



(10) 授权公告号 CN 110944656 B

(45) 授权公告日 2024.05.03

(21) 申请号 201880045606.3

(22) 申请日 2018.07.06

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110944656 A

(43) 申请公布日 2020.03.31

(30) 优先权数据
17305894.2 2017.07.07 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.01.07

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/068420 2018.07.06

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/008157 EN 2019.01.10

(73) 专利权人 吉尼松公司
地址 法国埃夫里
专利权人 埃夫里-瓦尔德艾松大学
国家健康和医学研究院 (INSERM)

(72) 发明人 I·理查德 E·吉凯尔-祖伊达
W·娄思透

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266
专利代理师 张璐 崔佳佳

(51) Int.Cl.
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2014144907 A1, 2014.09.18
WO 2016138387 A1, 2016.09.01
Lei Xu等. Adeno-associated virus 9 mediated FKRP gene therapy restores functional glycosylation of α -dystroglycan and improves muscle functions. Mol Ther . .2013, 第21卷(第10期), 第1832-1840页.
Evelyne Gicquel等. AAV-mediated transfer of FKRP shows therapeutic efficacy in a murine model but requires control of gene expression. Hum Mol Genet . .2017, 第26卷(第10期), 第1952-1965页.

审查员 门思琦

权利要求书1页 说明书19页
序列表22页 附图4页

(54) 发明名称

编码人类FKRP蛋白的新型多核苷酸

(57) 摘要

本发明涉及编码人福库汀相关蛋白(FKRP)的合成的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含避免从移码起始密码子产生的补充转录物的至少一个突变。所述的多核苷酸可用于,尤其是治疗与FKRP缺陷相关或由“ α -抗肌萎缩相关糖蛋白(α -DG)糖基化缺陷引起的病症,如LGMD2I。

1. 一种编码人福库汀相关蛋白 (FKRP) 的合成的多核苷酸, 其特征在于, 所述多核苷酸的序列如SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6所示。
2. 一种载体, 其特征在于, 包含如权利要求1所述的多核苷酸。
3. 如权利要求2所述的载体, 其特征在于, 所述载体是腺相关病毒 (AAV) 载体。
4. 如权利要求3所述的载体, 其特征在于, 所述AAV载体是血清型2、8或9。
5. 如权利要求4所述的载体, 其特征在于, 所述AAV载体是血清型2/9。
6. 如权利要求2至5中任一项所述的载体, 其特征在于, 包含序列SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:21。
7. 一种细胞, 其特征在于, 包含如权利要求1所述的多核苷酸或如权利要求2至6中任一项所述的载体。
8. 一种包含如权利要求1所述的多核苷酸或如权利要求2至6中任一项所述的载体或如权利要求7所述的细胞的组合物在制备药物中的用途, 其特征在于, 所述药物用于治疗与FKRP缺陷相关的病症。
9. 一种药物组合物, 其特征在于, 包含如权利要求1所述的多核苷酸或如权利要求2至6中任一项所述的载体或如权利要求7所述的细胞, 和药学上可接受的载体。
10. 一种权利要求9所述的药物组合物在制备药物中的用途, 其特征在于, 所述药物用于治疗与FKRP缺陷相关的病症。
11. 如权利要求10所述的用途, 其特征在于, 所述与FKRP缺陷相关的病症由 α -抗肌萎缩相关糖蛋白 (α -DG) 糖基化缺陷引起。
12. 如权利要求10所述的用途, 其特征在于, 所述病症选自: 2I型肢带型肌营养不良症 (LGMD2I)、1C型先天性肌营养不良症 (MDC1C)、沃克-沃堡 (Walker-Warburg) 综合征 (WWS) 和肌肉性眼脑 (Muscle-Eye-Brain) 疾病 (MEB)。
13. 如权利要求12所述的用途, 其特征在于, 所述病症是LGMD2I。

编码人类FKRP蛋白的新型多核苷酸

[0001] 本发明提供了一种有效的基因治疗产品,用于治疗由 α -抗肌萎缩相关糖蛋白(dystroglycan) (α -DG)糖基化缺陷引起的病症。本发明涉及编码人福库汀(fukutin)相关蛋白(FKRP)并含有避免从移码起始密码子产生的补充转录物的突变的多核苷酸。用所述多核苷酸观察到较高水平的FKRP表达,这为治疗与FKRP缺陷相关的各种疾病,例如2I型肢带型肌营养不良症(LGMD2I)提供了有价值的治疗工具。

[0002] 发明背景

[0003] “抗肌萎缩相关糖蛋白病(Dystroglycanopathies)”重新组合了导致 α -抗肌萎缩相关糖蛋白(dystroglycan) (α DG)继发性异常糖基化的不同遗传病症。这种蛋白主要存在于骨骼肌、心脏、眼和大脑组织中,是一种高糖基化膜蛋白,其糖基化过程将其重量从70kDa增加到156kDa。它是肌营养不良蛋白-糖蛋白复合物的一部分,该复合物将细胞骨架连接到细胞外基质(ECM)。它的高糖基化水平使 α DG直接与某些ECM蛋白的层粘连蛋白球状结构域结合,例如来自心肌和骨骼肌中的层粘连蛋白、神经肌肉接头处的凝集素和基底膜蛋白多糖(perlecan)、脑中的神经毒素和视网膜中的皮卡丘林(pikachurin)。 α DG的糖基化是一个复杂的过程,目前对其尚未完全了解。实际上,已经鉴定出许多基因与 α DG糖基化有关。由于对显示出 α DG糖基化缺陷的患者进行突变检测中高通量测序方法的使用,这些研究最近正在加速发展。这些蛋白之一是福库汀(Fukutin)相关蛋白(FKRP)。由于其序列中存在许多糖基转移酶所共有的DxD基序,并且在FKRP基因突变的患者中存在 α DG低糖基化的证据,因此最初将其归类为认定的 α DG糖基转移酶。(Breton等,1999;Brockington等,2001)。最近,FKRP及其同源的福库汀(Fukutin)被鉴定为5-磷酸核糖醇(Rbo5P)转移酶,形成了添加配体结合部分所必需的di-Rbo5P接头(Kanagawa等,2016)。

[0004] FKRP基因的突变可产生由 α DG糖基化缺陷引起的所有病症范围,从2I型肢带型肌营养不良症(LGMD2I;Muller等,2005)、1C型先天性肌营养不良症(MDC1C;Brockington等,2001),到沃克-沃伯格(Walker-Warburg)综合征(WWS)和肌肉性眼脑(Muscle-Eye-Brain)病(MEB;Beltran-Valero de Bernabe等,2004)。疾病的严重程度与患者人数之间呈负相关关系,患者越严重,病患越稀少(患病率参见www.orphanet.fr:WWS(所有基因):1-9/1,000,000和LGMD2I:1-9/100,000)。病理类型似乎至少部分与FKRP突变的性质有关。特别地,纯合的L276I突变,在蛋白质的276位上的亮氨酸被替代为异亮氨酸,其总是与LGMD2I有关(Mercuri等,2003)。LGMD2I是一种隐性常染色体肌肉营养不良,尽管异质地影响了肩部和骨盆带的肌肉,但它受到的影响较大。它是欧洲最常见的LGMD2之一,特别是由于北欧L276I突变的高流行性(Sveen等,2006)。病理的严重性差异巨大。肌肉症状可能出现在最初的十年到第三十年之间,并且从杜氏病(Duchenne-like disease)到相对良性的程度不等。心脏也可能受到导致严重心力衰竭和死亡等后果的影响(Muller等,2005)。使用心脏磁共振成像的研究表明,很大比例的LGMD2I患者(60-80%)会出现心肌功能障碍,例如射血分数降低(Wahbi等,2008年)。有趣的是,心脏异常的严重程度与骨骼肌受累无关。

[0005] 吉奎尔等(Hum Mol Genet,2017年3月3日,doi:10.1093/hmg/ddx066)报道了FKRP^{L276I}小鼠模型的产生,其中重组腺相关病毒(rAAV2/9)转移了鼠Fkrp基因的表达,该基

因被置于结蛋白启动子和 β -血红蛋白(HBB2)基因的聚腺苷酸化(polyA)信号的控制下,并对此进行评价。肌肉或静脉内递送后,观察到肌肉病理学改善。他们在mRNA和蛋白质水平上都获得了FKRP的强表达,并显示出 α DG适当糖基化的拯救和层粘连蛋白结合的增加,从而导致了营养不良的组织学和功能上的拯救。

[0006] W02016/138387提出将编码FKRP的野生型核苷酸序列的GC含量降低约5%至约10%,以增加FKRP的表达。它提供了一种合成的多核苷酸,即SEQ ID NO:1,与野生型序列相比其GC含量降低了9.99%。

[0007] 因此,基于FKRP的基因替代疗法似乎是由FKRP缺乏引起的病理学的有前途的治疗方法。但是,仍然需要改进的治疗方法。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明旨在通过提供由能够具有更高的FKRP表达水平的经修饰转基因编码的天然人FKRP蛋白来减轻或治愈与福库汀相关蛋白(FKRP)缺乏有关的破坏性病理学状况,如肢体型肌营养不良症2I型(LGMD2I)。

[0010] 本发明提供了基于FKRP优化序列的有前途的基因治疗产品。本申请报道了当将AAV9载体中衣壳化的要求保护的多核苷酸肌肉内注射到小鼠中时,能够获得与用天然编码序列获得的FKRP相比更高水平的FKRP。

[0011] 定义

[0012] 除非另有定义,否则其中使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解相同含义。本说明书中使用的术语仅是出于描述特定实施例的目的,并非旨在进行限制。

[0013] 本文使用的冠词“一”和“一个”是指该冠词的语法对象中的一个或多个(即,至少一个)。举例来说,“一个元件”是指一个元件或一个以上元件。

[0014] 如本文所用,“约”或“大约”是指当涉及诸如量、时间持续时间等的可测量值时,包括相对于指定值 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$,更优选地 $\pm 5\%$,甚至更优选地 $\pm 1\%$,还更优选地 $\pm 0.1\%$,因为这样的变化适合于执行所公开的方法。

[0015] 范围:在本发明全部内容中,可以以范围格式来呈现本发明的各个方面。应当理解,范围格式的描述仅是为了方便和简洁,而不应被解释为对本发明范围的不灵活的限制。因此,应该认为范围的描述已经具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的各个数值。例如,描述某范围,如1到6应视为已明确公开了子范围,例如从1到3、从1到4、从1到5、从2到4、从2到6、从3到6等,以及该范围内的单个数字,例如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。这种适用性与范围的广度无关。

[0016] “分离的”是指从自然状态改变的或去除的。例如,天然存在于活体动物中的核酸或肽不是“分离的”,但是与天然状态的共存材料部分或完全分离的相同核酸或肽是“分离的”。分离的核酸或蛋白质可以基本上以纯化的形式存在,或可以存在于非天然环境中,例如宿主细胞中。

[0017] 在本发明的上下文中,对于常见的核酸碱基使用以下缩写。“A”是指腺苷,“C”是指胞嘧啶,“G”是指鸟苷,“T”是指胸腺嘧啶,“U”是尿苷。

[0018] “编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此为简并形式并且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA或cDNA的核苷酸序列还可以包括内含子,其程度

为编码蛋白质的核苷酸序列在某些形式中可以包含一个或多个内含子。

[0019] “编码”是指多核苷酸(例如基因、cDNA或mRNA)中特定核苷酸序列的固有属性,以用作在具有确定的核苷酸序列(即rRNA、tRNA和mRNA)或确定的氨基酸序列的生物过程,以及由此产生的生物学特性中,合成其他聚合物和大分子的模板。因此,如果对应于一基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其他生物系统中产生一蛋白质,则该基因编码该蛋白质。编码链和非编码链都可以称为编码该基因或cDNA的蛋白质或其他产物,其中,编码链的核苷酸序列与mRNA序列相同且通常是在序列表中提供的编码链,而非编码链被用作基因或cDNA转录的模板。

[0020] 术语“起始密码子”表示由核糖体翻译的信使RNA(mRNA)转录物的第一个密码子。在真核生物中,起始密码子始终编码甲硫氨酸。最常见的起始密码子是AUG。结果,在DNA的编码链(或正义链或非模板链)上,起始密码子的序列为ATG。非编码链(或反义链或反编码链或模板链或转录菌株)上的相应反密码子是CAT。在说明书的其余部分中,术语“起始密码子”也用于DNA。

[0021] 如本文所用,术语“多核苷酸”被定义为可以是单链(ss)或双链(ds)的核苷酸链。此外,核酸是核苷酸的聚合物。因此,如本文所用的核酸和多核苷酸是可互换的。本领域技术人员具有核酸是多核苷酸的一般知识,其可以被水解成单体“核苷酸”。单体核苷酸可以被水解成核苷。如本文所用,多核苷酸包括但不限于通过本领域可用的任何手段获得的所有核酸序列,包括但不限于重组手段(即使用常规克隆技术和PCR等从重组文库或细胞基因组中克隆核酸序列),以及通过合成的方式。

[0022] 如本文所用,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用,并且是指由通过肽键共价连接的氨基酸残基组成的复合物。蛋白质或肽必须包含至少两个氨基酸,并且对构成蛋白质或肽的序列的最大氨基酸数没有限制。多肽包括包含通过肽键彼此连接的两个或更多个氨基酸的任何肽或蛋白质。如本文所用,该术语是指短链或长链,其中,短链在本领域中通常也被称为例如肽、寡肽和寡聚物,而长链在本领域中通常被称为蛋白质,其中有很多类型。“多肽”包括例如生物活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同二聚体、异二聚体、多肽的变体、修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等等。所述多肽包括天然肽、重组肽、合成肽,或其组合。

[0023] 蛋白质可以被“改变”并包含氨基酸残基的缺失、插入或取代,这些氨基酸残基具有沉默的改变并产生功能上等同的结果。可以基于残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲性质的相似性来进行故意的氨基酸取代。例如,带负电荷的氨基酸可包括天冬氨酸和谷氨酸;带正电荷的氨基酸可以包括赖氨酸和精氨酸;具有相似的亲水性数值的不带电荷的极性头基的氨基酸可以包括亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸、甘氨酸和丙氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺、丝氨酸和苏氨酸以及苯丙氨酸和酪氨酸。

[0024] 如本文所用,“变体”是指一个或多个氨基酸被改变的氨基酸序列。所述变体可以具有“保守的”变化,其中取代的氨基酸具有相似的结构或化学性质,例如用异亮氨酸替代亮氨酸。变体也可能具有“非保守的”变化,例如用色氨酸替代甘氨酸。类似的微小变化也可以包括氨基酸的缺失或插入,或两者。使用本领域众所周知的计算机程序可以找到确定哪些氨基酸残基可以被取代、插入或缺失而不丧失生物学或免疫学活性的指南。

[0025] “相同的”或“同源的”是指两个多肽之间或两个核酸分子之间的序列同一性或序

列相似性。当两个比较序列的某一位置均被相同的碱基或氨基酸单体亚基占据时(例如,如果两个DNA分子中的某一位置均被腺嘌呤占据),则这两个分子在该位置是同源的或相同的。两个序列之间的同源性/同一性百分比是两个序列共享的匹配位置数除以所比较的位置数 $\times 100$ 的函数。例如,如果两个序列中10个位置中的6个匹配,则两个序列60%相同。通常,当两个序列比对以给出最大的同源性/同一性时进行比较。

[0026] “载体”是包含分离的核酸并且可以用于将分离的核酸递送至细胞内部的物质组合物。许多载体是本领域已知的,包括但不限于线性多核苷酸、与离子或两亲性化合物相关的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“载体”包括自主复制质粒或病毒。该术语也应解释为包括有助于核酸转移到细胞中的非质粒和非病毒复合物,例如聚赖氨酸复合物、脂质体等。病毒载体的实例包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体等。

[0027] “表达载体”是指包含重组多核苷酸的载体,所述重组多核苷酸包含与待表达的核苷酸序列可操作地连接的表达调控序列。表达载体包含足够的顺式作用元件用于表达;其他表达元件可以由宿主细胞提供或在体外表达系统中提供。表达载体包括本领域已知的所有载体,例如掺入重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如,裸露的或包含在脂质体中的)和病毒(例如,慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0028] 如本文所用,术语“启动子”定义为启动多核苷酸序列的特异性转录所需的DNA序列,其被细胞的合成机制或引入的合成机制识别。

[0029] 如本文所用,术语“启动子/调节序列”是指表达可操作地连接至所述启动子/调节序列的基因产物所需的核酸序列。在某些情况下,该序列可以是核心启动子序列,在其他情况下,该序列也可以包括表达基因产物所需的增强子序列和其他调控元件。所述启动子/调节序列可以例如是一种以组织特异性方式表达基因产物的启动子/调节序列。

[0030] “组成型”启动子是一种核苷酸序列,当其与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,其导致在细胞的大多数或全部生理条件下在细胞中产生该基因产物。

[0031] “诱导型”启动子是一种核苷酸序列,当其与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,仅当对应于该启动子的诱导物存在于细胞中时,其才能导致在细胞中产生该基因产物。

[0032] “组织特异性”启动子是一种核苷酸序列,当与编码或指定基因的多核苷酸可操作连接时,如果该细胞是与该启动子相对应的组织类型的细胞,则优先使该基因产物在该细胞中产生。

[0033] 当在生物体、组织、细胞或其组成部分的上下文中使用时,术语“异常”是指在至少一种可观察或可检测的特征(例如年龄、治疗、天数等)方面,与显示“正常”(预期)的生物体、组织、细胞或其组成部分各自不同的生物体、组织、细胞或其组成部分。对于一种细胞或组织类型正常或预期的特征,对于另一种细胞或组织类型可能是异常的。

[0034] 术语“患者”、“受试者”、“个体”等在本文中可互换使用,并且是指无论是体外还是原位,适合于本文所述方法的任何动物或其细胞。受试者可以是哺乳动物,例如人、狗、小鼠、大鼠或非人灵长类动物。在某些非限制性实施方式中,所述的患者、受试者或个体是人。

[0035] “疾病”或“病症”是受试者的一种健康状态,其中受试者不能维持体内稳态,并且如果疾病没有得到改善,则受试者的健康状态继续恶化。相反,受试者的“紊乱(disorder)”是一种健康状态,其中受试者能够维持体内稳态,但是与不存在该紊乱的情况相比,受试者

的健康状态不佳。如果不及时治疗,紊乱不一定会导致受试者的健康状况进一步下降。

[0036] 如果所述疾病或紊乱的症状的严重性、患者经历这些症状的频率,或两者都降低,则所述疾病或紊乱被“减轻”或“缓解”。这也包括阻止所述疾病或紊乱的进展。如果所述疾病或紊乱的症状的严重性、患者经历这种症状的频率,或两者都消除,则所述疾病或病症被“治愈”。

[0037] “治疗性”疗法是施用于表现出病理学迹象的受试者,以减少或消除那些迹象的治疗。“预防性”治疗是为了预防或推迟这些迹象的发生,而施用于没有表现出病症迹象或尚未被诊断为该疾病的受试者的治疗。

[0038] 如本文所用,“治疗疾病或紊乱”是指降低受试者经历的疾病或紊乱的至少一种迹象或症状的频率或严重性。在治疗的背景下,疾病和紊乱在本文中可互换使用。

[0039] 化合物的“有效量”是足以向施用该化合物的受试者提供有益作用的化合物的量。如本文所用,短语“治疗有效量”是指足以或有效地预防或治疗(延缓或预防其发作、防止其发展、抑制、减少或逆转)疾病或病症的量,包括减轻此类疾病的症状。递送载体的“有效量”是足以有效结合或递送化合物的量。

[0040] 发明详述

[0041] 本发明基于以下的发现:抑制福库汀蛋白相关蛋白(FKRP)的编码区中包含的补充移码起始密码子,可增加FKRP的表达。

[0042] 因此,在一方面,本发明提供了编码人FKRP的合成的多核苷酸,其中所述多核苷酸包含避免从移码起始密码子产生的补充转录物的至少一个突变。

[0043] 根据本发明,所述合成的多核苷酸包含编码功能性人FKRP的核酸序列,或由其组成。

[0044] 在一个实施方式中,编码人FKRP的多核苷酸,也称为“开放阅读框”ORF,是cDNA。但是,例如可以使用单链或双链DNA或RNA。

[0045] 在本发明的框架中,人FKRP蛋白是由如SEQ ID NO:1(对应于495aa的蛋白质)所示的氨基酸序列组成,或包含其的蛋白。

[0046] 根据特定的实施方式,功能性人FKRP是具有与由SEQ ID NO:1编码的天然人FKRP相同功能的蛋白质,尤其是糖基化 α -抗肌萎缩相关糖蛋白(α DG)和/或至少部分缓解与FKRP缺陷有关的一种或多种症状,特别是如上所述的LGMD2I表型的能力。它可以是其片段和/或其衍生物。根据一个实施方式,所述FKRP序列与序列SEQ ID NO:1的同一性大于或等于60%、70%、80%、90%、95%或甚至99%。

[0047] 如本领域已知的,编码序列为SEQ ID NO:1的人FKRP蛋白的天然人序列中具有序列SEQ ID NO:2。

[0048] 本发明不包括天然序列SEQ ID NO:2,并且关注于编码SEQ ID NO:1但与SEQ ID NO:2不同的序列。更确切地说,天然多核苷酸(SEQ ID NO:2)已被修饰或优化:基于遗传密码子的简并性,天然序列(SEQ ID NO:2)的一个或多个碱基已被其他碱基取代,同时不改变所得氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。换句话说,本发明提供了一种合成的多核苷酸,即非天然存在的,优选经优化的多核苷酸。

[0049] 根据另一个具体的实施方式,本发明所述的合成的多核苷酸不包含序列SEQ ID NO:20,或与其具有至少90%同一性的任何序列,也不由其组成。

[0050] 优选地,编码人FKRP的合成的多核苷酸为与编码功能性人FKRP(优选为序列SEQ ID NO:1)的分离的核酸的核苷酸序列,尤其是序列SEQ ID NO:2约60%同源/相同,更优选为约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、88%、89%或约90%、91%、92%、93%、94%同源/相同,甚至更优选约95%同源/相同,甚至更优选约96%、97%、98%或甚至99%同源/相同。如前所述,所述多核苷酸不包含序列SEQ ID NO:2,或不由其组成。

[0051] 如本领域中已知的,编码序列可以在正义或反义方向上包含一个或多个移码起始密码子,其可以产生替代或补充的转录产物。作为示例,所述编码序列在正义起始密码子的情况下可以另外包含ATG,或者在反义起始密码子的情况下可以另外包含CAT。根据一个具体的实施方式,这些起始密码子是移码的,即它们产生替代的开放阅读框(ORF)与人FKRP的编码序列不同相/框,而是移位了一个核苷酸(“相/框+1”)或2个核苷酸(“相/框+2”)。换句话说,所谓的“移码”起始密码子在FKRP编码序列的替代框之一中。

[0052] 在SEQ ID NO:2的特定情况下,主ORF在第1位以编码甲硫氨酸(M或Met)的ATG(SEQ ID NO:2的1至3位核苷酸)开始;相应的ORF由1488个碱基或核苷酸组成,编码495aa的蛋白,由以终止密码子TGA结束。同相内(即同框内)的其他ORF起始于第430位(SEQ ID No:2的430至432位核苷酸)和第1279位(SEQ ID NO:2的1279至1281位核苷酸),具有编码甲硫氨酸(M或Met)的ATG。但是,它们不可能被更改,因为除了经典的ATG外,没有其他编码甲硫氨酸的密码子。

[0053] 在相+1的情况下,有4个起始密码子能够生成补充转录物:

[0054] -在反义方向上对应于ATG的第429位(SEQ ID NO:2的429至431位核苷酸)、第819位(SEQ ID NO:2的819至821位核苷酸)和第1431位(SEQ ID NO:2的1431至1433位核苷酸)的CAT;

[0055] -在正义方向上的第545位的ATG(SEQ ID NO:5的545至547位核苷酸)。

[0056] 在相/框+2的情况下,没有潜在的起始密码子(正义或反义)。

[0057] 根据本发明,引入至少一个碱基改变,以突变起始密码子,而不改变编码的氨基酸。

[0058] 根据一个实施方式,所述多核苷酸的一个起始密码子被突变,所述起始密码子位于序列SEQ ID NO:2的第429位(“429-431”),或第545位(“545-547”),或第819位(“819-821”),或第1431位(“1431-1433”)。

[0059] 在一个优选的实施方式中,所述多核苷酸的至少一个起始密码子被突变,所述起始密码子位于序列SEQ ID NO:2的第819位(“819-821”)。

[0060] 根据一个实施方式,所述多核苷酸的至少两个(2)起始密码子被突变,所述起始密码子位于序列SEQ ID NO:2的第429和545位,第429和819位,或第429和1431位,或第545和819位,或第545和1431位,或第819和1431位。优选地,突变的起始密码子位于序列SEQ ID NO:2的第429和819位、第545和819位或第819和1431位。

[0061] 根据另一个实施方式,所述多核苷酸的至少三个(3)起始密码子被突变,所述起始密码子位于序列SEQ ID NO:2的第429和545和819位、第429和545和1431位、或第429和819和1431位、或第545和819和1431位,优选地是SEQ ID NO:2的第429和819和1431位。更优选地,所述多核苷酸包括序列SEQ ID NO:4,或SEQ ID NO:7,或SEQ ID No:8,或由其组成。

[0062] 在另一个实施方式中,所述多核苷酸的至少四个(4)起始密码子被突变,所述起始密码子位于序列SEQ ID NO:2的第429和545和819和1431位。优选地,所述多核苷酸包括序列SEQ ID NO:3,或SEQ ID NO:5,或SEQ ID No:6,或由其组成。

[0063] 所述起始密码子的修饰可以由所述密码子中的1、2或3个突变引起。如已经提到的,所述突变不应改变编码的序列。

[0064] 第429位(“429-431”)的反义起始密码子的抑制可以是由于,例如将第429位的C碱基更改为G或A所引起。结果,“CAT”(反义方向的ATG)被转换为“GAT”(反义方向的ATC)或“AAT”(反义方向的ATT),其不再与反义方向上的起始密码子相对应,但不改变相应的氨基酸序列。

[0065] 第545位(“545-547”)的正义起始密码子的抑制可以是由,于例如将第546位的T碱基更改为C所引起。结果,“ATG”被转换为“ACG”,其不再对应于正义方向的起始密码子,但不改变相应的氨基酸序列。

[0066] 第819位(“819-821”)的反义起始密码子的抑制可以是由于,例如将第819位的C碱基更改为G或A所引起。结果,“CAT”(反义方向的ATG)被转换为“GAT”(反义方向的ATC)或“AAT”(反义方向的ATT),其不再与反义方向上的起始密码子相对应,但不改变相应的氨基酸序列。

[0067] 第1431位(“1431-1433”)的反义起始密码子的抑制可以是由于,例如将第1431位的C碱基更改为G所引起。结果,“CAT”(反义方向的ATG)被转换为“GAT”(反义方向的ATC),其不再与反义方向上的起始密码子相对应,但不改变相应的氨基酸序列。

[0068] 可以如下进一步优化本发明的多核苷酸:

[0069] 根据一个实施方式,GC含量被修改,优选被降低。优选地,本发明的多核苷酸的GC含量,相对于SEQ ID NO:2的GC含量降低小于5%,或相对于SEQ ID NO:2的GC含量降低大于10%。当用A或T取代G和C碱基时,氨基酸序列应保守,并且优选不引入额外的起始密码子。

[0070] 根据另一个实施方式,优选以与上述相同的预防措施替换CG基序以避免CpG结构的形成(氨基酸序列是保守的,并且不引入额外的起始密码子)。

[0071] 根据另一个实施方式,基于人的转运RNA频率(例如遵循Sharp等(1988)中公开的密码子频率表)优化序列,优选采用与上述相同的预防措施。

[0072] 根据另一个实施方式,本发明的多核苷酸还可在SEQ ID NO:2的区域553-559中(GCCCCG)的具有至少一个突变,其对应于茎环。优选地,由于一个或多个突变,所述茎环结构被修饰甚至被破坏。例如,SEQ ID NO:2的第558位的核苷酸C被转换为T。

[0073] 根据一个具体的实施方式,本发明的多核苷酸包含选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8的序列,或与其具有约60%同源/相同,更优选约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、88%、89%或约90%、91%、92%、93%、94%同源/相同,甚至更优选约95%同源/相同,甚至更优选约96%、97%、98%或甚至99%同源/相同的序列,或由其组成。

[0074] 根据一个优选的实施方式,所述同源序列具有相同的起始密码子突变。

[0075] 因此,作为实例,本发明还涉及与SEQ ID NO:4具有60%的同源性,更优选约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、88%、89%或大约90%、91%、92%、93%、94%的同源性,甚至更优选地,大约95%同源性,甚至更优选地,大约

96%、97%、98%或甚至99%的同一性的序列;并且在序列SEQ ID NO:2的第429、819和1431位的3个起始密码子突被变。根据一个具体的实施方式,所述序列是SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8。

[0076] 根据另一个实例,本发明还涉及与SEQ ID NO:6具有60%的同一性,更优选约65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、88%、89%或大约90%、91%、92%、93%、94%的同一性,甚至更优选地,大约95%同一性,甚至更优选地,大约96%、97%、98%或甚至99%的同一性的序列;并且在序列SEQ ID NO:2的第429、545、819和1431位的4个起始密码子突被变。根据一个具体的实施方式,所述序列是SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:3。

[0077] 根据一个具体的实施方式,将分离的多核苷酸插入载体。简而言之,天然或合成核酸的表达通常是通过将核酸或其部分可操作地连接至启动子,并将构建物掺入表达载体而实现的。所使用的载体适合在真核细胞中复制和任选地整合。典型的载体包含用于调节所需核酸序列表达的转录和翻译终止子、起始序列和启动子。

[0078] 在一个实施方式中,所述载体是表达载体,优选地是病毒载体。

[0079] 在一个实施方式中,所述病毒载体选自下组:杆状病毒载体、疱疹病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体和腺相关病毒(AAV)载体。

[0080] 根据本发明的特定实施方式,包含所述多核苷酸的病毒载体是腺相关病毒(AAV)载体。

[0081] 腺相关病毒(AAV)载体已成为治疗各种疾病的强大的基因传递工具。AAV载体具有许多功能,这使其非常适合基因治疗,所述的功能包括缺乏致病性、中等免疫原性以及以稳定和有效的方式转导有丝分裂后细胞和组织的能力。通过选择AAV血清型、启动子和递送方法的合适组合,可以将AAV载体中包含的特定基因的表达特异性地靶向一种或多种细胞。

[0082] 在一实施方式中,所述编码序列包含在AAV载体内。已知有超过100种自然存在的AAV血清型。AAV衣壳中存在许多天然变体,从而可以鉴定和使用具有特别适合于营养不良性疾病的特性的AAV。可以使用常规的分子生物学技术对AAV病毒进行工程改造,从而可以优化这些颗粒,以实现核酸序列的细胞特异性递送、最小化免疫原性、调节稳定性和颗粒寿命、有效降解、准确递送至细胞核。

[0083] 如上所述,使用AAV载体是DNA外源递送的一种常见方式,因为它相对无毒、可以提供有效的基因转移,并且可以很容易地针对特定目的进行优化。在从人或非人灵长类动物(NHP)分离并具有良好特征的AAV血清型中,人血清型2是第一个被开发为基因转移载体的AAV。当前使用的其他AAV血清型包括AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10、AAV11和AAV12。另外,非天然工程化变体和嵌合AAV也可以被使用。

[0084] 用于组装到载体中的理想AAV片段包括:cap蛋白,其包括vp1、vp2、vp3和高变区;rep蛋白,其包括rep78、rep68、rep52和rep40;以及编码这些蛋白的序列。这些片段可以容易地用于多种载体系统和宿主细胞中。

[0085] 此类片段可单独使用、与其他AAV血清型序列或片段结合使用,或与其他AAV或非AAV病毒序列的元件结合使用。如本文所用,人工AAV血清型包括但不限于具有非天然存在的衣壳蛋白的AAV。这样的人工衣壳可以通过任何合适的技术,使用选择的AAV序列(例如,vp1衣壳蛋白的片段)结合异源序列来产生,所述异源序列可以获自不同的选择的AAV血清

型、同样的AAV血清型的非连续部分、非AAV病毒来源的或非病毒来源的。人工AAV血清型可以是但不限于嵌合AAV衣壳、重组AAV衣壳或“人源化”AAV衣壳。因此,示例性AAV或人工AAV包括AAV2/8 (US7, 282, 199)、AAV2/5 (可从美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 获得)、AAV2/9 (W02005/033321)、AAV2/6 (US6, 156, 303) 和AAVrh10 (W02003/042397)。在一个实施方式中,可用于本文所述的组合物和方法中的载体至少包含编码选择的AAV血清型衣壳 (例如AAV8衣壳或其片段) 的序列。在另一个实施方式中,有用的载体至少包含编码选择的AAV血清型rep蛋白 (例如AAV8 rep蛋白或其片段) 的序列。任选地,这样的载体可以同时包含AAV帽蛋白和rep蛋白。在同时提供了AAV rep和cap的载体中,AAV rep和AAV cap序列都可以是一个血清型起源,例如所有AAV8起源。或者,可以使用其中rep序列来自一个不同于提供cap序列的AAV血清型的载体。在一个实施方式中,所述rep和cap序列从不同的来源 (例如不同的载体,或宿主细胞和载体) 表达。在另一个实施方式中,这些rep序列在框内与不同AAV血清型的cap序列融合,以形成嵌合AAV载体,例如AAV2/8 (US7, 282, 199)。

[0086] 根据一个实施方式,所述组合物包含血清型2、5、8或9的AAV。优选地,要求保护的载体是AAV8或AAV9载体,尤其是AAV2/8或AAV2/9载体。更优选地,要求保护的载体是AAV9载体或AAV2/9载体。

[0087] 在用于本发明的AAV载体中,AAV基因组可以是单链(ss)核酸或双链(ds)/自互补(sc)核酸分子。

[0088] 优选地,将编码人FKRP的多核苷酸插入AAV载体的ITR (“反向末端重复”) 序列之间。典型的ITR序列对应于SEQ ID NO:12 (5' ITR序列) 和SEQ ID NO:16 (3' ITR序列)。

[0089] 重组病毒颗粒可通过本领域技术人员已知的任何方法获得,例如通过单纯疱疹病毒系统和杆状病毒系统共转染293HEK细胞。所述载体滴度通常表示为每毫升病毒基因组(vg/mL)。

[0090] 在一个实施方式中,所述载体包含调节序列,尤其是启动子序列。这样的启动子可以是可诱导的或组成型的天然或合成(人工)启动子。

[0091] 在一个实施方式中,所述启动子是普遍存在的启动子或具有低的组织特异性的启动子。例如,所述表达载体可以带有磷酸甘油酸激酶1 (PGK)、EF1、 β -肌动蛋白、CMV启动子。

[0092] 在一个优选的实施方式中,启动子序列的选择是为了在表达水平以及组织特异性方面充分调控被其调控的核酸序列的表达。在一实施方式中,所述表达载体包含肌肉特异性启动子。这样的启动子允许在骨骼肌中并且可能在心肌(心脏)中强烈表达。本领域技术人员已知的合适启动子的实例是例如结蛋白(desmin)启动子、肌肉肌酸激酶(MCK)启动子、CK6启动子、Syn启动子、ACTA1启动子或合成启动子C5-12 (spC5-12)。特别感兴趣的是人结蛋白启动子,如序列SEQ ID NO:13所示。

[0093] 也可以使用FKRP启动子。

[0094] 其他可能的调节序列的非详尽列表是:

[0095] -转录稳定序列,例如血红蛋白(HBB2)的内含子1。如序列SEQ ID NO:14所示,所述HBB2内含子之后优选地包含共有的Kozak序列,位于mRNA内的AUG起始密码子之前,以改善翻译的起始;

[0096] -聚腺苷酸化信号,例如目的基因的polyA、SV40或 β 血红蛋白(HBB2)的polyA,优选

地位于编码人FKRP的序列的3'端。作为优选的实例,HBB2的polyA在序列SEQ ID NO:15中公开;

[0097] -增强子序列;

[0098] -miRNA靶序列,其可以抑制在非靶组织中编码人FKRP的序列的表达,在所述非靶组织中所述的表达是不希望的,例如在其可能是有毒的情况下。优选地,相应的miRNA不存在于骨骼肌中,并且可能不存在于心脏中。

[0099] 通常,本发明所述的载体包括:

[0100] -对应于SEQ ID NO:10或11的494至638位核苷酸的5' ITR序列(SEQ ID NO:12);然后是

[0101] -对应于SEQ ID NO:10或11的639至1699位核苷酸的人结蛋白启动子(SEQ ID NO:13);然后是

[0102] -HBB2内含子,然后是对应于SEQ ID NO:10或11的1700至2151位核苷酸的共有Kozak序列(SEQ ID NO:14);然后是

[0103] -编码人FKRP的多核苷酸,例如SEQ ID NO:3或4或5或6或7或8,在SEQ ID NO:3和4的情况下,对应于SEQ ID NO:10或11的2152至3639位核苷酸;然后是

[0104] -对应于SEQ ID NO:10或11的3640至4405位核苷酸的HBB2 polyA序列(SEQ ID NO:15);然后是

[0105] -对应于SEQ ID NO:10或11的4406至4550位核苷酸的3' ITR序列(SEQ ID NO:16)。

[0106] 关于含有序列SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6的多核苷酸,本发明的载体分别包含SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:21所示的序列。

[0107] 根据一个实施方式,本发明涉及一种载体,优选地是表达载体,更优选地是具有序列SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:21的AAV载体。如上所述,本发明还包括同源序列,即显示与序列SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:21具有约60%的同源性,更优选约70%的同源性,甚至更优选约80%的同源性,更优选约90%的同源性,甚至更优选约95%的同源性,并且甚至更优选约97%、98%或甚至99%的同源性。

[0108] 本发明的其他方面涉及:

[0109] -如上所述的包含本发明的多核苷酸的细胞或包含含有所述多核苷酸的载体的细胞。

[0110] 所述细胞可以是任何类型的细胞,即原核或真核细胞。所述细胞可以用于载体的增殖,或者可以被进一步引入(例如移植)到宿主或受试者中。可以通过本领域已知的任何方法将多核苷酸或载体引入细胞,例如通过转化、电穿孔或转染。也可以使用源自细胞的囊泡。

[0111] -一种转基因动物(优选地为非人),其包含本发明的多核苷酸、包含所述多核苷酸的载体,或包含所述多核苷酸或载体的细胞,如上所述。

[0112] 本发明的另一方面涉及一种包含如上所述的多核苷酸、载体或细胞的组合物,其被用作药物。

[0113] 根据一个实施方式,所述组合物至少包含所述基因治疗产物(所述多核苷酸、载体或细胞),以及可能的其他活性分子(其他基因治疗产物、化学分子、肽、蛋白质...),其专门用于相同的疾病或其他疾病的治疗。

[0114] 然后,本发明提供了包含本发明所述的多核苷酸、载体或细胞的药物组合物。这样的组合物包含治疗有效量的治疗剂(本发明的多核苷酸或载体或细胞),和药学上可接受的载体。在一个具体的实施方式中,术语“药学上可接受的”是指由联邦或州政府的监管机构批准或在美国或欧洲药典或其他公认的药典中列出的用于动物和人类的药物。术语“载体”是指与治疗剂一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。这样的药物载体可以是无菌液体,例如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的油,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当药物组合物静脉内施用,水是优选的载体。盐溶液以及葡萄糖水溶液和甘油溶液也可以用作液体载体,特别是用于注射溶液。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水、乙醇等。

[0115] 如果需要,所述组合物还可包含少量的润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。这些组合物可以采取溶液、混悬剂、乳剂、缓释制剂等形式。合适的药物载体的实例在E.W.Martin的“《雷明顿药学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)”中有所描述。这样的组合物将包含治疗有效量的治疗剂,优选以纯化形式,以及适当量的载体,以提供用于向受试者适当施用的形式。

[0116] 在一个优选的实施方式中,所述组合物被根据常规程序配制成适于静脉内施用于人的药物组合物。通常,用于静脉内施用的组合物是在无菌等渗水性缓冲液中的溶液。必要时,所述组合物还可包含增溶剂和局部麻醉剂(例如利多卡因),以在注射部位缓解疼痛。

[0117] 在一个实施方式中,本发明所述的组合物适合于在人中施用。所述组合物优选为液体形式,优选地为盐水组合物,更优选地为磷酸盐缓冲盐水(PBS)组合物或林格(Ringer)-乳酸盐溶液。

[0118] 可以通过标准的临床技术确定对目标疾病有效的本发明的治疗剂(即核酸、载体或细胞)的量。另外,可以任选地使用体内和/或体外测定来帮助预测最佳剂量范围。制剂中使用的精确剂量还取决于给药途径、体重、疾病的严重性,并且应根据从业者的判断和每个患者的情况来决定。

[0119] 适当的施用应允许将治疗有效量的基因治疗产品递送至靶组织,尤其是骨骼肌,可能还有心脏。在本发明的上下文中,当基因治疗产品是包含编码人FKRP的多核苷酸的病毒载体时,治疗剂量定义为包含FKRP序列的病毒颗粒的量(病毒基因组的vg),施用于受试者的每千克(kg)的量。

[0120] 可用的给药途径是局部(局部)的、肠内的(全身作用,但通过胃肠道胃肠道传递),或肠胃外的(全身作用,但通过胃肠道以外的途径传递)。本文公开的组合物的优选给药途径是肠胃外给药,包括肌肉内给药(即进入肌肉)和全身给药(即进入循环系统)。在本文中,术语“注射”(或“灌注”或“输注”)涵盖血管内,尤其是静脉内(IV)、肌肉(IM)、眼内或脑内给药。注射通常使用注射器或导管进行。

[0121] 在一个实施方式中,组合物的全身递送包括在局部治疗部位附近(即在衰弱的肌肉附近的静脉或动脉中)施用组合物。在某些实施方式中,本发明包括所述组合物的局部递送,其产生全身效应这种给药途径,通常称为“区域(局部)输注”、“通过单独的肢体灌注”或“高压静脉肢体灌注”进行的给药,已成功地用作肌肉营养不良的基因传递方法(Fan等,2012)。

[0122] 根据一方面,通过输注或灌注将所述组合物施用于离体的肢体(局部)。换句话说,

本发明包括在压力下通过血管内给药途径(即静脉(静脉)或动脉),在腿和/或手臂中局部递送所述组合物。这通常是通过使用止血带暂时停止血液循环,同时允许所注入产品的区域性扩散来实现的,例如由Toromanoff等(2008)公开的。

[0123] 在一个实施方式中,将所述组合物注射到受试者的四肢中。当受试者是人时,肢体可以是手臂或腿。根据一个实施方式,所述组合物在受试者身体的下部(例如在膝盖以下)施用,或在受试者身体的上部(例如在肘部以下)施用。

[0124] 在一个实施方式中,将所述组合物施用于外周静脉,例如头静脉。待输注的所述组合物的体积可以在肢体体积的约5%至40%之间的范围内变化。典型的剂量可在5至30ml/kg体重之间变化。在一个实施方式中,要施加的压力(止血带压力或最大管路压力)低于100000Pa,优选地低于50000Pa。在一个优选的实施方式中,所述施加的压力为约300托(40000Pa)。

[0125] 在一个实施方式中,使用止血带将肢体的血液循环停止,该止血带被拉紧几分钟至超过一个小时,通常在大约1至80分钟之间,例如大约30分钟。在一个优选的实施方式中,在给药之前、期间和之后使用止血带,例如在输注之前约10分钟、在输注期间约20分钟和在输注之后约15分钟。更通常地,施加压力几分钟,通常在大约1至80分钟之间,例如大约30分钟。在一个优选的实施方式中,在给药之前、期间和之后施加压力,例如在输注之前约10分钟、在输注期间约20分钟和在输注之后约15分钟。

[0126] 在一个实施方式中,平均流速在5至150ml/分钟之间,优选地在5至80ml/分钟之间,例如10ml/分钟。当然,所述流速还决定了血液循环停止和施加压力的时间段。

[0127] 在局部给药的情况下,注射剂量可以在 10^{12} 至 10^{14} vg/kg患者体重之间变化,优选在 10^{12} 和 10^{13} vg/kg之间。

[0128] 本发明的优选的给药方法是全身给药。全身注射为全身的注射开辟了道路,以便到达受试者的身体的所有肌肉,包括心脏和隔膜肌,然后真正治疗这些全身性的且仍无法治愈的疾病。在某些实施方式中,全身递送包括将组合物递送至受试者,使得所述组合物抵达受试者的所有身体部位。

[0129] 根据一个优选的实施方式,全身性给药是通过将组合物注射到血管中进行的,即血管内(静脉内或动脉内)给药。根据一个实施方式,所述组合物通过外周静脉,静脉内注射给药。

[0130] 全身性给药通常在以下条件下进行:

[0131] -流速为1至10mL/分钟,优选地为1至5mL/分钟,例如3mL/分钟;

[0132] -每kg受试者的总注射体积可以在1至20mL的载体制剂之间变化,优选5mL。注射体积不应超过总血体积的10%,最好为约6%。

[0133] 当全身性递送时,优选以小于或等于 10^{15} vg/kg或甚至 10^{14} vg/kg,优选地在 10^{12} vg/kg和 10^{14} vg/kg之间,更优选地在 $5 \cdot 10^{12}$ vg/kg和 10^{14} vg/kg之间(例如1、2、3、4、5、6、7、8或 $9 \cdot 10^{13}$ vg/kg)的剂量施用所述组合物。也可以考虑较低的剂量,例如1、2、3、4、5、6、7、8或 $9 \cdot 10^{12}$ vg/kg,以避免潜在的毒性和/或免疫反应。如本领域技术人员所知,就效率而言,优选以尽可能低的剂量给出令人满意的结果。

[0134] 在一个具体的实施方式中,所述治疗包括组合物的单次施用。

[0135] “抗肌萎缩相关糖蛋白病”是指与 α -抗肌萎缩相关糖蛋白(α DG)有关的疾病或病

理。此缺陷可能是由于FKRP缺陷引起的。根据一个具体的实施方式,所述病症选自下组:2I型肢带型肌营养不良症(LGMD2I)、1C型先天性肌营养不良症(MDC1C)、沃克-沃堡(Walker-Warburg)综合征(WWS)和肌肉性眼脑(Muscle-Eye-Brain)疾病(MEB),优选是LGMD2I。

[0136] 可以从本发明的组合物中受益的受试者包括所有被诊断出患有这种疾病或具有患这种疾病的风险的患者。然后通过本领域技术人员已知的任何方法,基于FKRP基因中突变或缺失的鉴定,选择待治疗的受试者,包括例如对FKRP基因进行测序,和/或通过本领域技术人员已知的任何方法对FKRP的表达或活性水平进行评估。因此,所述受试者包括已经表现出这种疾病症状的受试者和处于发展所述疾病的风险中的受试者。在一个实施方式中,所述受试者包括已经表现出这种疾病症状的受试者。在另一个实施方式中,所述受试者是非卧床患者和早期卧床患者。

[0137] 这些组合物主要用于基因治疗,特别是用于治疗:2I型肢带型肌营养不良症(LGMD2I)、1C型先天性肌营养不良症(MDC1C)、沃克-沃堡(Walker-Warburg)综合征(WWS)和肌肉性眼脑(Muscle-Eye-Brain)疾病(MEB),优选是LGMD2I。

[0138] 根据一个实施方式,本发明涉及一种治疗抗肌萎缩相关糖蛋白病的方法,其包括向受试者施用如上所述的基因治疗产品(多核苷酸、载体或细胞)。

[0139] 优选地,所述抗肌萎缩相关糖蛋白病是与 α -抗肌萎缩相关糖蛋白(α DG)的异常糖基化和/或FKRP缺乏相关的病症。更加优选地,所述病症是2I型肢带型肌营养不良症(LGMD2I)、1C型先天性肌营养不良症(MDC1C)、沃克-沃堡(Walker-Warburg)综合征(WWS)和肌肉性眼脑(Muscle-Eye-Brain)疾病(MEB)。

[0140] 在另一方面,本发明提供了增加细胞中 α -抗肌萎缩相关糖蛋白(α DG)的糖基化的方法,其包括将本发明的多核苷酸或载体递送至所述细胞,其中合成的多核苷酸在所述细胞中表达,从而产生FKRP,并且增加 α DG的糖基化。

[0141] 除非另有说明,本发明的实践将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,这些技术在本领域的技术范围内。此类技术文献中有充分的解释,例如《分子克隆:实验室手册》,第四版(Sambrook, 2012);《寡核苷酸合成》(Gait, 1984);《动物细胞的培养》(Freshney, 2010);《酶学方法》《实验免疫学手册》(Weir, 1997);《哺乳动物细胞的基因转移载体》(Miller and Calos, 1987);《分子生物学的简短实验步骤》(Ausubel, 2002);《聚合酶链反应:原理、应用和故障排除》, (Babar, 2011);《当前的免疫学方案》(Coligan, 2002)。这些技术适用于本发明的多核苷酸和多肽的产生,并且因此可以在进行和实施本发明时考虑。在以下部分中将讨论用于特定实施方式的特定有用的技术。

[0142] 本文引用的每个专利、专利申请和出版物的公开内容通过引用整体并入本文。

[0143] 无需进一步的描述,相信本领域的普通技术人员可以使用以上的描述和以下的示例性实施例来制备和使用本发明的化合物并实践所要求保护的方法。

[0144] 实验实施例

[0145] 参考以下实验实施例和附图进一步详细描述本发明。这些实施例的提供仅出于说明的目的,并不旨在进行限制。

[0146] 图1:本研究中所用质粒的方案:

[0147] A/pAAV-hDesmin(结蛋白)-hFKRPwt(野生型)

[0148] B/pAAV-hDesmin-hFKRP-OPTmin

[0149] C/pAAV-hDesmin-hFKRP-OPTcomp

[0150] 图2:以2种不同的剂量(3E9 vg/TA和1.5E10 vg/TA)向C57BI6小鼠注射或不注射(PBS) AAV9,所述AAV9中包含包含不同形式的人FKRP(hFKRP)转基因:hFKRP-wt(编码序列SEQ ID NO:2)、hFKRP-OPTmin(编码序列SEQ ID NO:3)和hFKRP-OPTcomp(编码序列SEQ ID NO:4):

[0151] A/通过蛋白质印迹对FKRP的表达的评估

[0152] B/用GADPH归一化后FKRP蛋白的定量

[0153] C/用GADPH归一化后FKRP蛋白的定量:剂量为3E9 vg/TA的FKRP wt(SEQ ID NO:2)、FKRP-OPTcomp(SEQ ID NO:4)、FKRP-06(SEQ ID NO:20)、FKRP-OPT-07(SEQ ID NO:5)、FKRP-OPT-08(SEQ ID NO:6)、FKRP-OPT-10(SEQ ID NO:7)和FKRP-OPT-11(SEQ ID NO:8)。

[0154] 图3:以2种不同剂量(3E9 vg/TA和1.5E10 vg/TA)施用于HSA-FKRPdel小鼠(FKRP缺陷型小鼠模型)后,FKRP-OPTcomp(SEQ ID NO:4)的体内评估:

[0155] A/TA肌肉中的离心指数

[0156] B/原位TA的力

[0157] C/逃生测试的结果。

[0158] 材料和方法:

[0159] 新型人FKRP序列的设计:

[0160] 人FKRP编码序列SEQ ID NO:2已根据以下规则进行了修饰:

[0161] -引入抑制存在于编码区的正义和反义移码ATG的突变,所述突变位于第429位(反义;相+1)、第546位(正义;相+1)、第819位(反义;相+1)和/或第1431位(反义;相+1);

[0162] -可能遵循密码子频率表,例如Sharp等(1988)中公开的内容;

[0163] -没有生成新的开放阅读框(ORF);

[0164] -可能取代CG基序,以避免CpG结构的形成;

[0165] -可能降低GC%;

[0166] -可能修饰存在于SEQ ID NO:2的第553-559位的茎环。

[0167] 所有产生的设计序列(下表1中所示的SEQ ID NO:3至8)编码具有序列SEQ ID NO:1的FKRP蛋白,其对应于人天然FKRP序列。

[0168] 质粒和AAV载体:

[0169] 人Fkrp基因的编码序列(SEQ ID NO:2)使用经典的基因合成方法合成,并插入包含AAV2 ITR、人结蛋白启动子、HBB2内含子、之后为Kozak序列和HBB2 polyA(血红蛋白亚基β2多腺苷酸化信号)的质粒(pUC57)中。

[0170] 所得到的质粒如图1A所示,称为pAAV-hDesmin-hFKRPwt。包含ITR序列的插入序列示于SEQ ID NO:9。

[0171] 质粒pAAV-hDesmin-hFKRP-OPTmin(图1B)和pAAV-hDesmin-hFKRP-OPTcomp(图1C)的插入序列分别示于SEQ ID NO:10和11,通过分别将修饰的序列SEQ ID NO:3和4替换天然人FKRP蛋白的编码序列(SEQ ID NO:2)而获得。通过分别将SEQ ID NO:2替换为SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8,以类似的方式获得了其他质粒FKRP-06、FKRP-OPT-07、FKRP-OPT-08、FKRP-OPT-10和FKRP-OPT-11。

[0172] 通过使用如前所述的三种质粒转染方案 (Bartoli等,2006),通过将AAV2-ITR重组基因组包装在AAV9衣壳中来产生无腺病毒的rAAV2/9病毒制剂。简而言之,将HEK293细胞与pAAV-hDesmin-hFKRPwt (或pAAV-hDesmin-hFKRP-OPTmin或pAAV-hDesmin-hFKRP-OPTcomp)、RepCap质粒 (pAAV2.9, J. Wilson博士, UPenn) 和腺病毒辅助质粒 (pXX6; Apparailly等,2005)以1:1:2的比例共转染。转染后60小时收获粗病毒裂解液,并通过冻融循环裂解。通过两轮CsCl超速离心然后透析来纯化病毒裂解物。使用与AAV载体基因组的HBB2 polyA相对应的引物和探针,通过TaqMan实时PCR分析定量病毒基因组。用于扩增的引物对和TaqMan探针为:

[0173] 正向:CCAGGCGAGGAGAAACCA (SEQ ID NO:17)

[0174] 反向:CTTGACTCCACTCAGTTCTCTTGCT (SEQ ID NO:18);和

[0175] 探针:CTCGCCGTA AACATGGAAGGAACACTTC (SEQ ID NO:19)。

[0176] 蛋白质印迹

[0177] 细胞沉淀和肌肉组织在RIPA裂解缓冲液 (赛默飞世尔科技,沃尔瑟姆,马萨诸塞州,美国)中进行机械均质处理,并补充以完全不含EDTA的蛋白酶抑制剂混合物 (罗氏,巴塞尔,瑞士)。样品中所含的核酸通过在37°C下与苯甲酰酶 (西格玛,圣路易斯,密苏里州,美国)一起温育15分钟来降解。

[0178] 使用预制聚丙烯酰胺凝胶 (4-15%,BioRad,赫拉克勒斯,加利福尼亚州,美国)分离蛋白质,然后将其转移至硝酸纤维素膜上。

[0179] 先前已经描述了针对FKRP的兔多克隆抗体 (Gicquel等,2017)。在室温下,用抗FKRP (1:100)和GAPDH抗体 (圣克鲁斯生物技术,达拉斯,德克萨斯州,美国,1:200)孵育硝酸纤维素膜2小时,以便归一化。

[0180] 最后,将膜与IRDye®孵育,以通过Odyssey红外扫描仪 (LI-COR生物科学,林肯,内布拉斯加州,美国)进行检测。

[0181] 动物和注射剂

[0182] 使用一个月大的小鼠。这项研究中的所有动物均按照欧洲有关人类护理和实验动物使用的准则进行处理,并且所有有关动物的程序均已获得热那波尔伦理委员会 (Genopole's ethics committee)的批准。

[0183] 为了评估基因转移效率,将雄性C57B16小鼠的TA (胫骨前肌)中肌肉内注射25 μ L的两种剂量:3E9 vg/TA和1.5E10 vg/TA。作为阴性对照,给小鼠注射用于AAV制剂的缓冲液,即PBS。1个月后对小鼠实施安乐死,解剖注射的肌肉,并在液氮中冷却的异戊烷中冷冻。

[0184] 对于体内功能测试,将包含FKRP-OPTcomp序列 (SEQ ID NO:4)的AAV9-FKRP通过静脉注射给予HSA-FKRPdel小鼠 (FKRP缺陷型小鼠模型),两种剂量:2.5E12 vg/kg和1E13 vg/kg。3个月后,将动物进行不同的功能测试。

[0185] 体内评估

[0186] 逃生测试:

[0187] 通过逃避测试评估小鼠的整体力量 (Carlson和Makiejus,1990)。简而言之,将小鼠放在面对30厘米长管入口的平台上。将缠绕在尾巴上的袖带连接到固定的力传感器,通过轻轻地捏住尾巴,诱使小鼠沿着与力传感器相反的方向从管内逃出。向前飞行会产生一个短的力峰,并分析通过体重归一化的五个最高力峰的平均值。

[0188] 所用材料:

[0189] 力传感器ADInstrument MLT1030系列810。

[0190] 软件ADinstrument Labchart7。

[0191] 原位TA的力:

[0192] 如前所述 (Vignaud等,2005),通过原位测量肌肉收缩来评估骨骼肌功能。通过腹腔内注射氯胺酮(100mg/kg)和甲苯噻嗪(10mg/kg)麻醉动物,并根据需要给予补充剂量以维持深度麻醉。膝盖和脚用夹子和不锈钢销钉固定。暴露出TA肌肉,切断远端肌腱并连接至力传感器(欧若拉科学,都柏林,爱尔兰)。使用0.1ms持续时间的超最大方波脉冲,用双极银电极将坐骨神经压向近端并向远端刺激。绝对最大力是在最佳长度(观察到最大强直张力的长度)下测定的。通过用肌肉质量归一化总肌肉力来计算比最大力。

[0193] 所用材料:

[0194] 欧若拉科学的仪器。

[0195] 传感器305C 5N剑桥技术模型6650n°X11271243Y。

[0196] 软件ASI 610A动态肌肉控制。

[0197] 离心参数:

[0198] 功能测试后不久将注射的小鼠处死。取样骨骼肌并在冷却的异戊烷中冷冻。横向冰冻切片用苏木精-福乐辛-藏红花(HPS)染色,并用于核化纤维计数。将角核化纤维的数量与切片面积相结合,以获得角核化指数。

[0199] 结果:

[0200] I/新型人FKRP序列的设计:

[0201] 为了评估修饰对FKRP编码序列的影响,设计合成了源自序列SEQ ID NO:2的编码人FKRP蛋白序列SEQ ID NO:1的一系列序列。所述序列的主要特征总结于表1中:

名称	序列	碱基位置	第 553-559 位的茎环
[0202] FKRP wt	SEQ ID NO: 2	- 429:C - 546:T - 819:C - 1431:C	未修饰的
FKRP-OPTmin	SEQ ID NO: 3	- 429:G - 546:C - 819:A	未修饰的

		- 1431: G	
	FKRP-OPTcomp SEQ ID NO: 4	- 429: G - 546: T - 819: G - 1431: G	修饰的
	FKRP-OPT-07 SEQ ID NO: 5	- 429: G - 546: C - 819: A - 1431: G	未修饰的
	FKRP-OPT-08 SEQ ID NO: 6	- 429: G - 546: C - 819: A - 1431: G	未修饰的
[0203]	FKRP-OPT-10 SEQ ID NO: 7	- 429: G - 546: T - 819: G - 1431: G	修饰的
	FKRP-OPT-11 SEQ ID NO: 8	- 429: A - 546: T - 819: G - 1431: G	修饰的
	FKRP-06 (WO2016/138387)	- 429: A - 546: C - 819: C - 1431: G	修饰的

[0204] 表1: 编码人FKRP蛋白的修饰序列的特征

[0205] II/对体内构建物的评估:

[0206] 图2A显示了通过蛋白质印迹获得的基因转移后FKRP表达的结果。由不同构建物(野生型wt和优化的)表达的FKRP蛋白具有预期的大小(58kDa)。而且,与野生型序列相比,修饰的FKRP转基因使得FKRP蛋白的表达更高。所获得的条带的强度通过GAPDH归一进行量化和归一化。定量结果表明与FKRP wt相比,hFKRP-OPTcomp增加了5倍(图2B)。

[0207] 使用表1所示的不同FKRP序列重复相同的实验,包括WO2016/138387中公开的序列(在所述文件中是SEQ ID NO:1;在本申请中是SEQ ID NO:20)。如图2C所示,WO2016/138387(标记为FKRP-06)中公开的序列不能达到用本发明所述的构建物所观察到的转基因表达水平。在新测试的序列中,FKRP-08是最佳的候选序列,但它们通常导致转基因表达水平高于天然序列。

[0208] III/构建物的功能评价:

[0209] 已在FKRP缺陷型小鼠模型中测试了最佳候选序列,即FKRP-OPTcomp(SEQ ID NO:4)的体内效果。

[0210] 图3A的数据揭示了在治疗的动物的中心成核减少。此外,胫前肌(TA)的力量(图3B)和通过逃避测试评估的整体力量(图3C)的原位测量值显示,治疗后的动物中肌肉功能有所改善。

[0211] 结论:

[0212] 本研究表明,在小鼠中肌肉内注射含有所述转基因的AAV载体后,人FKRP转基因的序列优化使得FKRP表达水平提高。这种增加具有治疗和临床意义,因为它改善了治疗的功

效和/或能够减少治疗产品的注射剂量。

[0213] 参考文献

[0214] Apparailly, F., Khoury, M., Vervoordeldonk, M. J., Adriaansen, J., Gicquel, E., Perez, N., Riviere, C., Louis-Plence, P., Noel, D., Danos, O. 等 (2005) 腺相关病毒假5型载体促进关节炎基因转移. *Hum. Gene Ther.*, 16, 426-434.

[0215] Bartoli, M., Poupiot, J., Goyenvallé, A., Perez, N., Garcia, L., Danos, O. 和 Richard, I. (2006) 肌营养不良动物模型治疗性基因转移的无创监测. *Gene Ther.*, 13, 20-28.

[0216] Beedle, A. M., Turner, A. J., Saito, Y., Lueck, J. D., Foltz, S. J., Fortunato, M. J., Nienaber, P. M. 和 Campbell, K. P. (2012) 小鼠福库汀 (fukutin) 缺失对肌营养不良的影响. *J. Clin. Invest.*, 122, 3330-3342.

[0217] Beltran-Valero de Bernabe, D., Voit, T., Longman, C., Steinbrecher, A., Straub, V., Yuva, Y., Herrmann, R., Sperner, J., Korenke, C., Diesen, C. 等 (2004) FKRP 基因突变可引起肌肉性眼脑疾病和沃克-沃堡 (Walker-Warburg) 综合征. *J. Med. Genet.*, 41, e61.

[0218] Breton, C. 和 Imberty, A. (1999) 糖基转移酶的结构与功能研究. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 9, 563-571.

[0219] Brockington, M., Blake, D. J., Prandini, P., Brown, S. C., Torelli, S., Benson, M. A., Ponting, C. P., Estournet, B., Romero, N. B., Mercuri, E. 等 (2001) 福库汀相关蛋白基因 (FKRP) 突变导致一种先天性肌营养不良, 其继发层粘连蛋白 $\alpha 2$ 缺乏并且 α -抗肌萎缩相关糖蛋白的糖基化异常. *Am. J. Hum. Genet.*, 69, 1198-1209.

[0220] Gicquel 等 (2017) *Hum Mol Genet*, doi:10.1093/hmg/ddx066.

[0221] Kanagawa, M., Kobayashi, K., Tajiri, M., Manya, H., Kuga, A., Yamaguchi, Y., Akasaka-Manya, K., Furukawa, J. I., Mizuno, M., Kawakami, H. 等 (2016) 磷酸核糖醇翻译后修饰在肌营养不良中的鉴定及其缺陷. *Cell reports*, 印刷中.

[0222] Mercuri, E., Brockington, M., Straub, V., Quijano-Roy, S., Yuva, Y., Herrmann, R., Brown, S. C., Torelli, S., Dubowitz, V., Blake, D. J. 等 (2003) 与福库汀相关蛋白基因突变相关的表型谱. *Ann. Neurol.*, 53, 537-542.

[0223] Muller, T., Krasnianski, M., Witthaut, R., Deschauer, M. 和 Zierz, S. (2005) 扩张型心肌病可能是 C826A 福库汀相关蛋白突变的早期迹象. *Neuromuscul. Disord.*, 15, 372-376.

[0224] Rohr, U. P., Wulf, M. A., Stahn, S., Steidl, U., Haas, R. 和 Kronenwett, R. (2002) 使用定量实时 PCR 快速可靠地滴定重组 2 型腺相关病毒. *J. Virol. Methods*, 106, 81-88.

[0225] Sharp, P. M., Cowe E., Higgins D. G., Shields D. C., Wolfe K. H., Wright F (1988) 大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、酿酒酵母、粟酒裂殖酵母、黑腹果蝇和智人的密码子使用方式; 大量物种内多样性的综述. *Nucleic Acids Res.*, 16(17):8207-11.

[0226] Sveen, M. L., Schwartz, M. 和 Vissing, J. (2006) 丹麦 2I 型肢带型肌营养不良症的高患病率和表型基因型相关性. *Ann. Neurol.*, 59, 808-815.

[0227] Toromanoff 等 (2008), *Molecular Therapy* 16(7):1291-99.

- [0228] Wahbi,K.,Meune,C.,Hamouda el,H.,Stojkovic,T.,Laforet,P.,Becane,H.M.,Eymard,B.和Duboc,D. (2008) 2I型肢带型肌营养不良症患者的心脏评估:超声检查、动态心电图和磁共振成像研究.Neuromuscul.Disord.,18,650-655.
- [0229] Zheng Fan等(2012),Molecular Therapy 20(2),456-461.

[0001] 序列表
 [0002] <110> 吉尼松公司
 [0003] 埃夫里-瓦尔德艾松大学
 [0004] 国家健康和医学研究院 (INSERM)
 [0005] <120> 编码人类FKRP蛋白的新型多核苷酸
 [0006] <130> G143-B-49229 PCT
 [0007] <150> EP17305894.2
 [0008] <151> 2017-07-07
 [0009] <160> 21
 [0010] <170> SIPOSequenceListing 1.0
 [0011] <210> 1
 [0012] <211> 495
 [0013] <212> PRT
 [0014] <213> 智人 (Homo sapiens)
 [0015] <400> 1
 [0016] Met Arg Leu Thr Arg Cys Gln Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ile Thr Leu
 [0017] 1 5 10 15
 [0018] Asn Leu Leu Val Leu Phe Tyr Val Ser Trp Leu Gln His Gln Pro Arg
 [0019] 20 25 30
 [0020] Asn Ser Arg Ala Arg Gly Pro Arg Arg Ala Ser Ala Ala Gly Pro Arg
 [0021] 35 40 45
 [0022] Val Thr Val Leu Val Arg Glu Phe Glu Ala Phe Asp Asn Ala Val Pro
 [0023] 50 55 60
 [0024] Glu Leu Val Asp Ser Phe Leu Gln Gln Asp Pro Ala Gln Pro Val Val
 [0025] 65 70 75 80
 [0026] Val Ala Ala Asp Thr Leu Pro Tyr Pro Pro Leu Ala Leu Pro Arg Ile
 [0027] 85 90 95
 [0028] Pro Asn Val Arg Leu Ala Leu Leu Gln Pro Ala Leu Asp Arg Pro Ala
 [0029] 100 105 110
 [0030] Ala Ala Ser Arg Pro Glu Thr Tyr Val Ala Thr Glu Phe Val Ala Leu
 [0031] 115 120 125
 [0032] Val Pro Asp Gly Ala Arg Ala Glu Ala Pro Gly Leu Leu Glu Arg Met
 [0033] 130 135 140
 [0034] Val Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ser Ala Arg Leu Val Ala Ala Pro Val
 [0035] 145 150 155 160
 [0036] Ala Thr Ala Asn Pro Ala Arg Cys Leu Ala Leu Asn Val Ser Leu Arg
 [0037] 165 170 175
 [0038] Glu Trp Thr Ala Arg Tyr Gly Ala Ala Pro Ala Ala Pro Arg Cys Asp
 [0039] 180 185 190
 [0040] Ala Leu Asp Gly Asp Ala Val Val Leu Leu Arg Ala Arg Asp Leu Phe
 [0041] 195 200 205

[0042]	Asn Leu Ser Ala Pro Leu Ala Arg Pro Val Gly Thr Ser Leu Phe Leu
[0043]	210 215 220
[0044]	Gln Thr Ala Leu Arg Gly Trp Ala Val Gln Leu Leu Asp Leu Thr Phe
[0045]	225 230 235 240
[0046]	Ala Ala Ala Arg Gln Pro Pro Leu Ala Thr Ala His Ala Arg Trp Lys
[0047]	245 250 255
[0048]	Ala Glu Arg Glu Gly Arg Ala Arg Arg Ala Ala Leu Leu Arg Ala Leu
[0049]	260 265 270
[0050]	Gly Ile Arg Leu Val Ser Trp Glu Gly Gly Arg Leu Glu Trp Phe Gly
[0051]	275 280 285
[0052]	Cys Asn Lys Glu Thr Thr Arg Cys Phe Gly Thr Val Val Gly Asp Thr
[0053]	290 295 300
[0054]	Pro Ala Tyr Leu Tyr Glu Glu Arg Trp Thr Pro Pro Cys Cys Leu Arg
[0055]	305 310 315 320
[0056]	Ala Leu Arg Glu Thr Ala Arg Tyr Val Val Gly Val Leu Glu Ala Ala
[0057]	325 330 335
[0058]	Gly Val Arg Tyr Trp Leu Glu Gly Gly Ser Leu Leu Gly Ala Ala Arg
[0059]	340 345 350
[0060]	His Gly Asp Ile Ile Pro Trp Asp Tyr Asp Val Asp Leu Gly Ile Tyr
[0061]	355 360 365
[0062]	Leu Glu Asp Val Gly Asn Cys Glu Gln Leu Arg Gly Ala Glu Ala Gly
[0063]	370 375 380
[0064]	Ser Val Val Asp Glu Arg Gly Phe Val Trp Glu Lys Ala Val Glu Gly
[0065]	385 390 395 400
[0066]	Asp Phe Phe Arg Val Gln Tyr Ser Glu Ser Asn His Leu His Val Asp
[0067]	405 410 415
[0068]	Leu Trp Pro Phe Tyr Pro Arg Asn Gly Val Met Thr Lys Asp Thr Trp
[0069]	420 425 430
[0070]	Leu Asp His Arg Gln Asp Val Glu Phe Pro Glu His Phe Leu Gln Pro
[0071]	435 440 445
[0072]	Leu Val Pro Leu Pro Phe Ala Gly Phe Val Ala Gln Ala Pro Asn Asn
[0073]	450 455 460
[0074]	Tyr Arg Arg Phe Leu Glu Leu Lys Phe Gly Pro Gly Val Ile Glu Asn
[0075]	465 470 475 480
[0076]	Pro Gln Tyr Pro Asn Pro Ala Leu Leu Ser Leu Thr Gly Ser Gly
[0077]	485 490 495
[0078]	<210> 2
[0079]	<211> 1488
[0080]	<212> DNA
[0081]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0082]	<400> 2
[0083]	atggcgctca cccgctgcca ggctgcctg gcgccgcca tcacctcaa cttctggtc 60

[0084]	ctcttctatg tctcgtggct gcagcaccag cctaggaatt cccgggccc ggggccccgt	120
[0085]	cgtgcctctg ctgccggccc ccgtgtcacc gtcctggtgc gggagttcga ggcatttgac	180
[0086]	aacgcggtgc ccgagctggt agactccttc ctgcagcaag acccagccca gcccggtggtg	240
[0087]	gtggcagccg acacgtccc ctaccgccc ctggccctgc cccgcatccc caacgtgcgt	300
[0088]	ctggcgtgc tccagcccgc cctggaccgg ccagccgag cctcgcgccc ggagacctac	360
[0089]	gtggccaccg agtttgtggc cctagtagct gatggggcgc gggctgaggc acctggcctg	420
[0090]	ctggagcgca tgggtggaggc gctccgcgca ggaagcgac gtctggtggc cgccccggtt	480
[0091]	gccacggcca accctgccag gtgcctggcc ctgaacgtca gcctgcgaga gtggaccgcc	540
[0092]	cgctatggcg cagccccgc cgcgccccgc tgcgacgccc tggacggaga tgctgtggtg	600
[0093]	ctctgcgcg cccgcgacct cttcaacctc tcggcgcccc tggcccggcc ggtgggcacc	660
[0094]	agcctctttc tgcagaccgc ctttcgcggc tgggcggtgc agctgctgga cttgaccttc	720
[0095]	gccgcggcgc gccagcccc gctggccacg gccacgcgc gctggaagge tgagcgcgag	780
[0096]	ggacgcctc ggcggcgccg gctgctccgc gcgctggca tccgcctagt gagctgggaa	840
[0097]	ggcggcgccg tggagtgggt cggctgcaac aaggagacca cgcgctgctt cggaaccgtg	900
[0098]	gtggcgaca cgccccta cctctacgag gagcgtgga cgccccctg ctgcctgcgc	960
[0099]	gcgtgcgcg agaccgccg ctatgtggtg ggcgtgctgg aggctgcggg cgtgcgctac	1020
[0100]	tggctcgagg gcggctcact gctgggggcc gcccgccacg gggacatcat cccatgggac	1080
[0101]	tacgacgtgg acctgggcat ctacttgag gacgtggca actgcgagca gctgcggggg	1140
[0102]	gcagaggccg gctcgggtgt ggatgagcgc ggcttcgtat gggagaaggc ggtcgagggc	1200
[0103]	gactttttc gcgtgcagta cagegaaagc aaccacttgc acgtggacct gtggcccttc	1260
[0104]	tacccccgca atggcgtcat gaccaaggac acgtggctgg accaccgca ggatgtggag	1320
[0105]	tttcccagc acttctgca gccgctggtg ccctgcctt ttgccgctt cgtggcgcag	1380
[0106]	gcgctaaca actaccgcc cttcctggag ctcaagttcg ggccccgggt catcgagaac	1440
[0107]	ccccagtacc ccaaccggc actgctgagt ctgacgggaa gcggctga	1488
[0108]	<210> 3	
[0109]	<211> 1488	
[0110]	<212> DNA	
[0111]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0112]	<400> 3	
[0113]	atgcggtca cccgtgccg ggctgccctg gcggccgcca tcacctcaa ctttctggtc	60
[0114]	ctcttctatg tctcgtggct gcagcaccag cctaggaatt cccgggccc ggggccccgt	120
[0115]	cgtgcctctg ctgccggccc ccgtgtcacc gtcctggtgc gggagttcga ggcatttgac	180
[0116]	aacgcggtgc ccgagctggt agactccttc ctgcagcaag acccagccca gcccggtggtg	240
[0117]	gtggcagccg acacgtccc ctaccgccc ctggccctgc cccgcatccc caacgtgcgt	300
[0118]	ctggcgtgc tccagcccgc cctggaccgg ccagccgag cctcgcgccc ggagacctac	360
[0119]	gtggccaccg agtttgtggc cctagtagct gatggggcgc gggctgaggc acctggcctg	420
[0120]	ctggagcgga tgggtggaggc gctccgcgca ggaagcgac gtctggtggc cgccccggtt	480
[0121]	gccacggcca accctgccag gtgcctggcc ctgaacgtca gcctgcgaga gtggaccgcc	540
[0122]	cgctacggcg cagccccgc cgcgccccgc tgcgacgccc tggacggaga tgctgtggtg	600
[0123]	ctctgcgcg cccgcgacct cttcaacctc tcggcgcccc tggcccggcc ggtgggcacc	660
[0124]	agcctctttc tgcagaccgc ctttcgcggc tgggcggtgc agctgctgga cttgaccttc	720
[0125]	gccgcggcgc gccagcccc gctggccacg gccacgcgc gctggaagge tgagcgcgag	780

[0126]	ggacgcgctc ggcgggcggc gctgctccgc gcgctgggaa tccgcctagt gagctgggaa	840
[0127]	ggcgggcggc tggagtggtt cggctgcaac aaggagacca cgcgctgctt cggaaccgtg	900
[0128]	gtgggcgaca cgcccccta cctctacgag gagegctgga cgccccctg ctgcctgcgc	960
[0129]	gcgctgcgcg agaccgcccg ctatgtggtg ggcgtgctgg aggctgcggg cgtgcgctac	1020
[0130]	tggctcgagg gcggctcact gctgggggcc gcccgccacg gggacatcat cccatgggac	1080
[0131]	tacgacgtgg acctgggcat ctacttgag gacgtgggca actgcgagca gctgcggggg	1140
[0132]	gcagaggccg gctcggtggt ggatgagcgc ggcttcgtat gggagaaggc ggtcgagggc	1200
[0133]	gactttttcc gcgtgcagta cagcгаааgс аассасctgc acgtggacct gtggcccttc	1260
[0134]	tacccccgca atggcgtcat gaccaaggac acgtggctgg accaccggca ggatgtggag	1320
[0135]	ttccccgagc acttctgca gccgctggtg cccctgcct ttgccggctt cgtggcgcag	1380
[0136]	gcgctaaca actaccgccc cttctggag ctcaagttcg ggccccgggt gatcgagaac	1440
[0137]	ccccagtacc ccaaccggc actgctgagt ctgacgggaa gcggctga	1488
[0138]	<210> 4	
[0139]	<211> 1488	
[0140]	<212> DNA	
[0141]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0142]	<400> 4	
[0143]	atgagactga ccagtgcca ggctgccctg gctgctgcca tcaccctgaa cctgctggtg	60
[0144]	ctgttctatg tgagctggct gcagcaccag cccaggaaca gcagggccag gggccccagg	120
[0145]	agggcctctg ctgctggccc cagggtgaca gtgctggtga gggagtttga ggcctttgac	180
[0146]	aatgctgtgc ctgagctggt ggacagcttc ctgcagcagg accctgcca gcctgtggtg	240
[0147]	gtggctgctg ataccctgcc ctaccccc ctggcctgc ccaggatccc caatgtgagg	300
[0148]	ctggcctgc tgcagcctgc cctggacagg cctgctgctg ccagcaggcc tgagacctat	360
[0149]	gtggccacag agtttgtggc cctggtgcct gatggggcca gggctgaggc ccctggcctg	420
[0150]	ctggagagga tggtagggc cctgagggt ggctctgcca ggctggtggtg tgccccctgtg	480
[0151]	gccacagcca accctgccag gtgcctggcc ctgaatgtga gcctgagaga gtggacagcc	540
[0152]	aggtatgggg ctgcccctgc tgccccagg tgtgatgcc tggatggaga tgctgtggtg	600
[0153]	ctgctgaggg ccaggacct gttcaacctg tctgcccc tggccaggcc tgtggggacc	660
[0154]	agcctgtttc tgcagacagc cctgaggggc tgggctgtgc agctgctgga cctgacctt	720
[0155]	gctgctgcca ggcagcccc cctggtaca gccacgcca ggtggaagc tgagagggag	780
[0156]	ggcagggcca ggaggctgc cctgctgagg gccctgggga tcaggctggt gagctgggag	840
[0157]	ggggcaggc tggagtggtt tggctgcaac aaggagaaa ccaggtgctt tgggacagt	900
[0158]	gtgggggata cccctgcta cctgtatgag gagaggtgga cccccctg ctgcctgagg	960
[0159]	gccctgaggg agacagccag gtatgtggtg ggggtgctgg aggctgctgg ggtgaggtac	1020
[0160]	tggctggagg gggcagcct gctggggct gccaggcac gggacattat cccctgggac	1080
[0161]	tatgatgtgg acctgggcat ctacctggag gatgtgggca actgtgagca gctgagggg	1140
[0162]	gctgaggctg gctctgtggt ggatgagagg ggctttgtgt gggagaagc tgtggaggg	1200
[0163]	gactttttca ggggtgcagta ctctgagagc aaccacctgc acgtggacct gtggcccttc	1260
[0164]	taccccagga atggggtgat gaccaaggac acctggctgg accacaggca ggatgtggag	1320
[0165]	ttcctgagc acttctgca gccctggtg cccctgcct ttgctggctt tgtggcccag	1380
[0166]	gccccaaaca actacaggag gttcctggag ctgaagttg gccctggggt gattgagaac	1440
[0167]	ccccagtacc ccaaccctgc cctgctgagc ctgacaggt ctggctga	1488

[0168] <210> 5
 [0169] <211> 1488
 [0170] <212> DNA
 [0171] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0172] <400> 5
 [0173] atgcggctca cccgctgcca ggctgccctg gctgcccga tcaccctcaa ctttctggtc 60
 [0174] ctcttctatg tcagctggct gcagaccag ctaggaatt cccgggccg gggcccagg 120
 [0175] agggcctctg ctgccggccc cagggtcacc gtctgggtgc gggagttega ggcatttgac 180
 [0176] aacgctgtgc ccgagctggt agactccttc ctgcagcaag acccagccca gccctgggtg 240
 [0177] gtggcagccg acaccctccc ctaccccccc ctggccctgc cccgcatccc caacgtgagg 300
 [0178] ctggccctgc tccagcccgc cctggaccgg ccagccgag ccagcccgc tgagacctac 360
 [0179] gtggccaccg agtttgtggt cctggtacct gatggggccc gggctgagge acctggcctg 420
 [0180] ctggagcgga tgggtgaggc cctccgcga ggaagcga ggctgggtgc cccccctgtt 480
 [0181] gccacagcca accctgccag gtgcctggcc ctgaactca gcctgcgaga gtggaccgcc 540
 [0182] cgctacggcg cagccccgc cccccccgc tgcgacgcc tggacggaga tgctgtgggt 600
 [0183] ctctcgcgcg cccgcgacct ctcaacctc tctcccccc tggcccggcc tgtgggcacc 660
 [0184] agcctctttc tgcagaccgc cttcgcggc tgggctgtgc agctgctgga cttgacctc 720
 [0185] gccgctgcc gccagcccc cctggccaca gccacgcc gctggaaggc tgagcgcgag 780
 [0186] ggacgcgctc ggccggctgc cctgctccgc gccctgggaa tccgcctggt gagctgggaa 840
 [0187] ggccggcggc tggagtgtt cggctgcaac aaggagacca cccgctgctt cggaacctg 900
 [0188] gtggcgaca cccccgcta cctctacgag gacgctgga cccccctg ctgctgcgc 960
 [0189] gccctgcgcg agaccgccc ctatgtggtg ggcgtgctgg aggctgctgg cgtgcgctac 1020
 [0190] tggctcgagg gcggctcact gctggggccc gcccgccag gggacatcat cccatgggac 1080
 [0191] tacgacgtgg acctgggcat ctacttgag gacgtggca actgcgagca gctgcggggg 1140
 [0192] gcagaggccg gctctgtggt ggatgagcgc ggcttcgtat gggagaagge tgctgaggc 1200
 [0193] gactttttcc gcgtgcagta cagcgaagc aaccacttc acgtggacct gtggcccttc 1260
 [0194] taccgcca atggcgtcat gaccaaggac acctggctgg accaccgca ggatgtggag 1320
 [0195] tttccgagc acttctgca gccctggtg ccctgcct ttgccgctt cgtggcccag 1380
 [0196] gccctaaca actaccgccc ctctctggag ctcaagtgc ggcccgggt gatcgagaac 1440
 [0197] cccagtagc ccaaccctgc actgctgagt ctgaccgga gcggctga 1488
 [0198] <210> 6
 [0199] <211> 1488
 [0200] <212> DNA
 [0201] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0202] <400> 6
 [0203] atgcggctca cccgctgcca ggctgccctg gctgctgcca tcaccctcaa ctttctggtc 60
 [0204] ctcttctatg tcagctggct gcagaccag ctaggaatt cccgggccg gggcccagg 120
 [0205] agggcctctg ctgctggccc cagggtcacc gtctgggtgc gggagttega ggcatttgac 180
 [0206] aacgctgtgc ccgagctggt agactccttc ctgcagcaag acccagccca gccctgggtg 240
 [0207] gtggcagctg acaccctccc ctaccccccc ctggccctgc cccgcatccc caacgtgagg 300
 [0208] ctggccctgc tccagcccgc cctggaccgg ccagctgag ccagcccgc tgagacctac 360
 [0209] gtggccaccg agtttgtggt cctggtacct gatggggccc gggctgagge acctggcctg 420

[0210]	ctggagcggg	tggtggaggc	cctcagggca	ggaagcgsaa	ggctggtggc	tgcccctgtt	480
[0211]	gccacagcca	accctgccag	gtgcctggcc	ctgaacgtca	gcctgcgaga	gtggaccgcc	540
[0212]	cgctacgggg	cagccccgc	tgccccgc	tgcgacgcc	tggacggaga	tgtgtggtg	600
[0213]	ctcctgagg	ccaggacct	cttcaacctc	tctgcccc	tggcccggcc	tgtgggcacc	660
[0214]	agccttttc	tgacagccg	ccttaggggc	tggtgtgtgc	agctgctgga	cttgacctc	720
[0215]	gctgctgcc	gccagcccc	cctggccaca	gccacgccc	gctggaaggc	tgagagggg	780
[0216]	ggaaggctc	ggcgggctgc	cctgctcagg	gccctgggaa	tccgctggt	gagctgggaa	840
[0217]	ggggggcgg	tgagtggtt	cggctgcaac	aaggagacca	cccgtgctt	cggaacctg	900
[0218]	gtgggggaca	ccccgccta	cctctacgag	gagcgtgga	ccccccctg	ctgcctgagg	960
[0219]	gccctgagg	agaccgccg	ctatgtggtg	ggggtgctgg	aggctgctgg	ggtgcgctac	1020
[0220]	tgctcgagg	gggctcact	gctgggggct	gcccgccacg	gggacatcat	cccatgggac	1080
[0221]	tacgacgtg	acctgggcat	ctacttgag	gacgtggca	actgcgagca	gctgcgggg	1140
[0222]	gcagaggctg	gctctgtgt	ggatgagagg	ggcttcgtat	gggagaaggc	tgtggagggg	1200
[0223]	gactttttca	gggtgcagta	cagcgaagc	aaccacttgc	acgtggacct	gtggcccttc	1260
[0224]	tacccccgca	atggggtcat	gaccaaggac	acctggctgg	accaccggca	ggatgtggag	1320
[0225]	tttcccgagc	acttctgca	gccctggtg	ccctgcct	ttgctggett	cgtagggccag	1380
[0226]	gccctaaca	actaccgccg	cttctggag	ctcaagtgc	ggcccgggt	gatcgagaac	1440
[0227]	cccagtagc	ccaacctgc	actgctgagt	ctgaccggaa	gcggctga	1488	
[0228]	<210>	7					
[0229]	<211>	1488					
[0230]	<212>	DNA					
[0231]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)					
[0232]	<400>	7					
[0233]	atgagactga	caaggtgcca	ggctgcctg	gctgctgcca	tcacactgaa	cctgctggtg	60
[0234]	ctgttttatg	tgagctggct	gcagaccag	cctaggaaca	gcagggccag	ggcccctagg	120
[0235]	agggcctctg	ctgctggccc	tagggtgaca	gtgctggtga	gggagtttga	ggcctttgac	180
[0236]	aatgctgtgc	ctgagctggt	ggacagctt	ctgcagcagg	accctgcca	gcctgtggtg	240
[0237]	gtggctgctg	atacactgcc	ttacctcct	ctggccctgc	ctaggatccc	taatgtgagg	300
[0238]	ctggccctgc	tgacagctgc	cctggacagg	cctgctgctg	ccagcaggcc	tgagacttat	360
[0239]	gtggccacag	agtttgtggc	cctggtgcct	gatggggcca	gggctgaggc	ccctggcctg	420
[0240]	ctggagagga	tggtggaggc	cctgagggct	ggctctgcca	ggctggtggc	tgcccctgtg	480
[0241]	gccacagcca	accctgccag	gtgcctggcc	ctgaatgtga	gcctgagaga	gtggacagcc	540
[0242]	aggatgggg	ctgcccctgc	tgcccctagg	tgtgatgcc	tggatggaga	tgtgtggtg	600
[0243]	ctgctgagg	ccaggacct	gtttaacctg	tctgcccc	tggccaggcc	tgtggggaca	660
[0244]	agcctgtttc	tgacagacg	cctgaggggc	tggtgtgtgc	agctgctgga	cctgacattt	720
[0245]	gctgctgcca	ggcagcctcc	tctggctaca	gccacgcca	ggtggaaggc	tgagagggg	780
[0246]	ggcaggcca	ggaggctgc	cctgctgagg	gccctgggga	tcaggctggt	gagctgggag	840
[0247]	ggggcaggc	tgagtggtt	tggtgcaac	aaggagaaa	caaggtgctt	tgggacagtg	900
[0248]	gtgggggata	cacctgccta	cctgtatgag	gagaggtgga	cacctcctg	ctgcctgagg	960
[0249]	gccctgagg	agacagccag	gtatgtggtg	ggggtgctgg	aggctgctgg	ggtgaggtac	1020
[0250]	tgctggagg	ggggcagcct	gctgggggct	gccaggcacg	gggacattat	cccttgggac	1080
[0251]	tatgatgtgg	acctgggcat	ctacctggag	gatgtgggca	actgtgagca	gctgaggggg	1140

[0252]	gctgaggctg gctctgtggt ggatgagagg ggctttgtgt gggagaaggc tgtggagggg	1200
[0253]	gactttttta gggcagta ctctgagagc aaccacctgc acgtggacct gtggcctttt	1260
[0254]	taccctagga atggggatgat gacaaaggac acatggctgg accacaggca ggatgtggag	1320
[0255]	tttctgagc actttctgca gcctctggtg cctctgcctt ttgctggctt tgtggcccag	1380
[0256]	gccctaaca actacaggag gtttctggag ctgaagtttg gccctggggt gattgagaac	1440
[0257]	cctcagtacc ctaacctgc cctgctgagc ctgacaggct ctggctga	1488
[0258]	<210>	8
[0259]	<211>	1488
[0260]	<212>	DNA
[0261]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0262]	<400>	8
[0263]	atgagactga caagtgcca ggctgccctg gctgctgcca tcacactgaa cctgctggtg	60
[0264]	ctgttttatg tgagctggct gcagcaccag ctagaaaaca gcagagccag aggccctaga	120
[0265]	agagcctctg ctgctggccc tagagtgaca gtgctggtga gagagtttga ggcctttgac	180
[0266]	aatgctgtgc ctgagctggt ggacagcttt ctgcagcagg accctgcccga gcctgtggtg	240
[0267]	gtggctgctg atacactgcc ttacctcct ctggccctgc ctagaatccc taatgtgaga	300
[0268]	ctggccctgc tgcagcctgc cctggacaga cctgctgctg ccagcagacc tgagacttat	360
[0269]	gtggccacag agtttgtggc cctggtgcct gatggggcca gagctgaggc ccctggcctg	420
[0270]	ctggagagaa tgggtggaggc cctgagagct ggctctgcca gactggtggc tgcccctgtg	480
[0271]	gccacagcca acctgccag atgcctggcc ctgaatgtga gcctgagaga gtggacagcc	540
[0272]	agatatgggg ctgcccctgc tgcccctaga tgtgatgccc tggatggaga tgctgtggtg	600
[0273]	ctgctgagag ccagagacct gtttaacctg tctgccctc tggccagacc tgtggggaca	660
[0274]	agcctgtttc tgcagacagc cctgagaggc tgggctgtgc agctgctgga cctgacattt	720
[0275]	gctgctgcca gacagcctcc tctggctaca gccacgcca gatggaaggc tgagagagag	780
[0276]	ggcagagcca gaagagctgc cctgctgaga gccctgggga tcaggctggt gagctgggag	840
[0277]	ggggcagac tggagtggtt tggctgcaac aaggagacaa caagatgctt tgggacagtg	900
[0278]	gtgggggata cacctgccta cctgtatgag gagagggtga cacctcctg ctgcctgaga	960
[0279]	gccctgagag agacagccag atatgtggtg ggggtgctgg aggctgctgg ggtgagatac	1020
[0280]	tgctggagg gggcagcct gctggggct gccagacag gggacattat cccttgggac	1080
[0281]	tatgatgtgg acctggcat ctacctggag gatgtggca actgtgagca gctgagaggg	1140
[0282]	gctgaggctg gctctgtggt ggatgagaga ggctttgtgt gggagaaggc tgtggagggg	1200
[0283]	gactttttta gactgagta ctctgagagc aaccacctgc acgtggacct gtggcctttt	1260
[0284]	taccctagaa atggggatgat gacaaaggac acatggctgg accacagaca ggatgtggag	1320
[0285]	tttctgagc actttctgca gcctctggtg cctctgcctt ttgctggctt tgtggcccag	1380
[0286]	gccctaaca actacagaag atttctggag ctgaagtttg gccctggggt gattgagaac	1440
[0287]	cctcagtacc ctaacctgc cctgctgagc ctgacaggct ctggctga	1488
[0288]	<210>	9
[0289]	<211>	6903
[0290]	<212>	DNA
[0291]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0292]	<400>	9
[0293]	tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgtca	60

[0294]	cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
[0295]	ttggcgggtg tcggggctgg cttactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
[0296]	accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcagggccc	240
[0297]	attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat	300
[0298]	tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt	360
[0299]	tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cgagctcggg accttaaacc	420
[0300]	ggttccatac tatgggttgc gcaatgcggc cgcagtactg cagaaatagg ccgaaatcgg	480
[0301]	caaaatccct ttattggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg	540
[0302]	accaaaggtc gcccagccc cgggcttgc ccgggcggcc tcagtgagcg agcgagcgcg	600
[0303]	cagagaggga gtggccaact ccatcactag gggttcctta cccctgccc cccacagctc	660
[0304]	ctctctgtg cttgtttcc cagccatgcg ttctctctta taaatacccg ctctggtatt	720
[0305]	tggggttggc agctgttgc gccaggaga tggttgggtt gacatgcggc tctgacaaa	780
[0306]	acacaaacc ctggtgtgtg tggcgtggg tgggtgtgagt aggggatga atcaggagg	840
[0307]	ggcggggga cccagggggc aggagccaca caaagtctgt gcgggggtgg gagcgccat	900
[0308]	agcaattgga aactgaaagc ttatcagacc ctttctggaa atcagcccac tgtttataa	960
[0309]	cttgaggccc caccctcagc agtaccggg aggaagagg cctgcactag tccagaggga	1020
[0310]	aactgaggct caggctagc tcgcccatac acatacatgg caggcaggct ttggccagga	1080
[0311]	tcctccgcc tgccaggcgt ctccctgccc tcccttctg cctagagacc cccaccctca	1140
[0312]	agcctggctg gtctttgcct gagaccmeta cctcttcgac ttcaagagaa tatttagaa	1200
[0313]	caagtggtt tagggcctt cctgggaaca ggccttgacc ctttaagaaa tgaccmaaag	1260
[0314]	tctctcctg accaaaaagg ggacctca actaaaggga agcctctct ctgctgtctc	1320
[0315]	ccctgacccc actcccccc accccaggac gaggagataa ccaggctga aagaggccc	1380
[0316]	cctgggggct gcagacatgc ttgctgctg ccctggcga ggattggcag gcttgcccgt	1440
[0317]	cacaggacc ccgctggctg actcaggggc gcaggcctct tgcgggggag ctggcctccc	1500
[0318]	cgccccacg gccacgggc gcccttctc ggcaggacag cgggatctg cagctgtcag	1560
[0319]	gggaggggag gcgggggctg atgtcaggag ggatacaaat agtgccgac gctggggg	1620
[0320]	ctgtctccc tcgcccac cactctccg ccggccgct gccgcccgc tctccgtgc	1680
[0321]	gcccaccagc ctgcccgcg tacacatatt gacaaatca gggtaattt gcatttgtaa	1740
[0322]	ttttaaaaa tgctttctc ttttaatac ctttttgtt tatcttatt ctaatactt	1800
[0323]	ccctaactc tttcttcag ggcaataat atacaatgta tcatgcctct ttgcaccatt	1860
[0324]	ctaaagaata acagtataa tttctgggtt aaggcaatag caatatttct gcataataa	1920
[0325]	atttctgat ataaattgta actgatgta gagtttcat attgctaata gcagctaca	1980
[0326]	tccagctacc attctgctt tatttttgg ttgggataag gctggattat tctgagcca	2040
[0327]	agctaggccc ttttgtaat cttgttcata cctcttatct tctcccaca gctctgggc	2100
[0328]	aacgtgctg tctctgtgct ggccatcac tttggcaaag aattgccac catgcggctc	2160
[0329]	accgctgcc aggtgccct ggcgccgcc atcacctca accttctggt cctctctat	2220
[0330]	gtctcgtggc tgcagacca gcctaggaat tcccggccc gggggcccc tcgtgcctct	2280
[0331]	gctgccggc cccgtgtcac cgtctgggt cgggagttc aggcatttga caacgcggtg	2340
[0332]	cccagctgg tagactcct cctgcagca gaccagccc agcccgtgt ggtggcagcc	2400
[0333]	gacacgtcc cctaccgcc cctggccctg ccccgatcc ccaacgtgc tctggcgtg	2460
[0334]	ctccagccc ccctggacc gccagccga gcctcgcgc cggagaccta cgtggccacc	2520
[0335]	gagtttggc ccctagtacc tgatggggcg cgggctgagg cacctggcct gctggagcgc	2580

[0336]	atggtggagg cgctccgcgc aggaagcgca cgtctggtgg ccgccccggt tgccacggcc	2640
[0337]	aacctgcca ggtgcttggc cctgaacgtc agcctgcgag agtggaccgc ccgctatggc	2700
[0338]	gcagcccccg ccgcgccccg ctgcgacgcc ctggacggag atgctgtggt gctcctgcgc	2760
[0339]	gcccgcgacc tcttcaacct ctcggcgcc ctggccccgc cgggtgggac cagcctcttt	2820
[0340]	ctgcagaccg cccttcgagg ctgggcgggtg cagctgctgg acttgacctt cgccgcggcg	2880
[0341]	cgccagcccc cgctggccac ggcccacgcg cgctggaagg ctgagcgcga gggacgcgct	2940
[0342]	cggcgggagg cgctgctccg cgcgctgggc atccgcctag tgagctggga aggcgggagg	3000
[0343]	ctggagtggg tcggctgcaa caaggagacc acgcgctgct tcggaaccgt ggtgggagc	3060
[0344]	acgcccgcct acctctacga ggagcgtgg acgccccct gctgcctgcg cgcgctgcgc	3120
[0345]	gagaccgccc gctatgtggt gggcgtgctg gaggctgcgg gcgtgcgcta ctggctcgag	3180
[0346]	ggcggtcac tgctgggggc cgcccaccac ggggacatca tccatggga ctacgacgtg	3240
[0347]	gacctgggca tctacttga ggacgtgggc aactgcgagc agctgcgggg ggcagaggcc	3300
[0348]	ggctcgggtg tggatgagc cggcttcgta tgggagaagg cggtcgagg cgactttttc	3360
[0349]	cgctgcagc acagcgaag caaccactg cacgtggacc tgtggccctt ctacccccg	3420
[0350]	aatggcgtca tgaccaagga cacgtggctg gaccaccgac aggatgtgga gtttcccag	3480
[0351]	cacttctgc agccgtggt gccctgcc tttgccgct tcgtggcgca ggcgctaac	3540
[0352]	aactaccgcc gcttcttga gctcaagtc gggccccggg tcatcgagaa cccccagtac	3600
[0353]	cccaaccg cactgctgag tctgacggga agcggctgaa ttcacccac cagtgcaggc	3660
[0354]	tgccatcag aaagtgtg ctggtgtggc taatgccctg gccacaagt atcactaagc	3720
[0355]	tcgctttctt gctgtccaat ttctattaaa ggttccctt ttcctaagt ccaactacta	3780
[0356]	aactggggga tattatgaag ggccttgagc atctggattc tgcctaataa aaaacattta	3840
[0357]	ttttcattgc aatgatgat ttaaattatt tctgaatatt ttactaaaaa gggaatgtgg	3900
[0358]	gagtcagtg catttaaac ataaagaaat gaagagctag ttcaaacctt gggaaaatac	3960
[0359]	actatatctt aaactccatg aaagaagggt aggctcaaaa cagctaagc acattggcaa	4020
[0360]	cagccctgat gcctatgctt tattcatccc tcagaaaagg attcaagtag aggccttgatt	4080
[0361]	tggaggttaa agttttgcta tgctgtattt tacattactt attgttttag ctgtcctcat	4140
[0362]	gaatgtcttt tcaactacca tttgcttacc ctgcatctct cagccttgac tccactcagt	4200
[0363]	tctcttctt agagatacca ctttcccct gaagtgttcc ttccatggtt tacggcgaga	4260
[0364]	tggtttctcc tcgcttggcc actcagcctt agttgtctct gttgtcttat agaggctac	4320
[0365]	ttgaagaagg aaaaacaggg ggcattggtt gactgtcctg tgagccctt ttcctgctt	4380
[0366]	ccccactca cagtaccgc gaatcaggaa ccctagtgga tggagtggc cactccctct	4440
[0367]	ctgcgcgctc gctcgtcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgccccgac cccgggcttt	4500
[0368]	gccccggcgg cctcagtgag cgagcagcg cgcagagagg gaggggcaa tttgagttct	4560
[0369]	tctactcagg ttaaacttaa gcgcggccgc agtccctaggt tgcgcaatgg gcatgctaca	4620
[0370]	gatcttccgc ggtgcagcaa gtcgactgca gaggcctgca tgcaagctt gcgtaatcat	4680
[0371]	ggtcatagct gtttctgtg tgaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacgag	4740
[0372]	ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggt cctaagtagt gagctaactc acattaattg	4800
[0373]	cgttgcgctc actgcccgt ttcagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa	4860
[0374]	tcggccaacg cgcggggaga ggcggttgc gtattgggag ctcttccgct tctcgtca	4920
[0375]	ctgactcgtc gcgctcggc gttcggctgc ggcgagcgg atcagctcac tcaaaggcgg	4980
[0376]	taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc	5040
[0377]	agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggcgg cgttctggtg gtttttccat aggcctccgc	5100

[0378]	ccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac cgcacaggac	5160
[0379]	tataaagata ccaggcgttt ccccctgaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgacc	5220
[0380]	tgccgcttac cggataactg tccgctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata	5280
[0381]	gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc	5340
[0382]	acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ctttatccgg taactatcgt cttgagtcca	5400
[0383]	acccggtaa acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag	5460
[0384]	cgaggtatgt aggcgggtct acagagttct tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta	5520
[0385]	gaagaacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg	5580
[0386]	gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc	5640
[0387]	agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt	5700
[0388]	ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggtttt ggtcatgaga ttatcaaaaa	5760
[0389]	ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat	5820
[0390]	atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga	5880
[0391]	tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac	5940
[0392]	gggagggtt accatctggc cccagtctg caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg	6000
[0393]	ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaaggc cgagcgcaga agtggctctg	6060
[0394]	caactttatc cgctccatc cagtctatta attggtgccc ggaagctaga gtaagtagtt	6120
[0395]	cgccagttaa tagtttgcgc aacgttgttg ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct	6180
[0396]	cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat	6240
[0397]	ccccatggt gtgcaaaaaa gcggttagct ctttcggctc tccgatcgtt gtcagaagta	6300
[0398]	agttggcgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcaact gcataattct cttactgtca	6360
[0399]	tgccatcctg aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat	6420
[0400]	agtgatgcg gcgaccgagt tgctcttgc cggcgtaac acgggataat accgcgccac	6480
[0401]	atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgtt ttcggggcga aaactctcaa	6540
[0402]	ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tcgtgcacc aactgatctt	6600
[0403]	cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg	6660
[0404]	caaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat	6720
[0405]	attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt	6780
[0406]	agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc cctgacgtct	6840
[0407]	aagaacccat tattatcatg acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg aggccctttc	6900
[0408]	gtc	6903
[0409]	<210>	10
[0410]	<211>	6903
[0411]	<212>	DNA
[0412]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0413]	<400>	10
[0414]	tcgctgcttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctccc gagacggta	60
[0415]	cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagccc tcagggcgcg tcagcgggtg	120
[0416]	ttggcgggtg tcgggctgg cttactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
[0417]	accatagcgt gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgc	240
[0418]	attgccatt caggctgcgc aactgttggg aaggcgatc ggtgcgggc tcttcgctat	300
[0419]	tacgccagct ggcgaaagg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt	360

[0420] tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cgagctcggg accttaaacc 420
[0421] ggttcctaca tatgggttgc gcaatgcggc cgcagtactg cagaaatagg ccgaaatcgg 480
[0422] caaaatccct ttattggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcaact aggccggggc 540
[0423] accaaaggtc gcccgacgcc cgggctttgc cggggcggcc tcagtgagcg agcgagcgcg 600
[0424] cagagaggga gtggccaact ccatcactag gggttcctta ccccctgccc cccacagctc 660
[0425] ctctcctgtg cttgtttcc cagccatgcg ttctcctcta taaatacccg ctctggtatt 720
[0426] tggggttggc agctgttgc gccagggaga tggttgggtt gacatgcggc tcctgacaaa 780
[0427] acacaaacc ctggtgtgtg tgggcgtggg tgggtgtgagt aggggatga atcaggagg 840
[0428] gggcggggga cccagggggc aggagccaca caaagtctgt gcgggggtgg gagcgcacat 900
[0429] agcaattgga aactgaaagc ttatcagacc ctttctggaa atcagcccac tgtttataaa 960
[0430] cttgagggcc caccctcagc agtaccgggg aggaagaggg cctgcactag tccagaggga 1020
[0431] aactgaggct cagggttagc tcgcccatac acatacatgg caggcaggct ttggccagga 1080
[0432] tccctcggcc tgccaggcgt ctccctgccc tcccttctg cctagagacc cccaccctca 1140
[0433] agcctggctg gtctttgcct gagaccctaa cctcttcgac ttcaagagaa tatttaggaa 1200
[0434] caagtggtt tagggccttt cctgggaaca ggccttgacc ctttaagaaa tgaccctaaag 1260
[0435] tctctccttg accaaaaagg ggaccctcaa actaaaggga agcctctctt ctgctgtctc 1320
[0436] ccctgacccc actccccccc accccaggac gaggagataa ccagggtga aagaggcccg 1380
[0437] cctgggggct gcagacatgc ttgctgcctg ccctggcga gattggcag gcttgcccgt 1440
[0438] cacaggaccc ccgctggctg actcaggggc gcaggcctct tgcgggggag ctggcctccc 1500
[0439] cgccccacg gccacgggc gcccttctc ggcaggacag cgggatcttg cagctgtcag 1560
[0440] gggaggggag gcgggggctg atgtcaggag ggatacaaat agtgccgac gctgggggccc 1620
[0441] ctgtctcccc tcgcccac cactctccgg ccggccgct gcccgccc tctcctgctc 1680
[0442] gcccgcagc ctgcccgcg tacacatatt gaccaaatac gggtaatttt gcatattgta 1740
[0443] ttttaaaaa tgctttctc ttttaataata cttttttgt tatcttattt ctaatacttt 1800
[0444] ccctaatactc tttcttctcag ggcaataatg atacaatgta tcatgcctct ttgcaccatt 1860
[0445] ctaaagaata acagtataa tttctgggtt aaggcaatag caatatttct gcatataaat 1920
[0446] atttctgcat ataaattgta actgatgtaa gaggtttcat attgctaata gcagctacaa 1980
[0447] tccagctacc attctgcttt tattttttgg ttgggataag gctggattat tctgagtcca 2040
[0448] agctagggcc ttttgetaat cttgttcata cctcttatct tctcccaca gctcctgggc 2100
[0449] aacgtgctgg tctctgtgct ggcccatcac tttggcaaag aattcgccac catgcggctc 2160
[0450] acccgtgcc aggtgcctt ggccggccc atcacctca accttctggt cctcttctat 2220
[0451] gtctcgtggc tgcagacca gcctaggaat tcccgggccc gggggccccg tcgtgcctct 2280
[0452] gctgcgggcc cccgtgtcac cgtcctggtg cgggagttcg aggcatattga caacgcgggtg 2340
[0453] cccgagctgg tagactcctt cctgcagcaa gaccagccc agcccgtggt ggtggcagcc 2400
[0454] gacacgtcc cctaccgcc cctggccctg ccccgcatcc ccaacgtgcg tctggcgctg 2460
[0455] ctccagcccg ccctggaccg gccagccga gcctcgcgc cggagaccta cgtggccacc 2520
[0456] gagtttggc ccctagtacc tgatggggcg cgggctgagg cacctggcct gctggagcgg 2580
[0457] atggtggagg cgctccgcg aggaagcga cgtctggtgg ccgccccgtg tgccacggcc 2640
[0458] aaccctgcca ggtgcctggc cctgaacgtc agcctgcgag agtggaccgc ccgctacggc 2700
[0459] gcagccccg ccgcgccccg ctgcgacgcc ctggacggag atgctgtggt gctcctgcgc 2760
[0460] gcccgcgacc tcttaacct ctggcgccc ctggcccggc cgggtgggac cagcctcttt 2820
[0461] ctgcagaccg cccttcgagg ctggggcgtg cagctgctgg acttgacctt cgccgaggcg 2880

[0462]	cgccagcccc	cgctggccac	ggcccacgcg	cgctggaagg	ctgagcgcga	gggacgcgct	2940
[0463]	cggcgggicgg	cgctgctccg	cgcgctggga	atccgcctag	tgagctggga	aggcgggicgg	3000
[0464]	ctggagtgg	tcggtgcaa	caaggagacc	acgcgctgct	tcggaaccgt	ggtgggicgac	3060
[0465]	acgccccct	acctctacga	ggagcgtgg	acgccccct	gctgcctgcg	cgcgctgcgc	3120
[0466]	gagaccgcc	gctatgtgg	ggcgtgctg	gaggctgcgg	gcgtgcgcta	ctggctcgag	3180
[0467]	ggcggctcac	tgctggggc	cgccccccac	ggggacatca	tcccatggga	ctacgacgtg	3240
[0468]	gacctgggca	tctacttga	ggacgtggc	aactgcgagc	agctgcgggg	ggcagaggcc	3300
[0469]	ggctcgggtg	tgatgagcg	cggcttcgta	tgggagaagg	cggtcgagg	cgactttttc	3360
[0470]	cgcgtgcagt	acagcgaag	caaccacttg	cacgtggacc	tgtggccctt	ctacccccgc	3420
[0471]	aatggcgtca	tgaccaagga	cacgtgctg	gaccaccgc	aggatgtgga	gtttcccag	3480
[0472]	cacttctgc	agccgtggt	gccccctgccc	tttgccgct	tcgtggcgca	ggcgcctaac	3540
[0473]	aactaccgcc	gcttctgga	gctcaagttc	ggccccggg	tgatcgagaa	ccccagtac	3600
[0474]	cccaaccgg	cactgctgag	tctgacggga	agcggctgaa	ttcacccac	cagtgcagge	3660
[0475]	tgctatcag	aaagtgggtg	ctggtgtggc	taatgccctg	gcccacaagt	atcactaagc	3720
[0476]	tcgctttctt	gctgtccaat	ttctatataa	ggttcctttg	ttccctaagt	ccaactacta	3780
[0477]	aactggggga	tattatgaag	ggccttgagc	atctggattc	tgctataata	aaaacattta	3840
[0478]	ttttcattgc	aatgatgat	ttaaattatt	tctgaatatt	ttactaaaa	gggaatgtgg	3900
[0479]	gagtcagtg	catttaaac	ataaagaaat	gaagagctag	ttcaaaccct	gggaaaatac	3960
[0480]	actatatctt	aaactccatg	aaagaagggtg	aggctgcaaa	cagctaatac	acattggcaa	4020
[0481]	cagccctgat	gcctatgctt	tattcatccc	tcagaaaagg	attcaagtag	aggcttgatt	4080
[0482]	tgagggttaa	agttttgcta	tgctgtattt	tacattactt	attgttttag	ctgtcctcat	4140
[0483]	gaatgtcttt	tactacca	tttgettate	ctgcatctct	cagccttgac	tccactcagt	4200
[0484]	tctcttgett	agagatacca	cctttcccct	gaagtgttcc	ttccatgitt	tacggcgaga	4260
[0485]	tggtttctcc	tcgctggcc	actcagcctt	agttgtctct	gttgtcttat	agaggcttac	4320
[0486]	ttgaagaagg	aaaaacagg	ggcatggttt	gactgtcctg	tgagcccttc	ttccctgctt	4380
[0487]	ccccactca	cagtgaccg	gaatcaggaa	cccctagtga	tgaggttggc	cactcctctt	4440
[0488]	ctgcgcgctc	gctcgtcac	tgaggccggg	cgaccaaagg	tcgcccagc	cccgggcttt	4500
[0489]	gcccgggicgg	cctcagtgag	cgagcgagcg	cgcagagagg	gagtggccaa	tttgagttct	4560
[0490]	tctactcagg	ttaaacttaa	gcgcggccgc	agtcctaggt	tgcgcaatgg	gcattgctaca	4620
[0491]	gatcttccgc	ggtgcagcaa	gtcactgca	gaggcctgca	tgcaagcttg	gcgtaatcat	4680
[0492]	ggtcatagct	gtttctgtg	tgaattgtt	atccgctcac	aattccacac	aacatacgag	4740
[0493]	ccggaagcat	aaagtgtaaa	gcctgggggtg	cctaatagag	gagctaactc	acattaattg	4800
[0494]	cgttgcgctc	actgccgct	ttccagtcgg	gaaacctgct	gtgccagctg	cattaatgaa	4860
[0495]	tcggccaacg	cgcggggaga	ggcggtttgc	gtattgggag	ctcttccgct	tctcgtccta	4920
[0496]	ctgactcgtc	gcgctcggtc	gttcggctgc	ggcagcgggt	atcagctcac	tcaaaggcgg	4980
[0497]	taatacgggt	atccacagaa	tcaggggata	acgcaggaaa	gaacatgtga	gcaaaaggcc	5040
[0498]	agcaaaaggc	caggaaccgt	aaaaaggccg	cgttgctggtc	gtttttccat	aggctccgcc	5100
[0499]	ccccctgacga	gcatacaaaa	aatcgacgct	caagtcagag	gtggcgaaac	ccgacaggac	5160
[0500]	tataaagata	ccaggcgttt	ccccctggaa	gctccctcgt	gcgctctcct	gttccgacct	5220
[0501]	tgccgcttac	cggataacctg	tccgccttc	tcccttcggg	aagcgtggcg	ctttctcata	5280
[0502]	gctcacgctg	taggtatctc	agttcgggtg	aggctgcttcg	ctccaagctg	ggctgtgtgc	5340
[0503]	acgaaccccc	cgttcagccc	gaccgctgcg	ccttatccgg	taactatcgt	cttgagtcca	5400

[0504]	accggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag	5460
[0505]	cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtgggtg gcctaactac ggctacacta	5520
[0506]	gaagaacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg	5580
[0507]	gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaage	5640
[0508]	agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt	5700
[0509]	ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa	5760
[0510]	ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat	5820
[0511]	atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga	5880
[0512]	tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac	5940
[0513]	gggagggctt accatctggc cccagtctg caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg	6000
[0514]	ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaaggcc cgagcgcaga agtggctctg	6060
[0515]	caactttatc cgctccatc cagtctatta attggtgccg ggaagctaga gtaagtagtt	6120
[0516]	cgccagttaa tagtttgcgc aacgttgttg ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct	6180
[0517]	cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttccaacg atcaaggcga gttacatgat	6240
[0518]	ccccatggt gtgcaaaaa gcggttagct cttcgggtcc tccgatcgtt gtcagaagta	6300
[0519]	agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcaact gcataattct cttactgtca	6360
[0520]	tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat	6420
[0521]	agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac	6480
[0522]	atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa	6540
[0523]	ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tcgtgcacc aactgatctt	6600
[0524]	cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg	6660
[0525]	caaaaaggg aataaggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat	6720
[0526]	attattgaag catttatcag ggttatgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt	6780
[0527]	agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc cctgacgtct	6840
[0528]	aagaaacct tattatcatg acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg aggccctttc	6900
[0529]	gtc	6903
[0530]	<210>	11
[0531]	<211>	6903
[0532]	<212>	DNA
[0533]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0534]	<400>	11
[0535]	tcgcgcttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctccc gagacggtca	60
[0536]	cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagccc tcaggcgcg tcagcgggtg	120
[0537]	ttggcgggtg tcgggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
[0538]	accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgc	240
[0539]	attgccatt caggctgcgc aactgttggg aaggcgcgac ggtgcgggc tcttcgctat	300
[0540]	tacgccagct gcgaaagg ggatgtgctg caaggcatt aagttgggta acgccagggt	360
[0541]	tttcccagtc acgacgttg aaaacgacgg ccagtgaatt cgagctcgg accttaaac	420
[0542]	ggttctaca tatgggtgc gcaatgcgc cgcagtactg cagaaatagg ccgaaatcgg	480
[0543]	caaaatccct ttattggcca ctccctctc gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg	540
[0544]	accaaaggtc gcccgacgc cgggcttgc ccggcggcc tcagtgagcg agcgagcgcg	600
[0545]	cagagagga gtggccaact ccatcaetg ggttctta cccctgccc cccacagctc	660

[0546]	ctctcctgtg	ccttgtttcc	cagccatgcg	ttctcctcta	taaatacccg	ctctggtatt	720
[0547]	tggggttggc	agctgttgct	gccagggaga	tggttgggtt	gacatgcggc	tcctgacaaa	780
[0548]	acacaaacc	ctggtgtgtg	tggcgtggg	tggtgtgagt	aggggatga	atcagggagg	840
[0549]	ggcggggga	cccaggggc	aggagccaca	caaagtctgt	gcgggggtgg	gagcgcacat	900
[0550]	agcaattgga	aactgaaagc	ttatcagacc	ctttctggaa	atcagcccac	tgtttataaa	960
[0551]	cttgaggccc	caccctcgac	agtaccgggg	aggaagagg	cctgcactag	tccagaggga	1020
[0552]	aactgaggct	cagggetagc	tcgcccatag	acatacatgg	caggcagget	ttggccagga	1080
[0553]	tcctccgcc	tgccaggcgt	ctcctgccc	tccttctctg	cctagagacc	cccaccctca	1140
[0554]	agcctggctg	gtctttgctt	gagacccaaa	cctcttcgac	ttcaagagaa	tatttaggaa	1200
[0555]	caagtggtt	tagggccttt	cctgggaaca	ggccttgacc	ctttaagaaa	tgacccaaag	1260
[0556]	tctctccttg	acaaaaaag	ggaccctcaa	actaaaggga	agcctctctt	ctgctgtctc	1320
[0557]	ccctgacccc	actcccccc	accccaggac	gaggagataa	ccagggetga	aagaggccc	1380
[0558]	cctggggct	gcagacatgc	ttgctgctg	ccctggcga	ggattggcag	gcttgcccgt	1440
[0559]	cacaggacc	ccgctggctg	actcagggc	gcaggcctct	tgcgggggag	ctggcctccc	1500
[0560]	cgccccacg	gccacggcc	gcccttctc	ggcaggacag	cgggatcttg	cagctgtcag	1560
[0561]	gggaggggag	gcggggctg	atgtcaggag	ggatacaaat	agtgcgacg	gctgggggcc	1620
[0562]	ctgtctcccc	tcgcccatc	cactctccgg	ccggccgct	gcccgccgc	tcctccgtgc	1680
[0563]	gcccgcagc	ctcgcccg	tacacatatt	gaccaaata	gggtaatttt	gcattttaa	1740
[0564]	tttaaaaaa	tgcttcttc	tttaataata	ctttttgtt	tatcttattt	ctaatactt	1800
[0565]	ccctaatactc	ttctttcag	ggcaataatg	atacaatgta	tcatgcctct	ttgcaccatt	1860
[0566]	ctaaagaata	acagtataa	tttctgggtt	aaggcaatag	caatatttct	gcataataat	1920
[0567]	atttctgcat	ataaattgta	actgatgtaa	gagtttcat	attgctaata	gcagctaaa	1980
[0568]	tccagctacc	attctgcttt	tatttttgg	ttgggataag	gctggattat	tctgagtcca	2040
[0569]	agctaggccc	tttgctaat	ctgttcata	cctcttatct	tcctcccaca	gctcctgggc	2100
[0570]	aacgtgctgg	tctctgtgt	ggccatcac	tttgcaaaag	aattcgccac	catgagactg	2160
[0571]	accagtgcc	aggctgcct	ggctgctgc	atcacctga	acctgctggt	gctgttctat	2220
[0572]	gtgagctggc	tcagcacca	gccaggaac	agcaggcca	ggggcccag	gaggcctct	2280
[0573]	gctgctggcc	ccagggtgac	agtgtggtg	agggagtgtg	aggcctttga	caatgctgtg	2340
[0574]	cctgagctgg	tggacagctt	cctgcagcag	gacctgccc	agcctgtggt	ggtggctgct	2400
[0575]	gataccctgc	cctaccccc	cctggccctg	cccaggatcc	ccaatgtgag	gctggccctg	2460
[0576]	ctgcagcctg	ccctggacag	gcctgctgct	gccagcagc	ctgagaccta	tgtggccaca	2520
[0577]	gagtttgtgg	ccctggtgcc	tgatggggcc	agggtgagg	cccctggcct	gctggagagg	2580
[0578]	atggtggagg	ccctgagggc	tggtctgccc	aggctggtgg	ctgcccctgt	ggccacagcc	2640
[0579]	aacctgcca	ggtgcctggc	cctgaatgtg	agcctgagag	agtggacagc	caggtatggg	2700
[0580]	gctgcccctg	ctgccccag	gtgtgatgcc	ctggatggag	atgctgtggt	gctgctgagg	2760
[0581]	gccagggacc	tgttcaacct	gtctgcccc	ctggccaggc	ctgtggggac	cagcctgttt	2820
[0582]	ctgcagacag	ccctgagggg	ctgggctgtg	cagctgctgg	acctgacctt	tgctgctgcc	2880
[0583]	aggcagcccc	ccctggctac	agcccagcc	aggtggaagg	ctgagaggga	gggcagggcc	2940
[0584]	aggaggctg	ccctgctgag	ggccctgggg	atcaggctgg	tgagctggga	ggggggcagg	3000
[0585]	ctggagtgg	ttggctgcaa	caaggagaca	accaggtgct	ttgggacagt	ggtgggggat	3060
[0586]	acctgacct	acctgtatga	ggagaggtgg	acccccct	gctgcctgag	ggccctgagg	3120
[0587]	gagacagcca	ggtatgtggt	gggggtgctg	gaggctgctg	gggtgaggta	ctggctggag	3180

[0588]	gggggcagcc tgctgggggc tgccaggcac ggggacatta tcccctggga ctatgatgtg	3240
[0589]	gacctgggca tctacctgga ggatgtgggc aactgtgagc agctgagggg ggctgaggct	3300
[0590]	ggctctgtgg tggatgagag gggctttgtg tgggagaagg ctgtggaggg ggactttttc	3360
[0591]	agggtgcagt actctgagag caaccacctg cacgtggacc tgtggccctt ctaccccagg	3420
[0592]	aatggggtga tgaccaagga cacctggctg gaccacaggc aggatgtgga gttccctgag	3480
[0593]	cacttctgc agccccgtgt gccctgccc tttgctggct ttgtggccca ggcccccaac	3540
[0594]	aactacagga gtttctgga gctgaagttt ggccctgggg tgattgagaa cccccagtac	3600
[0595]	cccaacctg cctgtctgag cctgacaggc tctggctgaa ttcacccac cagtgcaggc	3660
[0596]	tgctatcag aaagtgggtg ctggtgtggc taatgccctg gccacaagt atcactaagc	3720
[0597]	tcgctttctt gctgtccaat ttctatataa gtttcccttg ttccctaagt ccaactacta	3780
[0598]	aactggggga tattatgaag ggccttgagc atctggattc tgcctaataa aaaacattta	3840
[0599]	ttttcattgc aatgatgat ttaaattatt tctgaatatt ttactaaaaa gggaatgtgg	3900
[0600]	gagtcagtg catttaaac ataaagaaat gaagagctag ttcaaacctt gggaaaatac	3960
[0601]	actatatctt aaactccatg aaagaagggt aggctgcaa cagctaagc acattggcaa	4020
[0602]	cagccctgat gcctatgcct tattcatccc tcagaaaagg attcaagtag aggcttgatt	4080
[0603]	tggaggttaa agttttgcta tgctgtattt tacattactt attgttttag ctgtcctcat	4140
[0604]	gaatgtcttt tcaactacca tttgcttate ctgcatctct cagccttgac tccactcagt	4200
[0605]	tctcttgctt agagatacca ctttccct gaagtgttc ttccatgttt tacggcgaga	4260
[0606]	tggtttctcc tcgctggcc actcagcctt agttgtctct gttgtcttat agaggcttac	4320
[0607]	ttgaagaagg aaaaacaggg ggcatggttt gactgtcctg tgagccctc ttccctgect	4380
[0608]	ccccactca cagtgaccg gaatcaggaa ccctagtga tggagttggc cactcctct	4440
[0609]	ctgcgcctc gctcgtcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgccccagc cccgggcttt	4500
[0610]	gcccggcg gctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gaggggcaa tttgagttct	4560
[0611]	tctactcagg ttaaacttaa gcgcggccgc agtccctagg tgcgcaatgg gcatgctaca	4620
[0612]	gatcttccgc ggtgcagcaa gtcgactgca gaggcctgca tgcaagcttg gcgtaatcat	4680
[0613]	ggcatagct gtttctgtg tgaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacag	4740
[0614]	ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggt cctaagtagt gagctaactc acattaattg	4800
[0615]	cgttgcctc actgccgct ttccagtcgg gaaacctgc gtgccagctg cattaatgaa	4860
[0616]	tcggccaacg cgcggggaga ggcggttgc gtattgggag ctcttccgct tctcgtc	4920
[0617]	ctgactcgt gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcgt atcagctcac tcaaaggcgg	4980
[0618]	taatacgtt atccacagaa tcaggggata acgcagaaa gaacatgtga gcaaaaaggc	5040
[0619]	agcaaaaagg caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggt gtttttccat aggctccgcc	5100
[0620]	ccccgacga gcatcaciaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac	5160
[0621]	tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgacc	5220
[0622]	tgccgcttac cggatacctg tccgccttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata	5280
[0623]	gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc	5340
[0624]	acgaaccccc cgttcagccc gaccgtcgc cttatccgg taactatcgt cttgagtc	5400
[0625]	accggtaag acacgactta tcgccaactg cagcagccac tggtaacagg attagcagag	5460
[0626]	cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtgtg gcctaactac ggctacacta	5520
[0627]	gaagaacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg	5580
[0628]	gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc	5640
[0629]	agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt	5700

[0630] ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aaggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa 5760
 [0631] ggatcttcac ctatgcctt ttaaattaaa atgaagttt taaatcaatc taaagtatat 5820
 [0632] atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcact atctcagcga 5880
 [0633] tctgtctatt tcgttcatcc atagttgctt gactccccgt cgtgtagata actacgatac 5940
 [0634] gggagggtt accatctggc cccagtgtg caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg 6000
 [0635] ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaaggc cgagcgcaga agtggctctg 6060
 [0636] caactttatc cgctccatc cagtctatta attggtgccc ggaagctaga gtaagtagtt 6120
 [0637] cgccagttaa tagtttgcgc aacgttgtt ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct 6180
 [0638] cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat 6240
 [0639] ccccatgtt gtgcaaaaa gcggttagct ctttcggctc tccgatcgtt gtcagaagta 6300
 [0640] agttggccc agtgttatca ctatggta tggcagcact gcataattct cttactgtca 6360
 [0641] tgccatccgt aagatgctt tctgtgactg gtgagtact aaccaagtca ttctgagaat 6420
 [0642] agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac 6480
 [0643] atagcagaac tttaaaagt ctcatcattg gaaaacgtt ttcggggcga aaactctcaa 6540
 [0644] ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tcgtgcacc aactgatctt 6600
 [0645] cagcatctt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg 6660
 [0646] caaaaaggg aataaggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat 6720
 [0647] attattgaag catttatcag gttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt 6780
 [0648] agaaaaataa acaaatagg gttccgcga catttccccg aaaagtcca cctgacgtct 6840
 [0649] aagaaacct tattatcatg acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg aggccttctc 6900
 [0650] gtc 6903
 [0651] <210> 12
 [0652] <211> 145
 [0653] <212> DNA
 [0654] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0655] <400> 12
 [0656] ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccggcgacc aaaggtcgc 60
 [0657] cgacccccgg gctttcccc ggcgccctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagt 120
 [0658] gccaaactcca tcaactaggg ttct 145
 [0659] <210> 13
 [0660] <211> 1061
 [0661] <212> DNA
 [0662] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0663] <400> 13
 [0664] taccctctgc cccccacagc tcctctctg tgcttgttt cccagccatg cgttctctc 60
 [0665] tataaatacc cgctctggta tttggggtg gcagctgtg ctgccaggga gatggttggg 120
 [0666] ttgacatgcg gctctgaca aaacacaaac ccctggtgtg tgtggcgtg ggtggtgtga 180
 [0667] gtaggggat gaatcaggga gggggcggg gaccagggg gcaggagcca cacaaagtct 240
 [0668] gtgcgggggt gggagcgac atagcaattg gaaactgaaa gcttatcaga cccttctg 300
 [0669] aatcagccc actgtttata aacttaggc cccacctcg acagtaccg ggaggaagag 360
 [0670] ggctgcact agtccagag gaaactgagg ctgaggcta gctcgccat agacatacat 420
 [0671] ggcaggcagg ctttgccag gatecctccg cctgccaggc gtctcctgc cctccttcc 480

[0672] tgcctagaga cccccacct caagcctggc tggctcttgc ctgagacca aacctcttcg 540
 [0673] acttcaagag aatatttagg aacaaggtgg tttagggcct ttcctgggaa caggccttga 600
 [0674] ccccttaaga aatgacccaa agtctctcct tgaccaaaaa ggggacctc aaactaaagg 660
 [0675] gaagcctctc ttctgctgtc tcccctgacc cactcctccc ccaccccagg acgaggagat 720
 [0676] aaccagggtc gaaagaggcc cgcctggggg ctgcagacat gcttgctgcc tgccttgccg 780
 [0677] aaggattggc aggcttggcc gtcacaggac ccccgctggc tgactcaggg gcgcaggcct 840
 [0678] cttgcggggg agctggcctc cccgccccca cggccacggg ccgccccttc ctggcaggac 900
 [0679] agcgggatct tgcagctgtc aggggagggg aggcgggggc tgatgtcagg agggatacaa 960
 [0680] atagtcccga cggctggggg ccctgtctcc cctcggccga tccactctcc ggccggccgc 1020
 [0681] ctgcccgcg cctcctcctg gcgcccga gcctcggccg c 1061
 [0682] <210> 14
 [0683] <211> 452
 [0684] <212> DNA
 [0685] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0686] <400> 14
 [0687] gtacacatat tgaccaaate aggtaattt tgcatttga attttaaaa atgctttctt 60
 [0688] cttttaatat actttttgt ttatcttatt tctaatactt tccctaactc ctttctttca 120
 [0689] gggcaataat gatacaatgt atcatgcctc tttgcacat tctaaagaat aacagtgata 180
 [0690] atttctgggt taaggcaata gcaatattc tgcatataaa tatttctgca tataaattgt 240
 [0691] aactgatgta agaggttca tattgctaat agcagctaca atccagctac cattctgctt 300
 [0692] ttattttttg gttgggataa ggctggatta ttctgagtc aagctaggcc cttttgctaa 360
 [0693] tcttgttcat acctctatc ttctcccac agctcctggg caacgtgctg gtctctgtgc 420
 [0694] tggcccatca ctttgcaaa gaattcgcca cc 452
 [0695] <210> 15
 [0696] <211> 766
 [0697] <212> DNA
 [0698] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0699] <400> 15
 [0700] attcaccca ccagtgcagg ctgcctatca gaaagtgtg gctggtgtgg ctaatgcct 60
 [0701] ggcccacaag tactactaag ctgccttct tgcctgcca tttctattaa aggttcttt 120
 [0702] gttccctaag tccaactact aaactggggg atattatgaa gggccttgag catctggatt 180
 [0703] ctgcctaata aaaaacattt attttcattg caatgatgta tttaaattat ttctgaatat 240
 [0704] tttactaaaa agggaatgtg ggaggtcagt gcatttaaaa cataaagaaa tgaagagcta 300
 [0705] gttcaaacct tgggaaaata cactatatct taaactccat gaaagaaggt gaggctgcaa 360
 [0706] acagctaata cacattggca acagccctga tgcctatgcc ttattcatcc ctcagaaaag 420
 [0707] gattcaagta gaggctgat ttggaggta aagttttgct atgctgtatt ttacattact 480
 [0708] tattgtttta gctgtcctca tgaatgtct ttactacctc atttgcttat cctgcatctc 540
 [0709] tcagccttga ctccactcag ttctcttget tagagatacc acctttcccc tgaagtgttc 600
 [0710] cttccatggt ttacggcgag atggtttctc ctgcctggc cactcagcct tagttgtctc 660
 [0711] tgttgtctta tagaggctc cttgaagaag gaaaaacagg gggcatggtt tgactgtcct 720
 [0712] gtgagccctt cttccctgcc tccccactc acagtgacct ggaatc 766
 [0713] <210> 16

- [0714] <211> 145
[0715] <212> DNA
[0716] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0717] <400> 16
[0718] aggaaccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgtcg ctactgagg 60
[0719] ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccg gctttgccc ggcgccctca gtgagcgagc 120
[0720] gagcgcgag agagggagtg gccaa 145
[0721] <210> 17
[0722] <211> 18
[0723] <212> DNA
[0724] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0725] <400> 17
[0726] ccaggcgagg agaaacca 18
[0727] <210> 18
[0728] <211> 25
[0729] <212> DNA
[0730] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0731] <400> 18
[0732] cttgactcca ctcaattctc ttgct 25
[0733] <210> 19
[0734] <211> 29
[0735] <212> DNA
[0736] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0737] <400> 19
[0738] ctgccgtaa aacatggaag gaacactc 29
[0739] <210> 20
[0740] <211> 1488
[0741] <212> DNA
[0742] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0743] <400> 20
[0744] atgagactga caagatgcca ggccgccctg gccgctgcca tcacactgaa tctgctggtg 60
[0745] ctgttctatg tgtcctggct gcagcaccag ccccggaact ctagagccag aggcccaaga 120
[0746] agggcctctg ccgccggacc tagagtgaca gtgctcgtgc gcgagttcga ggccttcgac 180
[0747] aatgccgtgc ccgagctggt ggacagcttc ctgcagcaag acctgctca gcctgtggtg 240
[0748] gtggccgccg atacactgcc ttatcctcca ctggccctgc ccagaatccc caatgtgca 300
[0749] ctggctctgc tgcagccgc cctggataga cctgccgccg ctagcagacc tgagacatac 360
[0750] gtggccaccg agttcgtggc cctggtgctt gatggcgcca gagctgaagc tcccgccctg 420
[0751] ctggaagaa tgggtggaagc cctgagagcc ggcagcgcca gactggtggc tgctcctgtg 480
[0752] gctaccgcca acctgccag atgtctggcc ctgaatgtgt ccctgagaga gtggaccgcc 540
[0753] agatacggcg ctgccctgc cgctcctaga tgtgatgctc tggatggcga cgccgtggtg 600
[0754] ctgctgagag ccagggacct gttcaacctg agcgcccctc tggccagacc tgtgggcaca 660
[0755] agcctgtttc tgcagacagc cctgaggggc tgggccgtgc agctgctgga tctgacattt 720

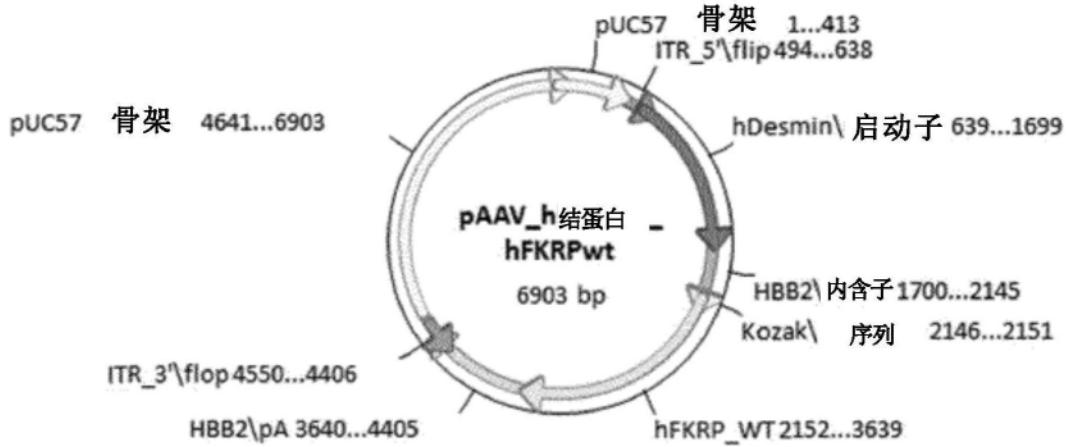
[0756]	gccgctgcca gacagcctcc tctggccaca gcccatgcca gatggaaggc cgagagagag	780
[0757]	ggcagagcca gaaggctgc tctgctgagg gccctgggca tcagactggt gtcttgggaa	840
[0758]	ggcgccagac tegagtgtt cggctgcaac aaagaaacca cccggtgctt cggcaccgtc	900
[0759]	gtggcgata caccagccta cctgtacgag gaaagatgga ccccccttg ctgcctgcgg	960
[0760]	gccctgagag aaacagccag atatgtctgt ggcgtgctgg aagccgctgg cgtgcgatat	1020
[0761]	tggctggaag gcgatctct gctgggagcc gccaggcacg gcgacatcat cccttgggac	1080
[0762]	tacgacgtgg acctgggcat ctacctgga gatgtgggca actgcgagca gctgagagge	1140
[0763]	gccgaagccg gctctgtgtt ggatgagagg ggcttctgtt gggagaagge cgtggaagge	1200
[0764]	gacttcttcc ggtgacagta cagcgagagc aaccatctgc atgtggacct gtggcccttc	1260
[0765]	taccccgga acggcgtgat gaccaaggac acctggctgg accaccggca ggacgtgga	1320
[0766]	ttccccgagc actttctgca gccctgtgtt cactgcctt tcgccgatt tgtggcccag	1380
[0767]	gcccccaaca actaccggc gttcttgga ctgaagtctg gccctggcgt gatcgagaac	1440
[0768]	ccccagtagc ctaacctgc cctgctgagc ctgaccggca gcggctaa	1488
[0769]	<210> 21	
[0770]	<211> 6903	
[0771]	<212> DNA	
[0772]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0773]	<400> 21	
[0774]	tcgctgcttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctccc gagacggtca	60
[0775]	cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagccc tcagggcgag tcagcgggtg	120
[0776]	ttggcgggtg tcgggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc	180
[0777]	accatatgag gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgc	240
[0778]	attgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat	300
[0779]	tacgccagct ggcaaaagg ggatgtctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt	360
[0780]	tttcccagtc acgacttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cgagctcggc accttaaacc	420
[0781]	ggttctaca tatgggtgc gcaatgcgc cgcagtactg cagaaatagg ccgaaatcgg	480
[0782]	caaaatccct ttattgcca ctccctctt gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggag	540
[0783]	accaaaggtc gcccgacgcc cgggcttgc ccggcgggcc tcagtgcagc agcgagcgc	600
[0784]	cagagaggga gtggccaact ccatactag ggttctctta cccctgccc cccacagctc	660
[0785]	ctctcctgtg cttgtttcc cagccatgag ttctctctta taaataccg ctcttggtatt	720
[0786]	tggggttggc agctgttct gccagggaga tgggtgggtt gacatgcgc tctgacaaa	780
[0787]	acacaaacc ctggtgtgtg tggcgtggg tgggtgtgagt aggggatga atcagggag	840
[0788]	ggcggggga cccaggggc aggagccaca caaagtctgt gcgggggtgg gagcgacat	900
[0789]	agcaattgga aactgaaagc ttatcagacc ctttctgga atcagcccac tgtttataaa	960
[0790]	cttgaggccc caccctgac agtaccggg aggaagagg cctgcactag tccagaggga	1020
[0791]	aactgaggct cagggtagc tcgccatag acatacatgg caggcaggct ttggccagga	1080
[0792]	tcctccgcc tgccagcgt ctccctgcc tcccttctg cctagagacc cccacctca	1140
[0793]	agcctggctg gtctttgct gagacccaaa cctcttcgac ttcaagagaa tatttaggaa	1200
[0794]	caagtggtt taggccttt cctgggaaca ggccttgacc ctttaagaaa tgacccaaag	1260
[0795]	tctctcctg accaaaaagg ggaccctca actaaaggga agcctctctt ctgctgtctc	1320
[0796]	ccctgacccc actcccccc accccaggac gaggagataa ccagggtga aagaggccc	1380
[0797]	cctgggggct gcagacatgc ttgctgctg ccctggcga ggattggcag gcttgcccgt	1440

[0798]	cacaggaccc	ccgctggctg	actcaggggc	gcaggcctct	tgcgggggag	ctggcctccc	1500
[0799]	cgccccacg	gccacgggcc	gccctttcct	ggcaggacag	cgggatcttg	cagctgtcag	1560
[0800]	gggaggggag	gcgggggctg	atgtcaggag	ggatacaaat	agtgccgacg	gctggggggc	1620
[0801]	ctgtctcccc	tcgccgcac	cactctccgg	ccggccgcct	gcccgccgcc	tcttccgtgc	1680
[0802]	gcccgcagc	ctcgcccgcg	tacacatatt	gaccaaata	gggtaatttt	gcatttghta	1740
[0803]	ttttaaaaa	tgctttcttc	ttttaatata	cttttttgtt	tatcttattt	ctaatacttt	1800
[0804]	ccctaatactc	tttctttcag	ggcaataatg	atacaatgta	tcatgcctct	ttgcaccatt	1860
[0805]	ctaaagaata	acagtataa	tttctgggtt	aaggcaatag	caatattttct	gcataataat	1920
[0806]	atttctgcat	ataaattgta	actgatgtaa	gaggtttcat	attgctaata	gcagctacaa	1980
[0807]	tccagctacc	attctgcttt	tattttttgg	ttgggataag	gctggattat	tctgagtcca	2040
[0808]	agctaggccc	ttttgtaaat	cttgttcata	cctcttatct	tcttcccaca	gctcctgggc	2100
[0809]	aacgtgctgg	tctctgtgct	ggcccatcac	tttggcaaag	aattcgccac	catgcggctc	2160
[0810]	accgctgcc	aggctgcct	ggctgctgcc	atcacctca	accttctggt	cctcttctat	2220
[0811]	gtcagctggc	tgtagacca	gcctaggaat	tcccgggccc	gggggccag	gagggcctct	2280
[0812]	gctgctggcc	ccagggtcac	cgctctggtg	cgggagttcg	aggcatttga	caacgctgtg	2340
[0813]	cccagctgg	tagactcctt	cctgcagcaa	gaccagccc	agcccgtggt	ggtggcagct	2400
[0814]	gacaccctcc	cctaccccc	cctggccctg	ccccgatcc	ccaacgtgag	gctggccctg	2460
[0815]	ctccagcccg	ccctggaccg	gccagctgca	gccagccgcc	ctgagaccta	cgtggccacc	2520
[0816]	gagtttgtgg	ccctggtacc	tgatggggcc	cgggctgagg	cacctggcct	gctggagcgg	2580
[0817]	atggtggagg	ccctcagggc	aggaagcgca	aggctggtgg	ctgcccctgt	tgccacagcc	2640
[0818]	aaccctgcca	ggtgcctggc	cctgaacgtc	agcctgcgag	agtggaccgc	ccgctacggg	2700
[0819]	gcagcccccg	ctgcccccg	ctgcgacgcc	ctggacggag	atgctgtggt	gctcctgagg	2760
[0820]	gccagggacc	tcttcaacct	ctctgcccc	ctggcccggc	ctgtgggcac	cagcctcttt	2820
[0821]	ctgcagaccg	cccttagggg	ctgggctgtg	cagctgctgg	acttgacctt	cgctgctgcc	2880
[0822]	cgccagcccc	ccctggccac	agcccagccc	cgctggaagg	ctgagagggg	gggaagggct	2940
[0823]	cggcgggctg	ccctgctcag	ggccctggga	atccgcctgg	tgagctggga	agggggcgcg	3000
[0824]	ctggagtgg	tcggctgcaa	caaggagacc	accgctgct	tcggaaccgt	ggtgggggac	3060
[0825]	acccccgct	acctctacga	ggagcgtgg	acccccct	gctgcctgag	ggccctgagg	3120
[0826]	gagaccgcc	gctatgtggt	gggggtgctg	gagctgctg	gggtgcgcta	ctggctcag	3180
[0827]	ggggctcac	tgctgggggc	tgcccgccac	ggggacatca	tcccatggga	ctacgacgtg	3240
[0828]	gacctgggca	tctacttgg	ggacgtggc	aactgcgagc	agctgcgggg	ggcagaggct	3300
[0829]	ggctctgtgg	tgatgagag	ggccttcgta	tgggagaagg	ctgtggaggg	ggactttttc	3360
[0830]	agggtgcagt	acagcgaag	caaccacttg	cacgtggacc	tgtggccctt	ctacccccgc	3420
[0831]	aatggggtca	tgaccaagga	cacctgctg	gaccaccg	aggatgtgga	gtttcccag	3480
[0832]	cacttctgc	agcccctggt	gcccctgcc	tttctgctg	tcgtggcca	ggcccctaac	3540
[0833]	aactaccgcc	gcttctgga	gctcaagtc	gggcccggg	tgatcgagaa	ccccagtac	3600
[0834]	cccaacctg	cactgctgag	tctgaccgga	agcggctgaa	ttcacccac	cagtgcaggc	3660
[0835]	tgctatcag	aaagtgggtg	ctggtgtggc	taatgcctg	gcccacaagt	atcactaagc	3720
[0836]	tcgctttctt	gctgtccaat	ttctattaaa	ggttctttg	ttccctaagt	ccaactacta	3780
[0837]	aactggggga	tattatgaag	ggccttgagc	atctggattc	tgctataata	aaaacattta	3840
[0838]	tttctattgc	aatgatgtat	ttaaattatt	tctgaatatt	ttactaaaa	gggaatgtgg	3900
[0839]	gaggtcagtg	catttaaac	ataaagaaat	gaagagctag	ttcaaactt	gggaaaatac	3960

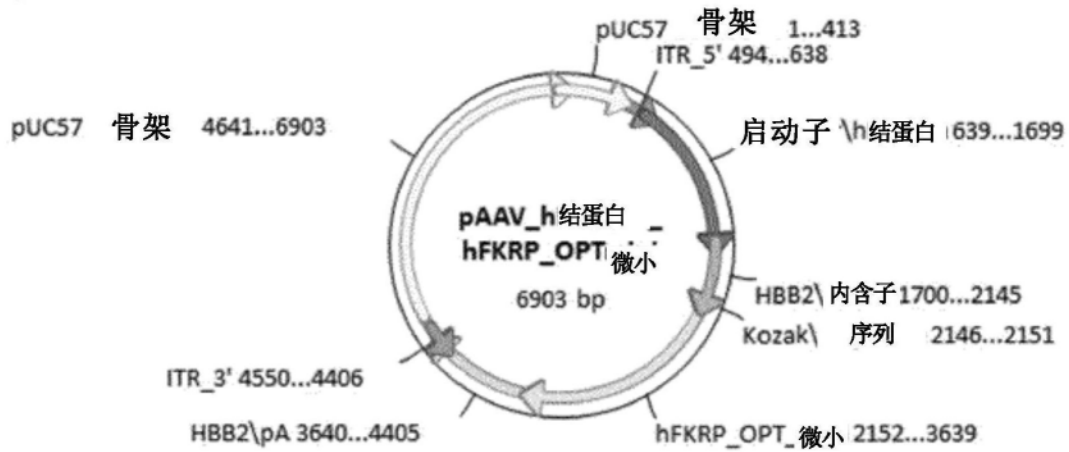
[0840] actatatctt aaactccatg aaagaaggtg aggctgcaa cagctaatgc acattggcaa 4020
[0841] cagccctgat gcctatgcct tattcatccc tcagaaaagg attcaagtag aggcttgatt 4080
[0842] tggaggttaa agttttgcta tgctgtattt tacattactt attgttttag ctgtcctcat 4140
[0843] gaatgtcttt tcaactacca tttgcttate ctgcatctct cagccttgac tccactcagt 4200
[0844] tctcttgctt agagatacca ctttccct gaagtgttc ttccatgttt tacggcgaga 4260
[0845] tggtttctcc tcgctggcc actcagcctt agttgtctct gttgtcttat agaggcttac 4320
[0846] ttgaagaagg aaaaacaggg ggcattggtt gactgtcctg tgagccctc ttccctgect 4380
[0847] cccccactca cagtgaccg gaatcaggaa ccctagtga tggagttggc cactccctct 4440
[0848] ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccagc cccgggcttt 4500
[0849] gcccggcgcg cctcagttag cgagcgagcg cgagagagg gaggggcaa tttgagttct 4560
[0850] tctactcagg ttaacttaa gcgcgccgc agtcctaggt tgcgcaatgg gcatgctaca 4620
[0851] gatcttccgc ggtgcagcaa gtcgactgca gaggcctgca tgcaagctg gcgtaatcat 4680
[0852] ggtcatagct gtttctgtg tgaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacag 4740
[0853] ccggaagcat aaagtgtaaa gcctggggtg cctaatgagt gagctaactc acattaattg 4800
[0854] cgttgcgctc actgccgct ttccagtcgg gaaacctgc gtgccagctg cattaatgaa 4860
[0855] tcggccaacg cgcggggaga ggcggttgc gtattgggag ctcttccgct tctcgcctca 4920
[0856] ctgactcgtc gcgctcgctc gttcggctgc ggcgagcgg atcagctcac tcaaaggcgg 4980
[0857] taatacggtt atccacagaa tcaggggata acgagggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc 5040
[0858] agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctgag gtttttccat aggctccgcc 5100
[0859] cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac 5160
[0860] tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gtcctctctg gcgctctctt gttccgacct 5220
[0861] tgccgcttac cggatacctg tccgccttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata 5280
[0862] gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc 5340
[0863] acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgag ctttatccgg taactatcgt cttgagctca 5400
[0864] acccgtaag acacgactta tcgccaactg cagcagccac tggtaacagg attagcagag 5460
[0865] cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtgtg gcctaactac ggctacacta 5520
[0866] gaagaacagt atttggatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg 5580
[0867] gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc 5640
[0868] agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt 5700
[0869] ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggtttt ggtcatgaga ttatcaaaaa 5760
[0870] ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat 5820
[0871] atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga 5880
[0872] tctgtctatt tcgttcatcc atagttgctt gactccccgt cgtgtagata actacgatac 5940
[0873] gggagggtt accatctggc cccagtgtg caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg 6000
[0874] ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaaggc cgagcgaga agtggtcctg 6060
[0875] caactttatc cgctccatc cagtctatta attgttgcg ggaagctaga gtaagtagtt 6120
[0876] cgccagttaa tagtttgcgc aacgttgtg ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct 6180
[0877] cgtcgttgg tatggttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat 6240
[0878] cccccatgtt gtgcaaaaa gcggttagct cttcggctc tccgatcgtt gtcagaagta 6300
[0879] agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact gcataattct cttactgtca 6360
[0880] tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat 6420
[0881] agtgtatgag gcgaccgagt tgctcttggc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac 6480

[0882] atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa 6540
[0883] ggatcttacc gctggtgaga tccagttcga tgtaaccac tcgtgcacc aactgatctt 6600
[0884] cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg 6660
[0885] caaaaaagg aataaggcg acacggaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat 6720
[0886] attattgaag catttatcag gtttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt 6780
[0887] agaaaaataa acaaatagg gttccgcgca catttccccg aaaagtcca cctgacgtct 6840
[0888] aagaaacat tattatcatg acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg aggccttctc 6900
[0889] gtc 6903

A/



B/



C/

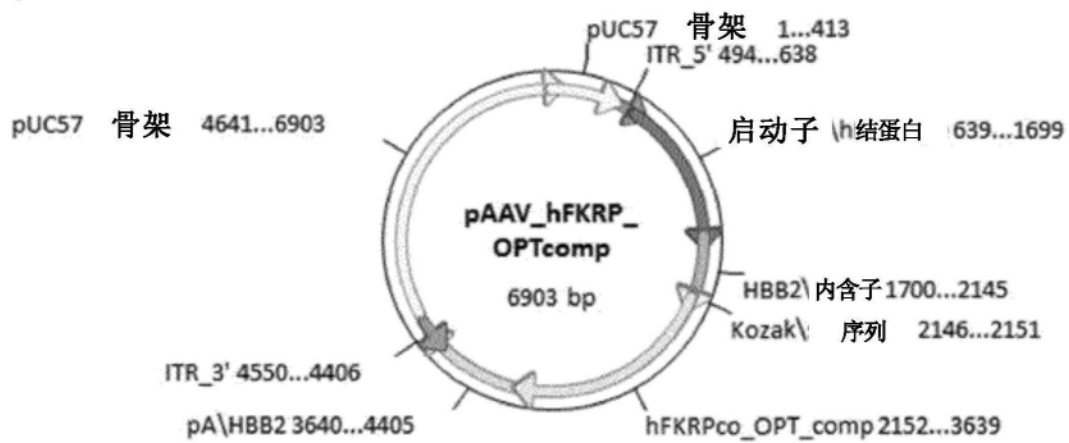


图1

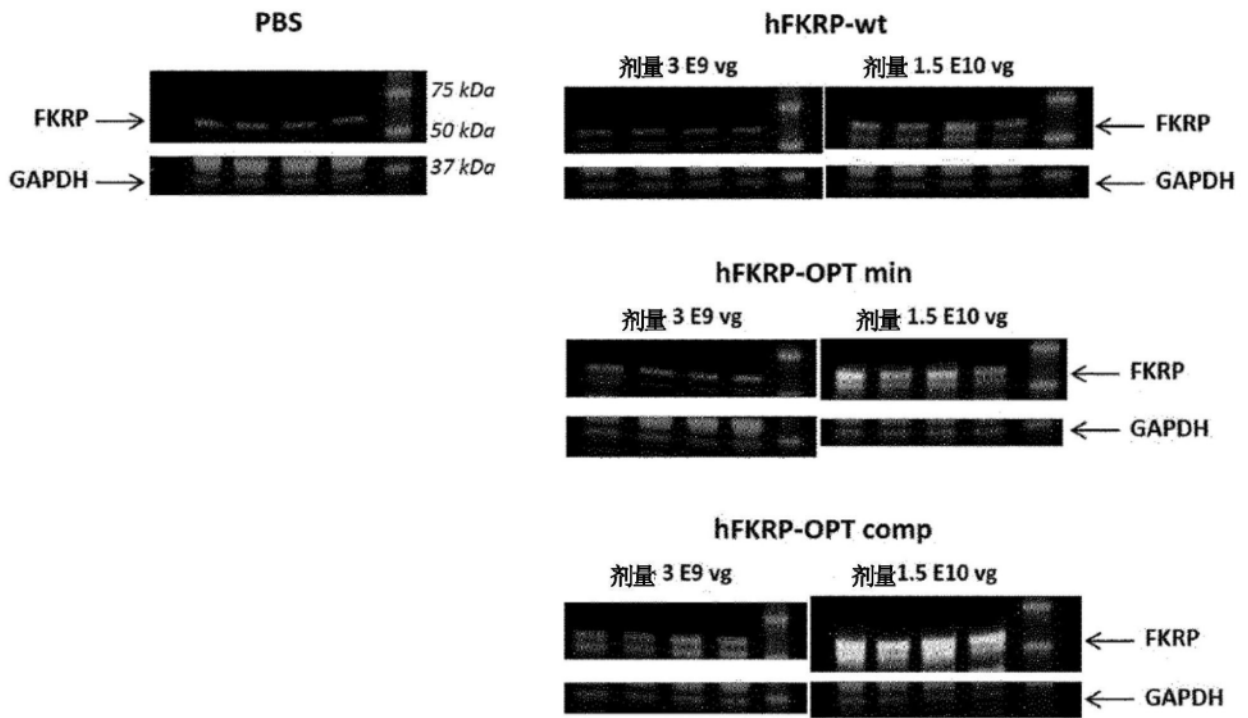


图2A

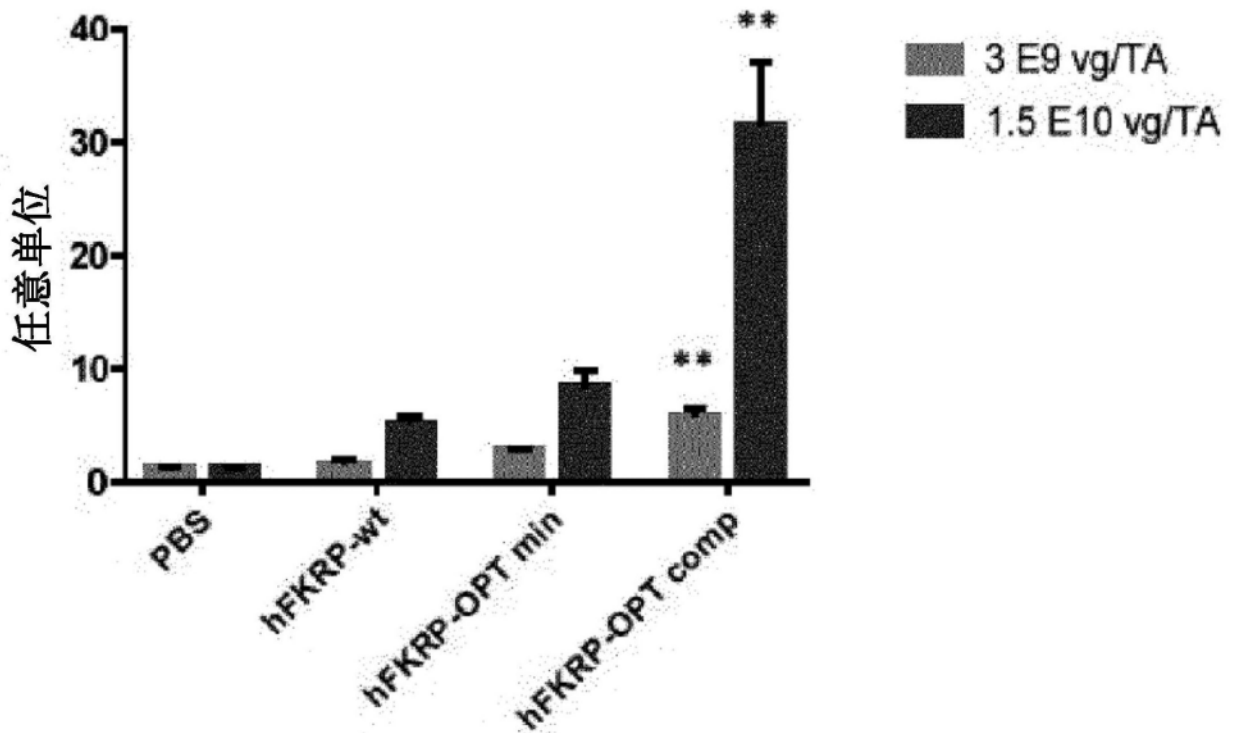


图2B

基因转移后的FKRP蛋白水平

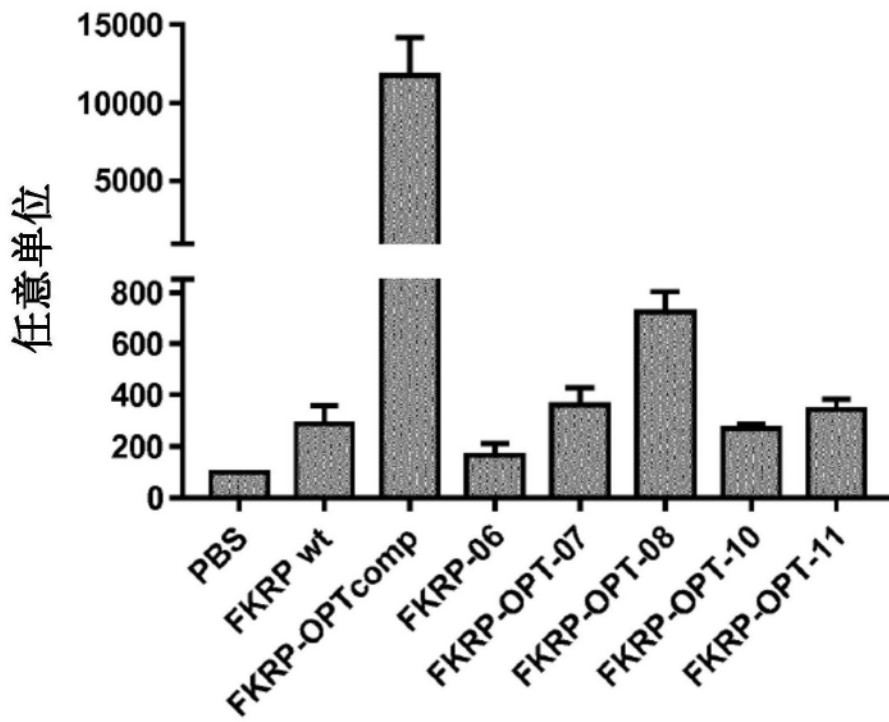


图2C

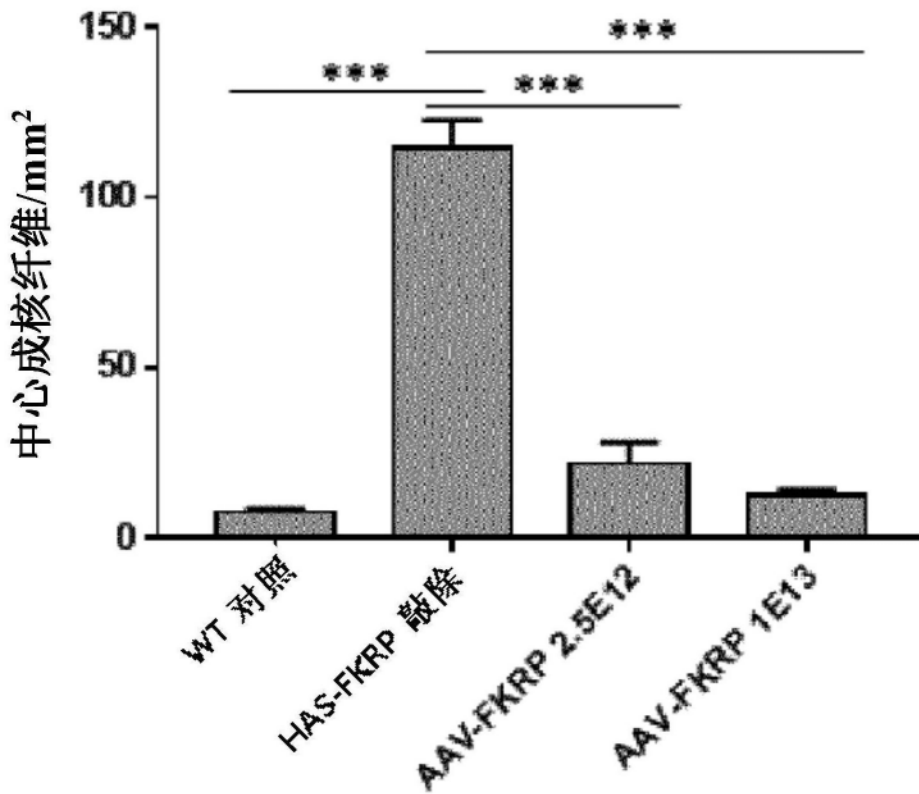


图3A

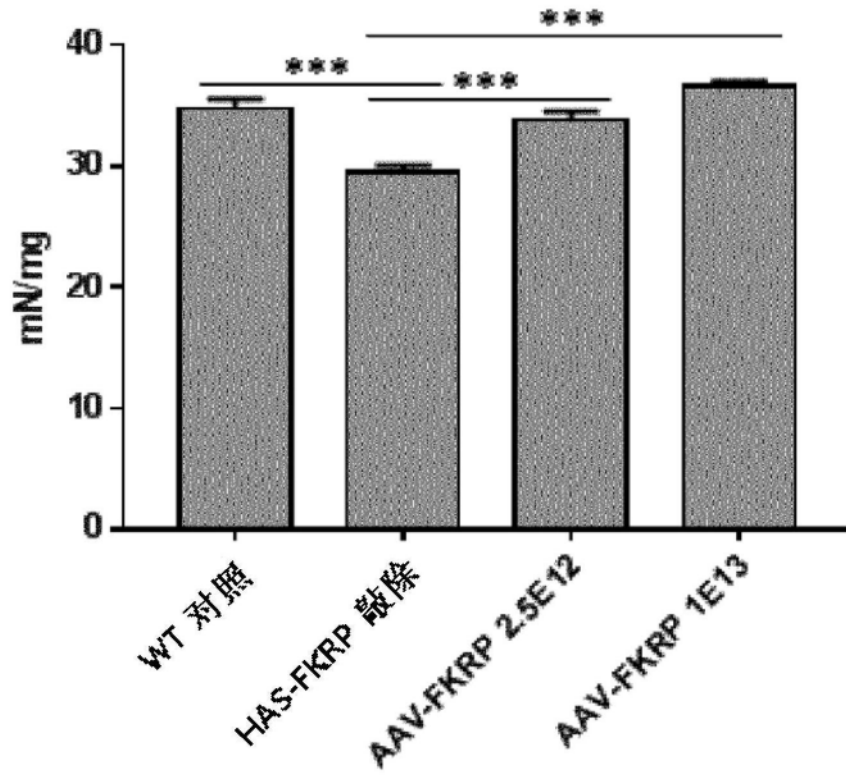


图3B

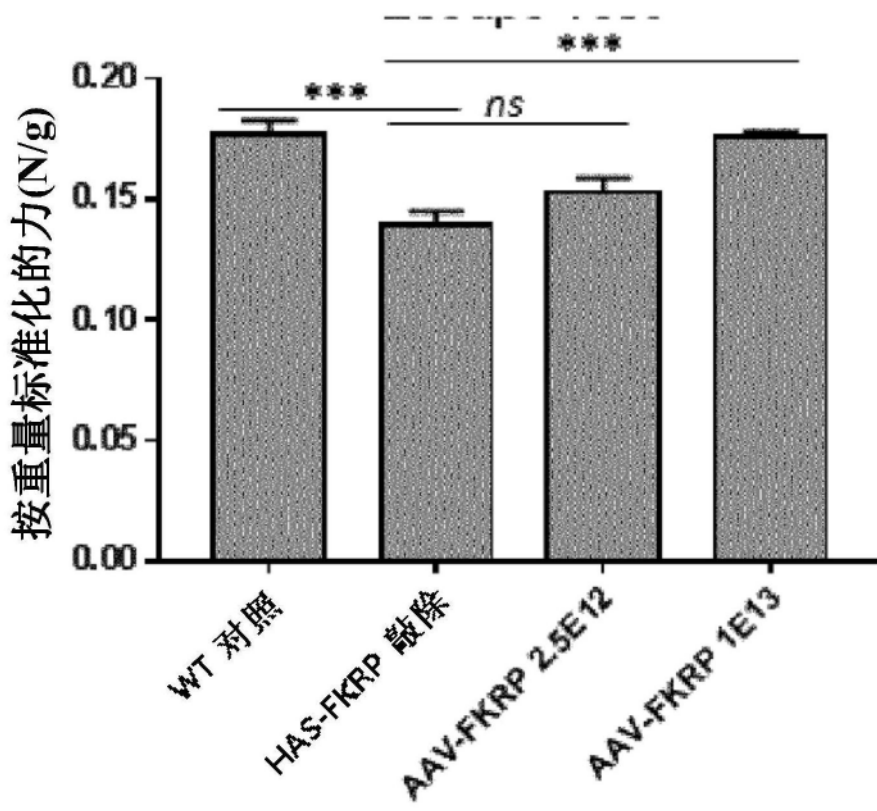


图3C