多能干细胞或其衍生物，其特征在于，所述基因组安全位点包括AAVS1安全位点、eGSH安全位点、H11安全位点中的一种或多种。

16. 根据权利要求1至4任一所述的多能干细胞或其衍生物，其特征在于，所述多能干细胞包括胚胎干细胞、胚胎生殖细胞、胚胎癌细胞、或者诱导多能干细胞。

17. 根据权利要求1至4任一所述的多能干细胞或其衍生物，其特征在于，所述多能干细胞衍生物包括多能干细胞所分化的成体干细胞、各胚层细胞或组织；

所述成体干细胞包括间充质干细胞或者神经干细胞。

18. 根据权利要求1至4任一所述的多能干细胞或其衍生物，其特征在于，所述Amyloid β 抗体的重链序列如SEQ ID NO.1所示，轻链序列如SEQ ID NO.2所示。

19. 权利要求1~18任一所述的多能干细胞或其衍生物在制备阿尔兹海默症治疗药物中的应用。

20. 一种制剂，包含权利要求1~18任一所述的多能干细胞或其衍生物。

一种表达Amyloid β 抗体的多能干细胞及其衍生物与应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,具体涉及一种表达Amyloid β 抗体的多能干细胞及其衍生物与应用。

背景技术

[0002] β -淀粉样蛋白(amyloid- β ,A β)是由淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein,APP)经 β -分泌酶和 γ -分泌酶的蛋白水解作用而产生的含有39-43个氨基酸的多肽。它可由多种细胞产生,循环于血液、脑脊液和脑间质液中,大多与伴侣蛋白分子结合,少数以游离状态存在。 β -淀粉样蛋白片段位于淀粉样前体蛋白的跨膜区域,淀粉样前体蛋白首先经 β -分泌酶在 β 位点裂解为 β -N端片段(sAPP β)和 β -C端片段,然后 γ -分泌酶在 β -C端片段的近N端跨膜区域水解释放出有39~43个氨基酸组成的A β 肽段,此过程被称为APP的淀粉样降解途径。

[0003] 另一方面,在细胞治疗领域,同种异体的免疫兼容问题依然是一大难题。近年已有许多报道通过敲除B2M、CIITA等基因,实现HLA-I和HLA-II细胞表面或本身基因的缺失表达,进而使细胞具备免疫耐受或逃逸T/B细胞特异性免疫应答,产生免疫兼容的通用型PSCs,为更广泛的通用型PSCs源细胞、组织、器官应用奠定了重要的基础。也有报道细胞过表达CTLA4-Ig、PD-L1从而抑制同种异的免疫排斥。然而,这些方案要么免疫兼容不彻底,仍有通过其他途径发生同种异体的免疫排斥;要么彻底消除同种异体免疫排斥应答,但使供体源移植物的细胞本身同时丧失了抗原提呈的能力,这给受体带来了极大的致瘤性和病毒感染等疾病的风险。

[0004] 为此,也有报道,不直接敲除B2M,而敲除HLA-A、HLA-B或一并敲除CIITA的同时,保留HLA-C,并构建12个覆盖人群超过90%的HLA-C免疫配型抗原,以此达到移植物的细胞仍具备一定程度的抗原提呈功能,并且同时能够通过HLA-C抑制NK细胞的固有免疫应答。但这类细胞,一来,HLA-I类抗原提呈的抗原类型缩小了三分之二以上,能够提呈的抗原完整性极大地不可逆的缩小,对于各种肿瘤、病毒以及其他疾病抗原的提呈具有极大的偏向性,仍然保留了相当程度的致瘤和病毒感染等疾病的风险,在CIITA同时敲除的情况下其致病风险更高;二来,12种高频免疫配型的HLA-C抗原种族差异很大,通过我们核实计算部分地区仅能占到70%的比例,而中国、印度等人口大国目前尚未有权威的大样本量的HLA数据展示,这样制备出来的通用型PSCs使用仍受到巨大的配型空缺考验;第三,这种方法会经历数次反复的基因编辑工作,按每次基因编辑至少两轮单细胞分离培养计,整个过程至少需要六轮以上的单细胞分离培养,这些流程不可避免且极大概率地因多次基因编辑脱靶或染色质不稳定或因大量单细胞传代增殖造成细胞各种不可预测的突变,进而诱发致癌、代谢疾病等各种问题。由此可见,这类免疫兼容方案亦为“过渡时期”的权宜之计,仍有许多问题没有更好的解决。

[0005] 此外,还有人设计通过诱导自杀基因在供体组织、细胞致病后诱导杀死,这样做的后果将产生严重的组织坏死、细胞因子风暴等不可预知的疾病风险问题,并且这类设计的

细胞杀死后将不复存在合适的供体细胞、组织和器官又是一大难题。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种多能干细胞或其衍生物；

[0007] 本发明的另一目的在于提供另一种多能干细胞或其衍生物；

[0008] 本发明的另一目的在于提供另一种多能干细胞或其衍生物；

[0009] 本发明的另一目的在于提供另一种多能干细胞或其衍生物；

[0010] 本发明的另一目的在于提供上述多能干细胞或其衍生物在制备阿尔兹海默症治疗药物中的应用；

[0011] 本发明的另一目的在于提供一种制剂。

[0012] 本发明所采取的技术方案是：

[0013] 本发明的第一个方面，提供：

[0014] 一种多能干细胞或其衍生物，该多能干细胞或其衍生物包含Amyloid β 抗体序列，上述Amyloid β 抗体序列优选插入于上述多能干细胞或其衍生物的基因组中。

[0015] 发明人发现，在多能干细胞或其衍生物中导入Amyloid β 抗体的表达序列后，多能干细胞或其衍生物中分泌的靶向Amyloid β 的Amyloid β 抗体，这些抗体与靶细胞结合，能够有效治疗阿尔兹海默症。

[0016] 本发明的第二个方面，提供：

[0017] 一种多能干细胞或其衍生物，该多能干细胞或其衍生物包含Amyloid β 抗体序列，上述Amyloid β 抗体序列优选插入于上述多能干细胞或其衍生物的基因组中；

[0018] 上述多能干细胞或其衍生物基因组的B2M基因和/或CIITA基因被敲除。

[0019] 当B2M和CIITA基因被敲除后，其完全消除HLA-I和HLA-II类分子产生的影响，因此，其治疗效果最佳。

[0020] 本发明的第三个方面，提供：

[0021] 一种多能干细胞或其衍生物，该多能干细胞或其衍生物包含Amyloid β 抗体序列，上述Amyloid β 抗体序列优选插入于上述多能干细胞或其衍生物的基因组中；

[0022] 上述多能干细胞或其衍生物中还包含免疫兼容分子表达序列，上述免疫兼容分子用于调控多能干细胞或其衍生物中与免疫应答相关的基因的表达；上述免疫兼容分子表达序列优选插入于所述多能干细胞或其衍生物基因组中。

[0023] 本发明的第四个方面，提供：

[0024] 一种多能干细胞或其衍生物，该多能干细胞或其衍生物包含Amyloid β 抗体序列，上述Amyloid β 抗体序列优选插入于上述多能干细胞或其衍生物的基因组中；

[0025] 上述多能干细胞或其衍生物中还包含免疫兼容分子表达序列，上述免疫兼容分子用于调控多能干细胞或其衍生物中与免疫应答相关的基因的表达；上述免疫兼容分子表达序列优选插入于所述多能干细胞或其衍生物基因组中；

[0026] 上述多能干细胞或其衍生物中还包含诱导型基因表达系统；上述诱导型基因表达系统优选插入于所述多能干细胞或其衍生物的基因组中。

[0027] 进一步地，上述诱导型基因表达系统为Tet-Off系统、二聚体诱导表达系统中的至少一种。

[0028] 本发明将tet-Off系统以及一种或多种免疫兼容分子的序列敲入多能干细胞的基因组安全位点处,通过四环素的添加与否精准开启或关闭免疫兼容分子的表达,从而可逆调控多能干细胞或其衍生物中主要组织相容性复合体相关基因的表达。

[0029] 二聚体关闭表达系统具体指:运用二聚化的诱导剂或者二聚体在无活性的融合蛋白上重组有活性的转录因子。最常用的体系是将天然产物雷帕霉素(rapamycin)或者无生物活性的类似物作为二聚化的药物。雷帕霉素(或类似物)同胞质蛋白FKBP12(FKBP与FK506结合的蛋白)和一种大的丝-苏氨酸蛋白激酶,称为FRAP(FRAP-雷帕霉素相关蛋白,即mTOR(哺乳动物的雷帕霉素靶点))有高度亲和性,又与这两种蛋白质相结合的功能,因此作为异源性二聚体将这两种蛋白质聚到一起。为调控靶基因转录,将DNA结合区域融合到一个或多个FKBP结构域,将转录抑制域融合到FRAP的93位氨基酸部位,称为FRB,这样足以结合FKBP-雷帕霉素复合物。只有在雷帕霉素存在的情况下,这两种融合蛋白才能发生二聚化。因而抑制具有与DNA结合区域相结合的位点的基因进行转录。

[0030] 更进一步地,上述免疫兼容分子包括以下的一种或多种:

[0031] (I) 免疫耐受相关基因,包括CD47或HLA-G;

[0032] (II) HLA-C类分子,包括人群中比例合计超过90%的HLA-C复等位基因,或者超过90%的HLA-C复等位基因与B2M构成的融合蛋白基因;

[0033] (III) 靶向所述与免疫应答相关的基因的shRNA和/或shRNA-miR。

[0034] 更进一步地,上述与免疫应答相关的基因包括:

[0035] (I) 主要组织相容性复合体基因,包括HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRA、HLA-DRB1、HLA-DRB3、HLA-DRB4、HLA-DRB5、HLA-DQA1、HLA-DQB1、HLA-DPA1和HLA-DPB1中的至少一种;

[0036] (II) 主要组织相容性复合体相关基因,包括B2M和CIITA中的至少一种。

[0037] 更进一步地,上述靶向B2M的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.3~SEQ ID NO.5中的一种;

[0038] 靶向CIITA的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.6~SEQ ID NO.15中的一种;

[0039] 靶向HLA-A的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.16~SEQ ID NO.18中的一种;

[0040] 靶向HLA-B的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.19~SEQ ID NO.24中的一种;

[0041] 靶向HLA-C的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.25~SEQ ID NO.30中的一种;

[0042] 靶向HLA-DRA的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.31~SEQ ID NO.40中的一种;

[0043] 靶向HLA-DRB1的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.41~SEQ ID NO.45中的一种;

[0044] 靶向HLA-DRB3的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.46~SEQ ID NO.47中的一种;

[0045] 靶向HLA-DRB4的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.48~SEQ ID NO.57中的一种;

[0046] 靶向HLA-DRB5的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.58~SEQ ID NO.66中的一种;

[0047] 靶向HLA-DQA1的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.67~SEQ ID NO.73中的一种;

[0048] 靶向HLA-DQB1的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.74~SEQ ID NO.83中的一种;

[0049] 靶向HLA-DPA1的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.84~SEQ ID NO.93中的一种;

[0050] 靶向HLA-DPB1的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.94~SEQ ID NO.103中的一种。

[0051] 更进一步地,上述多能干细胞或其衍生物的基因组中还导入shRNA加工复合体相关基因、miRNA加工复合体相关基因和抗干扰素效应分子中的至少一种。

[0052] 更进一步地,上述shRNA加工复合体相关基因、miRNA加工复合体相关基因包括Drosha、Ago1、Ago2、Dicer1、Exportin-5、TRBP (TARBP2)、PACT (PRKRA)、DGCR8中的至少一种;所述抗干扰素效应分子优选为靶向PKR、2-5As、IRF-3和IRF-7中至少一种的shRNA和/或shRNA-miR。

[0053] 在细胞核内的初级miRNA (pri-miRNA) 经过复合物Drosha-DGCR8进行微处理,将pri-miRNA裂解成前体miRNA (pre-miRNA),这时会形成发夹结构。接着,经Exportin-5-Ran-GTP复合物将pre-miRNA转运出核。在胞浆中与双链RNA结合蛋白TRBP (TARBP2) 结合的RNase Dicer酶将pre-miRNA分解成成熟的长度,miRNA在这时还处于双链状态。最后被转运进AGO2,形成RISC (RNA诱导沉默复合体)。最终miRNA双链的一条链保留在RISC复合物中,另外一条则排出被迅速降解掉。而DGCR8作为Drosha的主要结合蛋白,可以通过其C末端的两个双链RNA结合区域与pri-miRNA结合,招募并指导Drosha在pri-miRNA的正确位置剪切,生产pre-miRNA,pre-miRNA进一步被Dicer和TRBP/PACT加工剪切,形成成熟的miRNA。DGCR8的缺失或异常表达会影响Drosha的剪切活性,进而影响miRNA的活性,导致疾病的发生。TRBP能够招募Dicer复合物miRNA形成RISC Ago2。

[0054] 更进一步地,上述靶向PKR的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.104~SEQ ID NO.113中的一种;

[0055] 靶向2-5As的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.114~SEQ ID NO.143中的一种;

[0056] 靶向IRF-3的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.144~SEQ ID NO.153中的一种;

[0057] 靶向IRF-7的shRNA和/或shRNA-miR的靶序列选自SEQ ID NO.154~SEQ ID NO.163中的一种。

[0058] 更进一步地,上述shRNA表达框架:自5' 到3' 依次包括shRNA靶序列、茎环序列、上述shRNA靶序列的反向互补序列、Poly T;

[0059] 其中,所述shRNA靶序、茎环序列与上述shRNA靶序列的反向互补序列形成发夹结构;Poly T为RNA聚合酶III的转录终止子;

[0060] shRNA-miR表达框架:使用上述shRNA-miR靶序列上述的shRNA靶序列得到。

[0061] 更进一步地,上述shRNA表达框架中的茎环序列长度为3~9个碱基;上述Poly T长度为5~6个碱基。

[0062] 更进一步地,上述Amyloid β 抗体序列、上述免疫兼容分子表达序列或上述诱导型基因表达系统插入于上述多能干细胞或其衍生物基因组的安全位点。

[0063] 进一步地,上述基因组安全位点包括AAVS1安全位点、eGSH安全位点、H11安全位点中的一种或多种。

[0064] 进一步地,上述多能干细胞包括胚胎干细胞、胚胎生殖细胞、胚胎癌细胞、或者诱导多能干细胞。

[0065] 更进一步地,上述多能干细胞衍生物包括多能干细胞所分化的成体干细胞、各胚层细胞或组织;

[0066] 上述成体干细胞包括间充质干细胞或者神经干细胞。

[0067] 进一步地,上述Amyloid β 抗体的重链序列如SEQ ID NO.1所示,轻链序列如SEQ ID NO.2所示。

[0068] 本发明的第五个方面,提供:

[0069] 上述多能干细胞或其衍生物在制备阿尔兹海默症治疗药物中的应用。

[0070] 本发明的第六个方面,提供:

[0071] 一种制剂,该制剂包含上述的多能干细胞或其衍生物。

[0072] 本发明的有益效果是:

[0073] 1.本发明中的表达Amyloid β 抗体的多能干细胞或其衍生物,可用于自体细胞诱导iPSCs或分化成MSCs这类低免疫源性细胞进行运用,其可在体内持续表达Amyloid β 抗体,用于治疗阿尔兹海默症。

[0074] 2.本发明中的表达Amyloid β 抗体的免疫兼容多能干细胞或其衍生物,由于多能干细胞或其衍生物中的B2M、CIITA基因被敲除,或者其基因组中导入了免疫兼容分子表达序列,因而此类多能干细胞或其衍生物的免疫源性低,将其移植到受体中时,可以克服供体细胞和受体之间的同种异体免疫排斥问题,使得供体细胞能够在受体内长时间持续表达Amyloid β 抗体。

[0075] 3.本发明中的表达Amyloid β 抗体的免疫兼容可逆的多能干细胞或其衍生物的基因组中导入诱导型基因表达系统以及免疫兼容分子表达序列。诱导型基因表达系统受外源诱导物的调控,通过调整外源诱导物的添加量、持续作用时间、种类来控制诱导型基因表达系统的开启与关闭,从而控制免疫兼容分子表达序列的表达量。而免疫兼容分子可调控多能干细胞或其衍生物中与免疫应答相关的基因的表达。当免疫兼容分子正常表达时,多能干细胞或其衍生物中与免疫应答相关的基因的表达被抑制或过表达,可以消除或降低供体细胞和受体之间的同种异体免疫排斥应答,使得供体细胞能够长时间在受体中持续表达Amyloid β 抗体。而当供体细胞发生病变时,可通过外源诱导物诱导关闭免疫兼容分子的表达,从而可逆地使供体细胞表面重新表达HLAI类分子,恢复供体细胞的抗原提呈能力,使受体能够清除病变的细胞,从而提高了这类通用型多能干细胞或其衍生物的临床安全性,极大地扩展其在临床应用的价值。

附图说明

- [0076] 图1为AAVS1 KI Vector (shRNA,组成型)的质粒图谱;
 [0077] 图2为AAVS1 KI Vector (shRNA,诱导型)的质粒图谱;
 [0078] 图3为AAVS1 KI Vector (shRNA-miR,组成型)的质粒图谱;
 [0079] 图4为AAVS1 KI Vector (shRNA-miR,诱导型)的质粒图谱;
 [0080] 图5为sgRNA clone B2M-1质粒图谱;
 [0081] 图6为sgRNA clone B2M-2质粒图谱;
 [0082] 图7为sgRNA clone CIITA-1质粒图谱;
 [0083] 图8为sgRNA clone CIITA-2质粒图谱;
 [0084] 图9为Cas9 (D10A) 质粒图谱;
 [0085] 图10为sgRNA Clone AAVS1-1质粒图谱;
 [0086] 图11为sgRNA Clone AAVS1-2质粒图谱。

具体实施方式

[0087] 为了使本发明的发明目的、技术方案及其技术效果更加清晰,以下结合具体实施方式,对本发明进行进一步详细说明。应当理解的是,本说明书中描述的具体实施方式仅仅是为了解释本发明,并非为了限定本发明。

[0088] 所使用的实验材料和试剂,若无特别说明,均为常规可从商业途径所获得的耗材和试剂。

[0089] 1. Amyloid β 抗体的选择

[0090] Amyloid β 抗体的重链(HC)序列如SEQ ID NO.1所示,轻链(LC)序列如SEQ ID NO.2所示。

[0091] Amyloid β 抗体的重链(HC)序列为:

[0092] 5'-GTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCGTGGTGCAGCCCCGGCAGGAGCCTGAGGCTGAGCTGCGC
 CGCCAGCGGCTTCGCCTCAGCAGCTACGGCATGCACTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTG
 GCCGTGATCTGGTTCGACGGCACCAAGAAGTACTACACCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACA
 ACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACACCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGA
 CAGGGGCATCGGCGCCAGGAGGGGCCCTACTACATGGACGTGTGGGGCAAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC
 GCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACCGCCGCCCTGG
 GCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGAGCTGGAACAGCGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA
 CACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTG
 GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGGGTGGAGCCCAAGA
 GCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCC
 CCCCAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAG
 GACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGC
 AGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGGACGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAA
 GTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCGCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGGGAG
 CCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCAGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGG
 GCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCC

CGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAAC GTGTTTCAGCTGCAGCGTGTATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGC-3' (SEQ ID NO.1)。

[0093] Amyloidβ抗体的轻链(LC)序列为:

[0094] 5' -GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCAC CTGCAGGGCCAGCCAGAGCATCAGCAGCTACCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTG ATCTACGCCGCCAGCAGCCTGCAGAGCGGCGTGCCAGCAGGTTACGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCAACC TGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAGCTACAGCACCCCCCTGACCTT CGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAGAGGACCGTGGCCGCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAG CAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCAGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGA AAGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG CCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCCAGGTGACCCACCAG GGCCTGAGCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC-3' (SEQ ID NO.2)。

[0095] 2. 免疫兼容分子的选择

[0096] 本发明实施例中使用的免疫兼容分子的种类及序列如表1和表2所示。

[0097] 表1免疫兼容分子的种类及作用

[0098]

No.	免疫兼容分子分类	具体免疫兼容分子	免疫兼容分子功能
1	主要组织相容性复合体基因相关基因 shRNA	B2M(beta-2-microglobulin) shRNA	敲低 B2M 的表达。
2		CIITA shRNA	敲低 CIITA 的表达。
3	主要组织相容性复合体基因相关基因 shRNA-miR	B2M(beta-2-microglobulin) shRNA-miR	敲低 B2M 的表达。
4		CIITA shRNA-miR	敲低 CIITA 的表达。
5	主要组织相容性复合体基因相关基因	敲除 B2M(beta-2-microglobulin)	通过直接敲除 B2M 基因实现 HLA-I 类分子不表达。
6		敲除 CIITA	通过直接敲除 CIITA 基因实现 HLA-II 类分子不表达。
7	免疫耐受相关基因	CD47 (Accession number: NM_198793.2)	阻断并抑制巨噬细胞和 NK 细胞等几乎所有固有免疫应答的活性, 并通过其负性共刺激分子作用抑制 T 细胞活性。
8	主要组织相容性复合体基因 shRNA	HLA-A shRNA	敲低 HLA-A 的表达。
9		HLA-B shRNA	敲低 HLA-B 的表达。
10		HLA-C shRNA	敲低 HLA-C 的表达。
11		HLA-DRA shRNA	敲低 HLA-DRA 的表达。
12		HLA-DRB1 shRNA	敲低 HLA-DRB1 的表达。

[0099]	13	HLA-DRB3 shRNA	敲低 HLA-DRB3 的表达。
	14	HLA-DRB4 shRNA	敲低 HLA-DRB4 的表达。
	15	HLA-DRB5 shRNA	敲低 HLA-DRB5 的表达。
	16	HLA-DQA1 shRNA	敲低 HLA-DQA1 的表达。
	17	HLA-DQB1 shRNA	敲低 HLA-DQB1 的表达。
	18	HLA-DPA1 shRNA	敲低 HLA-DPA1 的表达。
	19	HLA-DPB1 shRNA	敲低 HLA-DPB1 的表达。
	20	HLA-A shRNA	敲低 HLA-A 的表达。
	21	HLA-B shRNA	敲低 HLA-B 的表达。
	22	HLA-C shRNA	敲低 HLA-C 的表达。
	23	HLA-DRA shRNA	敲低 HLA-DRA 的表达。
	24	HLA-DRB1 shRNA	敲低 HLA-DRB1 的表达。
	25	HLA-DRB3 shRNA	敲低 HLA-DRB3 的表达。
	26	HLA-DRB4 shRNA	敲低 HLA-DRB4 的表达。
	27	HLA-DRB5 shRNA	敲低 HLA-DRB5 的表达。
	28	HLA-DQA1 shRNA	敲低 HLA-DQA1 的表达。
	29	HLA-DQB1 shRNA	敲低 HLA-DQB1 的表达。
	30	HLA-DPA1 shRNA	敲低 HLA-DPA1 的表达。
	31	HLA-DPB1 shRNA	敲低 HLA-DPB1 的表达。

[0100] 表2免疫兼容分子的靶序列

[0101]

B2M				
No.	Start	Target sequence(DNA) (5'-3')	Region	序列号
1	634	GGGAGCAGAGAATTCTCTTAT	UTR3	SEQ ID NO.3
2	635	GGAGCAGAGAATTCTCTTATC	UTR3	SEQ ID NO.4
3	636	GAGCAGAGAATTCTCTTATCC	UTR3	SEQ ID NO.5
CIITA				
No.	Start	Target sequence(DNA) (5'-3')	Region	序列号
1	231	GCTACCTGGAGCTTCTTAACA	ORF	SEQ ID NO.6
2	238	GGAGCTTCTTAACAGCGATGC	ORF	SEQ ID NO.7
3	879	GGGTCTCCAGTATATTCATCT	ORF	SEQ ID NO.8
4	2656	GCCTCCTGATGCACATGTA	ORF	SEQ ID NO.9
5	2917	GGAAGACCTGGGAAAGCTTGT	ORF	SEQ ID NO.10
6	3276	GGCTAAGCTTGTAACAATAACT	ORF	SEQ ID NO.11
7	3688	GCGGAATGAACCACATCTTGC	UTR3	SEQ ID NO.12
8	3801	GGCCTTCTCTGAAGGACATTG	UTR3	SEQ ID NO.13
9	4354	GGACTCAATGCACTGACATTG	UTR3	SEQ ID NO.14
10	4578	GGTACCCACTGCTCTGGTTAT	UTR3	SEQ ID NO.15
HLA-A				
No.	Start	Target sequence(DNA) (5'-3')	Region	序列号
1	96	GCTCCCACTCCATGAGGTATT	ORF	SEQ ID NO.16
2	111	GGTATTTCTTCACATCCGTGT	ORF	SEQ ID NO.17
3	279	AGGAGACACGGAATGTGAAGG	ORF	SEQ ID NO.18
HLA-B				
No.	Start	Target sequence(DNA) (5'-3')	Region	序列号
1	95	GCTCCCACTCCATGAGGTATT	ORF	SEQ ID NO.19
2	110	GGTATTTCTACACCTCCGTGT	ORF	SEQ ID NO.20
3	273	GGACCGGAACACACAGATCTA	ORF	SEQ ID NO.21
4	275	ACCGGAACACACAGATCTACA	ORF	SEQ ID NO.22

[0102]

5	278	GGAACACACAGATCTACAAGG	ORF	SEQ ID NO.23
6	279	GAACACACAGATCTACAAGGC	ORF	SEQ ID NO.24
HLA-C				
No.	Start	Target sequence(DNA) (5'-3')	Region	序列号
1	1402	TTCTTACTCCCTAATGAAGT	UTR3	SEQ ID NO.25
2	1419	AAGTTAAGAACCTGAATATAA	UTR3	SEQ ID NO.26
3	1427	AACCTGAATATAAATTTGTGT	UTR3	SEQ ID NO.27
4	1428	ACCTGAATATAAATTTGTGTT	UTR3	SEQ ID NO.28
5	1466	AAGCGTTGATGGATTAATTA	UTR3	SEQ ID NO.29
6	1467	AGCGTTGATGGATTAATTA	UTR3	SEQ ID NO.30
HLA-DRA				
No.	Start	Target sequence(DNA) (5'-3')	Region	序列号
1	742	GGGCTGGTGGGCATCATTAT	ORF	SEQ ID NO.31
2	743	GGTCTGGTGGGCATCATTATT	ORF	SEQ ID NO.32
3	753	GCATCATTATTGGGACCATCT	ORF	SEQ ID NO.33
4	831	GCACATGGAGGTGATGGTGTT	UTR3	SEQ ID NO.34
5	837	GGAGGTGATGGTGTTTCTTAG	UTR3	SEQ ID NO.35
6	859	GAGAAGATCACTGAAGAACT	UTR3	SEQ ID NO.36
7	883	GCTTTAATGGCTTACAAAGC	UTR3	SEQ ID NO.37
8	891	GGCTTTACAAAGCTGGCAATA	UTR3	SEQ ID NO.38
9	892	GCTTTACAAAGCTGGCAATAT	UTR3	SEQ ID NO.39
10	999	GCTCCGTACTCTAACATCTAG	UTR3	SEQ ID NO.40
HLA-DRB1				
No.	Start	Target sequence(DNA) (5'-3')	Region	序列号
1	902	GATGACCACATTCAAGGAAGA	UTR3	SEQ ID NO.41
2	905	GACCACATTCAAGGAAGAACT	UTR3	SEQ ID NO.42
3	953	GCTTCCTGCTTGGCAGTTAT	UTR3	SEQ ID NO.43
4	965	GGCAGTTATTCTCCACAAGA	UTR3	SEQ ID NO.44

[0103]

5	966	GCAGTTATTCTCCACAAGAG	UTR3	SEQ ID NO.45
HLA-DRB3				
No.	Start	Target sequence(DNA) (5'-3')	Region	序列号
1	157	GCGTAAGTCTGAGTGTCATT	ORF	SEQ ID NO.46
2	851	GACAATTTAAGGAAGAATCTT	UTR3	SEQ ID NO.47
HLA-DRB4				
No.	Start	Target sequence(DNA) (5'-3')	Region	序列号
1	5	GGCCATAGTTCTCCCTGATTG	UTR5	SEQ ID NO.48
2	6	GCCATAGTTCTCCCTGATTGA	UTR5	SEQ ID NO.49
3	876	GCAGATGACCACATTCAAGGA	UTR3	SEQ ID NO.50
4	879	GATGACCACATTCAAGGAAGA	UTR3	SEQ ID NO.51
5	882	GACCACATTCAAGGAAGAACC	UTR3	SEQ ID NO.52
6	963	GCTTTGTCAGGACCAGGTTGT	UTR3	SEQ ID NO.53
7	973	GACCAGTTGTTACTGGTTCA	UTR3	SEQ ID NO.54
8	1050	GAAGCCTCACAGCTTTGATGG	UTR3	SEQ ID NO.55
9	1066	GATGGCAGTGCCTCATCTTCA	UTR3	SEQ ID NO.56
10	1069	GGCAGTGCCTCATCTTCAACT	UTR3	SEQ ID NO.57
HLA-DRB5				
No.	Start	Target sequence(DNA) (5'-3')	Region	序列号
1	174	GCAGCAGGATAAGTATGAGTG	ORF	SEQ ID NO.58
2	177	GCAGGATAAGTATGAGTGTC	ORF	SEQ ID NO.59
3	224	GGTTCCTGCACAGAGACATCT	ORF	SEQ ID NO.60
4	231	GCACAGAGACATCTATAACCA	ORF	SEQ ID NO.61
5	236	GAGACATCTATAACCAAGAGG	ORF	SEQ ID NO.62
6	325	GAGTACTGGAACAGCCAGAAG	ORF	SEQ ID NO.63
7	922	GCTTCCTGCTTGCTCTTAT	UTR3	SEQ ID NO.64
8	934	GGCTCTTATTCTCCACAAGA	UTR3	SEQ ID NO.65

[0104]

9	935	GCTCTTATTCTCCACAAGAG	UTR3	SEQ ID NO.66
HLA-DQA1				
No.	Start	Target sequence(DNA) (5'-3')	Region	序列号
1	681	GGATGTGGAACCCACAGATAC	UTR3	SEQ ID NO.67
2	682	GATGTGGAACCCACAGATACA	UTR3	SEQ ID NO.68
3	685	GTGGAACCCACAGATACAGAG	UTR3	SEQ ID NO.69
4	687	GGAACCCACAGATACAGAGAG	UTR3	SEQ ID NO.70
5	705	GAGCCAACTGTATTGCCTATT	UTR3	SEQ ID NO.71
6	706	AGCCAACTGTATTGCCTATTT	UTR3	SEQ ID NO.72
7	707	GCCAACTGTATTGCCTATTTG	UTR3	SEQ ID NO.73
HLA-DQB1				
No.	Start	Target sequence(DNA) (5'-3')	Region	序列号
1	91	GGGTAGCAACTGTCACCTTGA	ORF	SEQ ID NO.74
2	161	GGATTCGTGTTCCAGTTTAA	ORF	SEQ ID NO.75
3	184	GCATGTGCTACTTCACCAACG	ORF	SEQ ID NO.76
4	218	GCGTCTTGTGACCAGATACAT	ORF	SEQ ID NO.77
5	887	GCTTATGCCTGCCCAGAATTC	UTR3	SEQ ID NO.78
6	1219	GCAGGAAATCACTGCAGAATG	UTR3	SEQ ID NO.79
7	1398	GCTCAGTGCATTGGCCTTAGA	UTR3	SEQ ID NO.80
8	1443	GGTGAGTGCTGTGTAATAAG	UTR3	SEQ ID NO.81
9	1483	GACATATATAGTGATCCTTGG	UTR3	SEQ ID NO.82
10	1526	GGAAAGTCACATCGATCAAGA	UTR3	SEQ ID NO.83
HLA-DPA1				
No.	Start	Target sequence(DNA) (5'-3')	Region	序列号
1	138	GCTCACAGTCATCAATTATAG	UTR5	SEQ ID NO.84
2	173	GCCCTGAAGACAGAATGTTCC	ORF	SEQ ID NO.85
3	268	GCGGACCATGTGTCAACTTAT	ORF	SEQ ID NO.86

4	270	GGACCATGTGTCAACTTATGC	ORF	SEQ ID NO.87
5	292	GCGTTTGTACAGACGCATAGA	ORF	SEQ ID NO.88
6	437	GGCTGGCTAACATTGCTATAT	ORF	SEQ ID NO.89
7	438	GCTGGCTAACATTGCTATATT	ORF	SEQ ID NO.90
8	1334	GGACCAGGTCACATGTGAATA	UTR3	SEQ ID NO.91
9	1426	GGAAAAGGTCTGAGGATATTGA	UTR3	SEQ ID NO.92
10	1609	GGCAGATTAGGATTCCATTCA	UTR3	SEQ ID NO.93
HLA-DPB1				
No.	Start	Target sequence(DNA) (5'-3')	Region	序列号
[0105] 1	1365	GCCTGATAGGACCCATATTCC	UTR3	SEQ ID NO.94
2	1558	GCATCCAATAGACGTCATTTG	UTR3	SEQ ID NO.95
3	2067	GCGTCACTGGCACAGATATAA	UTR3	SEQ ID NO.96
4	2311	GCTGTACATAATAAGCTAAG	UTR3	SEQ ID NO.97
5	2326	GCTAAGGAAGACAGTATATAG	UTR3	SEQ ID NO.98
6	2843	GGGATTTCTAAGGAAGGATGC	UTR3	SEQ ID NO.99
7	3054	GGAGTTGAAGAGCAGAGATTC	UTR3	SEQ ID NO.100
8	3465	GCCAGTGAACACTTACCATAG	UTR3	SEQ ID NO.101
9	3584	GCTTCTCTGAAGTCTCATTGA	UTR3	SEQ ID NO.102
10	3897	GGCTGCAACTAACTTCAAATA	UTR3	SEQ ID NO.103

[0106] 3.shRNA/miRNA加工复合体基因和抗干扰素效应分子的选择

[0107] (1) shRNA/miRNA加工复合体基因的选择

[0108] 本发明中使用的shRNA/miRNA加工复合体基因包括可诱导关闭表达的shRNA和/或miRNA加工机器。上述可诱导关闭表达的shRNA和/或miRNA加工机器具体包括:Drosha (Accession number:NM_001100412)、Ago1 (Accession number:NM_012199)、Ago2 (Accession number:NM_001164623)、Dicer1 (Accession number:NM_001195573)、Exportin-5 (Accession number:NM_020750)、TRBP (Accession number:NM_134323)、PACT (Accession number:NM_003690) 和DGCR8 (Accession number:NM_022720)。

[0109] 上述可诱导关闭表达的shRNA和/或miRNA加工机器在细胞中的具体作用为:

[0110] 在细胞核内的初级miRNA (pri-miRNA) 经过复合物Drosha-DGCR8进行微处理,将pri-miRNA裂解成前体miRNA (pre-miRNA),这时会形成发夹结构。接着,经Exportin-5-Ran-GTP复合物将pre-miRNA转运出核。在胞浆中与双链RNA结合蛋白TRBP (TARBP2) 结合的RNase Dicer酶将pre-miRNA分解成成熟的长度,miRNA在这时还处于双链状态。最后被转运进AGO2,形成RISC (RNA诱导沉默复合体)。最终miRNA双链的一条链保留在RISC复合物中,另外一条则排出被迅速降解掉。而DGCR8作为Drosha的主要结合蛋白,可以通过其C末端的两个双链RNA结合区域与pri-miRNA结合,招募并指导Drosha在pri-miRNA的正确位置剪切,生产

pre-miRNA, pre-miRNA进一步被Dicer和TRBP/PACT加工剪切,形成成熟的miRNA。DGCR8的缺失或异常表达会影响Drosha的剪切活性,进而影响miRNA的活性,导致疾病的发生。TRBP能够招募Dicer复合体miRNA形成RISC Ago2。

[0111] (2) 抗干扰素效应分子的选择

[0112] 本发明中使用的抗干扰素效应分子包括可诱导关闭表达的针对抑制PKR、2-5As、IRF-3和IRF-7基因的shRNA和/或shRNA-miR表达序列,以降低dsRNA诱发的干扰素反应,从而避免产生细胞毒性。

[0113] 其中,所述抗干扰素效应分子的靶序列如表3所示。

[0114] 表3抗干扰素效应分子的靶序列

干扰素效应分子	No.	Start	Target sequence(DNA) (5'-3')	Region	序列号
PKR	1	1538	GGATGGATTGATTATGATCC	ORF	SEQ ID NO.104
	2	1672	GGACCTTGAACAATGGATTG	ORF	SEQ ID NO.105
	3	1982	GCTAATCCTTGCTGAACTTCT	ORF	SEQ ID NO.106
	4	1992	GCTGAACTTCTTCATGTATGT	ORF	SEQ ID NO.107
	5	2722	GCCTCATCTCTTTGTTCTAAA	UTR3	SEQ ID NO.108
	6	3708	GCTCTGGAGAAGATATATTTG	UTR3	SEQ ID NO.109
	7	4080	GCTCTTGAGGGAACTAATAGA	UTR3	SEQ ID NO.110
	8	4144	GGGACGGCATTAAATGTATTCA	UTR3	SEQ ID NO.111
	9	4250	GGACAAACATGCAAACCTATAG	UTR3	SEQ ID NO.112
	10	4270	GCAGCAACCAGCTACCATTCT	UTR3	SEQ ID NO.113

[0116]

2-5As (OAS1)	1	49	GCAGTTCTGTTGCCACTCTCT	UTR5	SEQ ID NO.114
	2	363	GGGAGAGTTCATCCAGGAAAT	ORF	SEQ ID NO.115
	3	364	GGAGAGTTCATCCAGGAAATT	ORF	SEQ ID NO.116
	4	365	GAGAGTTCATCCAGGAAATTA	ORF	SEQ ID NO.117
	5	400	GCCTGTCAAAGAGAGAGAGCA	ORF	SEQ ID NO.118
	6	471	GCTCAGCTTCGTA CTGAGTTC	ORF	SEQ ID NO.119
	7	644	GCTTCACAGAACTACAGAGAG	ORF	SEQ ID NO.120
	8	884	GCATCTACTGGACAAAGTATT	ORF	SEQ ID NO.121
	9	1055	GGCTGAATTACCCATGCTTTA	ORF	SEQ ID NO.122
	10	1056	GCTGAATTACCCATGCTTTAA	ORF	SEQ ID NO.123
2-5As (OAS2)	1	138	GGGTTGGTTTATCCAGGAATA	ORF	SEQ ID NO.124
	2	354	GGATCAGAAGAGAAGCCAACG	ORF	SEQ ID NO.125
	3	467	GGTTCACCATCCAGGTGTCA	ORF	SEQ ID NO.126
	4	698	GCTCTCTCTCTGGA ACTAAC	UTR3	SEQ ID NO.127
	5	1211	GCTAGAGTGACTCCATCTTAA	UTR3	SEQ ID NO.128
	6	1302	GCTGACCACCAATTATAATTG	UTR3	SEQ ID NO.129
	7	1322	GCAGAATATTTAAGGCCATAC	UTR3	SEQ ID NO.130
	8	1393	GCCCCTTAAAGGCAGCATTAA	UTR3	SEQ ID NO.131
	9	1442	GGTCATCAATACCACTGTAA	UTR3	SEQ ID NO.132
	10	1958	GCATTCCTCCTTCTCCTTTCT	UTR3	SEQ ID NO.133
2-5As (OAS3)	1	620	GGAGGAACTTTGTGAACATTC	ORF	SEQ ID NO.134
	2	776	GCTGTAAGAAGGATGCTTTCA	ORF	SEQ ID NO.135
	3	1985	GCTGCAGGCAGGATTGTTCA	ORF	SEQ ID NO.136
	4	2619	GCAGTTCGAGGTCAAGTTTGA	ORF	SEQ ID NO.137
	5	3852	GCCAATTAGCTGAGAAGAATT	UTR3	SEQ ID NO.138
	6	3983	GCAGGTTTACAGTGTATATGT	UTR3	SEQ ID NO.139
	7	5130	GCCTACAGAGACTAGAGTAGG	UTR3	SEQ ID NO.140
	8	5478	GCAGTTGGGTACCTTCCATTC	UTR3	SEQ ID NO.141

[0117]	IRF3	9	5573	GCAACTCAGGTGCATGATACA	UTR3	SEQ ID NO.142
		10	5993	GCATGGCGCTGGTACGTAAAT	UTR3	SEQ ID NO.143
	IRF3	1	148	GCCTCGAGTTTGAGAGCTA	UTR5	SEQ ID NO.144
		2	301	AGACATTCTGGATGAGTTA	UTR5	SEQ ID NO.145
		3	43	GGGTCTGTTACCCAAAGAA	UTR5	SEQ ID NO.146
		4	44	GGTCTGTTACCCAAAGAAT	UTR5	SEQ ID NO.147
		5	508	GGAAGGAAGCGGACGCTCA	ORF	SEQ ID NO.148
		6	275	GGAGGCAGTACTTCTGATA	UTR5	SEQ ID NO.149
		7	111	CGCTCTAGAGCTCAGCTGA	UTR5	SEQ ID NO.150
		8	834	CCACCACCTCAACCAATAA	UTR3	SEQ ID NO.151
		9	78	ATTCAAGAAGTCGATCAA	UTR5	SEQ ID NO.152
		10	488	GAAGATCTGATTACCTTCA	ORF	SEQ ID NO.153
	IRF-7	1	68	GGACACTGGTTCAACACCTGT	UTR5	SEQ ID NO.154
		2	75	GGTCAACACCTGTGACTTCA	UTR5	SEQ ID NO.155
		3	83	ACCTGTGACTTCATGTGTGCG	UTR5	SEQ ID NO.156
		4	1098	GCTGGACGTGACCATCATGTA	ORF	SEQ ID NO.157
		5	1101	GGACGTGACCATCATGTACAA	ORF	SEQ ID NO.158
		6	1102	GACGTGACCATCATGTACAAG	ORF	SEQ ID NO.159
		7	1103	ACGTGACCATCATGTACAAGG	ORF	SEQ ID NO.160
		8	1512	ACGCTATACCATCTACCTGGG	ORF	SEQ ID NO.161
9		1694	GCCTCTATGACGACATCGAGT	ORF	SEQ ID NO.162	
10		1705	GACATCGAGTGCTTCCTTATG	ORF	SEQ ID NO.163	

[0118] 上述干扰素效应分子PKR、2-5As、IRF-3和IRF-7在细胞中的具体作用为：

[0119] 蛋白激酶(double-stranded RNA-dependent Protein Kinase,PKR)和2',5'寡腺苷酸合成酶(2,5-Oligoadenylate Synthetase,2-5As)是IFN诱生的过程中细胞信号转导通路的关键因子,这两种酶与dsRNA诱生IFN密切相关。PKR能通过磷酸化真核细胞转录因子,从而抑制蛋白质合成,使细胞停滞于G0/G1和G2/M期,并诱导凋亡,而dsRNA可以促进2-5As合成,结果导致RNase即RNaseL的非特异性活化,降解细胞内所有的mRNA,致细胞死亡。I型干扰素的诱导特异性是通过IRF转录因子家族成员实现的,在细胞缺乏IRF-3和IRF-7的表达下,在很多病毒感染情况下I型干扰素是不能被诱导分泌的。

[0120] 4. 构建质粒载体

[0121] 本发明实施例中使用的质粒载体包括：

[0122] (1) Cas9 (D10A) 质粒：表达Cas 9 (D10A) 蛋白的质粒,在sgRNA的引导下特异性单链切割基因组DNA。

[0123] (2) sgRNA质粒:表达sgRNA的质粒,sgRNA (small guide RNA) 是向导RNA (guide RNA,gRNA),在基因编辑负责引导表达Cas 9 (D10A) 蛋白的靶向切割。

[0124] (3) Donor片段:两头含有重组臂,分别位于基因组DNA断裂位置的左右两边,中间含有需要插入的基因、片段或者表达元件。在Donor片段存在的情况下,细胞在基因组断裂的位置发生同源重组 (Homologous recombination,HR) 反应。如果不添加Donor片段,细胞的基因组断裂位置发生非同源末端连接 (Non-homologous End Joining-NHEJ) 反应。该片段由KI Vector质粒酶切后回收获取。

[0125] 上述质粒中的基因编辑均采用CRISPR-Cas9基因编辑系统,使用的Cas 9蛋白为Cas9 (D10A),Cas 9 (D10A) 与sgRNA结合,sgRNA负责特异识别靶序列 (细胞载体的基因组DNA),然后Cas 9 (D10A) 对该靶序列进行单链切割。基因组DNA发生双链断裂 (DNA Double Strand Break,DSB),必须有两组Cas 9 (D10A) /sgRNA分别对细胞载体的基因组DNA的两条链进行切割,且切割的距离不能太远。Cas 9 (D10A) /sgRNA方案与Cas 9/sgRNA方案相比,优点是特异性更高,脱靶的概率更低。

[0126] 其中,所述sgRNA的具体序列为:

[0127] sgRNA-B2M-1:5' -CGCGAGCACAGCTAAGGCCACGG-3' (SEQ ID NO.164);

[0128] sgRNA-B2M-2:5' -ACTCTCTCTTTCTGGCCTGGAGG-3' (SEQ ID NO.165)。

[0129] sgRNA-CIITA-1:5' -ACCCAGCAGGGCGTGGAGCCAGG-3' (SEQ ID NO.166);

[0130] sgRNA-CIITA-2:5' -GTCAGAGCCCCAAGGTAAAAAGG-3' (SEQ ID NO.167)。

[0131] 构建上述质粒载体的具体方法为:

[0132] (1) Cas9 (D10A) 质粒:直接从Addgene (Plasmid 41816,Addgene) 订购获得。

[0133] (2) sgRNA质粒:通过在原始空白质粒 (Plasmid 41824,Addgene) 中分别放入不同的靶序列构建得到。

[0134] 其中,放入sgRNA质粒中的靶序列包括上述的免疫兼容分子的序列、shRNA/miRNA加工复合体基因的序列、抗干扰素效应分子的序列。

[0135] (3) Donor片段 (KI质粒):

[0136] a) 设计PCR引物,以pUC18质粒 (Takara,Code No.3218) 为模板,使用高保真酶 (南京诺唯赞生物,P505-d1) 通过PCR的方法扩增得到Amp (R) -pUC origin片段;

[0137] b) 提取人细胞的基因组DNA并设计对应的引物,然后以人的基因组DNA为模板,使用高保真酶通过PCR的方法扩增得到AAVS1或者eGSH重组臂;

[0138] c) 设计KI (Knock-in) 质粒元件的PCR扩增引物,然后以含该KI质粒元件的质粒为模板,使用高保真酶扩增得到KI质粒元件 (亚克隆);

[0139] d) 使用多片段重组酶 (南京诺唯赞生物,C113-02) 或overlap PCR连接上述扩增得到的Amp (R) -pUC origin片段、AAVS1或者eGSH重组臂、KI质粒元件,形成一个完整的环状质粒。

[0140] 本发明实施例制备得到的质粒可根据质粒中的表达框架类型分为组成型质粒和诱导型质粒。

[0141] 上述组成型质粒中的表达框架包括shRNA组成型表达框架、shRNAmiR组成型表达框架。酶切上述组成型质粒获取的Donor片段,在敲入干细胞载体基因组DNA后,该片段的表达功能不可以进行调控。

[0142] 上述诱导型质粒中的表达框架包括shRNA诱导型表达框架、shRNAmiR诱导型表达框架。酶切上述诱导型质粒获取的Donor片段,敲入干细胞载体基因组DNA后,该片段的表达功能可以通过添加诱导物的方法来调控,相当于对表达功能添加了一个开启或者关闭的开关。

[0143] 上述表达框架的具体序列要求与结构组成如下所示。

[0144] (1) shRNA组成型表达框架的序列组成为:

[0145] 5' -GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAAT TGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAG TTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTGATTCTTGG CTTTATATATCTTGTGGAAAGGACgctagcgccacc (SEQ ID NO.168) N₁...N₂₁TTCAAGAGA (SEQ ID NO.169) N₂₂...N₄₂TTTTTT (SEQ ID NO.170) -3' ;

[0146] 其中,

[0147] a) N₁...N₂₁为上述靶序列的shRNA靶序列,N₂₂...N₄₂为上述靶序列的shRNA靶序列的反向互补序列;

[0148] b) 当使用上述shRNA组成型表达框架构建的质粒需要表达多个基因的shRNA时,则每个基因分别对应一个shRNA表达框架,然后无缝连接起来;

[0149] c) 当上述shRNA组成型表达框架需要带不同抗性基因时,所述shRNA组成型表达框架中只有抗性基因序列不同,其它序列均保持一样;

[0150] d) N表示A或T或G或C碱基。

[0151] (2) shRNAmiR组成型表达框架的序列组成为:

[0152] 5' -GAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGCCTGCACATCTTGAAACACTTGCTGGGATTACTTCT TCAGGTTAACCCAACAGAAGGCTAAAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCG (SEQ ID NO.171) M₁N₁...N₂₁TAGTGAAGCCACAGATGTA (SEQ ID NO.172) N₂₂...N₄₂M₂TGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGG GGCTACTTTAGGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAAGTGAATACCTTGTCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCT GAATTAATTTGGTATAAAT (SEQ ID NO.173) -3' ;

[0153] 其中,

[0154] a) N₁...N₂₁为上述靶序列的shRNAmiR靶序列,N₂₂...N₄₂为上述靶序列的shRNAmiR靶序列的反向互补序列;

[0155] b) 当使用上述shRNAmiR组成型表达框架构建的质粒需要表达多个基因的shRNAmiR时,则每个基因分别对应一个shRNAmiR表达框架,然后无缝连接起来;

[0156] c) 当上述shRNAmiR组成型表达框架需要带不同抗性基因时,所述shRNAmiR组成型表达框架中只有抗性基因序列不同,其它序列均保持一样;

[0157] d) N表示A或T或G或C碱基,M碱基表示A或C碱基;

[0158] e) 若N₁为G碱基,则M₁为A碱基;否则M₁为C碱基;

[0159] f) M₁碱基与M₂碱基互补。

[0160] (3) shRNA诱导型表达框架的序列组成为:

[0161] 5' -GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAAT TGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAG TTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTGATTCTTGG

养板中的培养基包括比例为1:1的DMEM/F12 (含1%N2, Invitrogen) 和Neurobasal培养基 (含2%B27, Invitrogen)、以及20ng/ml bFGF和20ng/ml EGF。使用Accutase进行消化传代。具体构建方法参见:FASEB J.2014;28(11):4642-4656。

[0177] EBs细胞:将细胞汇合度达到95%的iPSCs使用BioC-PDE1消化6min,用机械刮传法将细胞刮成块状,沉降细胞团块。将沉降的细胞团块转移到低粘附培养板中使用BioCISO-EB1培养7天,隔天换液。7天后转移到Matrigel包被的培养板中使用BioCISO培养基进行贴壁培养7天,即可获得具有内、中、外三胚层结构的拟胚体(EBs)。具体构建方法参见:Stem Cell Res Ther.2017Nov 2;8(1):245。

[0178] 所述多能干细胞衍生物还包括多能干细胞所分化的成体干细胞、各胚层细胞或组织、器官;所述成体干细胞包括间充质干细胞或者神经干细胞。

[0179] (2) 在构建的干细胞载体基因组中敲入安全位点

[0180] 本发明技术方案中,在构建的干细胞载体基因组中敲入的安全位点包括AAVS1安全位点、eGSH安全位点、H11安全位点。

[0181] AAVS1安全位点(PPP1R2C位点)是位于人类基因组第19号染色体上,是一个经过验证、能够确保转入DNA片段预期功能的“安全港”位点。该位点是一个开放的染色体结构,能保证转入基因能被正常转录,且该位点插入外源目的片段对细胞无已知的副作用。

[0182] eGSH安全位点位于人类基因组第1号染色体上,是能够确保转入DNA片段预期功能的另一个“安全港”位点。

[0183] H11安全位点(Hipp11),位于人的22号染色体,是Eif4enif1与Drg1这两个基因之间的一个位点。由于H11位点位于两个基因之间,故外源基因插入后影响内源基因表达的风险很小。

[0184] AAVS1基因敲入的单细胞克隆操作包括以下步骤:

[0185] a) 电转程序:

[0186] 供体细胞准备:人多能干细胞

[0187] 试剂盒:Human Stem CellNucleofector®Kit 1

[0188] 仪器:电转仪

[0189] 培养基:BioCISO

[0190] 诱导质粒:Cas9D10A、sgRNA clone AAVS1-1、sgRNA clone AAVS1-2、AAVS1 neo VectoI、AAVS1 neo Vector II

[0191] 其中,若使用eGSH基因敲入,则使用的诱导质粒为:Cas9D10A、sgRNA clone eGSH-1、sgRNA clone eGSH-2、eGSH-neo/eGSH-puro (donor)。其中,使用eGSH基因敲入时,donor质粒与AAVS1基因敲入时相比,只有左右重组臂不一样,其它质粒元件都一样。由于eGSH的基因编辑过程与AAVS1的相同,后述不再重复列举。

[0192] b) 电转后的人多能干细胞进行含G418和puro的双抗生素培养基进行筛选。

[0193] c) 进行单细胞克隆筛选及培养,获得单细胞克隆株。

[0194] d) 将获得的单细胞克隆株进行培养。

[0195] 其中,单细胞克隆株培养试剂包括:

[0196] 培养基为:BioCISO培养基、300μg/ml G418和0.5μg/ml puro。培养基需提前置于室温,避光条件放置30~60分钟,直至恢复到室温,但不可以置于37℃进行预热,以避免生

物分子活性降低。

[0197] 基质胶:hESC级Matrigel。传代或复苏细胞前,将Matrigel工作液加入细胞培养瓶皿中并摇匀,确保Matrigel完全没过培养瓶皿底部,且在使用前任意一处Matrigel都不能干掉。为保证细胞能够更好的贴壁和存活,Matrigel放入37℃培养箱包被时间:1:100X Matrigel不能低于0.5小时;1:200X Matrigel不能低于2小时。

[0198] 消化液:使用DPBS溶解EDTA至终浓度为0.5mM,pH7.4。所述EDTA不能使用水稀释,否则细胞会因渗透压降低而死亡。

[0199] 冻存液:60%BioCIS0、30%ESCs级FBS和10%DMSO。

[0200] 单细胞克隆株培养步骤采用本领域常规维持传代培养过程。

[0201] 其中,传代最佳时刻为细胞整体汇合度达到80%~90%。

[0202] 传代最佳比例为1:4~1:7,传代后次日最佳汇合度应维持在20%~30%。

[0203] 本发明中的具体传代操作步骤如下:

[0204] a) 弃去包被好的细胞培养瓶皿中的Matrigel,加入适量上述培养基放入37℃、5% CO₂培养箱中孵育;

[0205] b) 待细胞符合上述传代要求,弃去培养基上清,加入适量的0.5mM EDTA消化液到细胞瓶皿中;

[0206] c) 将细胞放入37℃、5%CO₂培养箱中孵育5~10分钟(消化至镜下观察到大部分细胞收缩变圆但还未漂浮即可),吹打细胞使其从壁上脱离,将细胞悬液吸到离心管内,200g离心5分钟;

[0207] d) 离心后,弃去上清,用培养基重悬细胞,反复吹打细胞至混匀,然后将细胞转移至包被有Matrigel的瓶皿中,摇匀,镜下观察无异常后,摇匀置于37℃、5%CO₂培养箱中进行培养;

[0208] e) 次日观察细胞贴壁存活状态,吸掉培养基,每天按时换液。

[0209] 传代获得的单细胞克隆株可直接用于实验或选择冻存处理。

[0210] 细胞冻存的具体步骤如下:

[0211] a) 使用0.5mM EDTA消化细胞至大部分细胞收缩变圆但尚未漂浮,吹打细胞,收集细胞悬液,200g离心5分钟,弃上清,加入适量冻存液重悬细胞,将细胞转移至冻存管(建议六孔板汇合度80%冻存一支,冻存液体积为0.5ml/支);

[0212] b) 将冻存管置于程序降温盒中,立即放入-80℃过夜(需保证冻存管每分钟温度下降1℃);

[0213] c) 次日立即将细胞转移入液氮。

[0214] 冻存细胞的细胞复苏的具体步骤如下:

[0215] a) 准备Matrigel包被的细胞瓶皿(复苏细胞前,弃去Matrigel),加入适量的BioCIS0培养基,置于37℃、5%CO₂培养箱中孵育;

[0216] b) 将冻存管从液氮中快速取出,立即放入37℃水浴锅快速摇晃,使细胞快速融解,观察待冰晶完全消失停止摇晃,将细胞转移至生物安全柜;

[0217] c) 配制10mL DMEM/F12(体积比为1:1)基础培养基,平衡至室温,吸取1mLDMEM/F12(体积比为1:1)基础培养基缓慢加入冻存管中,混匀,转移到准备好的含有9mL DMEM/F12(体积比为1:1)基础培养基的15ml离心管中,200g离心5分钟;

[0218] d) 弃去上清,加入适量BioCIS0培养基混匀细胞,移种至细胞瓶皿中,摇匀镜下观察无异常后,摇匀置于37℃、5%CO₂培养箱中培养;

[0219] e) 次日观察细胞贴壁存活状态,每天正常按时换液。若贴壁良好,则BioCIS0培养基更换为上述混合有BioCIS0、300μg/ml G418和0.5μg/ml puro的培养基中。

[0220] (3) 检测细胞载体中AAVS1基因敲入情况

[0221] 检测原理:

[0222] PCR检测经过基因敲入处理的细胞,测试该细胞是否为纯合子。由于两个Donor片段只有抗性基因的序列具有差异性,因此要判断该细胞是否为纯合子(两条染色体分别敲入不同抗性基因的Donor片段),就需要检测该细胞的基因组是否含有两种抗性基因的Donor片段,只有双敲入的细胞才有可能正确的纯合子。

[0223] 检测方法:

[0224] 在Donor质粒(KI质粒)内部(非重组臂部分)设计一条引物,然后在细胞的基因组(非重组臂部分)设计另一条引物。如果Donor片段在基因组能够正确插入,就会有目的条带出现,否则无目的条带出现。

[0225] 其中,上述引物的具体序列及扩增条件如下表所示。

[0226] 表4引物的具体序列及扩增条件

NO.	引物简写	序列(5'→3')	序列号	产物(bp)	PCR 条件(Phanta 酶)
1	F1	CCATAGCTCAGTCTGGTCTATC	SEQ ID NO.175	1578	58℃退火, 1min 延伸, 30cycles
2	R1	TCAGGATGATCTGGACGAAGAG	SEQ ID NO.176		
3	F2	CCGGTCCTGGACTTTGTCTC	SEQ ID NO.177	1728	62℃退火, 1min30sec 延伸, 30cycles
4	R2	CTCGACATCGGCAAGGTGTG	SEQ ID NO.178		
5	F2(外侧)	CGCATTGGAGTCGCTTTAAC	SEQ ID NO.179	1874	60℃退火, 1min30sec 延伸, 18cycles
6	R2(外侧)	CGAGCTGCAAGAACTCTTCTCAC	SEQ ID NO.180		
7	F3(外侧)	CACGGCACTTACCTGTGTCTGG	SEQ ID NO.181	2151	60℃退火, 1min30sec 延伸, 18cycles
8	R3(外侧)	CAGTACAGGCATCCCTGTGAAAG	SEQ ID NO.182		

[0228] (4) 利用本领域常规技术将选取的质粒敲入干细胞载体基因组

[0229] 按照下述表5和表6中的分组,分别将Amyloidβ抗体的序列、免疫兼容分子的序列、shRNA/miRNA加工复合体基因的序列、抗干扰素效应分子的序列采用本领域常规技术敲入到上述干细胞表达载体(干细胞载体)安全位点中,获得不同类型的组成型干细胞表达载体和诱导型干细胞表达载体,以检测其表达可行性。

[0230] 表5组成型敲入表达实验分组

敲入因子	实验组别					
	A1	A2	A3	A4	A5	A6
Amyloid β 抗体序列	+	+	+	+	+	+
B2M(beta-2-microglobulin) shRNA		+				
CIITA shRNA		+				
B2M(beta-2-microglobulin) shRNA-miR			+			
CIITA shRNA-miR			+			
B2M				-		
CIITA				-		
CD47		+	+	+	+	+
HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRA、HLA-DRB1、HLA-DRB3、HLA-DRB4、HLA-DRB5、HLA-DQA1、HLA-DQB1、HLA-DPA1 和 HLA-DPB1 的 shRNA					+	
HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRA、HLA-DRB1、HLA-DRB3、HLA-DRB4、HLA-DRB5、HLA-DQA1、HLA-DQB1、HLA-DPA1 和 HLA-DPB1 的 shRNA-miR						+
Drosha、Ago1、Ago2、Dicer1、Exportin-5、TRBP(TARBP2)、PACT(PRKRA) 和 DGCR8 的基因		+	+		+	+
PKR、2-5As、IRF-3 和 IRF-7 的 shRNA		+			+	
PKR、2-5As、IRF-3 和 IRF-7 的 shRNA-miR			+			+

[0232] 其中，“+”号表示基因或核酸序列的敲入，“-”号表示基因敲除。

[0233] 选取的质粒以及具体的敲入位置情况如下：

[0234] 总体原则：Amyloid β 抗体的序列放入对应质粒的MCS2(组成表达)内，其它分子按照shRNA和shRNA-miR放入对应质粒的shRNA或shRNA-miR表达框架，其他基因放入对应质粒的MCS1内。

[0235] 其中，Amyloid β 抗体的LC轻链、HC重链的前面均添加信号肽，中间使用EMCV IRESwt连接，具体结构为：信号肽-Amyloid β 抗体的LC轻链(含终止密码子，所述终止密码子为TGA)-EMCV IRESwt-信号肽-Amyloid β 抗体的HC重链(含终止密码子，所述终止密码子为TGA)。

[0236] EMCV IRESwt的序列如SEQ ID NO.183所示；

[0237] 信号肽的序列为：5'-ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCACTAAGTCTTGCACTTGT CACGAATTCG-3'(SEQ ID NO.184)。

[0238] 其中sgRNA clone B2M质粒包含sgRNA clone B2M-1和sgRNA clone B2M-2质粒。

[0239] sgRNA clone CIITA质粒包含sgRNA clone CIITA-1和sgRNA clone CIITA-2质粒。

[0240] (1) A1分组：

[0241] AAVS1 KI Vector(shRNA,组成型)质粒的MCS2放入Amyloid β 抗体序列。

[0242] (2) A2分组：

[0243] AAVS1 KI Vector(shRNA,组成型)质粒的MCS2放入Amyloid β 抗体序列，shRNA表达框架放入其他分子的shRNA靶序列(若存在多个shRNA则无缝连接起来)，MCS1放入其他基因序列。

[0244] (3) A3分组：

[0245] AAVS1 KI Vector(shRNA,组成型)质粒的MCS2放入Amyloid β 抗体序列，shRNA-miR

表达框架放入其他分子的shRNA-miR靶序列(若存在多个shRNA则无缝连接起来),MCS1放入其他基因序列。

[0246] (4) A4分组:

[0247] AAVS1 KI Vector (shRNA,组成型)质粒的MCS2放入Amyloid β 抗体序列,敲除B2M和CIITA,MCS1放入其他基因序列。

[0248] (5) A5分组:

[0249] AAVS1 KI Vector (shRNA,组成型)质粒的MCS2放入Amyloid β 抗体序列,shRNA表达框架放入其他分子的shRNA靶序列(若存在多个shRNA则无缝连接起来),MCS1放入其他基因序列。

[0250] (6) A6分组:

[0251] AAVS1 KI Vector (shRNA,组成型)质粒的MCS2放入Amyloid β 抗体序列,shRNA-miR表达框架放入其他分子的shRNA-miR靶序列(若存在多个shRNA则无缝连接起来),MCS1放入其他基因序列。

[0252] 其中,在进行免疫兼容改造的时候,可以先在hPSCs上进行进行改造,改造完成后再分化成多能干细胞的衍生物进行运用;也可以在hPSCs分化成多能干细胞的衍生物后再进行免疫兼容改造。

[0253] 表6诱导型敲入表达实验分组

	敲入因子	实验组别			
		B1	B2	B3	B4
	Amyloid β 抗体序列	+	+	+	+
	B2M(beta-2-microglobulin) shRNA	+			
	CIITA shRNA	+			
	B2M(beta-2-microglobulin) shRNA-miR		+		
	CIITA shRNA-miR		+		
	CD47	+	+	+	+
[0254]	HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRA、HLA-DRB1、HLA-DRB3、HLA-DRB4、HLA-DRB5、HLA-DQA1、HLA-DQB1、HLA-DPA1 和 HLA-DPB1 的 shRNA			+	
	HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DRA、HLA-DRB1、HLA-DRB3、HLA-DRB4、HLA-DRB5、HLA-DQA1、HLA-DQB1、HLA-DPA1 和 HLA-DPB1 的 shRNA-miR				+
	Drosha、Ago1、Ago2、Dicer1、Exportin-5、TRBP (TARBP2)、PACT (PRKRA) 和 DGCR8 的基因	+	+	+	+
	PKR、2-5As、IRF-3 和 IRF-7 的 shRNA	+		+	
	PKR、2-5As、IRF-3 和 IRF-7 的 shRNA-miR		+		+
	Tet-Off 系统	+	+	+	+

[0255] (1) B1分组:

[0256] AAVS1 KI Vector (shRNA,诱导型)质粒的MCS2放入Amyloid β 抗体序列,shRNA表达框架放入其他分子的shRNA靶序列(若存在多个shRNA则无缝连接起来),MCS1放入其他基因序列,插入Tet-Off系统。

[0257] (2) B2分组:

[0258] AAVS1 KI Vector (shRNA,诱导型)质粒的MCS2放入Amyloid β 抗体序列,shRNA-miR表达框架放入其他分子的shRNA-miR靶序列(若存在多个shRNA则无缝连接起来),MCS1放入其他基因序列,插入Tet-Off系统。

[0259] (3) B3分组:

[0260] AAVS1 KI Vector (shRNA, 诱导型) 质粒的MCS2放入Amyloid β 抗体序列, shRNA表达框架放入其他分子的shRNA靶序列 (若存在多个shRNA则无缝连接起来), MCS1放入其他基因序列, 插入Tet-Off系统。

[0261] (4) B4分组:

[0262] AAVS1 KI Vector (shRNA, 诱导型) 质粒的MCS2放入Amyloid β 抗体序列, shRNA-miR表达框架放入其他分子的shRNA-miR靶序列 (若存在多个shRNA则无缝连接起来), MCS1放入其他基因序列, 插入Tet-Off系统。

[0263] 其中, 在进行免疫兼容改造的时候, 可以先在hPSCs上进行进行改造, 改造完成后再分化成多能干细胞的衍生物进行运用; 也可以在hPSCs分化成多能干细胞的衍生物后再进行免疫兼容改造。

[0264] 本发明中的Tet-Off系统具体为:

[0265] 在没有四环素存在时, tTA蛋白持续作用在tet启动子上, 使基因持续表达。在需要转基因保持在一个持续表达状态下, 该系统是非常有用。加入四环素时, 四环素可使tTA蛋白的结构变化, 使其不能与启动子结合, 从而使其驱动基因表达水平下降。为了使该系统保持“关闭”状态, 必须连续添加四环素。

[0266] Tet-Off系统以及一种或多种免疫兼容分子的序列敲入多能干细胞的基因组安全位点处, 通过四环素的添加与否精准开启或关闭免疫兼容分子的表达, 从而可逆调控多能干细胞或其衍生物中主要组织相容性复合体相关基因的表达。

[0267] (5) 表达Amyloid β 抗体的多能干细胞或其衍生物表达的Amyloid β 抗体表达效果检测

[0268] 将表5和表6各实验组方案敲入iPSCs、MSCs、NSCs、EBs细胞的基因组安全位点, 37 $^{\circ}$ C, 0.5%CO $_2$ 培养箱培养, 收集培养基上清, 使用ELISA (双抗原夹心法) 对多能干细胞表达的Amyloid β 抗体进行检测。

[0269] 具体步骤为:

[0270] 在已经包被人Amyloid β 抗原的酶标板上进行上样, 待测样品孔先加样品稀释液40 μ L后再加待测样品10 μ L, 对照组则加不表达Amyloid β 抗体的多能干细胞及其衍生物的培养上清, 轻轻混匀。封板后置于37 $^{\circ}$ C温育30min, 洗涤5次后加入酶标Amyloid β 抗原试剂50 μ L, 置于37 $^{\circ}$ C继续温育30min, 洗涤5次后加入显色液显色15min, 加入终止液50 μ L, 在450nm读数测量吸光度值。

[0271] 各实验组的检测结果如表7所示。

[0272] 表7多能干细胞或其衍生物表达的Amyloid β 抗体表达结果

分组		OD450	偏差(±)	独立样本 T 检验 (*p<0.01)	分组		OD450	偏差(±)	独立样本 T 检验 (*p<0.01)
[0273] iPSCs	N(对照)	0.277	0.021	-	EBs	N(对照)	0.251	0.007	-
	A1	1.129	0.054	*		A1	1.223	0.066	*
	A2	1.229	0.131	*		A2	1.188	0.077	*
	A3	1.144	0.038	*		A3	1.201	0.105	*
	A4	1.154	0.028	*		A4	1.231	0.070	*
	A5	1.242	0.085	*		A5	1.119	0.034	*
	A6	1.198	0.088	*		A6	1.183	0.104	*
	B1	1.172	0.040	*		B1	1.218	0.094	*
	B2	1.215	0.087	*		B2	1.234	0.020	*
	B3	1.267	0.107	*		B3	1.189	0.065	*
B4	1.224	0.083	*	B4	1.255	0.053	*		
MSCs	N(对照)	0.269	0.015	-	NSCs	N(对照)	0.270	0.023	-
	A1	1.215	0.092	*		A1	1.105	0.007	*
	A2	1.269	0.036	*		A2	1.129	0.042	*
	A3	1.190	0.083	*		A3	1.131	0.045	*
	A4	1.172	0.071	*		A4	1.276	0.008	*
	A5	1.215	0.118	*		A5	1.133	0.061	*
	A6	1.243	0.030	*		A6	1.253	0.032	*
	B1	1.199	0.064	*		B1	1.217	0.091	*
	B2	1.264	0.055	*		B2	1.259	0.075	*
	B3	1.185	0.073	*		B3	1.188	0.065	*
B4	1.116	0.032	*	B4	1.218	0.094	*		

[0274] 从上表可以看出,本发明制备的多能干细胞或其衍生物能够有效表达出Amyloid β 抗体。而且其表达量在各组中表达相对恒定,所以多能干细胞衍生物所表达的Amyloid β 抗体不受细胞分化形态及其他外源基因(免疫兼容改造)所影响。

[0275] (6) 表达Amyloid β 抗体的多能干细胞在阿尔兹海默症治疗中的应用

[0276] 选择表达Amyloid β 抗体的方案组(A1)的细胞(MSCs)中进行测试。

[0277] 在人源化NSG小鼠阿尔兹海默症模型中,注射各组实验细胞(能够表达Amyloid β 抗体的hPSCs及hPSCs源衍生物(hPSCs-MSCs、hPSCs-NSCs、hPSCs-EBs)),使用水迷宫测试观察其治疗阿尔茨海默病的效果。为避免免疫兼容问题,使用的免疫细胞与hPSCs及hPSCs源衍生物均来源于同一人的。

[0278] 具体步骤包括:

[0279] 在人源化NSG小鼠(The Jackson Laboratory(JAX))中,注射同一供体的人免疫细胞来重建小鼠的免疫系统。2周后,采用10%的水合氯醛进行麻醉,于小鼠的双侧脑室一次性注入5 μ L凝聚态A β 1-42(80pmol/ μ L)以制备小鼠阿尔茨海默病模型。试验组进行尾静脉注射200 μ L PBS(含10⁶的表达抗Amyloid β 抗体的多能干细胞衍生物,此多能干细胞衍生物与人免疫细胞来源同一供体)进行阿尔茨海默病治疗。通过Morris水迷宫试验,判断其治疗效果。对照组为加注射200 μ L PBS(含不表达Amyloid β 抗体的多能干细胞及其衍生物)的小鼠模型。

[0280] 水迷宫实验是用于检测动物空间位置学习记忆能力的行为学实验方法。水迷宫由黑色圆形水池和可移动的有机玻璃平台组成,水池面积为122cm \times 75cm,有机玻璃平台高度

50cm,长度和宽度均为10cm,平台低于水面1cm,水池的水温控制范围为 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

[0281] 水迷宫实验分为训练期及测试期。

[0282] 训练期:实验前一天,让小鼠熟悉水迷宫的环境1min;对各组的小鼠进行训练,训练期持续5天,每天将每组实验的小鼠分别从水池的东、西、南、北四个象限面向池壁放入水中,记录小鼠找到平台的逃避潜伏时间,若小鼠超过1min仍未找到平台,则将其引导至平台上停留30s。

[0283] 测试期:训练期后的第6天为测试期,将水池中的平台撤去,将各组小鼠分别放入各个象限,利用Any-maze软件监测小鼠运动轨迹,记录1min内,小鼠穿越原平台位置的次数及逃避潜伏期,计算小鼠平均定位航行能力(潜伏期时间)和空间探索能力(游泳距离)。

[0284] 潜伏期时间越短或游泳距离越少,则说明对阿尔兹海默症治疗效果越好。

[0285] 各实验组的检测结果如表8所示。

[0286] 表8表达Amyloid β 抗体的多能干细胞对阿尔兹海默症治疗效果

	分组	小鼠(只)	潜伏期(s)	游泳距离(cm)
iPSCs	N(对照)	5	33.68 \pm 4.08	956.04 \pm 47.52
	Amyloid β 抗体	5	18.93 \pm 2.14 *	607.15 \pm 9.24 *
MSCs	N(对照)	5	31.52 \pm 2.40	936.47 \pm 28.07
	Amyloid β 抗体	5	20.18 \pm 1.78 *	601.71 \pm 22.19 *
EBs	N(对照)	5	33.61 \pm 7.13	934.86 \pm 33.65
	Amyloid β 抗体	5	17.20 \pm 2.90 *	586.43 \pm 31.06 *
NSCs	N(对照)	5	38.92 \pm 6.10	957.94 \pm 46.96
	Amyloid β 抗体	5	17.00 \pm 3.43 *	577.86 \pm 41.49 *

[0288] 其中,*表示与对照比较, $p<0.05$ 。

[0289] 从上表可以看出,在注射表达Amyloid β 抗体的hPSCs及hPSCs源衍生物治疗阿尔茨海默病模型的小鼠的潜伏期时间明显缩短,并且游泳距离也明显缩短,这可以说明能改善阿尔茨海默病模型小鼠的学习记忆功能,起到治疗阿尔茨海默病的效果。

[0290] (7) 表达Amyloid β 抗体的多能干细胞的免疫兼容性测试

[0291] 利用MSCs的低免疫源性的特点,在人源化NSG小鼠阿尔茨海默病模型中,对其进行注射能够表达Amyloid β 抗体的hPSCs源免疫兼容MSCs,观察其对阿尔茨海默病治疗的效果。其中,所使用的免疫细胞与hPSCs源MSCs来源于为同一人。

[0292] 对照组为未注射MSCs细胞的NSG小鼠阿尔茨海默病模型;

[0293] 加Dox组为:从注射表达Amyloid β 抗体的细胞开始,持续在小鼠饮食中添加0.5mg/mL的Dox饲养小鼠,直至试验结束。使用诱导剂Dox可以将其所敲入的序列(免疫兼容分子)呈现不表达的效果。

[0294] 免疫兼容分子诱导型表达组的可逆性表达测试结果如表9所示。

[0295] 表9免疫兼容分子诱导型表达组的可逆性表达测试结果

	分组	小鼠 (只)	潜伏期	游泳距离
[0296]	1 对照	5	39.63±2.21	1078.0±17.0
	2 仅表达抗体的非免疫兼容 MSCs(方案 A1)	5	26.66±1.95 *	749.4±66.1 *
	3 表达抗体的组成型免疫兼容 MSCs(方案 A2)	5	14.89±4.48 *	444.7±22.1 *
	4 表达抗体的组成型免疫兼容 MSCs(方案 A3)	5	16.06±3.18 *	410.6±31.5 *
	5 表达抗体的组成型免疫兼容 MSCs(方案 A4)	5	10.10±2.99 *	318.3±26.3 *
	6 表达抗体的组成型免疫兼容 MSCs(方案 A5)	5	13.03±1.53 *	382.7±26.6 *
	7 表达抗体的组成型免疫兼容 MSCs(方案 A6)	5	15.02±3.48 *	381.7±28.9 *
	8 表达抗体的可逆调控免疫兼容 MSCs(方案 B1)	5	14.75±1.49 *	386.6±11.3 *
	9 表达抗体的可逆调控免疫兼容 MSCs(方案 B2)	5	16.37±2.59 *	380.7±16.8 *
	10 表达抗体的可逆调控免疫兼容 MSCs(方案 B3)	5	16.87±2.06 *	447.0±66.6 *
	11 表达抗体的可逆调控免疫兼容 MSCs(方案 B4)	5	18.45±2.19 *	447.0±58.4 *
	12 表达抗体的可逆调控免疫兼容 MSCs(方案 B1, +Dox)	5	27.52±2.18 *	715.1±32.0 *
	13 表达抗体的可逆调控免疫兼容 MSCs(方案 B2, +Dox)	5	26.41±4.80 *	759.9±38.4 *
	14 表达抗体的可逆调控免疫兼容 MSCs(方案 B3, +Dox)	5	29.12±4.11 *	699.4±26.8 *
	15 表达抗体的可逆调控免疫兼容 MSCs(方案 B4, +Dox)	5	25.73±1.62 *	737.9±58.3 *

[0297] 其中,*表示与对照比较, $p < 0.05$ 。

[0298] 以上实验表明:在进行治疗阿尔茨海默病中。仅表达抗体的MSCs(组2),其具有低免疫源性,可以在异体内存在一定时间,所以其能够发挥一定的治疗效果,而进行免疫兼容改造的(组3-11,包括组成型和可逆诱导型免疫兼容),其免疫兼容效果更佳,比没有经免疫兼容改造的MSCs在体内存在时间更长(或能做到长期共存),其发挥治疗效果更佳,而组5为B2M和CIITA基因敲除组,其完全消除HLA-I和HLA-II类分子产生的影响,因此其治疗效果最佳。但由于其组成型免疫兼容改造(基因敲入/敲除),无法在移植物产生变异或不必要时进行清除,从而有组8-15方案设定。组12-15中在进行注射表达抗体细胞进入小鼠的同时,对小鼠使用Dox诱导剂(一直使用),注射表达抗体细胞的小鼠的免疫兼容效果将被消除,其在体内存在时间与未经免疫兼容改造的MSCs相当,其治疗效果也与未经免疫兼容改造的MSCs相当。

[0299] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

SEQUENCE LISTING

<110> 未来智人再生医学研究院(广州)有限公司

王林立

<120> 一种表达Amyloid β 抗体的多能干细胞及其衍生物与应用

<130>

<160> 184

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1356

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

```

gtgcagctgg tggagagcgg cggcggcgtg gtgcagcccc gcaggagcct gaggctgagc 60
tgcgccgcca gcggcttcgc cttcagcagc tacggcatgc actgggtgag gcaggcccc 120
ggcaagggcc tggagtgggt ggccgtgatc tggttcgacg gcaccaagaa gtactacacc 180
gacagcgtga agggcagggt caccatcagc agggacaaca gcaagaacac cctgtacctg 240
cagatgaaca ccctgagggc cgaggacacc gccgtgtact actgcccag ggacaggggc 300
atcggcgcca ggaggggccc ctactacatg gacgtgtggg gcaagggcac caccgtgacc 360
gtgagcagcg ccagcaccaa gggccccagc gtgttcccc tggccccag cagcaagagc 420
accagcggcg gcaccgccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgtg 480
accgtgagct ggaacagcgg cgccctgacc agcggcgtgc acacttccc cgccgtgctg 540
cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgaccg tgcccagcag cagcctgggc 600
accagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagagg 660
gtggagccca agagctgca caagaccac acctgcccc cctgccccgc ccccgagctg 720
ctgggcggcc ccagcgtgtt cctgttcccc ccaagccca aggacaccct gatgatcagc 780
aggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacc cgaggtgaag 840
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc cagggaggag 900
cagtacaaca gcacctacag ggtggtgagc gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg 960
aacggcaagg agtacaagtg caaggtgagc aacaaggccc tgcccgcccc catcgagaag 1020
accatcagca aggccaaggg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccccagc 1080
agggaggaga tgaccaagaa ccaggtgagc ctgacctgcc tgggtgaaggg cttctacccc 1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccc agaacaacta caagaccacc 1200
ccccccgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
agcaggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1320
cactacaccc agaagagcct gagcctgagc cccggc 1356

```

<210> 2

<211> 642

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca cagggtgacc 60
atcacctgca gggccagcca gagcatcagc agctacctga actggtacca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgcc gccagcagcc tgcagagcgg cgtgcccagc 180
aggttcagcg gcagcggcag cggcaccgac ttcacctga ccatcagcag cctgcagccc 240
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag agctacagca cccccctgac cttcggcggc 300
ggcaccaagg tggagatcaa gaggaccgtg gccgccccca gcgtgttcat cttccccccc 360
agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 420
cccagggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 480
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctgagcag caccctgacc 540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgect gcgaggtgac ccaccagggc 600
ctgagcagcc ccgtgaccaa gagettcaac aggggagcagc gc 642

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> human

<400> 3

gggagcagag aattctctta t 21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> human

<400> 4

ggagcagaga attctcttat c 21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> human

<400> 5

gagcagagaa ttctcttate c 21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> human

<400> 6

gctacctgga gcttcttaac a 21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA
<213> human
<400> 7
ggagcttctt aacagcgatg c 21
<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 8
gggtctccag tatattcate t 21
<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 9
gcctcctgat gcacatgtac t 21
<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 10
ggaagacctg ggaaagcttg t 21
<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 11
ggctaagctt gtacaataac t 21
<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 12
gcggaatgaa ccacatcttg c 21
<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 13

ggccttctct gaaggacatt g 21
<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 14
ggactcaatg cactgacatt g 21
<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 15
ggtaccact gctctggta t 21
<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 16
gctcccactc catgaggtat t 21
<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 17
ggtatttctt cacatccgtg t 21
<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 18
aggagacacg gaatgtgaag g 21
<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 19
gctcccactc catgaggtat t 21
<210> 20
<211> 21

<212> DNA
<213> human
<400> 20
ggtatttcta cacctccgtg t 21
<210> 21
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 21
ggaccggaac acacagatct a 21
<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 22
accggaacac acagatctac a 21
<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 23
ggaacacaca gatctacaag g 21
<210> 24
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 24
gaacacacag atctacaag c 21
<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 25
ttcttacttc cctaatgaag t 21
<210> 26
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 26

aagttaagaa cctgaatata a 21
<210> 27
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 27

aacctgaata taaatttgtg t 21
<210> 28
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 28

acctgaatat aaatttgtgt t 21
<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 29

aagcgttgat ggattaatta a 21
<210> 30
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 30

agcgttgatg gattaattaa a 21
<210> 31
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 31

gggtctgggtg ggcattatta t 21
<210> 32
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 32

ggtctgggtg ggcattattat t 21
<210> 33
<211> 21

<212> DNA
<213> human
<400> 33
gcatcattat tgggaccatc t 21
<210> 34
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 34
gcacatggag gtgatggtgt t 21
<210> 35
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 35
ggaggtgatg gtgtttctta g 21
<210> 36
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 36
gagaagatca ctgaagaaac t 21
<210> 37
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 37
gctttaatgg ctttaciaaag c 21
<210> 38
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 38
ggctttacaa agctggcaat a 21
<210> 39
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 39

gctttacaaa gctggcaata t 21
<210> 40
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 40
gctccgtact ctaacatcta g 21
<210> 41
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 41
gatgaccaca ttcaaggaag a 21
<210> 42
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 42
gaccacattc aaggaagaac t 21
<210> 43
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 43
gctttcctgc ttggcagtta t 21
<210> 44
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 44
ggcagttatt cttccacaag a 21
<210> 45
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 45
gcagttattc ttccacaaga g 21
<210> 46
<211> 21

<212> DNA
<213> human
<400> 46
gcgtaagtct gagtgcatt t 21
<210> 47
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 47
gacaatttaa ggaagaatct t 21
<210> 48
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 48
ggccatagtt ctccctgatt g 21
<210> 49
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 49
gccatagttc tccctgattg a 21
<210> 50
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 50
gcagatgacc acattcaagg a 21
<210> 51
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 51
gatgaccaca ttcaaggaag a 21
<210> 52
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 52

gaccacattc aaggaagaac c 21
<210> 53
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 53

gctttgtcag gaccaggtt g t 21
<210> 54
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 54

gaccaggtt g ttactggttc a 21
<210> 55
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 55

gaagcctcac agctttgatg g 21
<210> 56
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 56

gatggcagt g cctcatcttc a 21
<210> 57
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 57

ggcagtgcct catcttcaac t 21
<210> 58
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 58

gcagcaggat aagtatgagt g 21
<210> 59
<211> 21

<212> DNA
<213> human
<400> 59
gcaggataag tatgagtgtc a 21
<210> 60
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 60
ggttcctgca cagagacatc t 21
<210> 61
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 61
gcacagagac atctataacc a 21
<210> 62
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 62
gagacatcta taaccaagag g 21
<210> 63
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 63
gagtactgga acagccagaa g 21
<210> 64
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 64
gctttcctgc ttggctctta t 21
<210> 65
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 65

ggctcttatt cttccacaag a 21
<210> 66
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 66
gctcttattc ttccacaaga g 21
<210> 67
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 67
ggatgtggaa cccacagata c 21
<210> 68
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 68
gatgtggaac ccacagatac a 21
<210> 69
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 69
gtggaaccca cagatacaga g 21
<210> 70
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 70
ggaaccaca gatacagaga g 21
<210> 71
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 71
gagccaactg tattgcctat t 21
<210> 72
<211> 21

<212> DNA
<213> human
<400> 72
agccaactgt attgcctatt t 21
<210> 73
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 73
gccaactgta ttgcctatatt g 21
<210> 74
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 74
gggtagcaac tgtcaccttg a 21
<210> 75
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 75
ggatttcgtg ttccagttta a 21
<210> 76
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 76
gcatgtgcta cttcaccaac g 21
<210> 77
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 77
gcgtcttgtg accagataca t 21
<210> 78
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 78

gcttatgcct gccagaatt c 21
<210> 79
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 79
gcaggaaatc actgcagaat g 21
<210> 80
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 80
gctcagtgca ttggccttag a 21
<210> 81
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 81
ggtgagtgct gtgtaaataa g 21
<210> 82
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 82
gacatatata gtgaccttg g 21
<210> 83
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 83
ggaaagtcac atcgatcaag a 21
<210> 84
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 84
gctcacagtc atcaattata g 21
<210> 85
<211> 21

<212> DNA
<213> human
<400> 85
gccctgaaga cagaatgttc c 21
<210> 86
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 86
gcgaccatg tgtcaactta t 21
<210> 87
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 87
ggaccatgtg tcaacttatg c 21
<210> 88
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 88
gcgtttgtac agacgcatag a 21
<210> 89
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 89
ggctggctaa cattgctata t 21
<210> 90
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 90
gctggctaac attgctatat t 21
<210> 91
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 91

ggaccaggtc acatgtgaat a 21
<210> 92
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 92

ggaaaggctc gaggatattg a 21
<210> 93
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 93

ggcagattag gattccattc a 21
<210> 94
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 94

gcctgatagg acccatattc c 21
<210> 95
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 95

gcatccaata gacgtcattt g 21
<210> 96
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 96

gcgtcactgg cacagatata a 21
<210> 97
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 97

gctgtcacat aataagctaa g 21
<210> 98
<211> 21

<212> DNA
<213> human
<400> 98
gctaaggaag acagtatata g 21
<210> 99
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 99
gggatttcta aggaaggatg c 21
<210> 100
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 100
ggagttgaag agcagagatt c 21
<210> 101
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 101
gccagtgaac acttaccata g 21
<210> 102
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 102
gcttctctga agtctcattg a 21
<210> 103
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 103
ggctgcaact aacttcaaat a 21
<210> 104
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 104

ggatggattt gattatgac c 21
<210> 105
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 105

ggaccttggg acaatggatt g 21
<210> 106
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 106

gctaattctt gctgaacttc t 21
<210> 107
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 107

gctgaacttc ttcattgatg t 21
<210> 108
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 108

gcctcatctc tttgttctaa a 21
<210> 109
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 109

gctctggaga agatatattt g 21
<210> 110
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 110

gctcttgagg gaactaatag a 21
<210> 111
<211> 21

<212> DNA
<213> human
<400> 111
gggacggcat taatgtattc a 21
<210> 112
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 112
ggacaaacat gcaaaactata g 21
<210> 113
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 113
gcagcaacca gctaccattc t 21
<210> 114
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 114
gcagttctgt tgccactctc t 21
<210> 115
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 115
gggagagttc atccaggaaa t 21
<210> 116
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 116
ggagagttca tccaggaaat t 21
<210> 117
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 117

gagagttcat ccaggaaatt a 21
<210> 118
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 118

gcctgtcaaa gagagagagc a 21
<210> 119
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 119

gctcagcttc gtactgagtt c 21
<210> 120
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 120

gcttcacaga actacagaga g 21
<210> 121
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 121

gcatctactg gacaaagtat t 21
<210> 122
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 122

ggctgaatta cccatgcttt a 21
<210> 123
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 123

gctgaattac ccatgcttta a 21
<210> 124
<211> 21

<212> DNA
<213> human
<400> 124
gggttggttt atccaggaat a 21
<210> 125
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 125
ggatcagaag agaagccaac g 21
<210> 126
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 126
ggttcacat ccagtggtc a 21
<210> 127
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 127
gctctcttct ctggaactaa c 21
<210> 128
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 128
gctagagtga ctccatctta a 21
<210> 129
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 129
gctgaccacc aattataatt g 21
<210> 130
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 130

gcagaatatt taaggccata c 21
<210> 131
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 131

gcccacttaa aggcagcatt a 21
<210> 132
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 132

ggtcatcaat accactgtta a 21
<210> 133
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 133

gcattcctcc ttctccttc t 21
<210> 134
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 134

ggaggaactt tgtgaacatt c 21
<210> 135
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 135

gctgtaagaa ggatgcttcc a 21
<210> 136
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 136

gctgcaggca ggattgttcc a 21
<210> 137
<211> 21

<212> DNA
<213> human
<400> 137
gcagttcgag gtcaagtttg a 21
<210> 138
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 138
gccaattagc tgagaagaat t 21
<210> 139
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 139
gcaggtttac agtgtatatg t 21
<210> 140
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 140
gcctacagag actagagtag g 21
<210> 141
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 141
gcagttgggt accttcatt c 21
<210> 142
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 142
gcaactcagg tgcattgatac a 21
<210> 143
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 143

gcatggcgct ggtacgtaaa t 21

<210> 144

<211> 19

<212> DNA

<213> human

<400> 144

gcctcgagtt tgagagcta 19

<210> 145

<211> 19

<212> DNA

<213> human

<400> 145

agacattctg gatgagtta 19

<210> 146

<211> 19

<212> DNA

<213> human

<400> 146

gggtctgtta cccaagaa 19

<210> 147

<211> 19

<212> DNA

<213> human

<400> 147

ggtctgttac ccaaagaat 19

<210> 148

<211> 19

<212> DNA

<213> human

<400> 148

ggaaggaagc ggacgctca 19

<210> 149

<211> 19

<212> DNA

<213> human

<400> 149

ggaggcagta cttctgata 19

<210> 150

<211> 19

<212> DNA
<213> human
<400> 150
cgctctagag ctcagctga 19
<210> 151
<211> 19
<212> DNA
<213> human
<400> 151
ccaccacctc aaccaataa 19
<210> 152
<211> 19
<212> DNA
<213> human
<400> 152
atttcaagaa gtcgatcaa 19
<210> 153
<211> 19
<212> DNA
<213> human
<400> 153
gaagatctga ttaccttca 19
<210> 154
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 154
ggacactggt tcaacacctg t 21
<210> 155
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 155
ggttcaacac ctgtgacttc a 21
<210> 156
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 156

acctgtgact tcatgtgtgc g 21
<210> 157
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 157

gctggacgtg accatcatgt a 21
<210> 158
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 158

ggacgtgacc atcatgtaca a 21
<210> 159
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 159

gacgtgacca tcatgtacaa g 21
<210> 160
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 160

acgtgacat catgtacaag g 21
<210> 161
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 161

acgctatacc atctacctgg g 21
<210> 162
<211> 21
<212> DNA
<213> human
<400> 162

gcctctatga cgacatcgag t 21
<210> 163
<211> 21

<212> DNA
<213> human
<400> 163
gacatcgagt gcttccttat g 21
<210> 164
<211> 23
<212> DNA
<213> human
<400> 164
cgcgagcaca gctaaggcca cgg 23
<210> 165
<211> 23
<212> DNA
<213> human
<400> 165
actctctctt tctggcctgg agg 23
<210> 166
<211> 23
<212> DNA
<213> human
<400> 166
accagcagg gcgtggagcc agg 23
<210> 167
<211> 23
<212> DNA
<213> human
<400> 167
gtcagagccc caaggtaaaa agg 23
<210> 168
<211> 253
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 168
gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgttagagag 60
ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac gtgacgtaga 120
aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat 180
atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggcctt tatatatctt gtggaagga 240
cgctagcgcc acc 253
<210> 169

<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 169
ttcaagaga 9
<210> 170
<211> 6
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 170
tttttt 6
<210> 171
<211> 119
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 171
gaggcttcag tactttacag aatcgttgcc tgcacatctt ggaaacactt gctgggatta 60
cttcttcagg ttaacccaac agaaggctaa agaaggtata ttgctgttga cagtgagcg 119
<210> 172
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 172
tagtgaagcc acagatgta 19
<210> 173
<211> 119
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 173
tgcctactgc ctcggacttc aaggggctac tttaggagca attatcttgt ttactaaaac 60
tgaatacctt gctatctctt tgatacattt ttacaaagct gaattaaaat ggtataaat 119
<210> 174
<211> 686
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 174
gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgttagagag 60
ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag taaaaatac gtgacgtaga 120
aagtaataat ttcttgggta gtttgagtt taaaattat gttttaaaat ggactatcat 180

atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggett tatatatctt gtggaaagga 240
ctttaccact ccctatcagt gatagagaaa agtgaaagtc gagtttacca ctccctatca 300
gtgatagaga aaagtgaag tcgagtttac cactccctat cagtgataga gaaaagtgaa 360
agtcgagttt accactccct atcagtgata gagaaaagtg aaagtcgagt ttaccactcc 420
ctatcagtga tagagaaaag tgaaagtcga gtttaccact ccctatcagt gatagagaaa 480
agtgaagtc gagtttacca ctccctatca gtgatagaga aaagtgaag tcgagctcgg 540
taccggggtc gaggtaggcg tgtacgggtg gaggcctata taagcagagc tcgtttagtg 600
aaccgtcaga tcgcctggag acgccaatcca cgctgttttg acctccatag aagacaccgg 660
gaccgatcca gcctgctagc gccacc 686

<210> 175

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 175

ccatagctca gtctggtcta tc 22

<210> 176

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 176

tcaggatgat ctggacgaag ag 22

<210> 177

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 177

ccggtcctgg actttgtctc 20

<210> 178

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 178

ctcgacatcg gcaaggtgtg 20

<210> 179

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 179

cgcattggag tcgctttaac 20

<210> 180
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 180
cgagctgcaa gaactcttcc tcac 24
<210> 181
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 181
cacggcactt acctgtgttc tgg 23
<210> 182
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 182
cagtacaggc atccctgtga aag 23
<210> 183
<211> 590
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 183
cccctctccc tcccccccc ctaacgttac tggccgaagc cgcttggat aaggccggtg 60
tgcgtttgtc tatatgttat tttccacat attgccgtct tttggcaatg tgagggcccg 120
gaaacctggc cctgtcttct tgacgagcat tcttaggggt ctttcccctc tcgccaaagg 180
aatgcaaggt ctgttgaatg tctgaagga agcagttcct ctggaagctt cttgaagaca 240
aacaacgtct gtagcgacc tttgcaggca gcggaacccc ccacctggcg acaggtgcct 300
ctgcgcccaa aagccacgtg tataagatac acctgcaaag gcggcacaac cccagtgcc 360
cgttgtgagt tggatagttg tggaaagagt caaatggctc tctcaagcg tattcaaca 420
ggggctgaag gatgcccaga aggtaccca ttgtatggga tctgatctgg ggcctcggtg 480
cacatgcttt acatgtgttt agtcgaggtt aaaaaacgt ctaggcccc cgaaccacgg 540
ggacgtggtt ttcctttgaa aaacacgatg ataatatggc cacaacctg 590
<210> 184
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 184
atgtacagga tgcaactcct gtcttgcat gactaagtc ttgcacttgt cacgaattcg 60



图1



图2

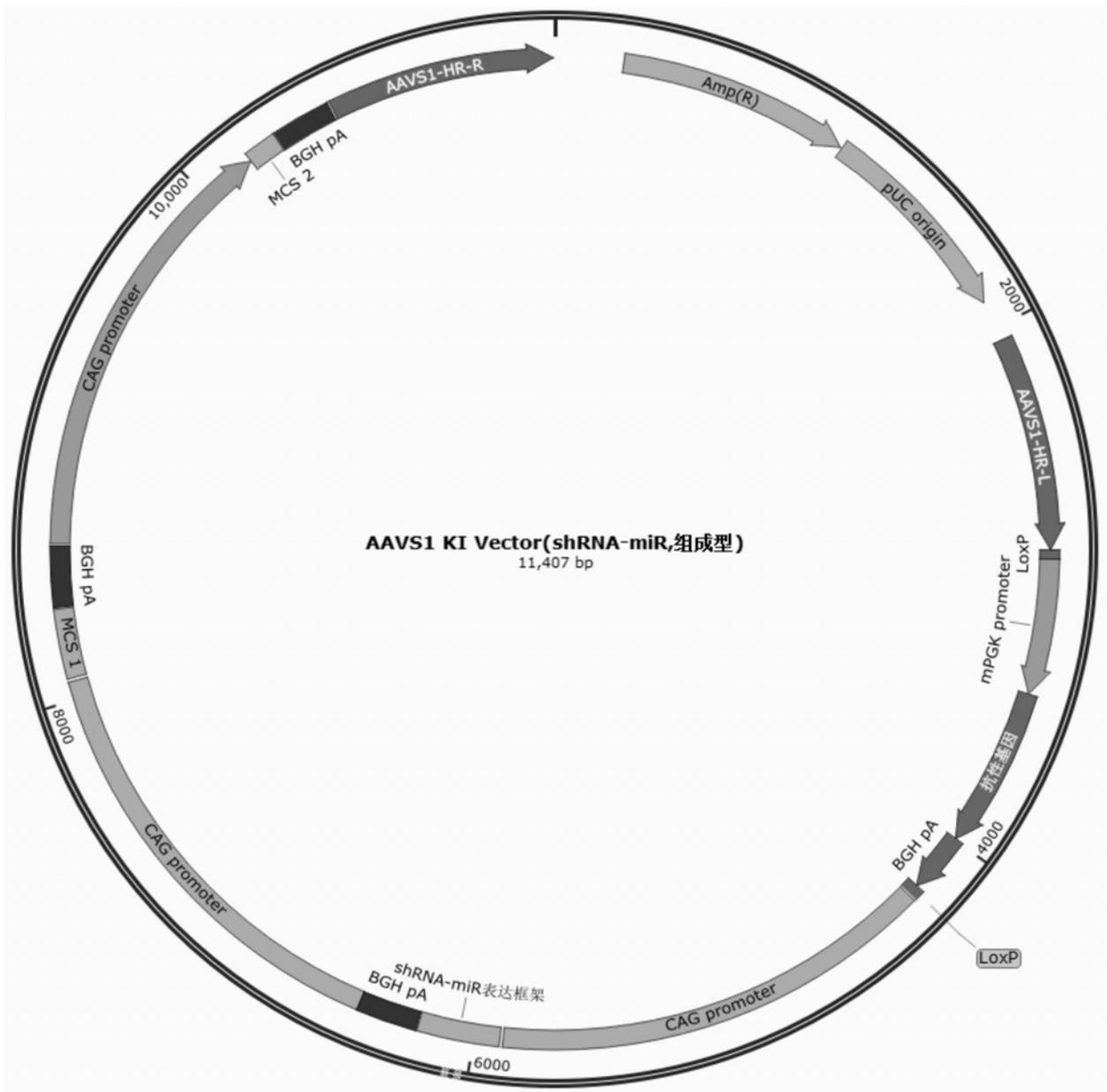


图3



图4



图5



图6

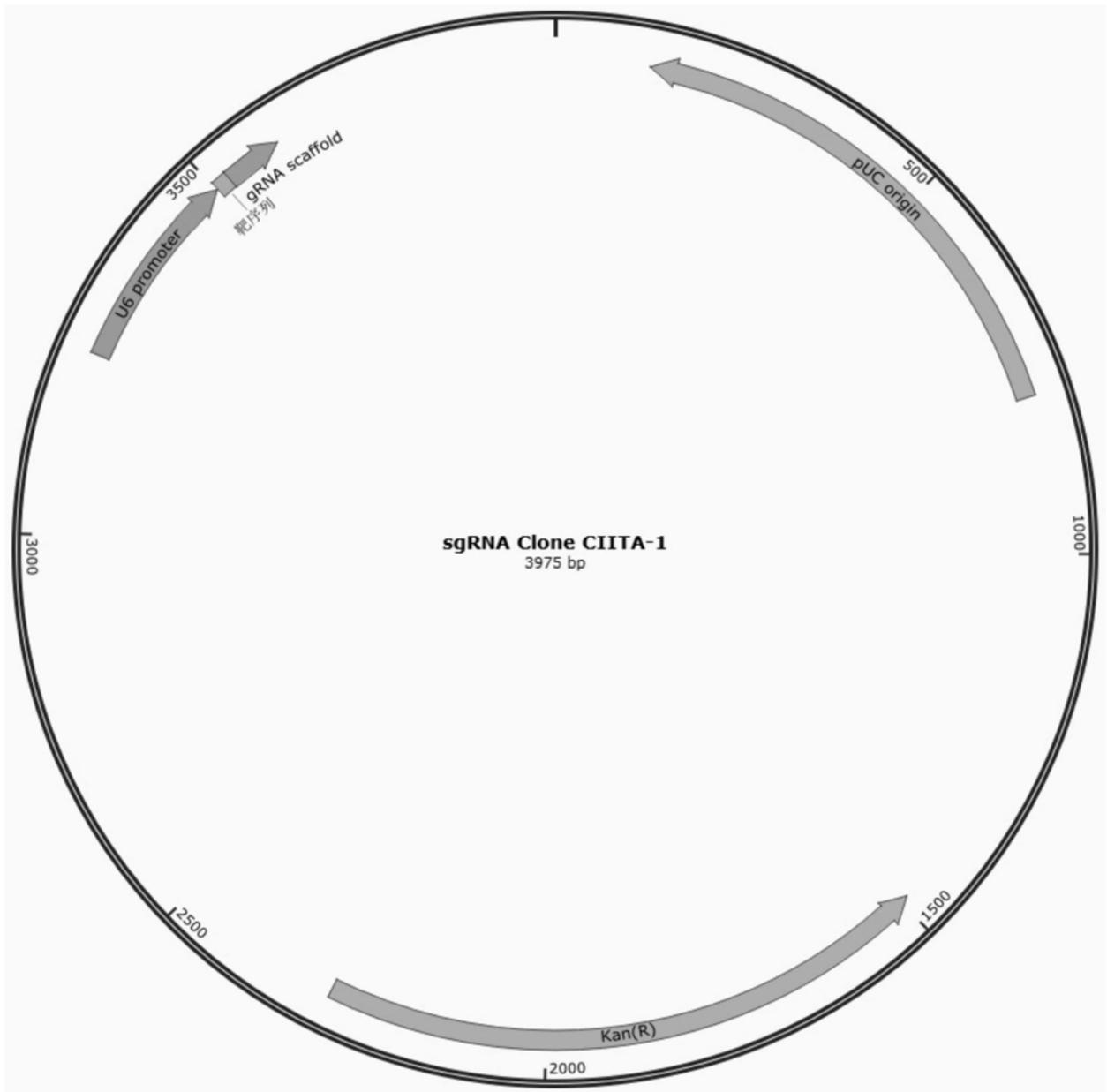


图7



图8

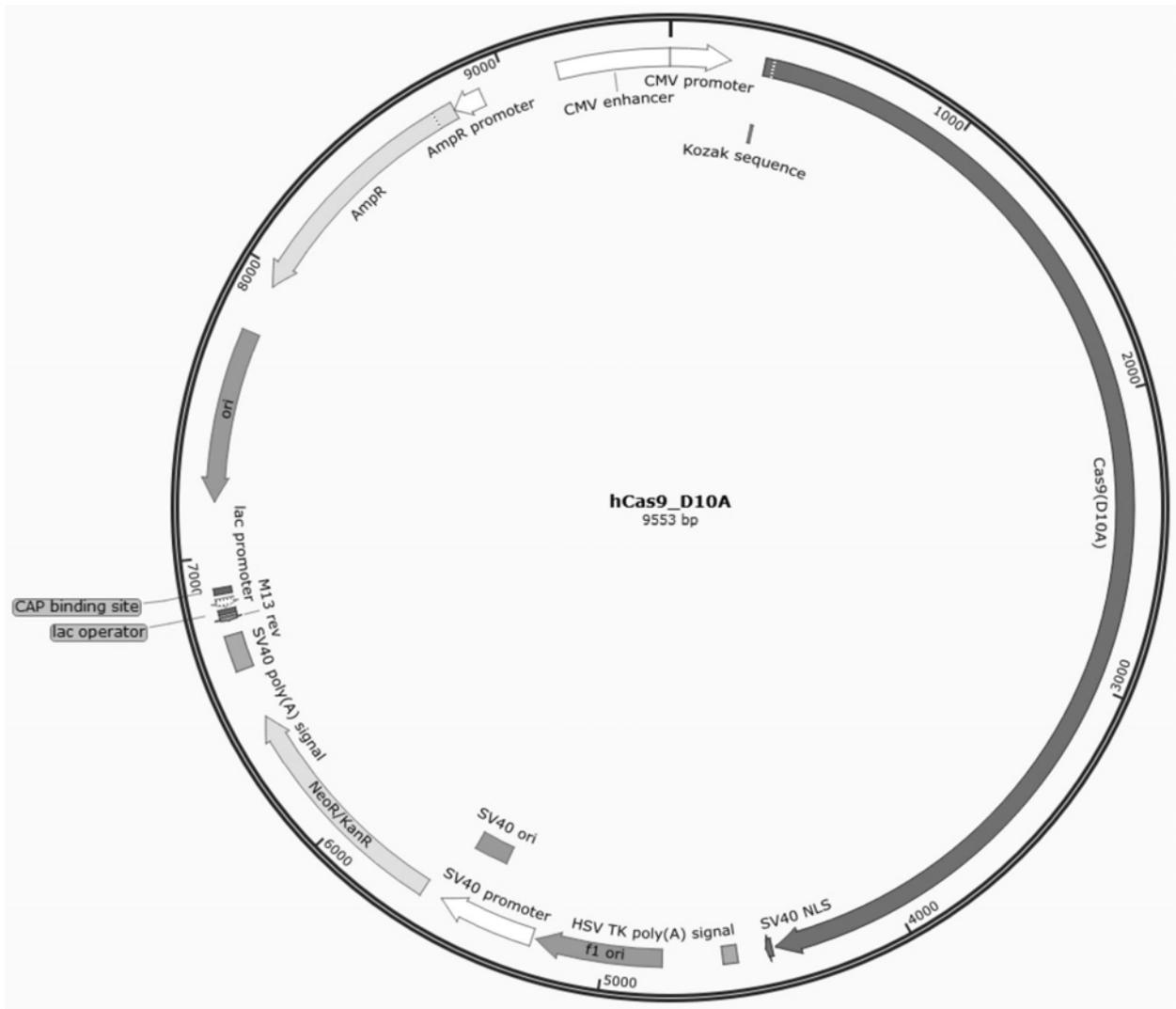


图9



图10

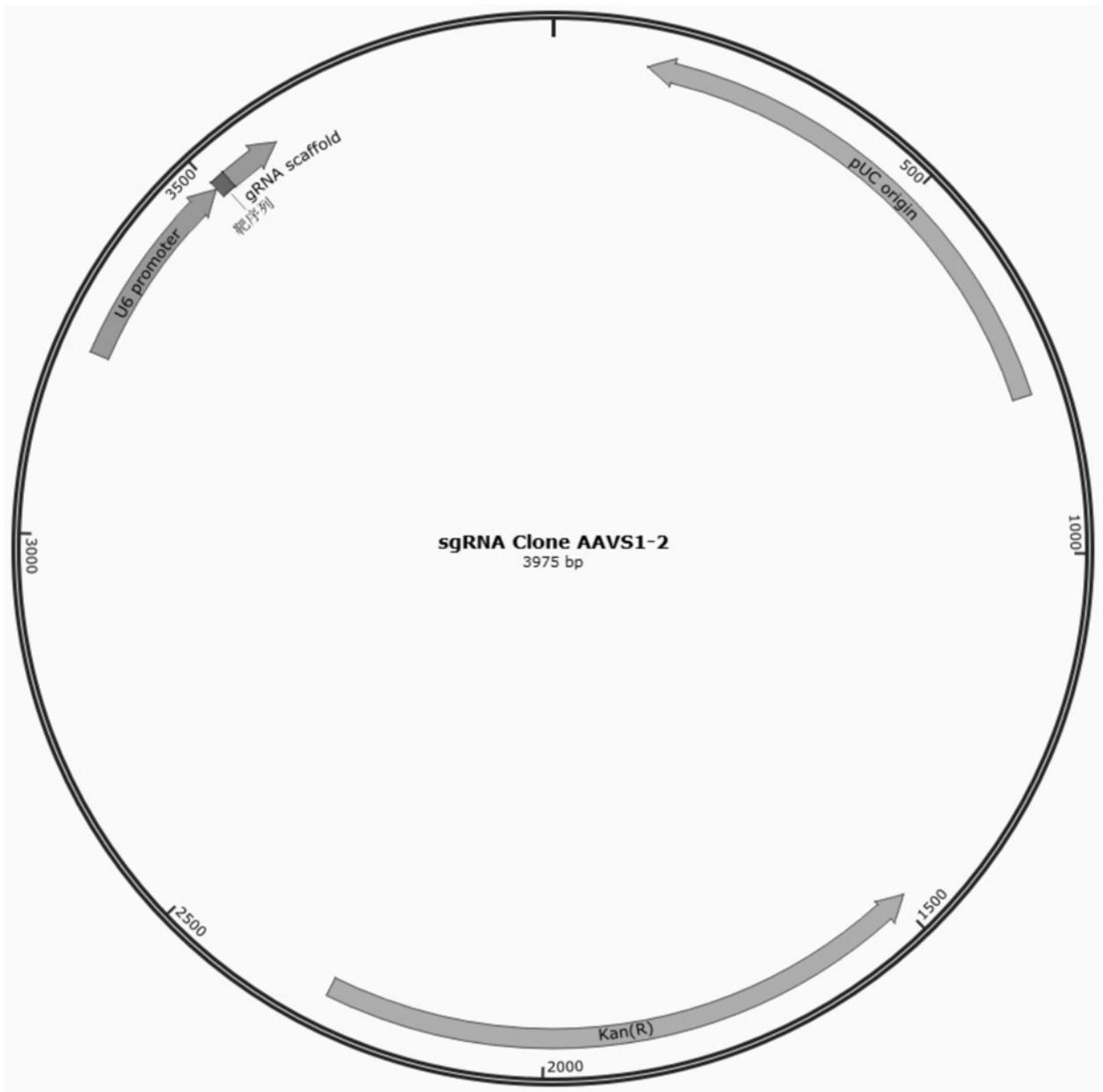


图11