



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107557337 A

(43)申请公布日 2018.01.09

(21)申请号 201710832709.1

(22)申请日 2017.09.15

(71)申请人 山东兴瑞生物科技有限公司

地址 261500 山东省潍坊市高密市高新技术产业开发区

(72)发明人 刘明录 金海峰 王立新 韩国英 韩庆梅 强邦明 万磊 卢永汕

(74)专利代理机构 昆明合众智信知识产权事务所 53113

代理人 陈娟

(51)Int.Cl.

C12N 5/10(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

A61K 35/17(2015.01)

A61P 35/00(2006.01)

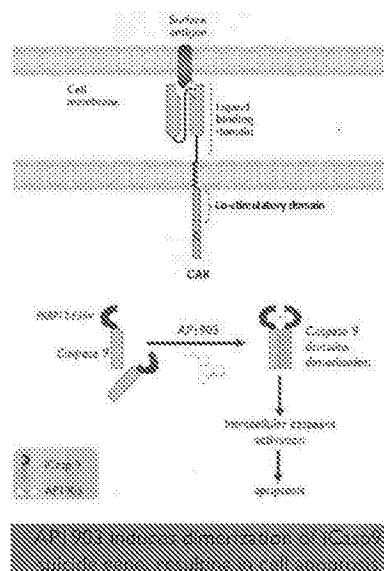
权利要求书1页 说明书5页
序列表5页 附图4页

(54)发明名称

一种抗ROR1安全型嵌合抗原受体修饰的免疫细胞及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种抗ROR1安全型嵌合抗原受体修饰的免疫细胞及其应用,免疫细胞经抗ROR1安全型嵌合受体修饰得到抗ROR1安全型嵌合抗原受体修饰的免疫细胞,所述抗ROR1安全型嵌合抗原受体包括,CD8 leader、ROR1结合区、CD8的铰链区,跨膜-刺激结构域、CD3ζ 刺激信号传导区和安全开关元件,该发明有效防止转导细胞引起不良反应,极大的提高CAR技术的临床有效性及安全性。



1. 一种抗ROR1安全型嵌合抗原受体修饰的免疫细胞,其特征在于:免疫细胞经抗ROR1安全型嵌合受体修饰得到抗ROR1安全型嵌合抗原受体修饰的免疫细胞,所述抗ROR1安全型嵌合抗原受体包括,CD8leader、ROR1结合区、CD8的铰链区,跨膜-刺激结构域、CD3 ζ 刺激信号传导区和安全开关元件。

2. 如权利要求1所述的一种抗ROR1安全型嵌合抗原受体修饰的免疫细胞,其特征在于:所述跨膜-刺激结构域选自CD8、CD27、CD28、CD137/4-1BB、CD134/OX40、ICOS分子其中之一的全部或部分片段。

3. 如权利要求1所述的一种抗ROR1安全型嵌合抗原受体修饰的免疫细胞,其特征在于:所述安全开关元件位于所述抗ROR1安全型嵌合抗原受体的N端或者C端。

4. 如权利要求1所述的一种抗ROR1安全型嵌合抗原受体修饰的免疫细胞,其特征在于:所述安全开关元件为FK506结合蛋白12-二聚化化学诱导子系统诱导的caspase9自杀基因安全开关,所述FK506结合蛋白12-二聚化化学诱导子系统包括人工构建的融合基因以及化学诱导物两部分,所述caspase9自杀基因融合于F36V-FKBP,在同型二聚体AP1903的作用下使F36V-FKBP发生二聚化,进而引起所述caspase9自杀基因的二聚化激活相关的调亡信号途径,诱导靶细胞的快速死亡。

5. 如权利要求1所述的一种抗ROR1安全型嵌合抗原受体修饰的免疫细胞,其特征在于:所述免疫细胞选自自体的或转基因的T细胞、NK细胞、细胞毒性T淋巴细胞或调节T细胞,记忆性T细胞、双特异性T细胞、CIK细胞其中的一种。

6. 如权利要求1所述的一种抗ROR1安全型嵌合抗原受体修饰的免疫细胞,其特征在于:所述抗ROR1安全型嵌合抗原受体的融合基因片段为F36V-FKBP-linker-caspase9-T2A-Leader-scFv (ROR1)-CD8-CD137-CD3 ζ 融合基因片段。

7. 如权利要求6所述的一种抗ROR1安全型嵌合抗原受体修饰的免疫细胞,其特征在于:所述F36V-FKBP-linker-caspase9-T2A-Leader-scFv (ROR1)-CD8-CD137-CD3 ζ 融合基因片段为序列SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列。

8. 一种治疗癌症的药物,其特征在于:含有权利要求1中所述的抗ROR1安全型嵌合抗原受体修饰的免疫细胞。

9. 权利要求1所述的抗ROR1安全型嵌合抗原受体修饰的免疫细胞用于制备治疗恶性肿瘤的药物的用途。

10. 如权利要求9所述的制备治疗恶性肿瘤的药物的用途,其特征在于:所述恶性肿瘤为B细胞恶性肿瘤、乳腺癌、结肠癌、卵巢癌、肺癌和肾癌等。

一种抗ROR1安全型嵌合抗原受体修饰的免疫细胞及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物基因领域,更具体的说,是一种抗ROR1安全型嵌合抗原受体修饰的免疫细胞及其应用。

背景技术

[0002] 受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(receptor tyrosine kinase-like orphan receptor-1,ROR1)是近年来发现的肿瘤相关性胚胎抗原,属于ROR亚族的细胞表面受体。在胚胎形成期高表达,但是在正常的成熟组织中不表达,除了在不成熟的B细胞前体亚组和脂肪细胞上低表达以外。目前研究也发现ROR1在多种B细胞恶性肿瘤上和多种实体瘤中如乳腺癌、结肠癌、肺癌、卵巢癌、肾癌中呈高表达,并与肿瘤的发展和预后密切相关。因此,ROR1是恶性肿瘤靶向治疗的理想分子靶点。

[0003] 恶性肿瘤是临床上常见的多发病,其发病率及其死亡率呈逐年上升趋势,已经成为影响全人类生命与健康的问题之一。目前治疗方法除了放疗、化疗、手术外,过继性免疫治疗尤其是嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR)修饰的T细胞免疫治疗(CAR-T)也逐渐在肿瘤治疗中得到应用。CAR-T是一种结合T细胞免疫治疗和抗体靶向治疗的治疗手段,具有特异性识别并杀伤肿瘤细胞的能力,其突出优点是可以克服MHC限制性。目前在临床应用的案例已取得令人振奋的结果,有完全治愈急性或慢性淋巴细胞白血病的报道。然而,CAR-T细胞在治疗实体肿瘤时,由于潜在的脱靶毒性,使其安全性成为了其在实体瘤治疗应用上的关键问题(国际上第一例CAR-T治疗死亡的案例就是为HER2阳性患者治疗时,引起正常肺组织表达的HER2受到CAR-T细胞攻击导致)。针对这个问题,研究发现,当出现上述副作用或者想去除基因修饰的细胞时,诱导这些细胞凋亡起着必要的作用。

发明内容

[0004] 为了弥补以上不足,为提高CAR-T治疗的“可控性”和“安全性”本发明提供了一种抗ROR1安全型嵌合抗原受体修饰的免疫细胞及其应用。

[0005] 本发明的方案是:

[0006] 一种抗ROR1安全型嵌合抗原受体修饰的免疫细胞,免疫细胞经抗ROR1安全型嵌合受体修饰得到抗ROR1安全型嵌合抗原受体修饰的免疫细胞,所述抗ROR1安全型嵌合抗原受体包括,CD8leader、ROR1结合区、CD8的铰链区,跨膜-刺激结构域、CD3 ζ 刺激信号传导区和安全开关元件。

[0007] 作为优选的技术方案,所述安全开关元件位于所述抗ROR1安全型嵌合抗原受体的N端或者C端。

[0008] 作为优选的技术方案,所述跨膜-刺激结构域选自CD8、CD27、CD28、CD137/4-1BB、CD134/OX40、ICOS分子的全部或部分片段。

[0009] 作为优选的技术方案,所述安全开关元件为FK506结合蛋白12-二聚化化学诱导子系统(FK506binding protein 12-chemical inducers of dimerizations,FKBP12-CID)诱

导的caspase9自杀基因安全开关,所述FK506结合蛋白12-二聚化化学诱导子系统包括人工构建的融合基因以及化学诱导物两部分,所述caspase9自杀基因融合于F36V-FKBP (FKBP12的突变体36位上的Phe被Val替代),在同型二聚体AP1903的作用下使F36V-FKBP发生二聚化,进而引起所述caspase9自杀基因的二聚化激活相关的调亡信号途径,诱导靶细胞的快速死亡。

[0010] 作为优选的技术方案,本发明抗ROR1安全型嵌合抗原受体修饰的免疫细胞选自自体的或转基因的T细胞、NK细胞、细胞毒性T淋巴细胞或调节T细胞,记忆性T细胞、双特异性T细胞、CIK细胞。

[0011] 作为优选的技术方案,所述抗ROR1安全型嵌合抗原受体的融合基因片段为F36V-FKBP-linker-caspase9-T2A-Leader-scFv (ROR1)-CD8-CD137-CD3 ζ 融合基因片段。

[0012] 作为优选的技术方案,所述F36V-FKBP-linker-caspase9-T2A-Leader-scFv (ROR1)-CD8-CD137-CD3 ζ 融合基因片段为序列表SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列。

[0013] 本发明还公开了一种治疗癌症的药物,含有所述抗ROR1安全型嵌合抗原受体修饰的免疫细胞。

[0014] 一种抗ROR1安全型嵌合抗原受体修饰的免疫细胞用于制备治疗恶性肿瘤的药物的用途。

[0015] 优选的技术方案,所述恶性肿瘤为B细胞恶性肿瘤、乳腺癌、结肠癌、卵巢癌、肺癌和肾癌。

[0016] 由于采用了上述技术方案,一种抗ROR1安全型嵌合抗原受体修饰的免疫细胞,免疫细胞经抗ROR1安全型嵌合受体修饰得到抗ROR1安全型嵌合抗原受体修饰的免疫细胞,所述抗ROR1安全型嵌合抗原受体包括,CD8 leader、ROR1结合区、CD8的较链区,跨膜-刺激结构域、CD3 ζ 刺激信号传导区和安全开关元件。

[0017] 该发明优点:

[0018] 1. 本发明所述F36V-FKBP诱导的caspase9自杀基因系统,与其它自杀基因系统相比,能够高效快速的诱导细胞调亡,同型二聚体AP1903的作用12h时细胞调亡率就可到达99%,而采用现有HSV-TK自杀基因系统需要在更昔洛韦的作用下持续3天才能达到此效果。并且该系统中的成分几乎全部是人源性的,防止转导细胞引起免疫反应。

[0019] 2. 本发明所述F36V-FKBP诱导的caspase9自杀基因系统通过自裂解多肽T2A与重组嵌合抗原受体其它功能结构域相连。CAR在转入细胞翻译成蛋白后,T2A通过自切使安全开关元件与重组嵌合抗原受体其它功能结构域分开,使得嵌合抗原受体和安全开关元件在结构和功能上不受影响,并且两者的表达水平一致。

[0020] 3. 本发明在第二代、第三代CAR技术上进行改造,加入了F36V-FKBP诱导的caspase9自杀基因区域,可以在保障治疗效果的同时避免了CAR-CIK治疗的毒副作用。并且本发明适用于任何可被CAR技术改造的免疫效应细胞,极大的提高CAR技术的临床有效性及安全性。

附图说明

[0021] 图1为本发明所述安全型嵌合抗原受体原理设计图

[0022] 图2为本发明所述的嵌合抗原受体F36V-FKBP-linker-caspase9-T2A-Leader-

scFv (ROR1)-CD8-CD137-CD3 ζ 的融合基因片段的设计图。

[0023] 图3为本发明所述的慢病毒F36V-FKBP-linker-caspase9-T2A-Leader-scFv (ROR1)-CD8-CD137-CD3 ζ 表达质粒的示意图。

[0024] 图4为本发明CAR-CIK细胞的表达CAR的效率为37.4%。

[0025] 图5为本发明CAR-CIK体内抑制ROR1阳性乳腺癌细胞系MDA-MB-231细胞的生长,且CAR-T活性受AP1903的控制。

具体实施方式

[0026] 为了使本发明实现的技术手段、创作特征、达成目的与功效易于明白了解,下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。

[0027] 实施例1表达本发明核酸编码的嵌合抗原受体蛋白的慢病毒质粒的构建及病毒包装

[0028] 1.将融合基因片段F36V-FKBP-linker-caspase9-T2A-Leader-scFv (ROR1)-CD8-CD137-CD3 ζ 插入慢病毒表达载体pLent-C-GFP。

[0029] F36V-FKBP-linker-caspase9-T2A-Leader-scFv (ROR1)-CD8-CD137-CD3 ζ 模块示意图见图2(完整核酸序列见附录SEQ ID NO.1)。

[0030] F36V-FKBP-linker-caspase9-T2A-Leader-scFv (ROR1)-CD8-CD137-CD3 ζ 的CAR各模块序列

[0031] (1) F36V-FKBP核酸人工序列 (SEQ ID NO.2)

[0032] (2) linker核酸人工序列 (SEQ ID NO.3)

[0033] (3) caspase9核酸人工序列 (SEQ ID NO.4)

[0034] (4) 自裂解多肽T2A核酸人工序列 (SEQ ID NO.5)

[0035] (5) 导引子Leader核酸人工序列 (SEQ ID NO.6)

[0036] (6) Anti-ROR1single chain Fv antibody (scFv) 核酸人工序列 (SEQ ID NO.7)

[0037] (7) CD8Hinge区核酸人工序列 (SEQ ID NO.8)

[0038] (8) CD8跨膜区核酸人工序列 (SEQ ID NO.9)

[0039] (9) CD137胞内区核酸人工序列 (SEQ ID NO.10)

[0040] (10) CD3 ζ 胞内区核酸人工序列 (SEQ ID NO.11)

[0041] 分别按导引子F36V-FKBP核酸人工序列、linker核酸人工序列、caspase9核酸人工序列、自裂解多肽T2A核酸人工序列、Leader的核酸人工序列、Anti-ROR1的核酸人工序列、CD8Hinge区核酸人工序列、CD8跨膜区的核酸人工序列、CD137的核酸人工序列、CD3 ζ 的核酸人工序列委托生工生物工程(上海)有限公司合成其整个表达框,插入pLent-C-GFP载体 (Invitrogen)NotI-AsiSI位点(见图3),转化到E.coli (DH5 α),经测序正确后,使用Qiagen公司的质粒纯化试剂盒提取并纯化质粒,获得重组表达载体的高品质质粒。

[0042] 2.慢病毒包装,滴度检测

[0043] 将慢病毒包装细胞系293T接种于含有DMEM+10%FBS 10cm培养皿中,37 $^{\circ}$ C,5%的CO $_2$ 条件下培养,贴壁率为70%-80%后进行转染。重组质粒和空载质粒分别与慢病毒包装质粒采用磷酸钙转染法共转染293T细胞,具体方法参考分子克隆。转染后24h后,细胞明显增大、呈球形,细胞核变大,变圆,贴壁能力下降而易脱落。48h后在倒置荧光显微镜下观察

到细胞内有绿色荧光蛋白表达。72h后,收集上清,过滤除菌,在-80℃低温冰箱中保存备用。根据Lenti-X™ Go Stix™试剂盒(北京华夏远洋科技有限公司产品)测定病毒滴度,结果表明,重组慢病毒的滴度 2.89×10^6 pfu/mL。

[0044] 实施例2慢病毒感染CIK细胞

[0045] 1. CIK细胞的制备

[0046] 取75ml患者自体外周血,用TBD样本密度分离液(购自天津灏洋华科生物),分离外周血单个核细胞。用含有1000IU/ml的重组干扰素 α 2a(购自沈阳三生制药)的培养基(购自CORNING公司,88-551-CM)诱导培养24小时后,加入1000IU/ml的重组白细胞介素2(购自沈阳三生制药)、50ng/ml的OKT-3和5%的患者自体血浆诱导继续培养24小时。每隔两天倍比加液,培养至第14天,流式细胞术检测CIK细胞中的CD3+、CD56+的阳性表达率(CD3-FITC, CD16/CD56-PE抗体购自BECKMAN公司,A07735)。CD3+阳性率 $>80\%$, CD3+CD56+双阳性率 $>20\%$,视为CIK诱导成功,并留取该CIK待病毒感染。

[0047] 2. 慢病毒感染CIK细胞及感染后CIK细胞的扩增培养

[0048] 以MOI=5用上述重组和空载慢病毒分别感染CIK细胞。感染后的细胞37℃,5%CO₂培养箱中培养8小时后,收集细胞,重新加入病毒液,1000g,32℃,再次离心90分钟后,37℃,5%CO₂培养箱中继续培养,如此反复进行多重感染,提高CIK细胞的感染效率。吸弃2ml培养上清,加入2ml的新鲜CORNING培养基,继续扩大培养,培养17天至细胞扩增至足够的用量。通过FC500流式细胞仪(购自BECKMAN公司)FL1通道检测嵌合抗原受体表达(图4)。以未感染的CIK淋巴细胞作为阴性对照,重组慢病毒感染CIK细胞其阳性率37.4%。

[0049] 实施例3:具有安全“开关”的CAR-CIK细胞杀伤活性研究

[0050] ROR1阳性的乳腺癌细胞系MDA-MB-231作为靶细胞,效应细胞为CAR-CIK细胞和空载慢病毒感染CIK。

[0051] 1. 安全“开关”对CAR-CIK细胞的控制有效性分析

[0052] 将CAR-CIK细胞按照密度 1×10^5 个/ml接种96孔板中,每孔100 μ l,置于5%CO₂、37℃培养箱培养24h;加入10nM AP1903(美国Apexbio产品),12h后每孔加入20 μ L CCK-8(MCE公司产品),继续孵育2h后上酶标仪检测,于450nm波长处读取OD值。设置未加AP1903的CAR-CIK细胞对照组和只加AP1903无细胞的空白对照组。CIK细胞的死亡率=[1-(加AP1903组OD值-空白对照组OD值)/(未加AP1903组OD值-空白对照组OD值)] $\times 100\%$ 。CIK细胞的死亡率为37.05%,AP1903对CAR-CIK细胞活性的控制率=死亡率/重组慢病毒感染CIK的阳性率=99.06%;结果说明本发明设计的CAR-CIK细胞活性受AP1903的控制,极大的提高CAR技术的临床有效性及安全性。

[0053] 2. CAR-CIK细胞对ROR1阳性肿瘤细胞系杀伤活性分析

[0054] 接种100 μ l 1×10^5 /孔的靶细胞MDA-MB-231到96孔细胞培养板中,设置效应细胞对照组和靶细胞对照组,并按照1:2效靶比加入效应细胞即CAR-CIK细胞,置于5%CO₂、37℃培养箱培养24h后每孔加入20 μ L CCK-8,继续孵育2h后上酶标仪检测,于450nm波长处读取OD值,杀伤率=[1-(实验组OD值-效应细胞对照组OD值)/靶细胞对照组OD值] $\times 100\%$ 。以空载慢病毒感染CIK作为对照组。CAR-CIK细胞对ROR1阳性肿瘤细胞系MDA-MB-231细胞的杀伤效率为92.25% $\pm 2.09\%$;结果说明本发明设计的CAR-CIK细胞对ROR1阳性肿瘤细胞系MDA-MB-231具有很高杀伤作用。

[0055] 实施例4: CAR-CIK细胞对KM小鼠肿瘤生长抑制作用

[0056] 18-22g雌性KM小鼠(购自广州中医药大学)于动物房饲养(室温 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度 $50\%\pm 10\%$), 收集对数期的乳腺癌细胞系MDA-MB-231细胞, 磷酸盐缓冲液(PBS)稀释至 2×10^5 个/mL。无菌条件下, 小鼠左腋下接种0.2mL MDA-MB-231细胞悬浮液, 观察3-5d, 待腋下出现米粒大小较硬的结节作为建模成功标准。乳腺癌移植瘤模型小鼠(游标卡尺量取皮下肿瘤组织块的大小为 $90-100\text{mm}^3$)随机分成4组, 每组20只, 开始注射治疗实验。实验组分别为:

[0057] a. 对照组, 尾部静脉注射同等体积的生理盐水, 持续观察14d;

[0058] b. 治疗一组, 尾部静脉注射 2×10^6 个细胞/只CAR-CIK细胞, 首次注射后2天再进行第二次同剂量注射, 持续观察14d;

[0059] c. 治疗二组, 尾部静脉注射 2×10^6 个细胞/只CAR-CIK细胞, 首次注射后2天再进行第二次同剂量注射, 且每次治疗注射2h后, 尾部静脉注射AP1903(0.01-100mg/kg), 持续观察14d;

[0060] d. 治疗三组, 尾部静脉注射 2×10^6 个细胞/只CAR-CIK细胞, 首次注射后2天再进行第二次同剂量注射, 且二次治疗注射2h后, 尾部静脉注射AP1903(0.01-100mg/kg), 持续观察14d。

[0061] 每天通过游标卡尺量取各个实验组小鼠皮下肿瘤组织块大小, 并记录, 用肿块均值绘制肿瘤生长曲线图, 结果如图5所示。注射CAR-CIK细胞后第2天, 60%小鼠的肿瘤开始变小, 在10天时, 92%小鼠触摸不到肿瘤。在14天时, 100%小鼠触摸不到肿瘤。注射CAR-CIK细胞后再注射AP1903, 肿瘤肿块变大, 且生长趋势与不注射CAR-CIK细胞完全一致, 说明AP1903通过消除CAR-CIK细胞抑制了CAR-CIK对肿瘤的作用, 从而也防止CAR-CIK细胞对正常的组织和器官的旁系损伤减少毒副作用。

[0062] 结论本发明设计的CAR-CIK细胞对KM小鼠肿瘤生长有明显的抑制作用, 且“有效性”受AP1903的控制。

[0063] 实施例5: CAR-CIK细胞临床应用方法

[0064] 用于ROR1阳性肿瘤病人的治疗, 治疗方法是局部肿瘤注射和静脉回输 2×10^6 个CAR-CIK细胞。若有不良反应的发生, 则局部肿瘤注射和静脉回输AP1903(0.01-100mg/kg)。

[0065] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征及本发明的优点。本行业的技术人员应该了解, 本发明不受上述实施例的限制, 上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理, 在不脱离本发明精神和范围的前提下, 本发明还会有各种变化和改进, 这些变化和改进都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等效物界。

序列表

<110> 山东兴瑞生物科技有限公司

<120> 一种抗ROR1安全型嵌合抗原受体修饰的免疫细胞及其应用

<130> 2017

<160> 11

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 2758

<212> DNA

<213> 人种 (Homo sapiens)

<400> 1

```

ggatccgcga tcgcatgctg gagggagtgc aggtggagac tattagcccc ggagatggca 60
gaacattccc caaaagagga cagaattgcg tcgtgcatta tactggaatg ctggaagacg 120
gcaagaaggt ggacagcagc cgggaccgaa acaagcctt caagttcatg ctggggaagc 180
aggaagtgat ccggggctgg gaggaaggag tcgcacagat gtcagtggga cagagggcc 240
aactgactat tagcccagac tacgettatg gagcaaccgg ccacccggg atcattcccc 300
ctcatgctac actggtcttc gatgtggagc tgctgaagct ggaaagcgga ggaggatccg 360
gagtggacgg gtttggagat gtgggagccc tggaatcctt gcggggcaat gccgatctgg 420
cttacatcct gtctatggag ccttgcggcc actgtctgat cattaacaat gtgaacttct 480
gcagagagag cgggctgcgg accagaacag gatccaatat tgactgtgaa aagctgcgga 540
gaaggttctc tagtctgcac tttatggtcg aggtgaaagg cgatctgacc gctaagaaaa 600
tggtgctggc cctgctggaa ctggctcggc aggaccatgg ggcactggat tgctgcgtgg 660
tcgtgatcct gtagtcacgc tgccaggett cacatctgca gttccctggg gcagtctatg 720
gaactgacgg ctgtccagtc agcgtggaga agatcgtgaa catcttcaac ggcacctctt 780
gccaagtctt gggcgggaag cccaaactgt tctttattca ggccctgtgga ggcgagcaga 840
aagatcacgg cttcgaagtg gctagcacct cccccagga cgaatcacct ggaagcaacc 900
ctgagccaga tgcaaccccc ttccaggaag gctgaggac atttgaccag ctggatgcc 960
tctcaagcct gcccacacct tctgacattt tcgtctctta cagtactttc cctggatttg 1020
tgagctggcg cgatccaaag tcaggcagct ggtacgtgga gacactggac gatatctttg 1080
agcagtgggc ccattctgaa gacctgcaga gtctgtctgt gcgagtggcc aatgctgtct 1140
ctgtgaaggg gatctacaaa cagatgccag gatgcttcaa ctttctgaga aagaaactgt 1200
tctttaagac ctccgcattt agggccgaag gccgaggag cctgctgaca tgtggcgatg 1260
tgaggaaaaa cccaggacca atggcctgc ctgtgacage cctgctgctg cctctggctc 1320
tgctgctgca tgccgctaga cccgaggtgc agctggtgga gtctggggga ggcttggtac 1380
agccagggcg gtccctgaga ctctcctgta cagcttctgg atctgacatt aatgattatc 1440
ctattagctg gttccgccag getccaggga aggggctgga gtgggtaggt ttattaata 1500
gcggtgggtc tacatggtac gcctcgtggg tgaaaggcag attcaccatc tcaagagatg 1560
attccaaaag catgcctat ctgcaaatga acagcctgaa aaccgatgac acagccactt 1620

```


atttctgtgc tagaggatac tccacgtatt atggtgattt taatatctgg ggccaaggga 1680
 caatggtcac cgtctcgagc ggaggaggag gaagcggagg aggaggaagc ggaggaggag 1740
 gaagcgacgt tgtgatgacc cagtctcett cctctctgtc tgcattctgta ggagacagag 1800
 tcaccatcac ttgccaagcc agtcagagta ttgatagcaa tttggcctgg tttcagcaga 1860
 aaccagggaa agcccctaac ctctgatct atagggcgtc taatttagct agtggggtcc 1920
 cgtcaagggtt cagcggcagt ggatctggga cagaattcac tctcaccatc agcagcctgg 1980
 gaagagaaga tgctgcaact tattactgtc ttggaggagt tggaaatgtt tcttacagaa 2040
 cttcgttcgg ccaagggacc aaggtggaaa tcaaaaccac gacgccagcg ccgcgaccac 2100
 caacaccggc gccaccatc gcgtcgcagc cctgtcctt gcgccagag gcgtgccggc 2160
 cagcggcggg gggcgcagtg cacacgaggg ggctggactt cgctgtgat atctacatct 2220
 gggcgccctt ggccgggact tgtggggctc ttctctgtc actggttate accctttact 2280
 gcaaacgggg cagaaagaaa ctctgtata tattcaaaca accatttatg agaccagtac 2340
 aaactactca agaggaagat ggetgtagct gccatttcc agaagaagaa gaaggaggat 2400
 gtgaactgag agtgaagtc agcaggagcg cagacgccc cgcgtacaag cagggccaga 2460
 accagctcta taacgagtc aatctaggac gaagagagga gtacgatgtt ttggacaaga 2520
 gacgtggccg ggaccctgag atggggggaa agccgagaag gaagaacct caggaaggcc 2580
 tgtacaatga actgcagaaa gataagatgg cggaggccta cagtgagatt gggatgaaag 2640
 gcgagcgccg gaggggcaag gggcacgatg gcctttacca ggtctcagt acagccacca 2700
 aggacaccta cgacgccctt cacatgcagg cctgcccc tcgcgcggcc gcctcgag 2758

<210> 2

<211> 330

<212> DNA

<213> 人种 (Homo sapiens)

<400> 2

atgctggagg gactgcaggt ggagactatt agccccggag atggcagaac attccccaaa 60
 agaggacaga cttgcgtcgt gcattatact ggaatgctgg aagacggcaa gaaggtggac 120
 agcagccggg accgaaacaa gcccttcaag ttcatgctgg ggaagcagga agtgatccgg 180
 ggctgggagg aaggagtcgc acagatgtca gtgggacaga gggccaaact gactattagc 240
 ccagactacg cttatggagc aaccggccac cccgggatca ttccccctca tgctacactg 300
 gtcttcgatg tggagctgct gaagctggaa 330

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 人种 (Homo sapiens)

<400> 3

agcggaggag gatccgga 18

<210> 4

<211> 864

<212> DNA

<213> 人种 (Homo sapiens)

<400> 4

gtggacgggt ttggagatgt gggagccctg gaatccctgc ggggcaatgc cgatctggct 60
 tacatcctgt ctatggagcc ttgcggccac tgtctgatca ttaacaatgt gaacttctgc 120
 agagagagcg ggctgcggac cagaacagga tccaatattg actgtgaaaa gctgcggaga 180
 aggttctcta gtctgcactt tatggtcgag gtgaaaggcg atctgaccgc taagaaaatg 240
 gtgctggccc tgctggaact ggctcggcag gaccatgggg cactggattg ctgcgtggtc 300
 gtgatcctga gtcacggctg ccaggettca catctgcagt tccctggggc agtctatgga 360
 actgacggct gtccagtcag cgtggagaag atcgtgaaca tcttcaacgg cacctcttgc 420
 ccaagtctgg gcggaagcc caaactgttc tttattcagg cctgtggagg cgagcagaaa 480
 gatcacggct tcgaagtggc tagcacctcc cccgaggacg aatcacctgg aagcaaccct 540
 gagccagatg caacccccct ccaggaagge ctgaggacat ttgaccagct ggatgccatc 600
 tcaagcctgc ccacacctc tgacatttcc gtctcttaca gtactttccc tggatttgtg 660
 agctggcgcg atccaaagtc aggcagctgg tacgtggaga cactggacga tatctttgag 720
 cagtgggccc attctgaaga cctgcagagt ctgetgetgc gagtggccaa tgctgtctct 780
 gtgaagggga tctacaaaca gatgccagga tgcttcaact ttctgagaaa gaaactgttc 840
 tttaaagacct ccgcatctag ggcc 864

<210> 5

<211> 54

<212> DNA

<213> 人种 (Homo sapiens)

<400> 5

gaaggccgag ggagcctgct gacatgtggc gatgtggagg aaaaccagc acca 54

<210> 6

<211> 63

<212> DNA

<213> 人种 (Homo sapiens)

<400> 6

atggccctgc ctgtgacage cctgetgetg cctctggctc tgctgetgca tgccgctaga 60
 ccc 63

<210> 7

<211> 795

<212> DNA

<213> 人种 (Homo sapiens)

<400> 7

atggccctgc ctgtgacage cctgetgetg cctctggctc tgctgetgca tgccgctaga 60
 cccgaggctgc agctggtgga gtctggggga ggcttggtac agccaggcg gtccctgaga 120
 ctctcctgta cagcttctgg atctgacatt aatgattatc ctattagctg gttccgccag 180
 gctccaggga aggggctgga gtgggtaggt ttcattaata gcggtgggctc tacatggtac 240

gcctcgtggg tgaaggcag attcaccatc tcaagagatg attccaaaag catcgcctat 300
 ctgcaaatga acagcctgaa aaccgatgac acagccactt atttctgtgc tagaggatac 360
 tccacgtatt atggtgattt taatatctgg ggccaaggga caatggtcac cgtctcgagc 420
 ggaggaggag gaagcggagg aggaggaagc ggaggaggag gaagcgacgt tgtgatgacc 480
 cagtctcctt cctctctgtc tgcattctgta ggagacagag tcaccatcac ttgccaagcc 540
 agtcagagta ttgatagcaa tttggcctgg tttcagcaga aaccagggaa agcccctaac 600
 ctctctgatct atagggcgtc taatttagct agtgggggtcc cgtcaagggt cagcggcagt 660
 ggatctggga cagaattcac tctcaccatc agcagcctgg gaagagaaga tgctgcaact 720
 tattactgtc ttggaggagt tggaaatggt tcttacagaa cttcgttcgg ccaagggacc 780
 aaggtggaaa tcaaa 795

<210> 8

<211> 135

<212> DNA

<213> 人种 (Homo sapiens)

<400> 8

accacgacgc cagcgcgcg accaccaaca ccggcgccca ccatecgcgc gcagcccctg 60
 tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg 120
 gacttcgcct gtgat 135

<210> 9

<211> 72

<212> DNA

<213> 人种 (Homo sapiens)

<400> 9

atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtgggggtcc ttctcctgtc actggttacc 60
 accctttact gc 72

<210> 10

<211> 126

<212> DNA

<213> 人种 (Homo sapiens)

<400> 10

aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacac catttatgag accagtacaa 60
 actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttcag aagaagaaga aggaggatgt 120
 gaactg 126

<210> 11

<211> 336

<212> DNA

<213> 人种 (Homo sapiens)

<400> 11

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc 60

tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttgacaa gagacgtggc 120
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180
gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300
tacgacgcc ttcacatgca ggcctgccc cctcgc 336

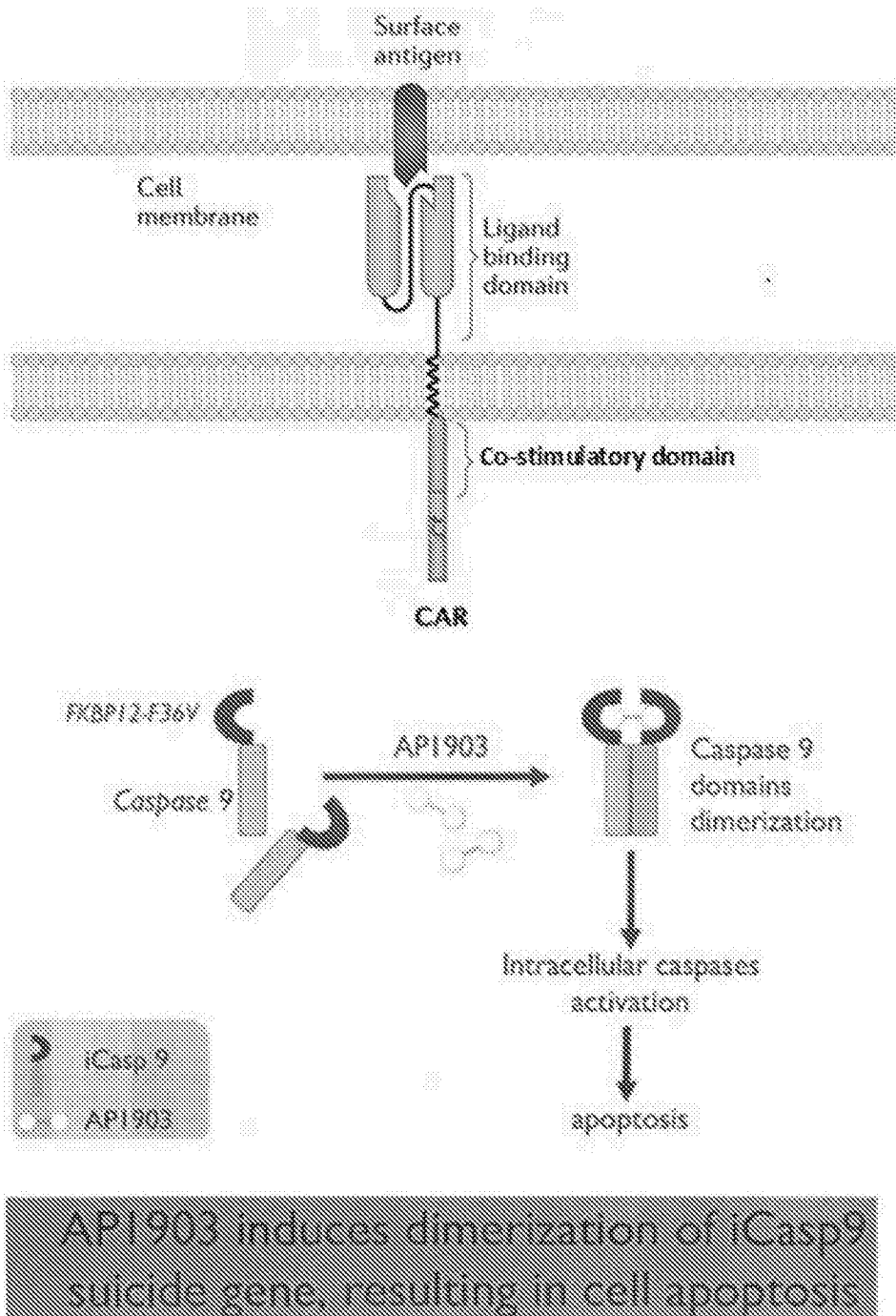


图1

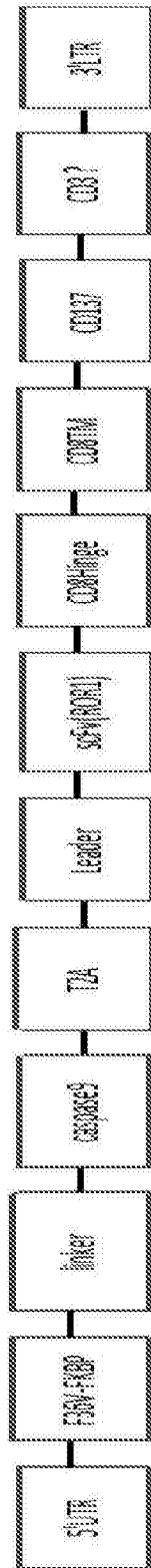


图2

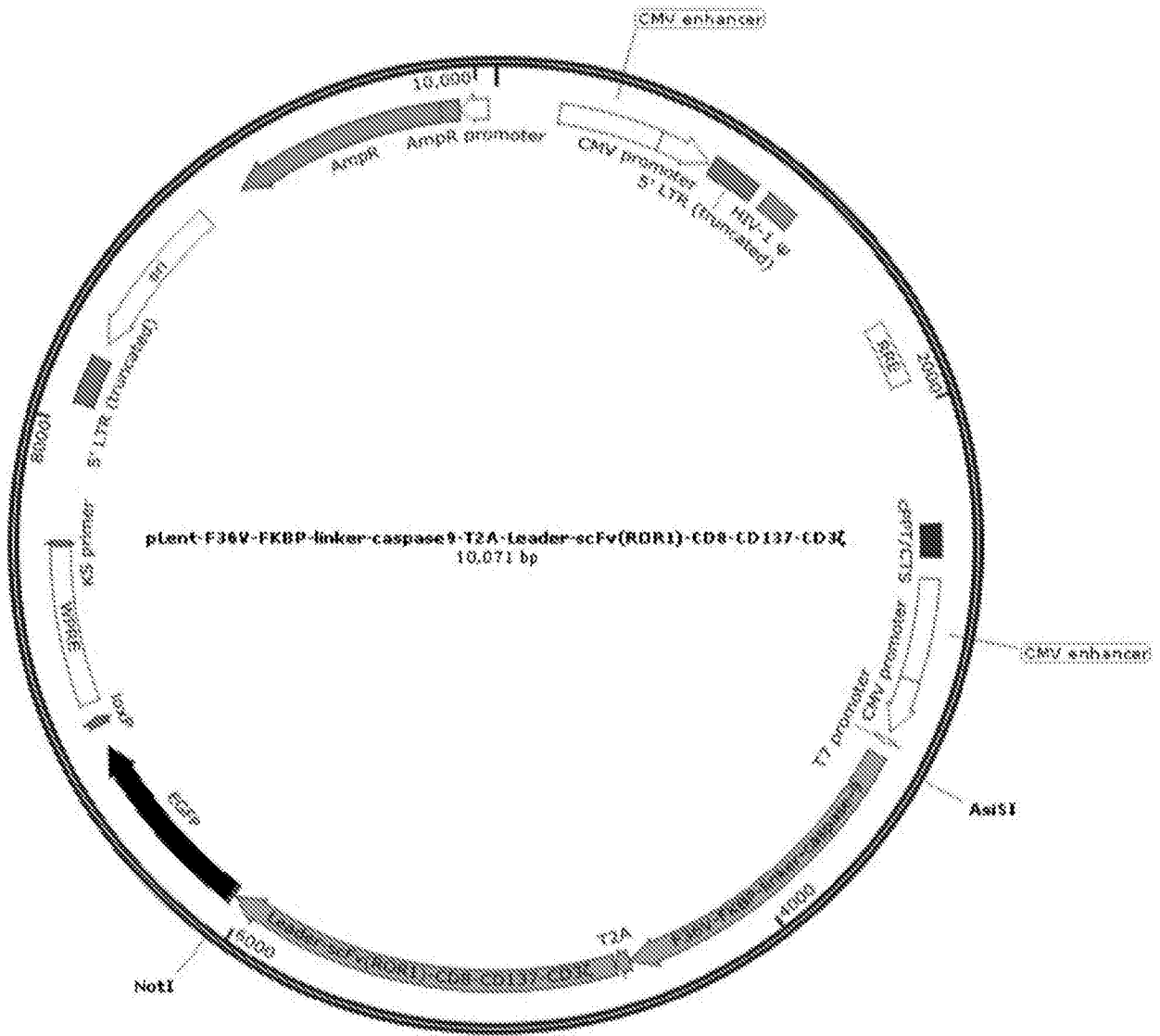


图3

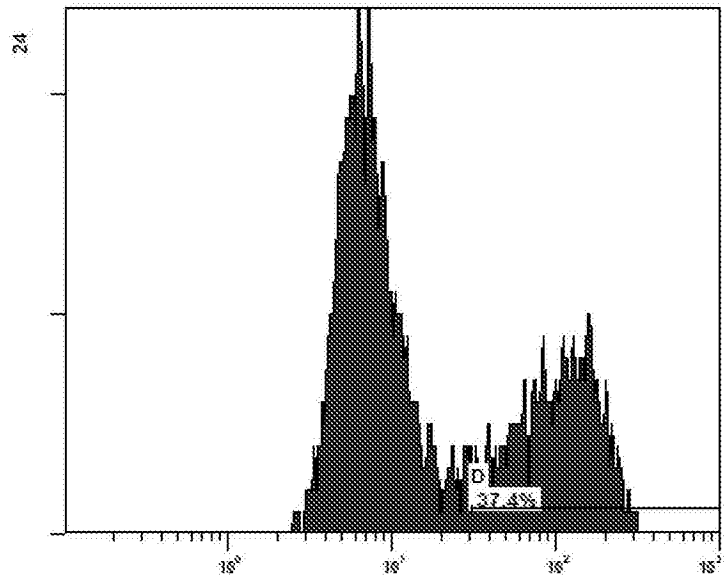


图4

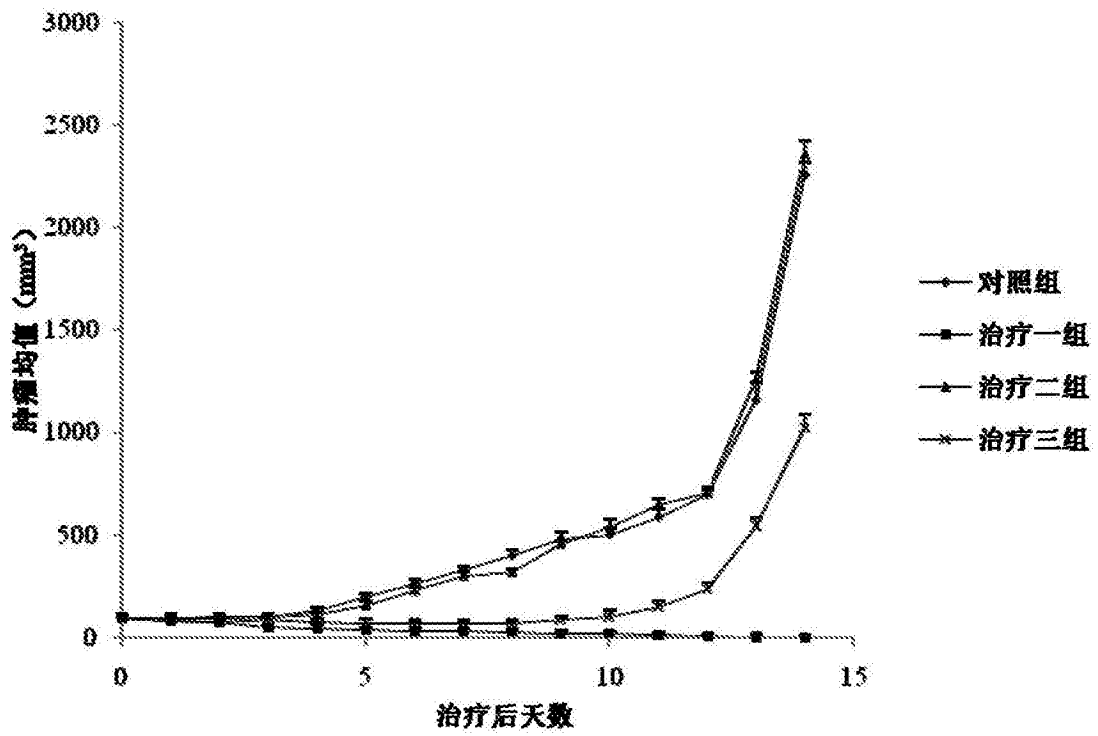


图5