(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119391775 A
(43)申请公布日 2025.02.07

(21)申请号 202411518110.7
(22)申请日 2020.11.04
(30)优先权数据
62/930520 2019.11.04 US
63/024959 2020.05.14 US
(62)分案原申请数据
202080091035.4 2020.11.04
(71)申请人 分贝治疗公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 J·伯恩斯 T·吉布森
G·普雷格尔尼
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 黄登高 彭昶
(51)Int.Cl.
C12N 15/864(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61K 31/7088(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
A61P 27/16(2006.01)
C12N 15/113(2010.01)

权利要求书2页 说明书63页
序列表（电子公布） 附图32页

(54)发明名称

前庭支持细胞启动子和其用途

(57)摘要

本公开涉及前庭支持细胞启动子和其用途。本公开提供了含有SLC6A14启动子的多核苷酸以及含有所述多核苷酸的载体,其可用于促进转基因在前庭支持细胞中的表达。本文所述的多核苷酸可以可操作地连接至转基因,例如编码治疗蛋白的转基因,以促进所述转基因的前庭支持细胞表达。本文所述的多核苷酸可以可操作地连接至治疗性转基因并用于治疗患有前庭功能障碍或具有患上前庭功能障碍的风险的受试者。

CN 119391775 A

1.一种核酸载体,所述核酸载体包含:

a.溶质载体家族6成员14(SLC6A14)启动子,其包含与SEQ ID NO:1-6中的任一者具有至少85%序列同一性的核苷酸序列,所述启动子可操作地连接至:

b.异源转基因,其中所述转基因编码治疗蛋白、短干扰RNA(siRNA)、反义寡核苷酸(ASO)、核酸酶,或者是微小RNA。

2.如权利要求1所述的核酸载体,其中所述SLC6A14启动子包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6的核苷酸序列。

3.如权利要求2所述的核酸载体,其中所述SLC6A14启动子包含SEQ ID NO:4的核苷酸序列。

4.如权利要求1-3中任一项所述的核酸载体,其中所述转基因编码治疗蛋白。

5.如权利要求4所述的核酸载体,其中所述治疗蛋白选自由以下组成的组:无调BHLH转录因子1(Atoh1)、婆罗双树样转录因子2(Sall2)、钙调蛋白结合转录激活因子1(Camta1)、具有YRPW基序2的Hes相关家族BHLH转录因子(Hey2)、Gata结合蛋白2(Gata2)、具有YRPW基序1的Hes相关家族BHLH转录因子(Hey1)、神经酰胺合酶2(Lass2)、SRY盒10(Sox10)、GATA结合蛋白3(Gata3)、Cut样同源异形盒1(Cux1)、核受体亚家族2F组成员(Nr2f1)、Hes相关家族BHLH转录因子(Hes1)、RAR相关孤儿受体B(Rorb)、Jun原癌基因AP-1转录因子亚基(Jun)、锌指蛋白667(Zfp667)、LIM同源异形盒3(Lhx3)、无义螺旋-环-螺旋1(Nhlh1)、MAX二聚化蛋白4(Mxd4)、MIZ-1型锌指(Zmiz1)、髓磷脂转录因子1(Myt1)、信号转导子和转录激活因子3(Stat3)、BarH样同源异形盒1(Barhl1)、胸腺细胞选择相关的高迁移率族盒(Tox)、Prospero同源异形盒1(Prox1)、核因子I A(Nfia)、甲状腺激素受体β(Thrb)、MYCL原癌基因BHLH转录因子(Mycl1)、赖氨酸去甲基酶5A(Kdm5a)、CAMP反应元件结合蛋白3样4(Creb3l4)、ETS变体1(Etv1)、父系表达的3(Peg3)、BTB结构域和CNC同源物2(Bach2)、ISL LIM同源异形盒1(Isl1)、锌指和含BTB结构域的38(Zbtb38)、肢芽和心脏发育(Lbh)、Tubby二分转录因子(Tub)、泛素C(Hmg20)、RE1沉默转录因子(Rest)、锌指蛋白827(Zfp827)、AF4/FMR2家族成员3(Aff3)、PBX/有节的1同源异形盒2(Pknox2)、富含AT的相互作用结构域3B(Arid3b)、MLX相互作用蛋白(Mlxip)、锌指蛋白(Zfp532)、IKAROS家族锌指2(Ikzf2)、婆罗双树样转录因子1(Sall1)、SIX同源异形盒2(Six2)、婆罗双树样转录因子3(Sall3)、Lin-28同源物B(Lin28b)、调节因子X7(Rfx7)、脑源性神经营养因子(Bdnf)、生长因子非依赖性1转录阻遏子(Gfi1)、POU 4类同源异形盒3(Pou4f3)、MYC原癌基因BHLH转录因子(Myc)、β-连环蛋白(Ctnnb1)、SRY盒2(Sox2)、SRY盒4(Sox4)、SRY盒11(Sox11)、TEA结构域转录因子2(Tead2)和Atoh1变体。

6.如权利要求5所述的核酸载体,其中所述治疗蛋白是Atoh1。

7.如权利要求1-6中任一项所述的核酸载体,其中所述核酸载体另外包含所述SLC6A14启动子5'的第一反向末端重复;和所述异源转基因3'并且以5'至3'顺序,任选的转录后调节元件、多聚腺苷酸化信号和第二反向末端重复。

8.如权利要求7所述的核酸载体,所述核酸载体包含SEQ ID NO:7的核苷酸233-2922、SEQ ID NO:7的核苷酸233-2922的5'的第一反向末端重复,其中所述5'反向末端重复与SEQ ID NO:7的核苷酸1-130具有至少80%序列同一性;和SEQ ID NO:7的核苷酸233-2922的3'的第二反向末端重复,其中所述3'反向末端重复与SEQ ID NO:7的核苷酸3010-3139具有至

少80％序列同一性。

9.如权利要求1-8中任一项所述的核酸载体,其中所述核酸载体是质粒。

10.如权利要求1-8中任一项所述的核酸载体,其中所述核酸载体是AAV病毒载体。

11.如权利要求10所述的核酸载体,其中所述AAV病毒载体具有AAV8衣壳。

12.一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求1-11中任一项所述的核酸载体和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

13.一种在哺乳动物前庭支持细胞(VSC)中表达转基因的方法,所述方法包括使所述哺乳动物VSC与权利要求1-11中任一项所述的核酸载体或权利要求12所述的组合物接触。

14.如权利要求13所述的方法,其中所述哺乳动物VSC是人类VSC。

前庭支持细胞启动子和其用途

[0001] 本申请是申请日为2020年11月4日,申请号为202080091035.4,发明名称为“前庭支持细胞启动子和其用途”的发明专利的分案申请。

背景技术

[0002] 前庭功能障碍是重大公共健康问题,其对生活质量有深远影响。大约35%的40岁及以上的美国成年人表现出平衡障碍,并且这个比例随年龄增长而显著增加,导致日常活动中断、情绪和认知下降以及老年人跌倒的盛行率增加。前庭功能障碍通常是获得性的,并且具有多种病因,包括疾病或感染、头部创伤、耳毒性药物和衰老。前庭功能障碍病因中的常见因素是内耳前庭毛细胞损伤。因此,旨在恢复毛细胞功能的疗法将有益于患有前庭功能障碍的患者。已知前庭支持细胞在损伤后自发分化为毛细胞,并因此可用作适于恢复毛细胞功能的治疗靶标。

发明内容

[0003] 本发明提供了促进目标基因(例如促进或改进毛细胞或支持细胞功能、再生、成熟、增殖或存活的基因)在特定细胞类型中的表达的组合物和方法。本文所述的组合物和方法涉及刺激转基因在内耳前庭支持细胞(VSC)中的转录的溶质载体家族6成员14(SLC6A14)启动子序列。本文所述的SLC6A14启动子序列可以可操作地连接至转基因,并且可施用于患者以治疗前庭功能障碍(例如眩晕、头晕、失衡、双侧前庭病、双侧前庭功能低下、振动幻视或平衡障碍)。

[0004] 在第一方面,本发明提供了核酸载体,其包含与SEQ ID NO:1-6中的任一者具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的多核苷酸。在一些实施方案中,多核苷酸与SEQ ID NO:1具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。在一些实施方案中,多核苷酸与SEQ ID NO:2具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。在一些实施方案中,多核苷酸与SEQ ID NO:3具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。在一些实施方案中,多核苷酸与SEQ ID NO:4具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。在一些实施方案中,多核苷酸与SEQ ID NO:5具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。在一些实施方案中,多核苷酸与SEQ ID NO:6具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。在一些实施方案中,多核苷酸具有SEQ ID NO:3的序列。在一些实施方案中,多核苷酸具有SEQ ID NO:4的序列。在一些实施方案中,多核苷酸具有SEQ ID

NO:5的序列。在一些实施方案中,多核苷酸具有SEQ ID NO:6的序列。在一些实施方案中,多核苷酸具有SEQ ID NO:2的序列。在一些实施方案中,多核苷酸具有SEQ ID NO:1的序列。

[0005] 在一些实施方案中,多核苷酸可操作地连接至转基因。在一些实施方案中,转基因是异源转基因。在一些实施方案中,转基因含有编码蛋白质(例如治疗蛋白或报告蛋白)、短干扰RNA(siRNA)、反义寡核苷酸(ASO)、核酸酶(例如CRISPR相关蛋白9(Cas9)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)、锌指核酸酶(ZFN)或向导RNA(gRNA))的多核苷酸序列,或者是微小RNA。在一些实施方案中,蛋白质是治疗蛋白。

[0006] 在一些实施方案中,多核苷酸能够引导蛋白质(例如治疗蛋白或报告蛋白)、siRNA、ASO、核酸酶或微小RNA在哺乳动物VSC中的前庭支持细胞(VSC)特异性表达。在一些实施方案中,VSC是人类VSC。

[0007] 在一些实施方案中,治疗蛋白是婆罗双树样转录因子2(Sall2)、钙调蛋白结合转录激活因子1(Camta1)、具有YRPW基序2的Hes相关家族BHLH转录因子(Hey2)、Gata结合蛋白2(Gata2)、具有YRPW基序1的Hes相关家族BHLH转录因子(Hey1)、神经酰胺合酶2(Lass2)、SRY盒10(Sox10)、GATA结合蛋白3(Gata3)、Cut样同源异形盒1(Cux1)、核受体亚家族2F组成员(Nr2f1)、Hes相关家族BHLH转录因子(Hes1)、RAR相关孤儿受体B(Rorb)、Jun原癌基因AP-1转录因子亚基(Jun)、锌指蛋白667(Zfp667)、LIM同源异形盒3(Lhx3)、无义螺旋-环-螺旋1(Nhlh1)、MAX二聚化蛋白4(Mxd4)、MIZ-1型锌指(Zmiz1)、髓磷脂转录因子1(Myt1)、信号转导子和转录激活因子3(Stat3)、BarH样同源异形盒1(Barhl1)、胸腺细胞选择相关的高迁移率族盒(Tox)、Prospero同源异形盒1(Prox1)、核因子I A(Nfia)、甲状腺激素受体β(Thrb)、MYCL原癌基因BHLH转录因子(Mycl1)、赖氨酸去甲基酶5A(Kdm5a)、CAMP反应元件结合蛋白3样4(Creb3I4)、ETS变体1(Etv1)、父系表达的3(Peg3)、BTB结构域和CNC同源物2(Bach2)、ISLLIM同源异形盒1(Isl1)、锌指和含BTB结构域的38(Zbtb38)、肢芽和心脏发育(Lbh)、Tubby二分转录因子(Tub)、泛素C(Hmg20)、RE1沉默转录因子(Rest)、锌指蛋白827(Zfp827)、AF4/FMR2家族成员3(Aff3)、PBX/有节的1同源异形盒2(Pknox2)、富含AT的相互作用结构域3B(Arid3b)、MLX相互作用蛋白(Mlxip)、锌指蛋白(Zfp532)、IKAROS家族锌指2(Ikzf2)、婆罗双树样转录因子1(Sall1)、SIX同源异形盒2(Six2)、婆罗双树样转录因子3(Sall3)、Lin-28同源物B(Lin28b)、调节因子X7(Rfx7)、脑源性神经营养因子(Bdnf)、生长因子非依赖性1转录阻遏子(Gfi1)、POU4类同源异形盒3(Pou4f3)、MYC原癌基因BHLH转录因子(Myc)、β-连环蛋白(Ctnnb1)、SRY盒2(Sox2)、SRY盒4(Sox4)、SRY盒11(Sox11)、TEA结构域转录因子2(Tead2)、无调BHLH转录因子1(Atoh1)或Atoh1变体。在一些实施方案中,Atoh1变体具有一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:S328A、S331A、S334A、S328A/S331A、S328A/S334A、S331A/S334A和S328A/S331A/S334。在一些实施方案中,治疗蛋白是Atoh1(例如人类Atoh1)。在一些实施方案中,Atoh1蛋白包含SEQ ID NO:10的序列或其具有一个或多个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个)保守氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,Atoh1蛋白变体中不超过10%(10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少)的氨基酸是保守氨基酸取代。在一些实施方案中,Atoh1蛋白由SEQ ID NO:10的序列组成。在一些实施方案中,Atoh1蛋白是由SEQ ID NO:11的序列编码。

[0008] 在一些实施方案中,核酸载体还包括反向末端重复序列(ITR)。在核酸载体包括可

操作地连接至转基因的本发明多核苷酸的实施方案中,核酸载体包括多核苷酸5'的第一ITR序列和转基因3'的第二ITR序列。在一些实施方案中,ITR是AAV2 ITR。在一些实施方案中,ITR与AAV2 ITR具有至少80%序列同一性(例如至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)。

[0009] 在一些实施方案中,核酸载体还包括多聚腺苷酸化(poly(A))序列。在一些实施方案中,poly(A)序列是牛生长激素(bGH)poly(A)信号序列。在核酸载体包括可操作地连接至转基因的本发明多核苷酸的实施方案中,poly(A)序列定位于转基因的3'。在核酸载体包括第一和第二ITR序列以及可操作地连接至转基因的本发明多核苷酸的实施方案中,poly(A)序列定位于转基因的3'和第二ITR序列的5'。

[0010] 在一些实施方案中,核酸载体还包括土拨鼠(Woodchuck)转录后调节元件(WPRE)。在一些实施方案中,WPRE具有SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15的序列。在核酸载体包括可操作地连接至转基因的本发明多核苷酸的实施方案中,WPRE定位于转基因的3'。在核酸载体包括可操作地连接至转基因的本发明多核苷酸和poly(A)序列的实施方案中,WPRE定位于转基因的3'和poly(A)序列的5'。

[0011] 在一些实施方案中,核酸载体含有包含SEQ ID NO:7的核苷酸233-2922的序列的多核苷酸序列。

[0012] 在一些实施方案中,本发明的核酸载体包括SLC6A14启动子(例如SEQ ID NO:1-6中任一者的多核苷酸),其可操作地连接至编码人类Atoh1(人类ATOH1蛋白=RefSeq登录号NP_005163(SEQ ID NO:10);mRNA序列=RefSeq登录号NM_005172)的多核苷酸序列。在一些更具体实施方案中,本发明的核酸载体包括SEQ ID NO:4的SLC6A14启动子,其可操作地连接至编码人类Atoh1的多核苷酸序列(例如编码SEQ ID NO:10的多核苷酸序列,例如SEQ ID NO:11的多核苷酸序列)。在一些甚至更具体实施方案中,核酸载体以5'至3'顺序包括第一反向末端重复;SEQ ID NO:4的SLC6A14启动子;可操作地连接至SLC6A14启动子的编码人类Atoh1的多核苷酸序列;多聚腺苷酸化序列;和第二反向末端重复。在其他更具体实施方案中,核酸载体以5'至3'顺序包括第一反向末端重复;SEQ ID NO:4的SLC6A14启动子;可操作地连接至SLC6A14启动子的编码人类Atoh1的多核苷酸序列;土拨鼠转录后调节元件(WPRE);多聚腺苷酸化序列;和第二反向末端重复。在甚至更具体实施方案中,核酸载体包括侧接有反向末端重复的SEQ ID NO:7的核苷酸233-2922。在甚至更具体实施方案中,核酸载体包括侧接有反向末端重复的SEQ ID NO:7的核苷酸233-2922,其中5'反向末端重复与SEQ ID NO:7的核苷酸1-130具有至少80%序列同一性(例如至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性);并且其中3'反向末端重复与SEQ ID NO:7的核苷酸3010-3139具有至少80%序列同一性(例如至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)。

[0013] 在一些实施方案中,核酸载体是病毒载体、质粒、粘粒或人工染色体。在一些实施方案中,核酸载体是选自包括腺相关病毒(AAV)、腺病毒和慢病毒的组的病毒载体。在一些实施方案中,病毒载体是AAV载体。在一些实施方案中,AAV载体具有AAV1、AAV2、AAV2quad(Y-F)、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、rh10、rh39、rh43、rh74、

Anc80、Anc80L65、DJ/8、DJ/9、7m8、PHP.B、PHP.eB或PHP.S衣壳。在一些实施方案中,AAV载体具有AAV1衣壳。在一些实施方案中,AAV载体具有AAV9衣壳。在一些实施方案中,AAV载体具有AAV6衣壳。在一些实施方案中,AAV载体具有AAV8衣壳。在一些实施方案中,AAV载体具有Anc80衣壳。在一些实施方案中,AAV载体具有Anc80L65衣壳。在一些实施方案中,AAV载体具有DJ/9衣壳。在一些实施方案中,AAV载体具有7m8衣壳。在一些实施方案中,AAV载体具有AAV2衣壳。在一些实施方案中,AAV载体具有PHP.B衣壳。在一些实施方案中,AAV载体具有AAV2quad(Y-F)衣壳。在一些实施方案中,AAV载体具有PHP.S衣壳。在一些实施方案中,AAV载体具有PHP.eB衣壳。在一些实施方案中,AAV载体具有AAV3衣壳。在一些实施方案中,AAV载体具有AAV4衣壳。在一些实施方案中,AAV载体具有AAV5衣壳。在一些实施方案中,AAV载体具有AAV7衣壳。

[0014] 本领域的普通技术人员应理解,产生本发明的病毒载体通常需要使用本发明的质粒以及提供适合的病毒包装和活力所需的元件的额外质粒(例如对于AAV,提供适当的AAV rep基因、cap基因和其他基因(例如E2A和E4)的质粒)。产生细胞系中那些质粒的组合产生病毒载体。然而,本领域技术人员应理解,对于用于产生病毒载体的本发明转移质粒中的任何给定对的反向末端重复序列(例如SEQ ID NO:7、8或9),病毒载体中的相应序列可因ITR在重组期间采取“翻转(flip)”或“倒转(flop)”取向而改变。因此,转移质粒中ITR的序列不必为在从其制备的病毒载体中发现的相同序列。然而,在一些非常具体的实施方案中,本发明的病毒载体包含SEQ ID NO:7的核苷酸1-3139。

[0015] 在另一方面,本发明提供了含有本发明核酸载体的组合物。在一些实施方案中,组合物还包括药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0016] 在另一方面,本发明提供了与可操作地连接至转基因的SEQ ID NO:1-6中的任一者具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的多核苷酸。在一些实施方案中,多核苷酸与SEQ ID NO:1具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。在一些实施方案中,多核苷酸与SEQ ID NO:2具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。在一些实施方案中,多核苷酸与SEQ ID NO:3具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。在一些实施方案中,多核苷酸与SEQ ID NO:4具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。在一些实施方案中,多核苷酸与SEQ ID NO:5具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。在一些实施方案中,多核苷酸与SEQ ID NO:6具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。在一些实施方案中,多核苷酸具有SEQ ID NO:3的序列。在一些实施方案中,多核苷酸具有SEQ ID NO:4的序列。在一些实施方案中,多核苷酸具有SEQ ID NO:5的序列。在一些实施方案中,多核苷酸具有SEQ ID NO:6的序列。在一些实施方案中,多核苷酸具有SEQ ID NO:2的序列。在一些实施方案中,多核苷酸具有SEQ ID

NO:1的序列。

[0017] 在一些实施方案中,转基因是异源转基因。在前述方面的一些实施方案中,转基因编码蛋白质(例如治疗蛋白或报告蛋白)、siRNA、ASO、核酸酶(例如Cas9、TALEN、ZFN或gRNA),或者是微小RNA。在一些实施方案中,蛋白质是治疗蛋白。

[0018] 在一些实施方案中,治疗蛋白是Sox9、Sall2、Camta1、Hey2、Gata2、Hey1、Lass2、Sox10、Gata3、Cux1、Nr2f1、Hes1、Rorb、Jun、Zfp667、Lhx3、Nhlh1、Mxd4、Zmiz1、Myt1、Stat3、Barhl1、Tox、Prox1、Nfia、Thrb、Mycl1、Kdm5a、Creb314、Etv1、Peg3、Bach2、Isl1、Zbtb38、Lbh、Tub、Hmg20、Rest、Zfp827、Aff3、Pknox2、Arid3b、Mlxip、Zfp532、Ikzf2、Sall1、Six2、Sall3、Lin28b、Rfx7、Bdnf、Gfi1、Pou4f3、Myc、Ctnnb1、Sox2、Sox4、Sox11、Tead2、Atoh1或Atoh1变体(例如具有一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸取代的Atoh1变体:S328A、S331A、S334A、S328A/S331A、S328A/S334A、S331A/S334A和S328A/S331A/S334)。在一些实施方案中,治疗蛋白是Atoh1(例如人类Atoh1)。在一些实施方案中,Atoh1蛋白包含SEQ ID NO:10的序列或其具有一个或多个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个)保守氨基酸取代的变体。在一些实施方案中,Atoh1蛋白变体中不超过10%(10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少)的氨基酸是保守氨基酸取代。在一些实施方案中,Atoh1蛋白由SEQ ID NO:10的序列组成。在一些实施方案中,Atoh1蛋白是由SEQ ID NO:11的序列编码。

[0019] 在另一方面,本发明提供了包括前述方面和实施方案中任一者的多核苷酸或核酸载体的细胞(例如哺乳动物细胞,例如人类细胞,例如VSC)。在一些实施方案中,细胞是哺乳动物VSC。在一些实施方案中,哺乳动物VSC是人类VSC。在一些实施方案中,多核苷酸与SEQ ID NO:1-6中的任一者具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。

[0020] 在另一方面,本发明提供了通过使哺乳动物VSC与前述方面和实施方案中任一者的核酸载体或组合物接触而在哺乳动物VSC中表达转基因的方法。在一些实施方案中,转基因在VSC中特异性表达。在一些实施方案中,哺乳动物VSC是人类VSC。

[0021] 在另一方面,本发明提供了通过向患有前庭功能障碍或具有患上前庭功能障碍的风险的受试者施用有效量的本发明核酸载体或组合物来治疗受试者的方法。在一些实施方案中,前庭功能障碍是眩晕、头晕、失衡、双侧前庭病、双侧前庭功能低下、振动幻视或平衡障碍。在一些实施方案中,前庭功能障碍是年龄相关的前庭功能障碍、头部创伤相关的前庭功能障碍、疾病或感染相关的前庭功能障碍或耳毒性药物诱导的前庭功能障碍。在一些实施方案中,前庭功能障碍与遗传突变相关。

[0022] 在另一方面,本发明提供了通过向有需要的受试者施用有效量的本发明核酸载体或组合物来诱导或增加受试者的前庭毛细胞再生的方法。

[0023] 在另一方面,本发明提供了通过向有需要的受试者施用有效量的本发明核酸载体或组合物来诱导或增加受试者的VSC增殖的方法。

[0024] 在另一方面,本发明提供了通过向有需要的受试者施用有效量的本发明核酸载体或组合物来诱导或增加受试者的前庭毛细胞增殖的方法。

[0025] 在另一方面,本发明提供了通过向有需要的受试者施用有效量的本发明核酸载体或组合物来诱导或增加受试者的前庭毛细胞成熟的方法。在一些实施方案中,前庭毛细胞

是再生前庭毛细胞。

[0026] 在另一方面,本发明提供了通过向有需要的受试者施用有效量的本发明核酸载体或组合物来增加受试者的VSC存活的方法。

[0027] 在另一方面,本发明提供了通过向有需要的受试者施用有效量的本发明核酸载体或组合物来增加受试者的前庭毛细胞存活的方法。

[0028] 在另一方面,本发明提供了通过向有需要的受试者施用有效量的本发明核酸载体或组合物来诱导或增加受试者的前庭毛细胞神经支配的方法。

[0029] 在前述方面中任一者的一些实施方案中,受试者患有前庭功能障碍(例如头晕、眩晕、失衡、双侧前庭病、双侧前庭功能低下、振动幻视或平衡障碍)或具有患上前庭功能障碍的风险。

[0030] 在另一方面,本发明提供了通过向患有双侧前庭功能低下或具有患上双侧前庭功能低下的风险的受试者施用有效量的本发明核酸载体或组合物来治疗受试者的方法。在一些实施方案中,双侧前庭功能低下是耳毒性药物诱导的双侧前庭功能低下。

[0031] 在前述方面中任一者的一些实施方案中,耳毒性药物选自由以下组成的组:氨基糖苷、抗肿瘤药物、依他尼酸(ethacrynic acid)、呋塞米(furosemide)、水杨酸盐和奎宁。

[0032] 在另一方面,本发明提供了通过向患有振动幻视或具有患上振动幻视的风险的受试者施用有效量的本发明核酸载体或组合物来治疗受试者的方法。

[0033] 在另一方面,本发明提供了通过向患有双侧前庭病或具有患上双侧前庭病的风险的受试者施用有效量的本发明核酸载体或组合物来治疗受试者的方法。

[0034] 在另一方面,本发明提供了通过向患有平衡障碍(例如失衡)或具有患上平衡障碍(例如失衡)的风险的受试者施用有效量的本发明核酸载体或组合物来治疗受试者的方法。

[0035] 在前述方面中任一者的一些实施方案中,所述方法还包括在施用核酸载体或组合物之前评估受试者的前庭功能。在一些实施方案中,所述方法还包括在施用核酸载体或组合物之后评估受试者的前庭功能。

[0036] 在前述方面中任一者的一些实施方案中,核酸载体或组合物是局部施用的。在一些实施方案中,核酸载体或组合物被施用于半规管。在一些实施方案中,核酸载体或组合物是经鼓室或鼓室内(例如经由经鼓室或鼓室内注射)施用的。在一些实施方案中,核酸载体或组合物被施用于外淋巴或内淋巴,例如经由卵圆窗、圆窗或半规管(例如外半规管),例如施用于前庭支持细胞。在一些实施方案中,本发明的核酸载体或组合物被施用于外淋巴中。在一些实施方案中,本发明的核酸载体或组合物被施用于内淋巴中。在一些实施方案中,本发明的核酸载体或组合物被施用于卵圆窗或经由卵圆窗施用。在一些实施方案中,本发明的核酸载体或组合物被施用于圆窗或经由圆窗施用。

[0037] 在前述方面中任一者的一些实施方案中,核酸载体或组合物是以足以预防或减轻前庭功能障碍、延迟前庭功能障碍的发生、减缓前庭功能障碍的进展、改进前庭功能、增加前庭毛细胞数、增加前庭毛细胞成熟、增加前庭毛细胞增殖、增加前庭毛细胞再生、增加前庭毛细胞神经支配、增加VSC增殖或增加VSC数的量施用。

[0038] 在一些实施方案中,受试者是人类。

[0039] 在另一方面,本发明提供了含有本发明核酸载体或本发明组合物的试剂盒。

[0040] 定义

[0041] 如本文所用,“施用”是指通过任何有效途径提供或给予受试者治疗剂(例如含有可操作地连接至转基因的溶质载体家族6成员14(SLC6A14)启动子的核酸载体)。下文阐述示例性施用途径。

[0042] 如本文所用,术语“细胞类型”是指共享基于基因表达数据在统计学上可分离的表型的细胞群。例如,常见细胞类型的细胞可共享相似的结构和/或功能特征,例如相似的基因活化模式和抗原呈递谱。常见细胞类型的细胞可包括从常见组织(例如上皮组织、神经组织、结缔组织或肌肉组织)分离的那些细胞和/或从常见器官、组织系统、血管或生物体中的其他结构和/或区域分离的那些细胞。

[0043] 如本文所用,术语“保守突变”、“保守取代”和“保守氨基酸取代”是指用一个或多个氨基酸取代一个或多个表现出相似物理化学性质(例如极性、静电荷和空间体积)的不同氨基酸。二十种天然存在氨基酸中每一者的这些性质汇总于下表1中。

[0044] 表1.天然存在氨基酸的代表性物理化学性质

[0045]

氨基酸	3字母代码	1字母代码	侧链极性	生理pH (7.4)下的静电特征	空间体积†
丙氨酸	Ala	A	非极性	中性	小
精氨酸	Arg	R	极性	阳离子	大
天冬酰胺	Asn	N	极性	中性	中等
天冬氨酸	Asp	D	极性	阴离子	中等
半胱氨酸	Cys	C	非极性	中性	中等
谷氨酸	Glu	E	极性	阴离子	中等
谷氨酰胺	Gln	Q	极性	中性	中等
甘氨酸	Gly	G	非极性	中性	小
组氨酸	His	H	极性	在pH 7.4下平衡的中性和阳离子形式两者	大
异亮氨酸	Ile	I	非极性	中性	大
亮氨酸	Leu	L	非极性	中性	大
赖氨酸	Lys	K	极性	阳离子	大
甲硫氨酸	Met	M	非极性	中性	大
苯丙氨酸	Phe	F	非极性	中性	大
脯氨酸	Pro	P	非极性	中性	中等
丝氨酸	Ser	S	极性	中性	小
苏氨酸	Thr	T	极性	中性	中等
色氨酸	Trp	W	非极性	中性	巨大
酪氨酸	Tyr	Y	极性	中性	大
缬氨酸	Val	V	非极性	中性	中等

†基于 A^3 的体积：50-100为小，100-150为中等，150-200为大，并且>200为巨大

[0046] 根据此表应了解,保守氨基酸家族包括(i)G、A、V、L和I;(ii)D和E;(iii)C、S和T;(iv)H、K和R;(v)N和Q;以及(vi)F、Y和W。因此,保守突变或取代是用一种氨基酸取代同一氨基酸家族的成员者(例如用Ser取代Thr或用Lys取代Arg)。

[0047] 如本文所用,本文所述的术语组合物、载体构建体或病毒载体的“有效量”、“治疗有效量”和“足量”是指在施用于受试者(包括哺乳动物,例如人类)时足以实现有益或期望结果(包括临床结果)的量,并且因此“有效量”或其同义词取决于应用其的情形。例如,在治疗前庭功能障碍的情形中,其是与未施用组合物、载体构建体或病毒载体时获得的反应相比,足以实现治疗反应的组合物、载体构建体或病毒载体的量。将对应于此量的本文所述的

给定组合物的量将根据多种因素而变化,例如给定剂、药物制剂、施用途径、疾病或病症的类型、受试者的身份(例如年龄、性别、体重)或所治疗的宿主等,但仍可以常规方式由本领域技术人员确定。此外,如本文所用,本公开的组合物、载体构建体或病毒载体的"治疗有效量"是与对照相比在受试者中产生有益或期望结果的量。如本文所定义,本公开的组合物、载体构建体或病毒载体的治疗有效量可容易地由本领域的普通技术人员通过本领域中已知的常规方法来确定。可调整给药方案以提供最佳治疗反应。

[0048] 如本文所用,术语"内源"阐述天然存在于特定生物体(例如人类)或生物体内的特定位置(例如器官、组织或细胞,例如人类细胞,例如人类前庭支持细胞)中的分子(例如多肽、核酸或辅因子)。

[0049] 如本文所用,术语"表达"是指以下事件中的一者或多者:(1)从DNA序列产生RNA模板(例如通过转录);(2)RNA转录物的加工(例如通过剪接、编辑、5'帽形成和/或3'端加工);(3)将RNA翻译成多肽或蛋白质;以及(4)多肽或蛋白质的翻译后修饰。

[0050] 如本文所用,术语"外源"阐述并非天然存在于特定生物体(例如人类)或生物体内的特定位置(例如器官、组织或细胞,例如人类细胞,例如人类前庭支持细胞)中的分子(例如多肽、核酸或辅因子)。外源材料包括从生物体的外部来源或从其提取的培养物提供的那些材料。

[0051] 如本文所用,术语"外显子"是指基因编码区内的区域,其核苷酸序列决定相应蛋白质的氨基酸序列。术语外显子也指RNA的从基因转录的相应区域。外显子转录成前mRNA,并且可包括在成熟mRNA中,这取决于基因的替代剪接。在加工后包括在成熟mRNA中的外显子被翻译成蛋白质,其中外显子的序列决定蛋白质的氨基酸组成。

[0052] 如本文所用,术语"异源"是指非天然元件的组合。例如,异源转基因是指并非由与其可操作地连接的启动子天然表达的转基因。

[0053] 如本文所用,术语"增加"和"减少"是指调节分别产生度量的功能、表达或活性相对于参照更大或更小的量。例如,在本文所述的方法中施用组合物后,受试者中如本文所述度量(例如转基因表达)的标志物的量相对于施用前标志物的量可增加或减少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%或更大。通常,度量是在施用后施用已具有所列举效应时(例如在治疗方案开始后至少一周、一个月、3个月或6个月)进行测量。

[0054] 如本文所用,"局部地"或"局部施用"意指旨在用于局部效应而非全身效应的身体特定位点处的施用。局部施用的实例是皮上、吸入、关节内、鞘内、阴道内、玻璃体内、子宫内、病灶内施用、淋巴结施用、肿瘤内施用、施用于中耳或内耳和施用于受试者的粘膜,其中施用旨在具有局部效应而非全身效应。

[0055] 如本文所用,术语"可操作地连接"是指接合至第二分子的第一分子,其中所述分子如此排列以使得第一分子影响第二分子的功能。两种分子可为或可不为单个邻接分子的一部分并且可为或可不为相邻的。例如,如果启动子调节目标可转录多核苷酸分子在细胞中的转录,则启动子可操作地连接至可转录多核苷酸分子。另外,如果接合转录调节元件的两部分使得一部分的转录活化功能不因另一部分的存在而受到不利影响,则所述两部分彼此可操作地连接。两个转录调节元件可借助于接头核酸(例如间插的非编码核酸)彼此可操作地连接或者可在不存在间插的核苷酸时彼此可操作地连接。

[0056] 如本文所用,术语“质粒”是指额外DNA区段可连接至其中的染色体外环状双链DNA分子。质粒是一种载体,其是能够运输与其连接的另一核酸的核酸分子。某些质粒能够在引入其的宿主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起点的细菌质粒和游离型哺乳动物质粒)。其他载体(例如非游离型哺乳动物载体)可在引入至宿主细胞中后整合至宿主细胞的基因组中,并由此与宿主基因组一起复制。某些质粒能够引导与其可操作地连接的基因的表达。

[0057] 如本文所用,术语“多核苷酸”是指核苷的聚合物。通常,多核苷酸由天然存在于通过磷酸二酯键接合的DNA或RNA中的核苷(例如腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷和脱氧胞苷)组成。所述术语涵盖包含含有经化学或生物修饰的碱基、经修饰主链等的核苷或核苷类似物的分子,无论是否发现于天然存在的核酸中,并且此类分子对于某些应用可为优选的。当此应用涉及多核苷酸时应理解,提供DNA、RNA和在每种情况下单链和双链形式(和每个单链分子的补体)。如本文所用的“多核苷酸序列”可指多核苷酸材料自身和/或生物化学表征特定核酸的序列信息(即用作碱基的缩写的字母串)。除非另有指示,否则本文所呈现的多核苷酸序列是以5’至3’方向呈现。

[0058] 如本文所用,术语“启动子”是指DNA上由RNA聚合酶结合的识别位点。聚合酶驱动转基因的转录。

[0059] 相对于参照多核苷酸或多肽序列的“序列同一性百分比(%)”定义为在比对序列和引入空位(如果需要)以实现最大序列同一性百分比后,候选序列中与参照多核苷酸或多肽序列中的核酸或氨基酸同一的核酸或氨基酸的百分比。出于确定核酸或氨基酸序列同一性百分比的目的,比对可以本领域技术人员的能力范围内的各种方式来实现,例如使用可公开获得的计算机软件,例如BLAST、BLAST-2或Megalign软件。本领域技术人员可确定适用于比对序列的参数,包括在所比较序列的全长范围内实现最大比对所需的任何算法。例如,序列同一性百分比值可使用序列比较计算机程序BLAST来产生。作为说明,给定核酸或氨基酸序列A相对于(to)、与(with)或针对(against)给定核酸或氨基酸序列B的序列同一性%(替代地可表达为相对于、与或针对给定核酸或氨基酸序列B具有特定序列同一性%的给定核酸或氨基酸序列A)计算如下:

[0060] 100×(分数X/Y)

[0061] 其中X是在A与B的程序比对中由序列比对程序(例如BLAST)评定为同一性匹配的核苷酸或氨基酸的数量,并且其中Y是B中核酸的总数。应了解,当核酸或氨基酸序列A的长度不等于核酸或氨基酸序列B的长度时,A相对于B的序列同一性%将不等于B相对于A的序列同一性%。

[0062] 如本文所用,术语“药物组合物”是指含有治疗剂、任选地与一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂和/或载体组合的混合物,有待施用于受试者(例如哺乳动物,例如人类)来预防、治疗或控制侵袭或可能侵袭受试者的特定疾病或疾患。

[0063] 如本文所用,术语“药学上可接受”是指适于与受试者(例如哺乳动物,例如人类)的组织接触而无过度毒性、刺激性、过敏反应和其他问题并发症并且与合理益处/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0064] 如本文所用,术语“转录调节元件”是指至少部分地控制目标基因的转录的核酸。转录调节元件可包括启动子、增强子和控制或帮助控制基因转录的其他核酸(例如多聚腺苷酸化信号)。转录调节元件的实例阐述于例如Lorence,Recombinant Gene Expression:

Reviews and Protocols(HumanaPress,NewYork,NY,2012)中。

[0065] 如本文所用,术语“转染”是指常用于将外源DNA引入原核或真核宿主细胞中的众多种技术中的任一者,例如电穿孔、脂转染、磷酸钙沉淀、DEAE聚葡萄糖转染、Nucleofection、挤压穿孔、声致穿孔、光学转染、磁性转染、刺穿转染等。

[0066] 如本文所用,术语“受试者”和“患者”是指动物(例如哺乳动物,例如人类)。有待根据本文所述的方法治疗的受试者可为已经诊断患有前庭功能障碍(例如头晕、眩晕或失衡)的受试者或具有患上这些疾患的风险的受试者。诊断可通过本领域中已知的任何方法或技术来实施。本领域技术人员应理解,有待根据本公开治疗的受试者可能已经受标准测试或者可能在无检查的情况下已经鉴定为因存在一种或多种与疾病或疾患相关的风险因子而具有风险的受试者。

[0067] 如本文所用,术语“转导(transduction)”和“转导(transduce)”是指将载体构建体或其一部分引入细胞中的方法。其中载体构建体含于病毒载体(例如AAV载体)中,转导是指用病毒感染细胞并随后将载体构建体或其一部分转移和整合至细胞基因组中。

[0068] 如本文所用,关于疾病或疾患的“治疗(treatment)”和“治疗(treating)”是指用于获得有益或期望结果(例如临床结果)的方法。有益或期望结果可包括(但不限于)缓和或改善一种或多种症状或疾患;降低疾病或疾患的程度;稳定(即不恶化)疾病、病症或疾患的状态;防止疾病或疾患的扩散;延迟或减缓疾病或疾患的进展;改善或减轻疾病或疾患;以及缓解(无论部分或完全),无论可检测或不可检测。“改善”或“减轻”疾病或疾患意指与无治疗时的程度或时程相比,减小疾病、病症或疾患的程度和/或不期望临床表现和/或减缓或延长进展的时程。“治疗”也可意指与未接受治疗时的预期存活相比提供存活。需要治疗的那些包括已患有疾患或病症的那些以及易患疾患或病症的那些或待预防疾患或病症的那些。

[0069] 如本文所用,术语“载体”包括核酸载体,例如DNA载体,例如质粒、粘粒或人工染色体、RNA载体、病毒或任何其他适宜复制子(例如病毒载体)。已开发出多种载体用于将编码外源蛋白质的多核苷酸递送至原核或真核细胞中。此类表达载体的实例阐述于例如Gellissen,Production of Recombinant Proteins:Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems(John Wiley&Sons,Marblehead,MA,2006)。适用于本文所述组合物和方法的表达载体含有多核苷酸序列以及例如用于表达蛋白质和/或将这些多核苷酸序列整合至哺乳动物细胞的基因组中的额外序列元件。可用于表达如本文所述转基因的某些载体包括含有引导基因转录的调节序列(例如启动子和增强子区域)的载体。可用于表达转基因的其他载体含有增强转基因的翻译速率或改进源自基因转录的mRNA的稳定性或核输出的多核苷酸序列。这些序列元件包括例如5’和3’非翻译区和引导表达载体上所携带基因的有效转录的多聚腺苷酸化信号位点。适用于本文所述组合物和方法的表达载体也可含有编码用于选择含有这种载体的细胞的标志物的多核苷酸。合适的标志物的实例包括编码抗生素(例如氨苄青霉素(ampicillin)、氯霉素(chloramphenicol)、卡那霉素(kanamycin)或诺尔丝菌素(nourseothricin))抗性的基因。

[0070] 如本文所用,术语“前庭支持细胞”和“VSC”是指内耳的前庭系统中参与前庭毛细胞发育、存活、功能、死亡和吞噬作用的特化上皮细胞的集合。VSC通过将前庭毛细胞锚定在感觉上皮中并释放对于毛细胞神经支配至关重要的神经营养因子来为所述前庭毛细胞提

供结构支持。

[0071] 如本文所用,术语“前庭支持细胞特异性表达”和“VSC特异性表达”是指与内耳的其他细胞类型(例如前庭毛细胞、耳蜗毛细胞、耳蜗支持细胞、神经胶质或其他内耳细胞类型)相比,主要在前庭支持细胞内产生RNA转录物或多肽。转基因的VSC表达可通过使用任何标准技术(例如定量RT PCR、免疫组织化学、蛋白质印迹分析(western blot analysis)或测量可操作地连接至启动子的报告基因(例如GFP)的荧光)比较内耳的各种细胞类型之间(例如VSC对非VSC细胞)的转基因表达(例如RNA或蛋白质表达)来确认。与以下内耳细胞类型中的至少3者(例如3者、4者、5者、6者、7者、8者、9者、10者或更多者)相比,在VSC中VSC特异性启动子诱导的与其可操作地连接的转基因的表达(例如RNA或蛋白质表达)大至少50%(例如大50%、75%、100%、125%、150%、175%、200%或更大):前庭神经节细胞、前庭器官的非感觉上皮细胞、前庭器官的暗细胞、前庭器官的间充质细胞、螺旋神经节细胞、边缘细胞、内指细胞、内柱细胞、外柱细胞、第一排戴特氏细胞(first row Deiter cell)、第二排戴特氏细胞、第三排戴特氏细胞、亨森氏细胞(Hensen’s cell)、克劳氏细胞(Claudius cell)、内沟细胞、外沟细胞、螺旋突细胞、根细胞、齿间细胞、血管纹基底细胞、血管纹中间细胞、血管纹缘细胞、内毛细胞、外毛细胞、前庭毛细胞和施旺细胞(Schwann cell)。

[0072] 如本文所用,术语“野生型”是指在给定生物体中具有特定基因的最高频率的基因型。

附图说明

[0073] 图1A-1B是显示如通过单细胞RNA测序所测量的小鼠内耳组织中的溶质载体家族6成员14(SLC6A14)表达的一系列小提琴图。仅在耳蜗细胞类型中观察到SLC6A14的背景表达(图1A)。在支持细胞椭圆囊和嵴中可见稳健的SLC6A14表达(图1B)。

[0074] 图2显示使用ARCHS4数据库分析多种组织的大量细胞系中的SLC6A14表达。HepG2细胞系(人类肝癌)是具有内源SLC6A14的最高中点表达的三种细胞系中的一者。

[0075] 图3是显示不同腺相关病毒(AAV)血清型在HepG2细胞中的转导效率的条形图。将巨细胞病毒(CMV)-人类组蛋白H2B-绿色荧光蛋白(GFP)报告基因包装至腺相关病毒(AAV)1、AAV8和AAV9衣壳中并且以1×10^{6}个载体基因组(vg)/细胞的感染复数(MOI)转导至HepG2细胞中。如果通过流式细胞术分析的细胞产生的GFP信号大于在未经转导(NT)的细胞中测量的背景,则将所述通过流式细胞术分析的细胞计数为GFP阳性。

[0076] 图4A-4B是显示经SLC6A14启动子质粒转染的HepG2细胞中的GFP表达的一系列条形图。用编码CMV或SLC6A14启动子的三种变体中的一者的质粒转导HepG2细胞。从所有测试的质粒观察到可检测GFP信号,所述质粒包括含有SLC6A14启动子的质粒(即含有SEQ ID NO:3的启动子序列的P335 SLC6A14 hum v1;含有SEQ ID NO:5的启动子序列的P372 Slc6a14 mus;和含有SEQ ID NO:4的启动子序列的P530 SLC6A14 hum v2),如通过流式细胞术所检测(图4A)。经过滤为GFP阳性的细胞产生强于CMV对照的GFP信号(图4B)。

[0077] 图5A-5E是显示在多个启动子控制下经核GFP转染的HepG2细胞的一系列荧光图像。在未经转染的对照细胞中未见GFP信号(图5A)。对四种不同质粒观察到GFP阳性核,包括P329 CMV(图5B)、P335 SLC6A14 v1(含有SEQ ID NO:3的启动子序列;图5C)、P372SLC6A14 v1(含有SEQ ID NO:5的启动子序列;图5D)和P530SLC6A14 v2(含有SEQ ID NO:4的启动子

序列;图5E)。

[0078] 图6显示在多个启动子控制下用编码GFP的AAV8载体转导HepG2细胞,所述多个启动子包括CMV、SLC6A14(鼠类启动子#1;SEQ ID NO:5)、SLC6A14(鼠类启动子#2;SEQ ID NO:6)、SLC6A14(人类启动子#3;SEQ ID NO:3)和SLC6A14(人类启动子#4;SEQ ID NO:4)。细胞以1×10^{6}vg/细胞的MOI转导。所有启动子产生GFP阳性细胞,这指示启动子在经病毒递送时为功能性启动子。

[0079] 图7A-7D是显示在SLC6A14鼠类启动子#1(SEQ ID NO:5)控制下GFP的病毒转导的一系列荧光图像。在感觉上皮中可见GFP表达,所述感觉上皮含有毛细胞(POU 4类同源异形盒3(Pou4f3))和支持细胞(婆罗双树样转录因子2(Sall2);图7A)。椭圆囊的横向视图显示与Sall2阳性支持细胞核一致、但不与Pou4f3阳性毛细胞核一致的GFP标记(图7B)。在外植嵴中也可见GFP表达(图7C)。嵴的横向视图显示主要与支持细胞共定位的GFP表达(图7D)。

[0080] 图8A-8D是显示在SLC6A14鼠类启动子#2(SEQ ID NO:6)控制下GFP的病毒转导的一系列荧光图像。仅在椭圆囊感觉上皮的小部分中可见GFP表达,所述小部分含有毛细胞(Pou4f3)和支持细胞(Sall2;图8A)。椭圆囊的横向视图显示与Sall2阳性支持细胞核以及Pou4f3阳性毛细胞核的一部分一致的GFP标记(图8B)。在外植嵴中也可见低水平的GFP表达(图8C)。嵴的横向视图显示主要与支持细胞共定位、但也出现在非特异性区域中的GFP表达(图8D)。

[0081] 图9A-9C是显示在经由局部注射将AAV8-SLC6A14鼠类启动子#1(SEQ ID NO:5)-H2B-GFP的病毒载体递送至成年小鼠的后半规管中后,小鼠前庭器官中的GFP表达的一系列荧光图像。在局部递送SLC6A14启动子AAV后在鼠类内耳的椭圆囊(图9A)、小囊(图9B)和嵴(图9C)中可见GFP表达。

[0082] 图10是显示GFP表达在内耳组织中的特异性的一系列图像。针对GFP蛋白进行小鼠内耳的内耳苏木素和曙红(H&E)染色的复染以鉴定耳蜗的小囊、椭圆囊、嵴和窝管中表达GFP的细胞的核。图像的上图显示苏木素和GFP染色。然后对图像滤色以从原始RGB图像仅提取红色通道(GFP)来突出显示GFP染色,如图像的下图中所显示。染色显示前庭器官的支持细胞核中的特异性表达,其中在毛细胞中几乎没有检测到GFP。在耳蜗组织(包括科蒂氏器官(organ ofCorti)或血管纹)中未检测到GFP。

[0083] 图11A-11B是显示SLC6A14启动子将GFP表达局限于支持细胞的一系列图像。针对GFP蛋白对小鼠内耳的内耳H&E切片进行复染以鉴定表达GFP的细胞的核(图11A)。在相邻切片中,用RNAScope探针标记AAV载体基因组的土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE)(图11B)。对于所显示的每个切片,然后对图像滤色以从原始RGB图像提取红色通道来突出显示GFP染色(图11A)或RNAScope染色(图11B),如图11A-11B中每一者的右图所示。可在感觉上皮下方的毛细胞、支持细胞和间充质细胞中检测到大量载体基因组,这指示表达GFP的载体转导多种细胞类型。然而,仅在支持细胞中检测到GFP表达。

[0084] 图12A-12D是显示经由支持细胞特异性启动子使新毛细胞中的Atoh1转基因表达沉默可驱动进一步成熟的一系列图。从雄性C57Bl/6J小鼠(6-8周龄)解剖椭圆囊并培养在100μl的基础培养基中。将庆大霉素(Gentamicin,0.5mg/mL)添加至培养基中保持24小时以杀死毛细胞,然后洗掉庆大霉素并更换为含有剂量为1E12 gc的以下AAV中的一者的250μL新鲜培养基:AAV8-CMV-Atoh1-2A-H2BGFP(CMV启动子组)、AAV8-GFAP-Atoh1-2A-H2BGFP(支

持细胞(SC)特异性启动子组)或AAV8-RLBP1-Atoh1-2A-H2BGFP(SC特异性启动子组)。温育一天后,洗掉病毒并将椭圆囊于2mL新鲜培养基中再培养3天、8天或16天。在培养时段结束时,使椭圆囊解离并且捕获并制备单细胞用于单细胞RNA-Seq。在Seurat中通过与从胚胎第18天(E18)、出生后第12天(P12)和成年小鼠产生的椭圆囊毛细胞单细胞RNA-Seq特征的数据库比较产生预测评分。产生小提琴图以显示成年椭圆囊外植体中再生毛细胞的Atoh1转基因表达和成熟预测评分。Atoh1转基因在SC特异性启动子组中在再生毛细胞中以低水平或不可检测的水平表达,而其在来自CMV组的几乎所有毛细胞中以高水平表达(图12A)。这些结果证实,Atoh1转基因在其由SC特异性启动子驱动时在再生毛细胞中自然下调。另外,来自SC特异性启动子组的与P12(图12C)和成年毛细胞(图12D)强相关的单细胞RNA-Seq特征多于来自CMV组的单细胞RNA-Seq特征。相反,来自CMV组的与E18毛细胞(图12B)强相关的单细胞RNA-Seq特征多于来自SC特异性启动子组的单细胞RNA-Seq特征。因此,具有SC特异性启动子的Atoh1转基因的天然沉默诱导再生毛细胞的成熟。

[0085] 图13A-13B是显示人类SLC6A14启动子也将GFP表达局限于小鼠前庭支持细胞的一系列图像。图13A显示已注射有AAV8载体的成年小鼠的平面安装的椭圆囊(顶部3图)和后嵴(底部3图)的最大强度共焦z-堆栈投影,所述AAV8载体含有驱动H2B-GFP表达(产生GFP的核表达)的人类SLC6A14启动子(SEQ ID NO:4)。用DAPI标记所有核(每个图中的第一个图像),并且用针对Sall2的抗体对支持细胞核进行免疫标记(每个图中的第二个图像)。非感觉细胞的DAPI标记延伸超出由Sall2分界的感觉上皮的区域。核GFP表达(每个图中的第三个图像)限于感觉上皮并且未延伸至由Sall2标记的区域。图13B显示经由图13A中所示的椭圆囊的共焦z-堆栈的正交横截面。从图的顶部至底部,DAPI标记显示毛细胞核的假复层、毛细胞核下方的支持细胞核单层和支持细胞下方的间充质细胞核。Sall2标记局限于支持细胞核和毛细胞核的小亚组。Pou4f3标记所有毛细胞核。GFP表达严密地仅局限于支持细胞核,这证实启动子序列的特异性。

[0086] 图14A-14B是展示人类SLC6A14启动子在非人类灵长类动物中的活性的一系列图像。图14A显示注射有AAV8载体的成年非人类灵长类动物的平面安装的椭圆囊的最大强度共焦z-堆栈投影,所述AAV8载体含有驱动H2B-GFP表达(产生GFP的核表达)的人类SLC6A14启动子(SEQ ID NO:4)。用DAPI标记所有核。核GFP表达局限于感觉上皮并且未延伸至非感觉上皮中(在右图中,感觉上皮与非感觉上皮之间的边缘由虚线分界)。图14B显示经H&E染色(上方图像)并且然后经滤色以从原始RGB图像去除红色通道来突出显示GFP染色的椭圆囊的FFPE切片。在大多数支持细胞中检测到核GFP表达(深色核)。

[0087] 图15A-15B展示含有人类SLC6A14启动子的AAV8载体在体内IDPN损伤小鼠模型中驱动ATOH1再生毛细胞的表达。图15A显示成年小鼠的右耳和左耳的平面安装的椭圆囊的最大强度共焦z-堆栈投影,向所述成年小鼠全身施用3,3'-亚氨基二丙腈(IDPN)以杀死前庭毛细胞并且然后局部注射含有人类SLC6A14启动子的AAV8载体,所述人类SLC6A14启动子驱动ATOH1和H2B-GFP融合蛋白(核GFP)在左耳中的共表达。用针对Pou4f3的抗体对毛细胞进行免疫标记。未经治疗的右耳(左图)显示与经治疗的左耳(右图)相比毛细胞密度的明显减小。图15B是显示经治疗对未经治疗的耳中$Pou4f3^{+}$细胞的量化的条形图。经治疗的耳显示与未经治疗的耳相比毛细胞的统计学上显著的增加($n=6$,Studentt检验,$p<0.01$)。

[0088] 图16是展示体内IDPN损伤小鼠模型中响应于AAV8载体的毛细胞再生的图,所述

AAV8载体含有驱动ATOH1和H2B-GFP融合蛋白(核GFP)在四种不同载体剂量下的共表达的人类SLC6A14启动子。用针对Pou4f3的抗体对毛细胞进行免疫标记并且通过从每只小鼠的经治疗左耳中的计数减去未经治疗的右耳中的计数来确定再生毛细胞数。误差条显示S.E.M。

[0089] 图17A-17B展示在成年小鼠庆大霉素损伤模型中含有驱动ATOH1表达的人类SLC6A14启动子的AAV8载体使体内毛细胞再生的能力。图17A显示成年小鼠的平面安装的椭圆囊的一系列最大强度共焦z-堆栈投影,向所述成年小鼠的左耳局部施用庆大霉素以杀死前庭毛细胞并且然后注射AAV8载体,所述AAV8载体含有驱动ATOH1和H2B-GFP融合蛋白(核GFP)(“AAV.ATOH1”)在同一耳中的共表达的人类SLC6A14启动子。用针对Pou4f3的抗体对毛细胞进行免疫标记。经媒介物治疗的庆大霉素损伤(“Gent(盐水)”)的椭圆囊显示与AAV8载体治疗的庆大霉素损伤的椭圆囊(“AAV.ATOH1”)相比毛细胞密度明显减小。与媒介物对照椭圆囊相比,ATOH1治疗的椭圆囊中的毛细胞密度似乎增加。图17B是显示用于多种治疗的Pou4f3+核的量化的散布图。与庆大霉素损伤的媒介物治疗的耳相比,AAV8庆大霉素损伤的载体治疗的耳显示毛细胞数显著增加(n＝12-14,ANOVA和Tukey检验,$p<0.05$)。

[0090] 图18是SEQ ID NO:7的转基因质粒(质粒P760)的图。

[0091] 图19是SEQ ID NO:9的转基因质粒(质粒P530)的图。

[0092] 图20是SEQ ID NO:8的转基因质粒(质粒P625)的图。

[0093] 图21是含有SEQ ID NO:3的人类SLC6A14启动子的转基因质粒P335的图。

[0094] 图22是含有SEQ ID NO:5的小鼠SLC6A14启动子的转基因质粒P372的图。

[0095] 图23是含有SEQ ID NO:6的小鼠SLC6A14启动子的转基因质粒P373的图。

具体实施方式

[0096] 本文阐述了用于特异性诱导转基因在内耳的前庭支持细胞(VSC)中的表达的组合物和方法。本发明的特征在于多核苷酸,其含有溶质载体家族6成员14(SLC6A14)启动子的能够在VSC中特异性表达转基因的区域。本发明的特征也在于核酸载体,其含有可操作地连接至编码多肽的多核苷酸的所述启动子。本文所述的组合物和方法可用于在VSC中表达编码蛋白质(例如治疗蛋白、报告蛋白或其他目标蛋白质)的多核苷酸,所述蛋白质向前庭毛细胞提供结构和营养支持,并且因此可将本文所述的组合物施用于受试者(例如哺乳动物受试者,例如人类)来治疗由前庭毛细胞的功能障碍引起的病症,例如源自前庭功能障碍的平衡障碍。

[0097] 支持细胞

[0098] 前庭系统的支持细胞是驻留于内耳中的特化上皮细胞。VSC构成介导正常前庭功能所需的关键结构、发育和营养活性的一类解剖学和形态学均一的细胞。VSC位于内耳的椭圆囊、小囊和半规管中并用作前庭毛细胞的结构锚,所述前庭毛细胞是外周前庭系统的主要感觉细胞,参与有助于平衡和空间定向感的运动感觉。突触形成至前庭耳蜗神经的毛细胞上是由VSC分泌的神经营养因子来介导,由此有助于建立和维持适合的前庭功能。此外,VSC借助于其控制细胞外和细胞内钙信号传导并形成吞噬细胞多细胞结构(称为吞噬体)用作前庭毛细胞存活、死亡和吞噬细胞清除的重要介体,所述吞噬细胞多细胞结构通过去除死亡或濒死的毛细胞来维持感觉上皮的完整性。前庭毛细胞损伤和破坏前庭毛细胞功能的遗传突变与前庭功能障碍(例如平衡缺失和眩晕(例如头晕))相关。基因疗法最近已成为用

于治疗前庭功能障碍的有吸引力的方法;然而,所述领域缺少使用于基因疗法中的核酸载体靶向前庭系统的支持细胞的方法。

[0099] 本发明部分地基于SLC6A14在内耳VSC中特异性表达的发现。SLC6A14是编码钠和氯依赖性神经递质转运蛋白的基因,所述钠和氯依赖性神经递质转运蛋白能够以先前尚未鉴定为在内耳中表达的钠和氯依赖性方式转运中性和带正电的氨基酸。本文所公开的SLC6A14启动子序列以VSC特异性方式诱导内耳中的基因表达。因此,本文所述的组合物和方法可用于在VSC中表达目标基因(例如在患有前庭功能障碍的受试者中,参与前庭毛细胞发育、前庭毛细胞命运特化、前庭毛细胞再生、前庭毛细胞和/或VSC增殖、前庭毛细胞神经支配或前庭毛细胞成熟的基因或已知被破坏、例如突变的基因)以治疗患有前庭功能障碍(例如眩晕、头晕或平衡缺失)或具有患上所述疾病的风险的受试者。

[0100] 本文所述的组合物和方法包括表2中所示的SLC6A14启动子(例如SEQ ID NO:1-6中的任一者),其能够在VSC或其变体(例如与表2中所列出的多核苷酸序列中的任一者(例如SEQ ID NO:1-6中的任一者)具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的核酸序列)中特异性表达转基因。本文所述的多核苷酸可包括位于SLC6A14基因的翻译起始位点(TSS)上游和下游的区域或者可仅包括SLC6A14基因的上游区域。

[0101] 前述核酸序列汇总于下表2中。

[0102] 表2:SLC6A14启动子序列

[0103]

SEQ ID NO:	启动子序列的描述	启动子序列
1	含有位于人类SLC6A14基因的翻译起始位点(TSS)的-2 kb至+0.5 kb的多核苷酸的人类SLC6A14启动子序列#1 (人类启动子#1)	GATACTAAAAAGGCAGGCAGGAGCCAG GTCATGAAAAGCAAAGCATGGTAATGG GAATAATCCTACCCCCCCCCACCCCGAA ACAGAAGTATATTATCTAAAATCGATCT CACATTTTATGTGTTAAATGCTCCAACT CTCAAAGGTGATAGAAACTTTACTGCAT AACAGGCAGGGAAAATTGGCCCCCCTG TATAACAGATACCCTTGCCTTGTGATATG TTTGGGCTTTGTGCCCCCACCCAAATTT TATCTTAAATTGTAGTTCCCATGATCCCC ACGTGTGATGGAAGGGACCCAGTGGTA TGTCATTGAAACATGGGGTGGTTACCCC CATGCTGTTCTCGTGATAGTGAGTAAAT TCTCACAAGATCTGATGGTTATATAAGG GACTTTTCTCCCTTTGCTTGGCACTTCT TTCTCCTGCTGCCATGTGAATAAGGACG TGTTTGCTTTCCCTTCCACCATGATTGTA AGTTTCCCAAGGCCTCCCCAGCCACGT GGAACTGTTAATCAATTAAACCTCTTTC CTTTATAAATTACCTAGTCTCGAGCAATT CTTCATAGCAGCATGAGAACGAACTAAT ACACCTTGTGATTCCCATAATCTCTCTAT CCTTAGGATTCCTGTCTTCTTTCTATTTC CTTGGTTACCAATTGTTTGACGTGCCCC AAGGTTGGCTTCTTTCATTTATATGGGA CTTTGATCGTTTAGTAAATGCTATTGGAT TTGCTTTTTAGCTCATCCTTTTATAAGGA GGTTTATAAGCCCTTCTTGCTCCTCTCC CTTCTATGTTTAATCTTAGCCTTTAGGTC ATACCAGTAGTGTACAGTACTAATAGGC ACACACTCATGCATTAGCACTCTCCATC CCCCAATTCCCCATTGATACATGCACAT GTGCACACACACACACATGCACATCAG CCTTTGTTATGTTCAAGACAAAGTTAAA TAAAACTTATTGATACTTTCCTTACTACC ATCCTACATCTTTCATGGACTTTTCTCTA CCTTACCTGCCAAGATTCCCCAGGGCAT ATTTCTATTGCAAATGGAAAATTCTTGC AGTCAGTGGAGAACAAAGGAGCTATAC ATAGGGTACAGAATTTGCCTATTTGCTC ATTCCTCTGTGTGCATGAATTTGTGCTT TGCTTCATAGAACCACCATCACTATCTG

[0104]

SEQ ID NO:	启动子序列的描述	启动子序列
		TTACCTGGGCAGACTGAGTTTAAATCCT TTGAGTTTCCTGATGAAAAGGCATTCCA TTGGTAAACAGCATTATAATAATTATTTC CTCCCTGGTCAAGCTGGGATGTTTCCTC ATAGTTTACTTTCTAGGCCTCATCTTTCT TACAGACTGTGCTCCTTTGTTAAGGTTA GAATTTCCCATAAACCTGCTCAATAATT TGTTTGTGTTTGGCTTCTTTGAAATACT ACACAAAGCAATCCCTGTAAAAGGCAA AGCTGTCCTGAAGGCTGAGAAAGGAG CCTGAGACATAGGCTCCAAGTTGCTCTT TTCAGGCAGAGCCAGCTGGGTAATCTTA TCTCAGATGGCTGCTTTTCAAGGTGCCC AATTCAGGGGCTTTTCCTCTGGGAGCA GCATTTGCCCCAGGGAATCAAGTGCTTT CTAGTCAGGGGCAAAACTTTGGGAAAT CTGAGGACCCAGGGTGGTATGGTCTGT TCAGGAGAATTTTGGGGAACAGAATGG CCCCCTTCTCCCTCCAGCACTTGTACAG ATCAGCACTTGGCCCCAGAACAGAGAC CAGACTGAGAGACGAGGTTAGGAGGA AACAGGGGACCCAGGAAAGGCGGCTA GATTGCAAACGTACCTACACAGCTCTG AGTCAAAGGCTGTCAGTCATCTCGGCT CAGACTGCTCTGCTCTCCAGCAGCCCA GCCCTTTCCCAGGGCTGGGGCAGGAGA TTGCTACATGTAGGCTTATCTGGGGAAA AACCAGAGCCTCACTTTAGTCCCTTCC GGTAATTGACACTACTGGACACCCAGG AGGGGGAGGAGAGAGCTTCTCTTCATA AATGTTCCCACCCCTGGGCAAGGTGGC TCACTCTGGCAGGTAGGAACAGGGGAG AGTGCACCTGCTACCAGTCAAGCTCAG CCAGACTGCAAGAGGAGGCGAGGCGG AGCCAGCCGAGGGAGTGAACCATGGA CAAGTTGAAATGCCCGAGTTTCTTCAA GTGCAGGGAGAAGGAGGTAGGGGTCT GGGAGCTGCGGGAGGTGTGGAGGACC TGAGAGTGGAAAACTTAAGGGGGGTTG CTAGTCTCAGTTTTTGCTTTCTGTGGCT GTTCCTTGTGCTCCACATTTCTGTTCAA CTATTAGGTGTGACTGAGATATACCTATA GAGTAGAGAAGAAAGAAAAGCTCTTAC TCTCATAGCTAGAAGACTTAGGGCCAC CTCATCCTCTGCCTTGGGAGTACCCACA AAATCCTGTTCTCTATCCCTCTCCTAACT GTGTCCACATGCTAGAGGAAAGTACAA AAGTACACTGTTCTTAATTGACCCAAAG

[0105]

SEQ ID NO:	启动子序列的描述	启动子序列
		AACCCTC
2	含有人类启动子#1 (SEQ ID NO: 1)的在哺乳动物物种中保守的区域的人类SLC6A14 启动子序列#2	ACTTTTCTCTACCTTACCTGCCAAGATT CCCCAGGGCATATTTCTATTGCAAATGG AAAATTCTTGCAGTCAGTGGAGAACAA AGGAGCTATACATAGGGTACAGAATTTG CCTATTTGCTCATTCCTCTGTGTGCATGA ATTTGTGCTTTGCTTCATAGAAGTTTCC TGATGAAAAGGCATTCCATTGGTAAAC AGCATTATAATAATTATTTCCTCCCTGGT CAAGCTGGGATGTTTCCTCATAGTTTAC TTTCTAGGCCTCATCTTTCTTACAGACT GTGCTCCTTTGTTAAGGTTAGAATTTCC CATAAACCTGCTCAATAATTTGTTTGTG TTTGGCTTCTTTGAAATACTACACAAAG CAATCCCTGTAAAAGGCAAAGCTGTCC TGAAGGCTGAGAAAGGAGCCTGAGAC ATAGGCTCCAAGTTGCTCTTTTCAGGCA GAGCCAGCTGGGTAATCTTATCTCAGAT GGCTGCTTTTCAAGGTGCCCAATTCAG GGGCTTTTCCTCTGGGAGCAGCATTTGC CCCAGGGAATCAAGTGCTTTCTAGTCA GGGGCAAAACTTTGGGAAATCTGAGGA CCCAGGGTGGTATGGTCTGTTCAGGAG AATTTTGGGGAACAGAATGGCCCCCTT CTCCCTCCAGCACTTGTACAGATCAGC ACTTGGCCCCAGAACAGAGACCAGACT GAGAGACGAGGTTAGGAGGAAACAGG GGACCCAGGAAAGGCGGCTAGATTGCA AACGTACCTACACAGCTCTGAGTCAAA GGCTGTCAGTCATCTCGGCTCAGACTG CTCTGCTCTCCAGCAGCCCAGCCCTTTC CCAGGGCTGGGGCAGGAGATTGCTACA TGTAGGCTTATCTGGGGAAAAACCAGA GCCTCACTTTAGTCCCTTCCGGTAATTG ACACTACTGGACACCCAGGAGGGGGA GGAGAGAGCTTCTCTTCATAAATGTTCC CACCCCTGGGCAAGGTGGCTCACTCTG GCAGGTAGGAACAGGGGAGAGTGCAC CTGCTACCAGTCAAGCTCAGCCAGACT GCAAGAGGAGGCGAGGCGGAGCCAGC CGAGGGAGTGAACCATGGACAAGTTGA AATGCCCGAGTTTCTTCAAGTGCAGGG AGAAGGAGGTAGGGGTCTGGGAGCTG CGGGAGGTGTGGAGGACCTGAGAGTG GAAAACTTAAGGGGGGTTGCTAGTCTC AGTTTTTGCTTTCTGTGGCTGTTCCTTG TGCTCCACATTTCTGTTCAACTATTAGG TGTGACTGAGATATACCTATAGAGTAGA

[0106]

SEQ ID NO:	启动子序列的描述	启动子序列
		GAAGAAAGAAAAGCTCTTACTCTCATT CCCTCTCCTAACTGTGTCCACATGCTAG AGGAAAGTACAAAAGTACACTGTTCTT AATTGACCCAAAGAACCCTCCATACCC CAGAGAAGTGAGCAGGTTGGGA
3	人类 SLC6A14 启动子序列#3	ACCTGGGCAGACTGAGTTTAAATCCTTT GAGTTTCCTGATGAAAAGGCATTCCATT GGTAAACAGCATTATAATAATTATTTCCT CCCTGGTCAAGCTGGGATGTTTCCTCAT AGTTTACTTTCTAGGCCTCATCTTTCTTA CAGAGTGTGCTCCTTTGTTAAGGTTAGA ATTTCCCATAAACCTGCTCAATAATTTGT TTGTGTTTGGCTTCTTTGAAATACTACA CAAAGCAATCCCTGTAAAAGGCAAAGC TGTCCTGAAGGCTGAGAAAGGAGCCTG AGACATAGGCTCCAAGTTGCTCTTTTCA GGCAGAGCCAGCTGGGTAATCTTATCTC AGATGGCTGCTTTTCAAGGTGCCCAATT CAGGGGCTTTTCCTCTGGGAGCAGCAT TTGCCCCAGGGAATCAAGTGCTTTCTAG TCAGGGGCAAAACTTTGGGAAATCTGA GGACCCAGGGTGGTATGGTCTGTTCAG GAGAATTTTGGGGAACAGAATGGCCCC CTTCTCCCTCCAGCACTTGTACAGATCA GCACTTGGCCCCAGAACAGAGACCAG ACTGAGAGGCGAGGTTAGGAGGAAAC AGGGGACCCAGGAAAGGCGGCTAGATT GCAAACGTACCTACACAGCTCTGAGTC AAAGGCTGTCAGTCATCTCGGCTCAGA CTGCTCTGCTCTCCAGCAGCCCAGCCC TTTCCCAGGGCTGGGGCAGGAGATTGC TACATGTAGGCTTATCTGGGGAAAAACC AGAGCCTCACTTTAGTCCCTTCCGGTAA TTGACACTACTGGACACCCAGGAGGGG GAGGAGAGAGCTTCTCTTCATAAATGTT CCCACCCCTGGGCAAGGTGGCTCACTC TGGCAGGTAGGAACAGGGGAGAGTGC ACCTGCTACCAGTCAAGCTCAGCCAGA CTGCAAGAGGAGGCGAGGCGGAGCCA GCCGAGGGAGTGAACC
4	人类 SLC6A14 启动子序列#4	AAGCTGGGATGTTTCCTCATAGTTTACT TTCTAGGCCTCATCTTTCTTACAGAGTG TGCTCCTTTGTTAAGGTTAGAATTTCCC ATAAACCTGCTCAATAATTTGTTTGTGT TTGGCTTCTTTGAAATACTACACAAAGC AATCCCTGTAAAAGGCAAAGCTGTCCT GAAGGCTGAGAAAGGAGCCTGAGACAT AGGCTCCAAGTTGCTCTTTTCAGGCAG

[0107]

SEQ ID NO:	启动子序列的描述	启动子序列
		AGCCAGCTGGGTAATCTTATCTCAGATG GCTGCTTTTCAAGGTGCCCAATTCAGG GGCTTTTCCTCTGGGAGCAGCATTTGCC CCAGGGAATCAAGTGCTTTCTAGTCAG GGGCAAAACTTTGGGAAATCTGAGGAC CCAGGGTGGTATGGTCTGTTCAGGAGA ATTTTGGGGAACAGAATGGCCCCCTTCT CCCTCCAGCACTTGTACAGATCAGCAC TTGGCCCCAGAACAGAGACCAGACTGA GAGGCGAGGTTAGGAGGAAACAGGGG ACCCAGGAAAGGCGGCTAGATTGCAAA CGTACCTACACAGCTCTGAGTCAAAGG CTGTCAGTCATCTCGGCTCAGACTGCTC TGCTCTCCAGCAGCCCAGCCCTTTCCC AGGGCTGGGGCAGGAGATTGCTACATG TAGGCTTATCTGGGGAAAAACCAGAGC CTCACTTTAGTCCCTTCCGGTAATTGAC ACTACTGGACACCCAGGAGGGGGAGG AGAGAGCTTCTCTTCATAAATGTTCCCA CCCCTGGGCAAGGTGGCTCACTCTGGC AGGTAGGAACAGGGGAGAGTGCACCT GCTACCAGTCAAGCTCAGCCAGACTGC AAGAGGAGGCGAGGCG
5	鼠类 SLC6A14 启动子序列#1	AACCTGGCTTGTTTCCTTACAGTTTACT TTCTAGGCCTCGCCTTTCTCACAGAGTG AAGTCCTTTGTTAAGGTTCGAATTTCCC ATAAACCTGCTCAATAATTTGTTTGTGT TTGGCTTCTTTGAAATACTACACAAAGC AATCCTTGTAAAAGGCAAAACTATTCCG AAGGCTGAGAAAGGAGCTCCAGGACAT AGATTCAAAGTCGCTCTTTTCAGGTAGA GACAGCTGGGTAATCTTATCTTAACTGG CTACATTTCAAGGTTCCCAATTCAGGGG CTTTCCCCTCTGGGAGCAGCATTCTCTC CGGGTGATGAAGAGCTTTCTAGTGAGG AGCAAAACTTTCAGAAAACCGGAGGG CCCAGAGCAGTCTGGTCTGTTCACAAA AATTATAGCAAACAAAATAAGCCCGGC GGATTGGGTCTCTCCTACCTCCAGCACC AGGGGAGATCAGCACTTGGCCCCAGGA CAGAGACCTGAGAAGTGAGGTTTGGA AGAAGCCAGGAATCCAGGAAAGGAGG CAAGATTGCTAAGGCACCGGCACAGCT CTGAGTCAAAAGTTGTCAGTCTTCTTTG GCTCTGGCTGCGGAGCTCAATTGCTCA CAGCCCTGCCCTTTCCTAGGGCTGGGG CAAGGAATTGCTACATTCAGGATTACCT GGGGGAAAAACCAGAGGCTTGCTTTGG

[0108]

SEQ ID NO:	启动子序列的描述	启动子序列
		TCCCTTCCGGTAATTGAAAGGACTGGC CGTCAGCGAGGGGGAGGAGAGCTT CCCTCCATAAATGGTCCCACCCCTGGGC AAGGTGGCTCACTTTGGCAGGTAGCAA CCGGGGAGTGTGCACCTGCCACCAGTC AAGCTCAGCCAGACTGTGAGAAGAGG AGAGGCG
6	鼠类 SLC6A14 启动子序列#2	GTAGAATATAAATAACATACAGTAGAAT TTAATGCAAGATTGTTTTATTGTTGCAA AAATAATGCTTTTTATACTTTGTGAATTG TTAAGGTAGGCCCAATAAGAACATGAA ACTAACCAAGGCGACCCACAGAGCGA AAGAAAATGAATTGCACAATACTCTAGT AATGTGGAAACAGCTTTTCAGTTACAC CACTTTAACTTACTTGAGCTTACAGGTT CTGTTAGAAGTATTGAGGTGACATGTGC CTGTATTACATAATTGAATACCATTGAAA TTTTGCCAGTATAATTATTTTTCTCTTGG CACAATAGGATTTTGTGTGGTGATGTTT CAACCACATATCTTGTTAATTGAGTGAT CAGCACTTGGCCCCAGGACAGAGACCT GAGAAGTGAGGTTTGGAAGAAGCCAG GAATCCAGGAAAGGAGGCAAGATTGCT AAGGCACCGGCACAGCTCTGAGTCAAA AGTTGTCAGTCTTCTTTGGCTCTGGCTG CGGAGCTCAATTGCTCACAGCCCTGCC CTTTCCTAGGGCTGGGGCAAGGAATTG CTACATTCAGGATTACCTGGGGGAAAA ACCAGAGGCTTGCTTTGGTCCCTTCCG GTAATTGAAAGGACTGGCCGTCAGCGA GGGGGAGGAGAGAGCTTCCCTCCATAA ATGGTCCCACCCCTGGGCAAGGTGGCT CACTTTGGCAGGTAGCAACCGGGGAGT GTGCACCTGCCACCAGTCAAGCTCAGC CAGACTGTGAGAAGAGGAGAGGCG

[0109] 外源核酸在哺乳动物细胞中的表达

[0110] 本文所述的组合物和方法可用于通过施用含有可操作地连接至编码目标蛋白质的核酸序列的SLC6A14启动子(例如与SLC6A14启动子的序列(例如SEQ ID NO:1-6中的任一者)具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的多核苷酸)的核酸载体,诱导或增加由目标基因(例如参与前庭功能障碍的基因的野生型形式,或参与前庭毛细胞发育、前庭毛细胞命运特化、前庭毛细胞再生、前庭毛细胞和/或VSC增殖、前庭毛细胞神经支配或前庭毛细胞成熟的基因)编码的蛋白质在VSC中的表达。已建立将蛋白质递送至哺乳动物细胞和在哺乳动物细胞中稳定表达编码蛋白质的基因的众多种方法。可与本文所述的组合物结

合表达(例如当编码蛋白质的转基因可操作地连接至SLC6A14启动子(例如与表2中所列出序列中的任一者(例如SEQ ID NO:1-6中任一者的多核苷酸)具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的多核苷酸)的蛋白质是在健康VSC中表达的蛋白质(例如在前庭毛细胞发育、前庭毛细胞命运特化、前庭毛细胞再生、前庭毛细胞和/或VSC增殖、前庭毛细胞神经支配或前庭毛细胞成熟中起作用的蛋白质,或在患有前庭功能障碍的受试者中缺失的蛋白质)或其他目标蛋白质。可使用本文所述的组合物和方法在VSC中表达的蛋白质包括婆罗双树样转录因子2(Sall2)、钙调蛋白结合转录激活因子1(Camta1)、具有YRPW基序2的Hes相关家族BHLH转录因子(Hey2)、Gata结合蛋白2(Gata2)、具有YRPW基序1的Hes相关家族BHLH转录因子(Hey1)、神经酰胺合酶2(Lass2)、SRY盒10(Sox10)、GATA结合蛋白3(Gata3)、Cut样同源异形盒1(Cux1)、核受体亚家族2族F成员(Nr2f1)、Hes相关家族BHLH转录因子(Hes1)、RAR相关孤儿受体B(Rorb)、Jun原癌基因AP-1转录因子亚基(Jun)、锌指蛋白667(Zfp667)、LIM同源异形盒3(Lhx3)、无义螺旋-环-螺旋1(Nhlh1)、MAX二聚化蛋白4(Mxd4)、MIZ-1型锌指(Zmiz1)、髓磷脂转录因子1(Myt1)、信号转导子和转录激活因子3(Stat3)、BarH样同源异形盒1(Barhl1)、胸腺细胞选择相关的高迁移率族盒(Tox)、Prospero同源异形盒1(Prox1)、核因子IA(Nfia)、甲状腺激素受体β(Thrb)、MYCL原癌基因BHLH转录因子(Mycl1)、赖氨酸去甲基酶5A(Kdm5a)、CAMP反应元件结合蛋白3样4(Creb3l4)、ETS变体1(Etv1)、父系表达的3(Peg3)、BTB结构域和CNC同源物2(Bach2)、ISLLIM同源异形盒1(Isl1)、锌指和含BTB结构域的38(Zbtb38)、肢芽和心脏发育(Lbh)、Tubby二分转录因子(Tub)、泛素C(Hmg20)、RE1沉默转录因子(Rest)、锌指蛋白827(Zfp827)、AF4/FMR2家族成员3(Aff3)、PBX/有节的1同源异形盒2(Pknox2)、富含AT的相互作用结构域3B(Arid3b)、MLX相互作用蛋白(Mlxip)、锌指蛋白(Zfp532)、IKAROS家族锌指2(Ikzf2)、婆罗双树样转录因子1(Sall1)、SIX同源异形盒2(Six2)、婆罗双树样转录因子3(Sall3)、Lin-28同源物B(Lin28b)、调节因子X7(Rfx7)、脑源性神经营养因子(Bdnf)、生长因子非依赖性1转录阻遏子(Gfi1)、POU4类同源异形盒3(Pou4f3)、MYC原癌基因BHLH转录因子(Myc)、β-连环蛋白(Ctnnb1)、SRY盒2(Sox2)、SRY盒4(Sox4)、SRY盒11(Sox11)、TEA结构域转录因子2(Tead2)、无调BHLH转录因子1(Atoh1)和在氨基酸328、331和/或334处含有取代(例如S328A、S331A、S334A、S328A/S331A、S328A/S334A、S331A/S334A和S328A/S331A/S334)的Atoh1变体。本文所述的多核苷酸(例如SLC6A14启动子)也可用于在VSC中表达短干扰RNA(siRNA)、反义寡核苷酸(ASO)、核酸酶(例如CRISPR相关蛋白9(Cas9)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)、锌指核酸酶(ZFN)或向导RNA(gRNA))或微小RNA。

[0111] 在一些实施方案中,使用本文所述的组合物和方法在VSC中表达的蛋白质是Atoh1。SLC6A14启动子(例如与表2中所列出序列中的任一者(例如SEQ ID NO:1-6中任一者的多核苷酸)具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的多核苷酸)可操作地连接至编码野生型Atoh1或其变体的多核苷酸序列,例如编码与野生型哺乳动物(例如人类或小鼠)Atoh1的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:12)具有至少85%序列同一性(例如85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的蛋白质的多核苷酸序列。示例性Atoh1氨基酸和多核苷酸序列列于下表3中。

[0112] 在一些实施方案中,编码Atoh1蛋白的多核苷酸序列编码相对于SEQ ID NO:10含有一个或多个保守氨基酸取代(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个或更多个保守氨基酸取代)的氨基酸序列,条件是编码的Atoh1类似物保留野生型Atoh1的治疗功能(例如促进毛细胞发育的能力)。Atoh1蛋白中不超过10%的氨基酸可用保守氨基酸取代来代替。在一些实施方案中,编码Atoh1的多核苷酸序列是因遗传密码的冗余性而编码SEQ ID NO:10的任何多核苷酸序列。编码Atoh1的多核苷酸序列可经部分或完全密码子优化用于表达(例如在人类VSC中)。Atoh1可由具有SEQ ID NO:11的序列的多核苷酸编码。Atoh1蛋白可为人类Atoh1蛋白或者可为来自另一哺乳动物物种(例如小鼠、大鼠、牛、马、山羊、绵羊、驴、猫、犬、兔、天竺鼠或其他哺乳动物)的人类Atoh1蛋白的同源物。

[0113] 表3:Atoh1序列

[0114]

SEQ ID NO:	启动子序列的描述	序列
10	人类 Atoh1 氨基酸序列，RefSeq 登录号 NP_005163.1	MSRLLHAEEWAEVKELGDHHRQPQPHHLPQ PPPPPQPPATLQAREHPVYPPELSLLDSTDPR AWLAPTLQGICTARAAQYLLHSPELGASEAA APRDEVDGRGELVRRSSGGASSSKSPGPVKV REQLCKLKGGVVVDELGCSRQRAPSSKQVN GVQKQRRLAANARERRRMHGLNHAFDQLR NVIPSFNNDKKLSKYETLQMAQIYINALSEL LQTPSGGEQPPPPPASCKSDHHHLRTAASYE GGAGNATAAGAQQASGGSQRPTPPGSCRTR FSAPASAGGYSVQLDALHFSTFEDSALTAMM AQKNLSPSLPGSILQPVQEENSKTSPRSHRSD GEFSPHSHYSDSDEAS

[0115]

SEQ ID NO:	启动子序列的描述	序列
11	人类 ATOH1 蛋白编码序列，也记载于 RefSeq 登录号 NM_005172.2 下	ATGTCCCGCCTGCTGCATGCAGAAGAGTGG GCTGAAGTGAAGGAGTTGGGAGACCACCA TCGCCAGCCCCAGCCGCATCATCTCCCGCA ACCGCCGCCGCCGCCGCAGCCACCTGCAA CTTTGCAGGCGAGAGAGCATCCCGTCTACC CGCCTGAGCTGTCCCTCCTGGACAGCACC GACCCACGCGCCTGGCTGGCTCCCACTTTG CAGGGCATCTGCACGGCACGCGCCGCCCA GTATTTGCTACATTCCCCGGAGCTGGGTGC CTCAGAGGCCGCTGCGCCCCGGGACGAGG TGGACGGCCGGGGGGAGCTGGTAAGGAGG AGCAGCGGCGGTGCCAGCAGCAGCAAGA GCCCCGGGCCGGTGAAAGTGCGGGAACAG CTGTGCAAGCTGAAAGGCGGGGTGGTGGT AGACGAGCTGGGCTGCAGCCGCCAACGGG CCCCTTCCAGCAAACAGGTGAATGGGGTG CAGAAGCAGAGACGGCTAGCAGCCAACGC CAGGGAGCGGCGCAGGATGCATGGGCTGA ACCACGCCTTCGACCAGCTGCGCAATGTTA TCCCGTCGTTCAACAACGACAAGAAGCTG TCCAAATATGAGACCCTGCAGATGGCCCAA ATCTACATCAACGCCTTGTCCGAGCTGCTA CAAACGCCCAGCGGAGGGGAACAGCCACC GCCGCCTCCAGCCTCCTGCAAAAGCGACC ACCACCACCTTCGCACCGCGGCCTCCTATG AAGGGGGCGCGGGCAACGCGACCGCAGCT GGGGCTCAGCAGGCTTCCGGAGGGAGCCA GCGGCCGACCCCGCCCGGGAGTTGCCGGA CTCGCTTCTCAGCCCCAGCTTCTGCGGGAG GGTACTCGGTGCAGCTGGACGCTCTGCACT TCTCGACTTTCGAGGACAGCGCCCTGACA GCGATGATGGCGCAAAAGAATTTGTCTCCT TCTCTCCCCGGGAGCATCTTGCAGCCAGTG CAGGAGGAAAACAGCAAAACTTCGCCTCG GTCCCACAGAAGCGACGGGGAATTTTCCC CCCATTCCCATTACAGTGACTCGGATGAGG CAAGT

[0116]

SEQ ID NO:	启动子序列的描述	序列
12	鼠类 Atoh1 氨基酸序列，UniProt P48985	MSRLLHAEEWAEVKELGDHHRHPQPHHVPP LTPQPPATLQARDLPVYPAELSLLDSTDPRAW LTPTLQGLCTARAAQYLLHSPELGASEAAAP RDEADSQGELVRRSGCGGLSKSPGPVKVRE QLCKLKGGVVVDELGCSRQRAPSSKQVNGV QKQRRLAANARERRRMHGLNHAFDQLRNV IPSFNNDKKLSKYETLQMAQIYINALSELLQT PNVGEQPPPPTASCKNDHHHLRTASSYEGGA GASAVAGAQPAPGGGPRPTPPGPCRTRFSGPA SSGGYSVQLDALHFPAFEDRALTAMMAQKD LSPSLPGGILQPVQEDNSKTSPRSHRSDGEFS PHSHYSDSDEAS
13	鼠类 ATOH1 蛋白编码序列，也记载于 RefSeq 登录号 NM_007500.5 下	ATGTCCCGCCTGCTGCATGCAGAAGAGTGG GCTGAGGTAAAAGAGTTGGGGGACCACCA TCGCCATCCCCAGCCGCACCACGTCCCGCC GCTGACGCCACAGCCACCTGCTACCCTGC AGGCGAGAGACCTTCCCGTCTACCCGGCA GAACTGTCCCTCCTGGATAGCACCGACCCA CGCGCCTGGCTGACTCCCACTTTGCAGGGC CTCTGCACGGCACGCGCCGCCCAGTATCTG CTGCATTCTCCCGAGCTGGGTGCCTCCGAG GCCGCGGCGCCCCGGGACGAGGCTGACAG CCAGGGTGAGCTGGTAAGGAGAAGCGGCT GTGGCGGCCTCAGCAAGAGCCCCGGGCCC GTCAAAGTACGGGAACAGCTGTGCAAGCT GAAGGGTGGGGTTGTAGTGGACGAGCTTG GCTGCAGCCGCCAGCGAGCCCCTTCCAGC AAACAGGTGAATGGGGTACAGAAGCAAAG GAGGCTGGCAGCAAACGCAAGGGAACGG CGCAGGATGCACGGGCTGAACCACGCCTT CGACCAGCTGCGCAACGTTATCCCGTCCTT CAACAACGACAAGAAGCTGTCCAAATATG AGACCCTACAGATGGCCCAGATCTACATCA ACGCTCTGTCGGAGTTGCTGCAGACTCCCA ATGTCGGAGAGCAACCGCCGCCGCCCACA GCTTCCTGCAAAAATGACCACCATCACCTT CGCACCGCCTCCTCCTATGAAGGAGGTGCG GGCGCCTCTGCGGTAGCTGGGGCTCAGCC AGCCCCGGGAGGGGGCCCGAGACCTACCC CGCCCGGGCCTTGCCGGACTCGCTTCTCAG GCCCAGCTTCCTCTGGGGGTTACTCGGTGC AGCTGGACGCTTTGCACTTCCCAGCCTTCG AGGACAGGGCCCTAACAGCGATGATGGCA CAGAAGGACCTGTCGCCTTCGCTGCCCGG GGGCATCCTGCAGCCTGTACAGGAGGACA ACAGCAAAACATCTCCCAGATCCCACAGA AGTGACGGAGAGTTTTCCCCCCACTCTCAT TACAGTGACTCTGATGAGGCCAGT

[0117] 编码目标蛋白质的多核苷酸

[0118] 可用于在哺乳动物细胞中实现目标蛋白质的治疗有效的细胞内浓度的一个平台

是经由稳定表达编码目标蛋白质的基因(例如,通过整合至哺乳动物细胞的核或线粒体基因组中,或通过在哺乳动物细胞核中形成游离型多联体)。所述基因是编码相应蛋白质的一级氨基酸序列的多核苷酸。为将外源基因引入哺乳动物细胞中,可将基因并入载体中。可通过多种方法将载体引入细胞中,包括转化、转染、转导、直接摄取、射弹轰击和通过将载体囊封于脂质体中。转染或转化细胞的合适方法的实例包括磷酸钙沉淀、电穿孔、显微注射、感染、脂转染和直接摄取。此类方法更详细阐述于例如Green等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第四版(Cold Spring Harbor University Press,NewYork 2014);和Ausubel等人,CurrentProtocols inMolecular Biology(JohnWiley&Sons,NewYork2015),所述文献各自的公开内容通过引用并入本文。

[0119] 也可通过使含有编码目标蛋白质的基因的载体靶向细胞膜磷脂将目标蛋白质引入哺乳动物细胞中。例如,可通过将载体分子连接至VSV-G蛋白使载体靶向细胞膜的细胞外表面上的磷脂,所述VSV-G蛋白是对所有细胞膜磷脂具有亲和力的病毒蛋白。这种构建体可使用本领域技术人员所熟知的方法产生。

[0120] 哺乳动物RNA聚合酶对编码目标蛋白质的多核苷酸的识别和结合对于基因表达至关重要。因此,可在多核苷酸内包括对招募RNA聚合酶并促进转录复合物在转录起始位点组装的转录因子表现出高亲和力的序列元件。此类序列元件包括例如哺乳动物启动子,其序列可由特异性转录起始因子和最终RNA聚合酶识别和结合。哺乳动物启动子的实例已阐述于Smith等人,Mol.Sys.Biol.,3:73,在线出版中,其公开内容通过引用并入本文。用于本文所述方法和组合物中的启动子是SLC6A14启动子(例如与表2中所列出的多核苷酸序列中的任一者(例如SEQ ID NO:1-6中任一者的多核苷酸)具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的多核苷酸)。

[0121] 一旦将编码目标蛋白质的多核苷酸并入哺乳动物细胞的核DNA中,就可立即通过本领域中已知的方法来诱导这种多核苷酸的转录。例如,可通过使哺乳动物细胞暴露于外部化学试剂(例如调节转录因子和/或RNA聚合酶与哺乳动物启动子的结合并因此调节基因表达的剂)来诱导表达。化学试剂可用于促进RNA聚合酶和/或转录因子与哺乳动物启动子的结合,例如通过去除已结合启动子的抑制蛋白。或者,化学试剂可用于增强哺乳动物启动子对RNA聚合酶和/或转录因子的亲和力,使得位于启动子下游的基因的转录速率在化学试剂存在下增加。加强通过上述机制的多核苷酸转录的化学试剂的实例包括四环素和强力霉素。这些试剂可购得(Life Technologies,Carlsbad,CA)并且可根据所建立的方案施用于哺乳动物细胞来促进基因表达。

[0122] 可包括在用于本文所述组合物和方法中的多核苷酸中的其他DNA序列元件包括增强子序列。增强子代表另一类调节元件,其诱导含有目标基因的多核苷酸的构象变化,使得DNA采取有利于转录因子和RNA聚合酶在转录起始位点结合的三维取向。因此,用于本文所述组合物和方法中的多核苷酸包括编码目标蛋白质并且另外包括哺乳动物增强子序列的那些多核苷酸。现在从哺乳动物基因已知许多增强子序列,并且实例包括来自编码哺乳动物珠蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、α-胎儿蛋白和胰岛素的基因的增强子。用于本文所述组合物和方法中的增强子也包括衍生自能够感染真核细胞的病毒的遗传材料的那些增强子。实例包括在复制起点后侧(bp 100-270)的SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、在复

制起点后侧的多瘤增强子和腺病毒增强子。诱导真核基因转录活化的其他增强子序列包括CMV增强子和RSV增强子。增强子可剪接至含有编码目标蛋白质的多核苷酸的载体中,例如在此基因的位置5'或3'处。在一个优选取向中,增强子定位于启动子的5'侧,所述启动子进而位于相对于编码目标蛋白质的多核苷酸的5'。

[0123] 本文所述含有SLC6A14启动子的核酸载体可包括土拨鼠转录后调节元件(WPRE)。WPRE在mRNA水平上通过促进转录物的核输出和/或通过增加新生转录物的多聚腺苷酸化效率、由此增加细胞中mRNA的总量起作用。将WPRE添加至载体可在体外和体内实质上改进来自若干不同启动子的转基因表达的水平。在本文所述的组合物和方法的一些实施方案中,WPRE具有以下序列:

[0124] GATCCAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGA(SEQ ID NO:14)。

[0125] 在其他实施方案中,WPRE具有以下序列:

[0126] AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATCTAGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGAGATGTGGGAGGTTTTTTAAA(SEQ ID NO:15)

[0127] 在一些实施方案中,本文所述含有SLC6A14启动子的核酸载体包括报告基因序列,其可用于验证可操作地连接至VSC中的SLC6A14启动子的基因的表达。可提供于转基因中的报告基因序列包括编码β-内酰胺酶、β-半乳糖苷酶(LacZ)、碱性磷酸酶、胸苷激酶、绿色荧光蛋白(GFP)、氯霉素乙酰基转移酶(CAT)、荧光素酶和本领域中所熟知的其他蛋白质的DNA序列。当与驱动其表达的调节元件(例如SLC6A14启动子)缔合时,报告基因序列提供可通过常规方法检测到的信号,所述常规方法包括酶促、放射照相、比色、荧光或其他光谱测定、荧光激活细胞分选测定和免疫测定,包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)和免疫组织化学。例如,当标志物序列是LacZ基因时,通过测定β-半乳糖苷酶活性检测到携带信号的载体的存在。当转基因是绿色荧光蛋白或荧光素酶时,携带信号的载体可在视觉上通过光度计中的色彩或光产生来测量。

[0128] 可用于产生用于本文所述组合物和方法中的核酸载体(例如AAV载体)的转移质粒提供于表4中。转移质粒(例如含有有待通过核酸载体递送、例如有待通过AAV递送的DNA序列的质粒)可与辅助质粒(例如提供AAV制造所需的蛋白质的质粒)和rep/cap质粒(例如提供AAV衣壳蛋白和将转移质粒DNA序列插入衣壳外壳中的蛋白质的质粒)共递送至产生细胞中以产生用于施用的核酸载体(例如AAV载体)。可使用表4中所提供的转移质粒来产生含有

可操作地连接至转基因(例如编码Atoh1的多核苷酸或编码GFP的多核苷酸)的SLC6A14启动子的核酸载体(例如AAV载体)。

[0129] 表4:转移质粒

[0130]

SEQ ID NO.	描述	质粒序列
7	SLC6A14-ATOH1 位置 1-130 处的 ITR 位置 233-1066 处的 SLC6A14 启动子 位置 1083-2144 处的 Atoh1 编码序列 位置 2155-2702 处的 WPRE 序列 位置 2715-2922 处的牛生长激素多聚腺苷酸化(bGH poly(A))序列 位置 3010-3139 处的 ITR 位置 1-3139 处的待转移至载体中的转基因	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC GCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGC GACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAG CGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTG TAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACT TATCTACGTAGCCATGCTCTAGGAAGAT CGGAATTCGCCCTTAAGCTAGCGGCGC GCCACCGGTGCGATCGCAAGCTGGGA TGTTTCCTCATAGTTTACTTTCTAGGCC TCATCTTTCTTACAGAGTGTGCTCCTTT GTTAAGGTTAGAATTTCCCATAAACCT GCTCAATAATTTGTTTGTGTTTGGCTTC TTTGAAATACTACACAAAGCAATCCCT GTAAAAGGCAAAGCTGTCCTGAAGGC TGAGAAAGGAGCCTGAGACATAGGCT CCAAGTTGCTCTTTTCAGGCAGAGCCA GCTGGGTAATCTTATCTCAGATGGCTG CTTTTCAAGGTGCCCAATTCAGGGGCT TTTCCTCTGGGAGCAGCATTTGCCCCA GGGAATCAAGTGCTTTCTAGTCAGGGG CAAAACTTTGGGAAATCTGAGGACCC AGGGTGGTATGGTCTGTTCAGGAGAAT TTTGGGGAACAGAATGGCCCCCTTCTC CCTCCAGCACTTGTACAGATCAGCACT TGGCCCCAGAACAGAGACCAGACTGA GAGGCGAGGTTAGGAGGAAACAGGG GACCCAGGAAAGGCGGCTAGATTGCA AACGTACCTACACAGCTCTGAGTCAAA GGCTGTCAGTCATCTCGGCTCAGACTG CTCTGCTCTCCAGCAGCCCAGCCCTTT CCCAGGGCTGGGGCAGGAGATTGCTA CATGTAGGCTTATCTGGGGAAAAACCA GAGCCTCACTTTAGTCCCTTCCGGTAA TTGACACTACTGGACACCCAGGAGGG GGAGGAGAGAGCTTCTCTTCATAAATG TTCCCACCCCTGGGCAAGGTGGCTCAC TCTGGCAGGTAGGAACAGGGGAGAGT GCACCTGCTACCAGTCAAGCTCAGCC AGACTGCAAGAGGAGGCGAGGCGCCG CGGCCGCGCCACCATGTCCCGCCTGCT GCATGCAGAAGAGTGGGCTGAAGTGA AGGAGTTGGGAGACCACCATCGCCAG CCCCAGCCGCATCATCTCCCGCAACCG

[0131]

SEQ ID NO.	描述	质粒序列
		CCGCCGCCGCCGCAGCCACCTGCAAC TTTGCAGGCGAGAGAGCATCCCGTCTA CCCGCCTGAGCTGTCCCTCCTGGACAG CACCGACCCACGCGCCTGGCTGGCTC CCACTTTGCAGGGCATCTGCACGGCAC GCGCCGCCCAGTATTTGCTACATTCCC CGGAGCTGGGTGCCTCAGAGGCCGCT GCGCCCCGGGACGAGGTGGACGGCCG GGGGGAGCTGGTAAGGAGGAGCAGCG GCGGTGCCAGCAGCAGCAAGAGCCCC GGGCCGGTGAAAGTGCGGGAACAGCT GTGCAAGCTGAAAGGCGGGGTGGTGG TAGACGAGCTGGGCTGCAGCCGCCAA CGGGCCCCTTCCAGCAAACAGGTGAA TGGGGTGCAGAAGCAGAGACGGCTAG CAGCCAACGCCAGGGAGCGGCGCAGG ATGCATGGGCTGAACCACGCCTTCGAC CAGCTGCGCAATGTTATCCCGTCGTTC AACAACGACAAGAAGCTGTCCAAATA TGAGACCCTGCAGATGGCCCAAATCTA CATCAACGCCTTGTCCGAGCTGCTACA AACGCCCAGCGGAGGGGAACAGCCAC CGCCGCCTCCAGCCTCCTGCAAAAGC GACCACCACCACCTTCGCACCGCGGC CTCCTATGAAGGGGGCGCGGGCAACG CGACCGCAGCTGGGGCTCAGCAGGCT TCCGGAGGGAGCCAGCGGCCGACCCC GCCCGGGAGTTGCCGGACTCGCTTCTC AGCCCCAGCTTCTGCGGGAGGGTACT CGGTGCAGCTGGACGCTCTGCACTTCT CGACTTTCGAGGACAGCGCCCTGACA GCGATGATGGCGCAAAAGAATTTGTCT CCTTCTCTCCCCGGGAGCATCTTGCAG CCAGTGCAGGAGGAAAACAGCAAAAC TTCGCCTCGGTCCCACAGAAGCGACG GGGAATTTTCCCCCCATTCCCATTACA GTGACTCGGATGAGGCAAGTTAGAAG CTTGGATCCAATCAACCTCTGGATTAC AAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATT CTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTAT GTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTA TCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTC ATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGT TGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGC CCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTG TGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCC ACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGT

[0132]

SEQ ID NO.	描述	质粒序列
		CAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTC CCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTC ATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGG ACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGA CAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATC ATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGT GTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACG TCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTC AATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGC CTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCG CGTCTTCGAGATCTGCCTCGACTGTGC CTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTG CCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCT GGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTC CTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCA TTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTG GGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCA AGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGC AGGCATGCTGGGGACTCGAGTTAAGG GCGAATTCCCGATAAGGATCTTCCTAG AGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATG GCGGGTTAATCATTAACTACAAGGAAC CCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCT CTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGC CCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGT GAGCGAGCGAGCGCGCAGCCTTAATT AACCTAATTCACTGGCCGTCGTTTTAC AACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGC GTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCA CATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAAT AGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCC TTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGG CGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCG CATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTA CGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCC AGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCT TTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCG CCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATC GGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTA GTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAA AACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTA GTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTT TTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGT TCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAA CTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGG TCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTT

[0133]

SEQ ID NO.	描述	质粒序列
		GCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAA TGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGC GAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACA ATTTAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATG TGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTT CTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTC ATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTT CAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATG AGCCATATTCAACGGGAAACGTCGAG GCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGC TGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGC GATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACA ATCTATCGCTTGTATGGGAAGCCCGAT GCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGC AAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACA GATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTG ACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATC AAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATG CATGGTTACTCACCACTGCGATCCCCG GAAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAG AATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGT TGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCG GTTGCATTCGATTCCTGTTTGTAATTGT CCTTTTAACAGCGATCGCGTATTTCGTC TTGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATA ACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTG ATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTG AACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAA CTTTTGCCATTCTCACCGGATTCAGTC GTCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATA ACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAA TAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCG GAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTG CCATCCTATGGAACTGCCTCGGTGAGT TTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTT TCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGAT ATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGC TCGATGAGTTTTTCTAACTGTCAGACC AAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGA TTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGG ATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATC TCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGT TTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCG TAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAG ATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTG CTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTAC CAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAG

[0134]

SEQ ID NO.	描述	质粒序列
		AGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAA CTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCA AATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGT TAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAG CACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAAT CCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGG CGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGA CTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGC GCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTT CGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGA ACGACCTACACCGAACTGAGATACCTA CAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCAC GCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACA GGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGA ACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCC AGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAG TCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACT TGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTC AGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACG CCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCC TGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACAT GTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCT GTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAG TGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGA ACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAG CGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATAC GCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGC CGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACA GGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGT GAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAG CTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTA CACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGT GTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTC ACACAGGAAACAGCTATGACCATGATT ACGCCAGATTTAATTAAGGCCTTAATTA GG
8	SLC6A14-H2B-EGFP 位置 1-130 处的 ITR 位置 233-1066 处的 SLC6A14 启动子 位置 1083-2198 处的融合至组蛋白 2b 基因的 H2B 片段的 GFP (H2B-GFP 融	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC GCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGC GACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAG CGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTG TAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACT TATCTACGTAGCCATGCTCTAGGAAGAT CGGAATTCGCCCTTAAGCTAGCGGCGC GCCACCGGTGCGATCGCAAGCTGGGA TGTTTCCTCATAGTTTACTTTCTAGGCC TCATCTTTCTTACAGAGTGTGCTCCTTT

[0135]

SEQ ID NO.	描述	质粒序列
	合物) 位置 2207-2754 处的 WPRE 序列 位置 2767-2974 处的 bGH poly(A)序列 位置 3062-3191 处的 ITR 位置 1-3191 处的待转移至载体中的转基因	GTTAAGGTTAGAATTTCCCATAAACCT GCTCAATAATTTGTTTGTGTTTGGCTTC TTTGAAATACTACACAAAGCAATCCCT GTAAAAGGCAAAGCTGTCCTGAAGGC TGAGAAAGGAGCCTGAGACATAGGCT CCAAGTTGCTCTTTTCAGGCAGAGCCA GCTGGGTAATCTTATCTCAGATGGCTG CTTTTCAAGGTGCCCAATTCAGGGGCT TTTCCTCTGGGAGCAGCATTTGCCCCA GGGAATCAAGTGCTTTCTAGTCAGGGG CAAAACTTTGGGAAATCTGAGGACCC AGGGTGGTATGGTCTGTTCAGGAGAAT TTTGGGGAACAGAATGGCCCCCTTCTC CCTCCAGCACTTGTACAGATCAGCACT TGGCCCCAGAACAGAGACCAGACTGA GAGGCGAGGTTAGGAGGAAACAGGG GACCCAGGAAAGGCGGCTAGATTGCA AACGTACCTACACAGCTCTGAGTCAAA GGCTGTCAGTCATCTCGGCTCAGACTG CTCTGCTCTCCAGCAGCCCAGCCCTTT CCCAGGGCTGGGGCAGGAGATTGCTA CATGTAGGCTTATCTGGGGAAAAACCA GAGCCTCACTTTAGTCCCTTCCGGTAA TTGACACTACTGGACACCCAGGAGGG GGAGGAGAGAGCTTCTCTTCATAAATG TTCCCACCCCTGGGCAAGGTGGCTCAC TCTGGCAGGTAGGAACAGGGGAGAGT GCACCTGCTACCAGTCAAGCTCAGCC AGACTGCAAGAGGAGGCGAGGCGCCG CGGCCGCGCCACCATGCCAGAGCCAG CGAAGTCTGCTCCCGCCCCGAAAAAG GGCTCCAAGAAGGCGGTGACTAAGGC GCAGAAGAAAGGCGGCAAGAAGCGC AAGCGCAGCCGCAAGGAGAGCTATTC CATCTATGTGTACAAGGTTCTGAAGCA GGTCCACCCTGACACCGGCATTTCGTC CAAGGCCATGGGCATCATGAATTCGTT TGTGAACGACATTTTCGAGCGCATCGC AGGTGAGGCTTCCCGCCTGGCGCATTA CAACAAGCGCTCGACCATCACCTCCA GGGAGATCCAGACGGCCGTGCGCCTG CTGCTGCCTGGGGAGTTGGCCAAGCA CGCCGTGTCCGAGGGTACTAAGGCCAT CACCAAGTACACCAGCGCTAAGGATCC ACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGG GCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTG CCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGA

[0136]

SEQ ID NO.	描述	质粒序列
		CGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGT CCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACC TACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATC TGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCC CTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGAC CTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTA CCCCGACCACATGAAGCAGCACGACT TCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCT ACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCA AGGACGACGGCAACTACAAGACCCGC GCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACAC CCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG GCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAAC ATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAA CTACAACAGCCACAACGTCTATATCAT GGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCA AGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAAC ATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGC CGACCACTACCAGCAGAACACCCCCA TCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCC GACAACCACTACCTGAGCACCCAGTC CGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGA AGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGT TCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCG GCATGGACGAGCTGTACAAGTAATAAG CTTGGATCCAATCAACCTCTGGATTAC AAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATT CTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTAT GTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTA TCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTC ATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGT TGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGC CCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTG TGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCC ACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGT CAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTC CCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTC ATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGG ACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGA CAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATC ATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGT GTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACG TCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTC AATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGC CTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCG CGTCTTCGAGATCTGCCTCGACTGTGC CTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTG

[0137]

SEQ ID NO.	描述	质粒序列
		CCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCT GGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTC CTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCA TTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTG GGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCA AGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGC AGGCATGCTGGGGACTCGAGTTAAGG GCGAATTCCCGATAAGGATCTTCCTAG AGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATG GCGGGTTAATCATTAACTACAAGGAAC CCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCT CTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGC CCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGT GAGCGAGCGAGCGCGCAGCCTTAATT AACCTAATTCACTGGCCGTCGTTTTAC AACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGC GTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCA CATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAAT AGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCC TTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGG CGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCG CATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTA CGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCC AGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCT TTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCG CCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATC GGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTA GTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAA AACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTA GTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTT TTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGT TCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAA CTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGG TCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTT GCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAA TGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGC GAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACA ATTTAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATG TGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTT CTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTC ATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTT CAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATG AGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTA TTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCC TGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGT GAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGT

[0138]

SEQ ID NO.	描述	质粒序列
		TGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAA CTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTT GAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTT CCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTG CTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTG ACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGC CGCATACACTATTCTCAGAATGACTTG GTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAA GCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAG AGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCAT GAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACT TCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGG AGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGG GGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTT GGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATA CCAAACGACGAGCGTGACACCACGAT GCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGC GCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTA CTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAG ACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCA GGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCG GCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTG GAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGT ATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGT AAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACA CGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGAT GAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATA GGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAA CTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATAC TTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTA ATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCT TTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCT TAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCG TCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGG ATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGC GTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAA ACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTT GCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTT TCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAG CGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAG TGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCA AGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACC TCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGG CTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTC TTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGT TACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGC TGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCC

[0139]

SEQ ID NO.	描述	质粒序列
		CAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCG AACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTAT GAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGG AGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAG CGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCA CGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCC TGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTC GCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTT TGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGC CTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGC CTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGG CCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGT TATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTAT TACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGC TCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCA GCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAA GAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTC CCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGC AGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTG GAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAA TTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGG CACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCC GGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAG CGGATAACAATTTCACACAGGAAACA GCTATGACCATGATTACGCCAGATTTAA TTAAGGCCTTAATTAGG
9	与 H2B-EGFP 共表达的 SLC6A14-ATOH1 位置 1-130 处的 ITR 位置 233-1066 处的 SLC6A14 启动子 位置 1083-2144 处的 Atoh1 编码序列 位置 2217-3332 处的融合至组蛋白 2b 基因的 H2B 片段的 GFP (H2B-GFP 融合物) 位置 3341-3888 处的 WPRE 序列	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC GCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGC GACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAG CGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG GCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTTG TAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACT TATCTACGTAGCCATGCTCTAGGAAGAT CGGAATTCGCCCTTAAGCTAGCGGCGC GCCACCGGTGCGATCGCAAGCTGGGA TGTTTCCTCATAGTTTACTTTCTAGGCC TCATCTTTCTTACAGAGTGTGCTCCTTT GTTAAGGTTAGAATTTCCCATAAACCT GCTCAATAATTTGTTTGTGTTTGGCTTC TTTGAAATACTACACAAAGCAATCCCT GTAAAAGGCAAAGCTGTCCTGAAGGC TGAGAAAGGAGCCTGAGACATAGGCT CCAAGTTGCTCTTTTCAGGCAGAGCCA GCTGGGTAATCTTATCTCAGATGGCTG CTTTTCAAGGTGCCCAATTCAGGGGCT TTTCCTCTGGGAGCAGCATTTGCCCCA GGGAATCAAGTGCTTTCTAGTCAGGGG

[0140]

SEQ ID NO.	描述	质粒序列
	位置 3901-4108 处的 bGH poly(A)序列 位置 4196-4325 处的 ITR 位置 1-4325 处的待转移至载体中的转基因	CAAAACTTTGGGAAATCTGAGGACCC AGGGTGGTATGGTCTGTTCAGGAGAAT TTTGGGGAACAGAATGGCCCCCTTCTC CCTCCAGCACTTGTACAGATCAGCACT TGGCCCCAGAACAGAGACCAGACTGA GAGGCGAGGTTAGGAGGAAACAGGG GACCCAGGAAAGGCGGCTAGATTGCA AACGTACCTACACAGCTCTGAGTCAAA GGCTGTCAGTCATCTCGGCTCAGACTG CTCTGCTCTCCAGCAGCCCAGCCCTTT CCCAGGGCTGGGGCAGGAGATTGCTA CATGTAGGCTTATCTGGGGAAAAACCA GAGCCTCACTTTAGTCCCTTCCGGTAA TTGACACTACTGGACACCCAGGAGGG GGAGGAGAGAGCTTCTCTTCATAAATG TTCCCACCCCTGGGCAAGGTGGCTCAC TCTGGCAGGTAGGAACAGGGGAGAGT GCACCTGCTACCAGTCAAGCTCAGCC AGACTGCAAGAGGAGGCGAGGCGCCG CGGCCGCGCCACCATGTCCCGCCTGCT GCATGCAGAAGAGTGGGCTGAAGTGA AGGAGTTGGGAGACCACCATCGCCAG CCCCAGCCGCATCATCTCCCGCAACCG CCGCCGCCGCCGCAGCCACCTGCAAC TTTGCAGGCGAGAGAGCATCCCGTCTA CCCGCCTGAGCTGTCCCTCCTGGACAG CACCGACCCACGCGCCTGGCTGGCTC CCACTTTGCAGGGCATCTGCACGGCAC GCGCCGCCCAGTATTTGCTACATTCCC CGGAGCTGGGTGCCTCAGAGGCCGCT GCGCCCCGGGACGAGGTGGACGGCCG GGGGGAGCTGGTAAGGAGGAGCAGCG GCGGTGCCAGCAGCAGCAAGAGCCCC GGGCCGGTGAAAGTGCGGGAACAGCT GTGCAAGCTGAAAGGCGGGGTGGTGG TAGACGAGCTGGGCTGCAGCCGCCAA CGGGCCCCTTCCAGCAAACAGGTGAA TGGGGTGCAGAAGCAGAGACGGCTAG CAGCCAACGCCAGGGAGCGGCGCAGG ATGCATGGGCTGAACCACGCCTTCGAC CAGCTGCGCAATGTTATCCCGTCGTTC AACAACGACAAGAAGCTGTCCAAATA TGAGACCCTGCAGATGGCCCAAATCTA CATCAACGCCTTGTCCGAGCTGCTACA AACGCCCAGCGGAGGGGAACAGCCAC CGCCGCCTCCAGCCTCCTGCAAAAGC GACCACCACCACCTTCGCACCGCGGC

[0141]

SEQ ID NO.	描述	质粒序列
		CTCCTATGAAGGGGGCGCGGGCAACG CGACCGCAGCTGGGGCTCAGCAGGCT TCCGGAGGGAGCCAGCGGCCGACCCC GCCCGGGAGTTGCCGGACTCGCTTCTC AGCCCCAGCTTCTGCGGGAGGGTACT CGGTGCAGCTGGACGCTCTGCACTTCT CGACTTTCGAGGACAGCGCCCTGACA GCGATGATGGCGCAAAAGAATTTGTCT CCTTCTCTCCCCGGGAGCATCTTGCAG CCAGTGCAGGAGGAAAACAGCAAAAC TTCGCCTCGGTCCCACAGAAGCGACG GGGAATTTTCCCCCCATTCCCATTACA GTGACTCGGATGAGGCAAGTACGCGT GGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCT GCTGAAGCAGGCTGGCGACGTGGAGG AGAACCCTGGACCTATGCCAGAGCCA GCGAAGTCTGCTCCCGCCCCGAAAAA GGGCTCCAAGAAGGCGGTGACTAAGG CGCAGAAGAAAGGCGGCAAGAAGCG CAAGCGCAGCCGCAAGGAGAGCTATT CCATCTATGTGTACAAGGTTCTGAAGC AGGTCCACCCTGACACCGGCATTTCGT CCAAGGCCATGGGCATCATGAATTCGT TTGTGAACGACATTTTCGAGCGCATCG CAGGTGAGGCTTCCCGCCTGGCGCATT ACAACAAGCGCTCGACCATCACCTCC AGGGAGATCCAGACGGCCGTGCGCCT GCTGCTGCCTGGGGAGTTGGCCAAGC ACGCCGTGTCCGAGGGTACTAAGGCCA TCACCAAGTACACCAGCGCTAAGGATC CACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAG GGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGT GCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCG ACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTG TCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCAC CTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCAT CTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGC CCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGA CCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCT ACCCCGACCACATGAAGCAGCACGAC TTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGC TACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCG CGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACA CCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG GGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAA CATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACA

[0142]

SEQ ID NO.	描述	质粒序列
		ACTACAACAGCCACAACGTCTATATCA TGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATC AAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAA CATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCG CCGACCACTACCAGCAGAACACCCCC ATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCC GACAACCACTACCTGAGCACCCAGTC CGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGA AGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGT TCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCG GCATGGACGAGCTGTACAAGTAATAAG CTTGGATCCAATCAACCTCTGGATTAC AAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATT CTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTAT GTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTA TCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTC ATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGT TGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGC CCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTG TGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCC ACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGT CAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTC CCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTC ATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGG ACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGA CAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATC ATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGT GTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACG TCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTC AATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGC CTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCG CGTCTTCGAGATCTGCCTCGACTGTGC CTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTG CCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCT GGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTC CTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCA TTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTG GGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCA AGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGC AGGCATGCTGGGGACTCGAGTTAAGG GCGAATTCCCGATAAGGATCTTCCTAG AGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATG GCGGGTTAATCATTAACTACAAGGAAC CCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCT CTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGC CCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGT

[0143]

SEQ ID NO.	描述	质粒序列
		GAGCGAGCGAGCGCGCAGCCTTAATT AACCTAATTCACTGGCCGTCGTTTTAC AACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGC GTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCA CATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAAT AGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCC TTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGG CGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCG CATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTA CGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCC AGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCT TTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCG CCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATC GGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTA GTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAA AACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTA GTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTT TTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGT TCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAA CTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGG TCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTT GCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAA TGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGC GAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACA ATTTAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATG TGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTT CTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTC ATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTT CAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATG AGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTA TTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCC TGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGT GAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGT TGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAA CTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTT GAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTT CCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTG CTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTG ACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGC CGCATACACTATTCTCAGAATGACTTG GTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAA GCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAG AGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCAT GAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACT TCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGG AGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGG GGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTT

[0144]

SEQ ID NO.	描述	质粒序列
		GGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATA CCAAACGACGAGCGTGACACCACGAT GCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGC GCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTA CTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAG ACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCA GGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCG GCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTG GAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGT ATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGT AAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACA CGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGAT GAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATA GGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAA CTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATAC TTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTA ATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCT TTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCT TAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCG TCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGG ATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGC GTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAA ACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTT GCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTT TCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAG CGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAG TGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCA AGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACC TCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGG CTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTC TTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGT TACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGC TGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCC CAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCG AACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTAT GAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGG AGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAG CGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCA CGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCC TGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTC GCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTT TGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGC CTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGC CTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGG CCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGT TATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTAT TACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGC

[0145]

SEQ ID NO.	描述	质粒序列
		TCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCA GCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAA GAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTC CCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGC AGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTG GAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAA TTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGG CACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCC GGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAG CGGATAACAATTTCACACAGGAAACA GCTATGACCATGATTACGCCAGATTTAA TTAAGGCCTTAATTAGG

[0146] 将外源核酸递送至靶细胞的方法

[0147] 可用于将转基因(例如可操作地连接至本文所述的SLC6A14启动子的转基因)引入靶细胞(例如哺乳动物细胞)中的技术是本领域中众所周知的。例如,可使用电穿孔通过将静电势施加至目标细胞(例如人类靶细胞)使哺乳动物细胞透化。以此方式经受外部电场的哺乳动物细胞(例如人类细胞)随后易于摄取外源核酸。哺乳动物细胞的电穿孔详细阐述于例如Chu等人,Nucleic Acids Research 15:1311(1987)中,所述文献的公开内容通过引用并入本文。类似技术Nucleofection™利用施加的电场来刺激外源多核苷酸摄取至真核细胞的核中。Nucleofection™和可用于实施此技术的方案详细阐述于例如Distler等人,Experimental Dermatology 14:315(2005)以及US 2010/0317114中,所述文献各自的公开内容通过引用并入本文。

[0148] 可用于转染靶细胞的其他技术包括挤压-穿孔方法。此技术诱导细胞的快速机械变形以刺激经由响应于所施加应力形成的膜孔摄取外源DNA。此技术的优点在于,载体并非将核酸递送至细胞(例如人类靶细胞)中所必需。挤压-穿孔详细阐述于例如Sharei等人,Journal of Visualized Experiments 81:e50980(2013)中,所述文献的公开内容通过引用并入本文。

[0149] 脂转染代表可用于转染靶细胞的另一种技术。此方法涉及将核酸加载至脂质体中,所述脂质体通常呈现朝向脂质体外部的阳离子官能团,例如季胺或质子化胺。这由于细胞膜的阴离子性质而促进脂质体与细胞之间的静电相互作用,最终例如通过引导脂质体与细胞膜融合或通过复合物的胞吞作用摄取外源核酸。脂转染详细阐述于例如美国专利第7,442,386号中,所述专利的公开内容通过引用并入本文。利用与细胞膜的离子相互作用来引起外源核酸摄取的类似技术包括使细胞与阳离子聚合物-核酸复合物接触。与多核苷酸缔合以赋予有利于与细胞膜相互作用的正电荷的示例性阳离子分子包括活化的树枝状聚合物(阐述于例如Dennig,Topics in Current Chemistry 228:227(2003)中,所述文献的公开内容通过引用并入本文)、聚乙烯亚胺和二乙基氨基乙基(DEAE)-聚葡萄糖,其作为转染剂的用途详细阐述于例如Gulick等人,Current Protocols in Molecular Biology 40:I:9.2:9.2.1(1997)中,所述文献的公开内容通过引用并入本文。磁珠是可用于以温和且有效的方式转染靶细胞的另一种工具,这是因为这种方法利用所施加的磁场来引导核酸的摄

取。这种技术详细阐述于例如US 2010/0227406中,所述专利的公开内容通过引用并入本文。

[0150] 另一种可用于诱导靶细胞对外源核酸的摄取的工具是激光转染,也称为光学转染,其是涉及使细胞暴露于特定波长的电磁辐射以温和地透化细胞并允许多核苷酸透过细胞膜的技术。这种技术的生物活性类似于电穿孔,并且在一些情况下发现优于电穿孔。

[0151] 刺穿转染是可用于将遗传材料递送至靶细胞的另一种技术。其依赖于纳米材料(例如碳纳米纤维、碳纳米管和纳米线)的使用。垂直于基底的表面来合成针样纳米结构。将含有旨在细胞内递送的基因的DNA附接至纳米结构表面。然后将具有这些针的阵列的芯片按压在细胞或组织上。由纳米结构刺穿的细胞可表达所递送的基因。这种技术的实例阐述于Shalek等人,PNAS107:1870(2010)中,所述文献的公开内容通过引用并入本文。

[0152] 也可使用磁性转染将核酸递送至靶细胞。磁性转染原理是使核酸与阳离子磁性纳米粒子缔合。磁性纳米粒子由完全生物可降解的氧化铁制成,并且涂覆有根据应用变化的特定阳离子专有分子。其与基因载体(DNA、siRNA、病毒载体等)的缔合是通过盐诱导的胶体聚集和静电相互作用来实现。然后通过影响磁铁所产生的外部磁场使磁性粒子集中于靶细胞上。这种技术详细阐述于Scherer等人,Gene Therapy9:102(2002),所述文献的公开内容通过引用并入本文。

[0153] 另一种可用于诱导靶细胞对外源核酸的摄取的工具是声致穿孔,其是涉及使用声音(通常超声波频率)来改变细胞质膜的透性以透化细胞并允许多核苷酸透过细胞膜的技术。这种技术详细阐述于例如Rhodes等人,Methods in Cell Biology 82:309(2007),所述文献的公开内容通过引用并入本文。

[0154] 微泡代表可用于根据本文所述的方法修饰靶细胞的基因组的另一种潜在媒介物。例如,已通过糖蛋白VSV-G与例如基因组修饰蛋白(例如核酸酶)的共同过表达诱导的微泡可用于将蛋白质有效地递送至细胞中,随后催化内源多核苷酸序列的位点特异性裂解以使细胞的基因组准备用于共价并入目标多核苷酸(例如基因或调节序列)。此类囊泡(也称为纳米囊泡(Gesicle))用于真核细胞的遗传修饰的用途详细阐述于例如Quinn等人,Genetic Modification ofTarget Cells by Direct Delivery of Active Protein[摘要].Methylation changes in early embryonic genes in cancer[摘要],Proceedings of the 18th Annual Meeting ofthe American SocietyofGene and Cell Therapy;2015年5月13日,摘要编号122。

[0155] 将外源核酸递送至靶细胞的载体

[0156] 除实现高转录和翻译速率以外,外源基因在哺乳动物细胞中的稳定表达可通过将含有基因的多核苷酸整合至哺乳动物细胞的核基因组中来实现。已开发出将编码外源蛋白质的多核苷酸递送并整合至哺乳动物细胞的核DNA中的多种载体。表达载体的实例阐述于例如Gellissen,Production of Recombinant Proteins:Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems(JohnWiley&Sons,Marblehead,MA,2006)中。用于本文所述组合物和方法中的表达载体含有可操作地连接至编码目标蛋白质的多核苷酸序列的SLC6A14启动子(例如与表2所示多核苷酸序列中的任一者具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的多核苷酸),以及例如用于表达这些剂和/或将这些多核苷酸序列整

合至哺乳动物细胞的基因组中的其他序列元件。可含有可操作地连接至编码目标蛋白质的转基因的SLC6A14启动子的载体包括质粒(例如可在细胞内自主复制的环状DNA分子)、粘粒(例如pWE或sCos载体)、人工染色体(例如人类人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1源性人工染色体(PAC))和病毒载体。可用于表达目标蛋白质的某些载体包括含有引导基因转录的调节序列(例如增强子区域)的质粒。其他可用于表达目标蛋白质的载体含有增强这些基因的翻译速率或改进源自基因转录的mRNA的稳定性或核输出的多核苷酸序列。这些序列元件包括例如5'和3'非翻译区、内部核糖体进入位点(IRES)和引导表达载体上所携带基因的有效转录的多聚腺苷酸化信号位点。适用于本文所述组合物和方法的表达载体也可含有编码用于选择含有这种载体的细胞的标志物的多核苷酸。合适的标志物的实例包括编码抗生素(例如氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素或诺尔丝菌素)抗性的基因。

[0157] 用于核酸递送的病毒载体

[0158] 病毒基因组提供可用于将目标基因有效递送至靶细胞(例如哺乳动物细胞,例如人类细胞)的基因组中的载体的丰富来源。病毒基因组是特别可用于基因递送的载体,这是因为含于此类基因组内的多核苷酸通常通过一般或专门转导并入哺乳动物细胞的核基因组中。这些过程作为天然病毒复制周期的一部分出现,并且无需添加蛋白质或试剂来诱导基因整合。病毒载体的实例包括逆转录病毒(例如逆转录病毒科病毒载体)、腺病毒(例如Ad5、Ad26、Ad34、Ad35和Ad48)、小病毒(例如腺相关病毒)、冠状病毒、负链RNA病毒如正粘液病毒(例如流行性感冒病毒)、棒状病毒(例如狂犬病和水疱性口炎病毒)、副粘液病毒(例如麻疹和仙台病毒(Sendai))、正链RNA病毒如微小RNA病毒和α病毒以及双链DNA病毒,包括腺病毒、疱疹病毒(例如1型和2型单纯疱疹病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)、巨细胞病毒)和痘病毒(例如牛痘、经修饰安卡拉牛痘(modified vaccinia Ankara,MVA)、鸡痘和金丝雀痘)。其他病毒包括例如诺沃克病毒(Norwalk virus)、披衣病毒、黄病毒、呼肠孤病毒(reovirus)、乳多泡病毒、嗜肝DNA病毒、人类乳头瘤病毒、人类泡沫病毒和肝炎病毒。逆转录病毒的实例包括:鸟白血病-肉瘤、鸟C型病毒、哺乳动物C型、B型病毒、D型病毒、致癌逆转录病毒、HTLV-BLV族、慢病毒、α逆转录病毒、γ逆转录病毒、泡沫病毒(Coffin,J.M.,Retroviridae:The viruses and their replication,Virology,第三版(Lippincott-Raven,Philadelphia,1996))。其他实例包括鼠类白血病病毒、鼠类肉瘤病毒、小鼠乳腺肿瘤病毒、牛白血病病毒、猫白血病病毒、猫肉瘤病毒、鸟白血病病毒、人类T细胞白血病病毒、狒狒内源病毒、长臂猿白血病病毒、梅森菲舍猴病毒(MasonPfizermonkeyvirus)、猿猴免疫缺失病毒、猿猴肉瘤病毒、劳斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)和慢病毒。载体的其他实例阐述于例如美国专利第5,801,030号中,所述专利关于用于基因疗法中的病毒载体的公开内容通过引用并入本文。

[0159] 用于核酸递送的AAV载体

[0160] 在一些实施方案中,将本文所述组合物和方法的多核苷酸并入rAAV载体和/或病毒粒子中以促进其引入细胞(例如VSC)中。可用于本文所述组合物和方法中的rAAV载体是重组核酸构建体,其包括(1)本文所述的SLC6A14启动子(例如与表2中所列出的多核苷酸序列中的任一者(例如SEQ ID NO:1-6中任一者的多核苷酸)具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或

更大的序列同一性)的多核苷酸),(2)待表达的异源序列,和(3)促进异源基因的稳定性和表达的病毒序列。病毒序列可包括DNA顺式复制和包装(例如功能性ITR)至病毒粒子中所需的那些AAV序列。在典型应用中,转基因编码可促进或增加前庭毛细胞发育、前庭毛细胞命运特化、前庭毛细胞再生、前庭毛细胞和/或VSC增殖、前庭毛细胞神经支配或前庭毛细胞成熟的蛋白质,或在患有多种形式的遗传性前庭功能障碍的受试者中突变的前庭毛细胞蛋白的野生型形式,其可用于改进携带与前庭功能障碍(例如头晕、眩晕、失衡、双侧前庭病、双侧前庭功能低下、振动幻视或平衡障碍)相关的突变的受试者的前庭功能。此类rAAV载体也可含有标志物或报告基因。有用的rAAV载体具有一个或多个整体或部分缺失的AAV WT基因,但保留功能性侧接ITR序列。AAV ITR可具有适于特定应用的任何血清型。为用于本文所述方法和组合物中,ITR可为AAV2 ITR。使用rAAV载体的方法阐述于例如Tal等人,J.Biomed.Sci.7:279(2000)以及Monahan和Samulski,Gene Delivery7:24(2000)中,所述文献中的每一者关于用于基因递送的AAV载体的公开内容都通过引用并入本文。

[0161] 本文所述的多核苷酸和载体(例如可操作地连接至编码目标蛋白质的转基因的SLC6A14启动子)可并入rAAV病毒粒子中以促进多核苷酸或载体引入细胞(例如VSC)中。AAV的衣壳蛋白构成外部,病毒粒子的非核酸部分是由AAVcap基因编码。cap基因编码三种病毒外壳蛋白VP1、VP2和VP3,其为病毒粒子组装所必需。rAAV病毒粒子的构建已阐述于例如US 5,173,414;US 5,139,941;US 5,863,541;US 5,869,305;US 6,057,152;和US 6,376,237;以及Rabinowitz等人,J.Virol.76:791(2002)和Bowles等人,J.Virol.77:423(2003)中,所述文献中的每一者关于用于基因递送的AAV载体的公开内容都通过引用并入本文。

[0162] 可与本文所述的组合物和方法结合使用的rAAV病毒粒子包括衍生自多种AAV血清型的那些rAAV病毒粒子,所述AAV血清型包括AAV 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、rh10、rh39、rh43、rh74、Anc80、Anc80L65、DJ/8、DJ/9、7m8、PHP.B、PHP.eB和PHP.S。为靶向VSC,AAV1、AAV2、AAV2quad(Y-F)、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、Anc80、Anc80L65、7m8、PHP.B、PHP.eB或PHP.S血清型可能是特别有用的。经进化用于转导视网膜的血清型也可用于本文所述方法和组合物中。不同血清型的AAV载体和AAV蛋白的构建和用途阐述于例如Chao等人,Mol.Ther.2:619(2000);Davidson等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA97:3428(2000);Xiao等人,J.Virol.72:2224(1998);Halbert等人,J.Virol.74:1524(2000);Halbert等人,J.Virol.75:6615(2001);和Auricchio等人,Hum.Molec.Genet.10:3075(2001)中,所述文献中的每一者关于用于基因递送的AAV载体的公开内容都通过引用并入本文。

[0163] 假型rAAV载体也可与本文所述的组合物和方法结合使用。假型载体包括经衍生自除给定血清型(例如AAV1、AAV2、AAV2quad(Y-F)、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8等)外的血清型的衣壳基因假型化的给定血清型(例如AAV9)的AAV载体。涉及假型rAAV病毒粒子的构建和用途的技术是本领域中已知的并且阐述于例如Duan等人,J.Virol.75:7662(2001);Halbert等人,J.Virol.74:1524(2000);Zolotukhin等人,Methods,28:158(2002);和Auricchio等人,Hum.Molec.Genet.10:3075(2001)中。

[0164] 在病毒粒子衣壳内具有突变的AAV病毒粒子可用于比非突变衣壳病毒粒子更有效地感染特定细胞类型。例如,合适的AAV突变体可具有帮助AAV靶向特定细胞类型的配体插入突变。AAV衣壳突变体(包括插入突变体、丙氨酸筛选突变体和表位标签突变体)的构建和

表征阐述于Wu等人,J.Virol.74:8635(2000)中。可用于本文所述方法中的其他rAAV病毒粒子包括通过病毒的分子育种以及通过外显子改组产生的那些衣壳杂合体。参见例如Soong等人,Nat.Genet.,25:436(2000)以及Kolman和Stemmer,Nat.Biotechnol.19:423(2001)。

[0165] 在一些实施方案中,核酸载体(例如AAV载体)包括本文所述的SLC6A14启动子(例如与表2中所列出的多核苷酸序列中的任一者(例如SEQ ID NO:1-6中任一者的多核苷酸)具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的多核苷酸),其可操作地连接至编码人类Atoh1的多核苷酸序列(人类ATOH1蛋白=RefSeq登录号NP_005163(SEQ ID NO:10);mRNA序列=RefSeq登录号NM_005172)。在一些实施方案中,SLC6A14启动子是SEQ ID NO:4的SLC6A14启动子(也由SEQ ID NO:7的核苷酸233-1066表示)并且其可操作地连接至编码人类Atoh1的多核苷酸序列。在一些实施方案中,编码人类Atoh1的多核苷酸序列是SEQ ID NO:11。在一些实施方案中,编码人类Atoh1的多核苷酸序列是SEQ ID NO:7的核苷酸1083-2144。在一些实施方案中,编码人类Atoh1的多核苷酸序列是因遗传密码的冗余性而编码SEQ ID NO:10的任何多核苷酸序列。编码人类Atoh1的多核苷酸序列可经部分或完全密码子优化用于表达。在一些实施方案中,载体以5'至3'顺序包括第一反向末端重复;SEQ ID NO:4的SLC6A14启动子;可操作地连接至SLC6A14启动子的编码人类Atoh1的多核苷酸序列;多聚腺苷酸化序列;和第二反向末端重复。在一些实施方案中,核酸载体以5'至3'顺序包括第一反向末端重复;SEQ ID NO:4的SLC6A14启动子;可操作地连接至SLC6A14启动子的编码人类Atoh1的多核苷酸序列;土拨鼠转录后调节元件(WPRE);多聚腺苷酸化序列;和第二反向末端重复。在一些实施方案中,WPRE具有SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15的序列。在一些实施方案中,WPRE具有SEQ ID NO:14的序列。在一些实施方案中,WPRE具有SEQ ID NO:7的核苷酸2155-2702的序列。在一些实施方案中,多聚腺苷酸化序列具有SEQ ID NO:7的核苷酸2715-2922的序列。在某些实施方案中,核酸载体包括侧接有反向末端重复的SEQ ID NO:7的核苷酸233-2922。在一些实施方案中,侧接反向末端重复是AAV2反向末端重复。在一些实施方案中,侧接反向末端重复是AAV2反向末端重复的可经携带AAV2 Rep基因的质粒壳体化的任何变体。在特定实施方案中,核酸载体包括侧接有反向末端重复的SEQ ID NO:7的核苷酸233-2922,其中5'反向末端重复与SEQ ID NO:7的核苷酸1-130具有至少80%序列同一性(例如至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性);并且其中3'反向末端重复与SEQ ID NO:7的核苷酸3010-3139具有至少80%序列同一性(例如至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)。在一些实施方案中,核酸载体是病毒载体。在一些实施方案中,病毒载体是AAV载体。在一些实施方案中,AAV载体具有AAV8衣壳。

[0166] 本领域的普通技术人员应理解,产生本发明的病毒载体通常需要使用本发明的质粒以及提供适合的病毒包装和活力所需的元件的额外质粒(例如对于AAV,提供适当的AAV rep基因、cap基因和其他基因(例如E2A和E4)的质粒)。产生细胞系中那些质粒的组合产生病毒载体。然而,本领域技术人员应理解,对于用于产生病毒载体的本发明转移质粒中的任何给定对的反向末端重复序列(例如SEQ ID NO:7、8或9),病毒载体中的相应序列可因ITR在重组期间采取"翻转"或"倒转"取向而改变。因此,转移质粒中ITR的序列不必为在从其制

备的病毒载体中发现的相同序列。然而,在一些非常具体的实施方案中,本发明的病毒载体包括SEQ ID NO:7的核苷酸1-3139。

[0167] 药物组合物

[0168] 本文所述的多核苷酸(例如与表2中所列出的多核苷酸序列中的任一者(例如SEQ ID NO:1-6中任一者的多核苷酸)具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的SLC6A14启动子)可以可操作地连接至转基因(例如编码目标蛋白质、siRNA、ASO或核酸酶(例如Cas9、TALEN、ZFN或gRNA)的转基因,或者为微小RNA的转基因)并且并入媒介物中以施用于患者,例如患有前庭功能障碍的人类患者。含有含可操作地连接至转基因的本文所述多核苷酸的载体(例如病毒载体)的药物组合物可使用本领域中已知的方法来制备。例如,此类组合物可使用例如生理上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington:The Science and Practice ofPharmacology,第22版,Allen,L.编辑,(2013);通过引用并入本文)并且以期望形式(例如以冻干制剂或水溶液的形式)来制备。

[0169] 含有可操作地连接至转基因的本文所述SLC6A14启动子(例如与表2中所列出的核酸序列中的任一者(例如SEQ ID NO:1-6中任一者的多核苷酸)具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的多核苷酸)的核酸载体(例如病毒载体)的混合物可在与一种或多种赋形剂、载体或稀释剂适当混合的水中制备。分散液也可在甘油、液体聚乙二醇和其混合物中以及油中制备。在普通储存和使用条件下,这些制剂可含有防止微生物生长的防腐剂。适于可注射用途的药物形式包括无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末(阐述于US 5,466,468中,其公开内容通过引用并入本文)。在任何情况下,制剂可为无菌的并且可为达到易于注射程度的流体。制剂在制造和储存条件下可为稳定的并且可防止微生物(例如细菌和真菌)的污染作用。载体可为含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适混合物和/或植物油的溶剂或分散介质。可例如通过使用包衣(例如卵磷脂)、在分散液的情形下通过维持所需粒径和通过使用表面活性剂来维持适当流动性。可通过多种抗细菌和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等)来防止微生物的作用。在许多情况下,应优选包括等渗剂,例如糖或氯化钠。可注射组合物的延长吸收可通过在组合物中使用延迟吸收剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现。

[0170] 例如,如果需要,含有本文所述药物组合物的溶液可经适当缓冲,并且首先用足量盐水或葡萄糖使液体稀释剂等渗。这些特定水溶液尤其适用于静脉内、肌内、皮下和腹膜内施用。就此而言,根据本公开,可采用的无菌水性介质将为本领域技术人员已知的。例如,可将一个剂量溶解在1ml NaCl等渗溶液中并添加至1000ml皮下灌注液中或在所提出的输注位点处注射。根据所治疗受试者的疾患,剂量必然将发生一些变化。为局部施用于中耳或内耳,组合物可经配制以含有合成外淋巴溶液。示例性的合成外淋巴溶液包括20-200mMNaCl、1-5mM KCl、0.1-10mM $CaCl_2$、1-10mM葡萄糖和2-50mM HEPE,其中pH介于约6与9之间并且摩尔渗透压浓度为约300mOsm/kg。负责施用的人在任何情形下将决定个别受试者的适当剂量。此外,对于人类施用,制剂应符合FDA生物制品标准办公室(FDA Office of Biologics standards)所要求的无菌性、热原性、一般安全性和纯度标准。

[0171] 治疗方法

[0172] 本文所述的组合物可通过多种途径施用于患有前庭功能障碍或具有患上前庭功能障碍的风险的受试者,例如局部施用于中耳或内耳(例如施用于外淋巴或内淋巴中,例如经由卵圆窗、圆窗或半规管(例如外半规管),或通过经鼓室或鼓室内注射,例如施用于前庭支持细胞或毛细胞)、静脉内、肠胃外、真皮内、透皮、肌内、鼻内、皮下、经皮、气管内、腹膜内、动脉内、血管内、吸入、灌注、灌洗和口服施用。在任何给定情况下最适于施用的途径将取决于所施用的特定组合物、患者、药物配制方法、施用方法(例如施用时间和施用途径)、患者的年龄、体重、性别、所治疗疾病的严重程度、患者的饮食和患者的排泄速率。组合物可施用一次或一次以上(例如每年一次、每年两次、每年三次、每两月、每月或每两周)。

[0173] 可如本文所述治疗的受试者是患有前庭功能障碍或具有患上前庭功能障碍的风险的受试者。本文所述的组合物和方法可用于治疗患有前庭毛细胞损伤(例如与疾病或感染、头部创伤、耳毒性药物(例如氨基糖苷)或衰老相关的损伤)或具有患上所述疾病的风险的受试者,患有前庭功能障碍(例如头晕、眩晕、失衡、双侧前庭病、双侧前庭功能低下、振动幻视或平衡障碍)或具有患上所述疾病的风险的受试者,携带与前庭功能障碍相关的遗传突变的受试者或具有遗传性前庭功能障碍家族史的受试者。在一些实施方案中,与毛细胞(例如前庭毛细胞)损伤或损失相关的疾病是其中自身免疫反应导致毛细胞损伤或死亡的自身免疫疾病或疾患。与前庭功能障碍相关的自身免疫疾病包括自身免疫内耳疾病(AIED)、结节性多动脉炎(PAN)、科根综合征(Cogan's syndrome)、复发性多发性软骨炎、全身性红斑狼疮(SLE)、韦格纳肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)、舍格伦综合征(Sjögren'ssyndrome)和白塞病(Behçet'sdisease)。一些传染病(例如莱姆病(Lyme disease)和梅毒)也可引起前庭功能障碍(例如通过触发自身抗体产生)。病毒感染(例如风疹、巨细胞病毒(CMV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、1型和2型HSV、西尼罗病毒(West Nile virus,WNV)、人类免疫缺失病毒(HIV)、水痘带状疱疹病毒(VZV)、麻疹和腮腺炎)也可引起前庭功能障碍。在一些实施方案中,受试者患有与毛细胞(例如前庭毛细胞)损失相关或源自其的前庭功能障碍。在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法可用于治疗患有振动幻视或具有患上振动幻视的风险的受试者。在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法可用于治疗患有双侧前庭病或具有患上双侧前庭病的风险的受试者。在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法可用于治疗患有平衡障碍(例如失衡)或具有患上平衡障碍(例如失衡)的风险的受试者。本文所述的方法可包括在用本文所述的组合物治疗或施用本文所述的组合物之前筛选受试者的已知与前庭功能障碍相关的基因的一个或多个突变的步骤。受试者的遗传突变可使用本领域技术人员已知的标准方法(例如遗传性测试)来筛选。本文所述的方法也可包括在用本文所述的组合物治疗之前或施用本文所述的组合物之前评价受试者的前庭功能的步骤。前庭功能可使用例如以下的标准测试来评价:眼动测试(例如眼震图(ENG)或视频眼震图(VNG))、前庭眼反射(VOR)测试(例如可在床边实施的头部冲击测试(哈-克测试(Halmagyi-Curthoys test))或使用视频头部冲击测试(VHIT)或热量反射测试)、体位图、旋转椅测试、ECOG、前庭引发的肌源性电势(VEMP)和专门临床平衡测试,例如Mancini和Horak,Eur JPhys Rehabil Med,46:239(2010)中所述的那些测试。这些测试也可用于在用本文所述的组合物治疗或施用本文所述的组合物后评价受试者的前庭功能。本文所述的组合物和方法也可作为预防性治疗施用于具有患上前庭功能障碍的风险

的患者,例如具有前庭功能障碍家族史(例如遗传性前庭功能障碍)的患者、尚未表现出前庭功能障碍症状的携带与前庭功能障碍相关的遗传突变的患者或暴露于获得性前庭功能障碍的风险因子(例如疾病或感染、头部创伤、耳毒性药物或衰老)的患者。

[0174] 本文所述的组合物和方法可用于诱导或增加受试者中的毛细胞再生(例如前庭毛细胞再生)和/或诱导或增加前庭毛细胞和/或VSC的增殖。可从促进或诱导前庭毛细胞再生、前庭毛细胞神经支配和/或前庭毛细胞和/或VSC增殖的组合物获益的受试者包括因毛细胞损失(例如与创伤(例如头部创伤)、疾病或感染、耳毒性药物或衰老相关的前庭毛细胞损失)而患有前庭功能障碍或具有患上前庭功能障碍的风险的受试者,和具有异常前庭毛细胞(例如与正常前庭毛细胞相比不能适当地发挥功能的前庭毛细胞)、受损前庭毛细胞(例如与创伤(例如头部创伤)、疾病或感染、耳毒性药物或衰老相关的前庭毛细胞损伤)或因遗传突变或先天异常导致的前庭毛细胞数减少的受试者。本文所述的组合物和方法也可用于促进或增加前庭毛细胞成熟,这可改进前庭功能。在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法促进或增加再生前庭毛细胞的成熟(例如促进或增加响应于本文所述的组合物(例如含有可操作地连接至转基因的SLC6A14启动子的组合物)在VSC中的表达形成的前庭毛细胞的成熟)。本文所述的组合物和方法也可促进或增加VSC和/或前庭毛细胞存活和/或改进VSC功能。

[0175] 本文所述的组合物和方法也可用于预防或减轻已用耳毒性药物治疗或当前正在用耳毒性药物治疗或很快开始用耳毒性药物治疗的受试者中由耳毒性药物诱导的毛细胞损伤或死亡(例如前庭毛细胞损伤或死亡)引起的前庭功能障碍。耳毒性药物对内耳细胞有毒性,并且可引起前庭功能障碍(例如眩晕、头晕、失衡、双侧前庭病、双侧前庭功能低下或振动幻视)。已发现具有耳毒性的药物包括氨基糖苷抗生素(例如庆大霉素、新霉素(neomycin)、链霉素(streptomycin)、妥布霉素(tobramycin)、卡那霉素、万古霉素(vancomycin)和阿米卡星(amikacin))、紫霉素(viomycin)、抗肿瘤药物(例如含铂化学治疗剂,例如顺铂、卡铂和奥沙利铂(oxaliplatin))、袢利尿剂(例如依他尼酸和呋塞米)、水杨酸盐(例如阿司匹林(aspirin),特别是在高剂量下)和奎宁。在一些实施方案中,本文所述的方法和组合物可用于治疗双侧前庭功能低下。双侧前庭功能低下可由氨基糖苷诱导(例如在患有氨基糖苷诱导的双侧前庭功能低下的受试者中,可使用本文所述的方法和组合物来减少氨基糖苷诱导的前庭毛细胞损伤或死亡,或促进或增加毛细胞再生和/或毛细胞或VSC增殖)。

[0176] 如本文所述可操作地连接至SLC6A14启动子(例如与表2中所列出的多核苷酸序列中的任一者(例如SEQ ID NO:1-6中任一者的多核苷酸)具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的多核苷酸)来治疗受试者的转基因可为编码在健康VSC中表达的蛋白质(例如在前庭毛细胞发育、前庭毛细胞命运特化、前庭毛细胞再生、前庭毛细胞和/或VSC增殖、前庭毛细胞成熟或前庭毛细胞神经支配中起作用的蛋白质或患有前庭功能障碍的受试者中缺失的蛋白质)、另一目标蛋白质(例如治疗蛋白或报告蛋白,例如荧光蛋白、lacZ或荧光素酶)、siRNA、ASO、核酸酶或微小RNA的转基因。转基因可基于受试者前庭功能障碍的病因(例如如果受试者的前庭功能障碍与特定遗传突变相关,则转基因可为在受试者中突变的基因的野生型形式,或者如果受试者患有与毛细胞损失相关的前庭功能障碍,则转基

因可编码促进前庭毛细胞再生、前庭毛细胞神经支配或前庭毛细胞和/或VSC增殖的蛋白质)、受试者前庭功能障碍的严重程度、受试者的毛细胞的健康状况、受试者的年龄、受试者的前庭功能障碍家族史或其他因素来选择。如本文所述可由可操作地连接SLC6A14启动子的转基因表达来治疗受试者的蛋白质包括Sox9、Sall2、Camta1、Hey2、Gata2、Hey1、Lass2、Sox10、Gata3、Cux1、Nr2f1、Hes1、Rorb、Jun、Zfp667、Lhx3、Nhlh1、Mxd4、Zmiz1、Myt1、Stat3、Barhl1、Tox、Prox1、Nfia、Thrb、Mycl1、Kdm5a、Creb314、Etv1、Peg3、Bach2、Isl1、Zbtb38、Lbh、Tub、Hmg20、Rest、Zfp827、Aff3、Pknox2、Arid3b、Mlxip、Zfp532、Ikzf2、Sall1、Six2、Sall3、Lin28b、Rfx7、Bdnf、Gfi1、Pou4f3、Myc、Ctnnb1、Sox2、Sox4、Sox11、Tead2、Atoh1和在氨基酸328、331和/或334处含有取代的Atoh1变体(例如S328A、S331A、S334A、S328A/S331A、S328A/S334A、S331A/S334A和328A/S331A/S334)。

[0177] 治疗可包括以不同单位剂量施用含有含本文所述的SLC6A14启动子(例如SEQ ID NO:1-6中的任一者)的核酸载体(例如AAV病毒载体)的组合物。每个单位剂量通常将含有预定量的治疗性组合物。待施用的量和特定施用途径和制剂在临床领域的技术人员的技能范围内。单位剂量无需作为单次注射来施用,但可包括在设定的时间段内连续输注。可使用注射泵进行给药来控制输注速率以最小化内耳(例如前庭迷路)的损伤。在核酸载体为AAV载体(例如AAV1、AAV2、AAV2quad(Y-F)、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、rh10、rh39、rh43、rh74、Anc80、Anc80L65、DJ/8、DJ/9、7m8、PHP.B、PHP.eB或PHP.S载体)的情况下,病毒载体可以例如下列剂量施用于患者:约1×10^{9}个载体基因组(VG)/mL至约1×10^{16}VG/mL(例如1x 10^{9}VG/mL、2x 10^{9}VG/mL、3x 10^{9}VG/mL、4x10^{9}VG/mL、5x 10^{9}VG/mL、6x 10^{9}VG/mL、7x 10^{9}VG/mL、8x 10^{9}VG/mL、9x 10^{9}VG/mL、1x 10^{10}VG/mL、2x 10^{10}VG/mL、3x 10^{10}VG/mL、4x 10^{10}VG/mL、5x 10^{10}VG/mL、6x 10^{10}VG/mL、7x 10^{10}VG/mL、8x 10^{10}VG/mL、9x 10^{10}VG/mL、1x 10^{11}VG/mL、2x 10^{11}VG/mL、3x 10^{11}VG/mL、4x 10^{11}VG/mL、5x 10^{11}VG/mL、6x 10^{11}VG/mL、7x 10^{11}VG/mL、8x 10^{11}VG/mL、9x 10^{11}VG/mL、1x 10^{12}VG/mL、2x 10^{12}VG/mL、3x 10^{12}VG/mL、4x 10^{12}VG/mL、5x 10^{12}VG/mL、6x 10^{12}VG/mL、7x 10^{12}VG/mL、8x 10^{12}VG/mL、9x 10^{12}VG/mL、1x 10^{13}VG/mL、2x 10^{13}VG/mL、3x 10^{13}VG/mL、4x 10^{13}VG/mL、5x 10^{13}VG/mL、6x 10^{13}VG/mL、7x 10^{13}VG/mL、8x 10^{13}VG/mL、9x 10^{13}VG/mL、1x 10^{14}VG/mL、2x 10^{14}VG/mL、3x 10^{14}VG/mL、4x 10^{14}VG/mL、5x 10^{14}VG/mL、6x 10^{14}VG/mL、7x 10^{14}VG/mL、8x 10^{14}VG/mL、9x 10^{14}VG/mL、1x 10^{15}VG/mL、2x 10^{15}VG/mL、3x 10^{15}VG/mL、4x 10^{15}VG/mL、5x 10^{15}VG/mL、6x 10^{15}VG/mL、7x 10^{15}VG/mL、8x 10^{15}VG/mL、9x 10^{15}VG/mL或1x 10^{16}VG/mL)于1μL至200μL(例如1μL、2μL、3μL、5μL、6μL、7μL、8μL、9μL、10μL、15μL、20μL、25μL、30μL、35μL、40μL、45μL、50μL、55μL、60μL、65μL、70μL、75μL、80μL、85μL、90μL、95μL、100μL、110μL、120μL、130μL、140μL、150μL、160μL、170μL、180μL、190μL或200μL)的体积中。AAV载体可以下列剂量施用于受试者:约1x 10^{7}VG/耳至约2x 10^{15}VG/耳(例如,1x 10^{7}VG/耳、2x 10^{7}VG/耳、3x 10^{7}VG/耳、4x 10^{7}VG/耳、5x 10^{7}VG/耳、6x 10^{7}VG/耳、7x 10^{7}VG/耳、8x 10^{7}VG/耳、9x 10^{7}VG/耳、1x10^{8}VG/耳、2x 10^{8}VG/耳、3x 10^{8}VG/耳、4x 10^{8}VG/耳、5x 10^{8}VG/耳、6x 10^{8}VG/耳、7x 10^{8}VG/耳、8x 10^{8}VG/耳、9x 10^{8}VG/耳、1x10^{9}VG/耳、2x 10^{9}VG/耳、3x 10^{9}VG/耳、4x 10^{9}VG/耳、5x 10^{9}VG/耳、6x 10^{9}VG/耳、7x 10^{9}VG/耳、8x 10^{9}VG/耳、9x 10^{9}VG/耳、1x10^{10}VG/耳、2x 10^{10}VG/耳、3x 10^{10}VG/耳、4x 10^{10}VG/耳、5x 10^{10}VG/耳、6x 10^{10}VG/耳、7x 10^{10}VG/耳、8x 10^{10}VG/耳、9x 10^{10}VG/耳、1x 10^{11}VG/耳、2x 10^{11}VG/耳、3x 10^{11}VG/耳、4x 10^{11}VG/耳、5x 10^{11}VG/耳、6x

10^{11}VG/耳、7x 10^{11}VG/耳、8x 10^{11}VG/耳、9x 10^{11}VG/耳、1x 10^{12}VG/耳、2x 10^{12}VG/耳、3x 10^{12}VG/耳、4x 10^{12}VG/耳、5x 10^{12}VG/耳、6x 10^{12}VG/耳、7x 10^{12}VG/耳、8x 10^{12}VG/耳、9x 10^{12}VG/耳、1x 10^{13}VG/耳、2x 10^{13}VG/耳、3x 10^{13}VG/耳、4x 10^{13}VG/耳、5x 10^{13}VG/耳、6x 10^{13}VG/耳、7x 10^{13}VG/耳、8x 10^{13}VG/耳、9x 10^{13}VG/耳、1x 10^{14}VG/耳、2x 10^{14}VG/耳、3x 10^{14}VG/耳、4x 10^{14}VG/耳、5x 10^{14}VG/耳、6x 10^{14}VG/耳、7x 10^{14}VG/耳、8x 10^{14}VG/耳、9x 10^{14}VG/耳、1x 10^{15}VG/耳或2x 10^{15}VG/耳)。

[0178] 本文所述的组合物是以足以改进前庭功能(例如改进平衡或减少头晕或眩晕)、治疗双侧前庭病、治疗双侧前庭功能低下、治疗振动幻视、治疗平衡障碍、增加由可操作地连接至SLC6A14启动子的转基因编码的蛋白质的表达、增加由可操作地连接至SLC6A14启动子的转基因编码的蛋白质的功能、促进或增加毛细胞发育、增加毛细胞数(例如促进或诱导毛细胞再生或增殖)、增加或诱导毛细胞成熟(例如再生毛细胞的成熟)、改进毛细胞功能、改进VSC功能、促进或增加VSC和/或前庭毛细胞存活和/或促进或增加VSC增殖的量施用。前庭功能可使用标准平衡和眩晕测试(例如眼动测试(例如ENG或VNG)、VOR测试(例如头部冲击测试(哈-克测试,例如VHIT)或热量反射测试)、体位图、旋转椅测试、ECOG、VEMP和专门临床平衡测试)来评估,并且与在治疗之前获得的测量相比可改进5%或更大(例如5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、200%或更大)。本文所述的组合物也可以足以减缓或防止前庭功能障碍的发生或进展的量来施用(例如在携带与前庭功能障碍相关的遗传突变、具有前庭功能障碍家族史(例如遗传性前庭功能障碍)或已暴露于与前庭功能障碍相关的风险因子(例如耳毒性药物、头部创伤或疾病或感染)但未表现出前庭功能障碍(例如眩晕、头晕或失衡)的受试者中,或在表现出轻度至中度前庭功能障碍的受试者中)。在施用于受试者的核酸载体中由可操作地连接至SLC6A14启动子的转基因编码的蛋白质的表达可使用免疫组织化学、蛋白质印迹分析、定量实时PCR或本领域中已知用于检测蛋白质或mRNA的其他方法来评估,并且与施用本文所述的组合物之前的表达相比可增加5%或更大(例如5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、200%或更大)。毛细胞数、毛细胞功能、毛细胞成熟、毛细胞再生或由施用于受试者的核酸载体编码的蛋白质的功能可间接基于前庭功能的测试来评估,并且与施用本文所述的组合物之前的毛细胞数、毛细胞功能、毛细胞成熟、毛细胞再生或蛋白质功能相比或与未经治疗的受试者相比,可增加5%或更大(例如5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、200%或更大)。这些效应可在例如施用本文所述的组合物之后1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、15周、20周、25周或更长时间内出现。可在施用组合物之后1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月或更长时间来评估患者,这取决于用于治疗的剂量和施用途径。根据评估的结果,患者可接受额外治疗。

[0179] 试剂盒

[0180] 本文所述的组合物可于用于治疗前庭功能障碍的试剂盒中提供。组合物可包括本文所述的SLC6A14启动子(例如与表2中所列出的多核苷酸序列中的任一者(例如SEQ ID NO:1-6中任一者的多核苷酸)具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的多核苷酸)、含有此类多核苷酸的核酸载体和含有可操作地连接至编码目标蛋白质(例如可在VSC

中表达以治疗前庭功能障碍的蛋白质)的转基因的本文所述多核苷酸的核酸载体。核酸载体可包装于AAV病毒衣壳(例如AAV1、AAV2、AAV2quad(Y-F)、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、Anc80、7m8、PHP.B、PHP.eB或PHP.S)中。所述试剂盒还可包括指导试剂盒的使用者(例如医师)实施本文所述方法的包装插页。所述试剂盒可任选地包括注射器或用于施用组合物的其他器件。

[0181] 实施例

[0182] 提出以下实施例以向本领域的普通技术人员提供可如何使用、制造和评估本文所述的组合物和方法的描述,并且旨在纯粹示例本发明,而不旨在限制本发明人视为其发明的范围。

[0183] 实施例1.使用单细胞RNA-Seq将溶质载体家族6成员14(SLC6A14)鉴定为前庭支持细胞特异性基因

[0184] 对成年小鼠的前庭和耳蜗组织实施单细胞RNA测序并且分析转录组以鉴定在内耳的不同细胞类型中表达的基因。此分析集中在鉴定在前庭支持细胞中表达但不在耳蜗支持细胞中表达的基因。SLC6A14被鉴定为在前庭支持细胞(VSC)中稳健检测到、但在其他前庭细胞类型或耳蜗细胞类型中无法检测到的转录物(图1A-1B)。

[0185] 实施例2.鉴定内源表达SLC6A14的细胞系

[0186] 为鉴定内源表达SLC6A14基因的细胞系,我们询问了ARCHS数据库,其含有可公开获得的鼠类和人类细胞的RNA测序数据(amp.pharm.mssm.edu/archs4)。根据此询问将多种细胞系鉴定为内源表达SLC6A14(图2)。HepG2(人类肝癌细胞)是具有SLC6A14最高中点表达的三种细胞系中的一者。

[0187] 实施例3.测定HepG2细胞中多种腺相关病毒(AAV)血清型的转导效率

[0188] 为以实验方式验证HepG2细胞可由多种重组AAV血清型转导,通过质粒构建体使用多种AAV血清型转导HepG2细胞。具体而言,首先将HepG2细胞接种至板中。通过Lipofectamine 3000转染质粒。使用常规三重转染方法将AAV包装于HEK293T细胞中。从产生细胞收获AAV病毒,通过碘克沙醇(iodixanol)梯度离心纯化,并且然后通过缓冲液交换以产生最终纯AAV原液。将在巨细胞病毒(CMV)启动子控制下编码融合至绿色荧光蛋白基因(GFP)的人类组蛋白H2B基因(CMV-H2B-GFP)的质粒构建体包装至AAV1、AAV8和AAV9衣壳中并且以1×10^{6}vg/细胞的感染复数(MOI)转导至HepG2细胞中。通过荧光显微镜使GFP可视化并通过流式细胞术量化。发现所有血清型都转导HepG2细胞,但AAV9转导细胞的效率低得多(图3)。

[0189] 实施例4.测定HepG2细胞中的SLC6A14启动子活性

[0190] 鼠类(SEQ ID NO:5)和人类(SEQ ID NO:3-4)SLC6A14启动子经设计以促进外源转基因表达。为验证这些SLC6A14启动子在作为外源DNA递送时有活性并且与病毒包装的功效无关,使用Lipofectamine将编码SLC6A14启动子的三种变体的质粒P530、P335和P372(分别为图19、图21和图22)转染至HepG2细胞中。还比较了SLC6A14启动子活性与CMV启动子的活性。使用未经转导的细胞作为对照。所测试构建体的脂转染效率显示于图4A中。经SLC6A14启动子变体转染的细胞的GFP表达水平相当于或大于普遍存在的强CMV启动子,这指示细胞系可用作SLC6A14启动子活性的模型(图4B)。用荧光显微镜验证这些结果(图5A-5E)。

[0191] 实施例5.测定HepG2细胞中编码SLC6A14启动子的AAV8病毒载体的转导效率

[0192] 在CMV启动子或四种SLC6A14启动子变体中的一者控制下将含有核H2B-GFP的转基因包装至AAV8病毒载体中。使用转基因质粒P530(人类SEQ ID NO:4的SLC6A14启动子)、P335(SEQ ID NO:3的人类SLC6A14启动子)、P372(SEQ ID NO:5的小鼠SLC6A14启动子)或P373(SEQ ID NO:6的小鼠SLC6A14启动子;图23)合成驱动H2B-GFP表达的SLC6A14启动子。将每个病毒载体以1×10^{6}vg/细胞的MOI递送至HepG2细胞。所有病毒都导致存在GFP阳性HepG2细胞,从而确认包装至AAV8中的SLC6A14启动子能够驱动基因表达(图6)。

[0193] 实施例6.测定体外鼠类前庭器官中的SLC6A14启动子活性

[0194] 为测定体外鼠类前庭器官中的SLC6A14启动子活性,从尸检后成年C57Bl/6小鼠的内耳解剖成年雄性小鼠椭圆囊和嵴并将其维持在细胞培养物中。添加庆大霉素以杀死毛细胞。在上述SLC6A14启动子的鼠类形式中的任一者(SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6)控制下将携带GFP的AAV8载体以1×10^{11}个病毒基因组(vg)/培养物的剂量递送至细胞培养基中来转导组织。培养七天后,用4%多聚甲醛将组织在室温下固定一小时。用磷酸盐缓冲盐水(PBS)将器官洗涤三次,每次五分钟,然后在室温下用M.O.M.封闭试剂(Vector Laboratories,Burlingame CA)根据制造商的方案封闭一小时。然后将器官在室温下用PBS+0.5%Triton X-100(PBST)中的10%血清封闭3小时,接着在4℃下在PBST加2%血清中的一级兔抗Sall2(支持细胞的标志物)抗体(1:200稀释;目录号HPA004162,Millipore Sigma,St.Louis,MO)或一级小鼠单克隆抗Brn-3c(Pou4f3-毛细胞的标志物)抗体(1:200稀释;目录号sc-81980,Santa Cruz Biotechnology,Dallas,TX)中温育过夜。使组织达到室温并且然后用PBS洗涤三次,每次五分钟。然后将组织与PBST加2%血清中的Alexa Fluor 568驴抗兔或Alexa Fluor647抗小鼠二级抗体(1:500稀释;ThermoFisher Scientific,WalthamMA)在室温下一起温育三小时。用PBS将器官洗涤三次,每次五分钟,安装至载玻片上,并使用具有airyscan的Zeiss LSM 880(Zeiss,Germany)获得共焦图像。将耳用福尔马林固定并且用石蜡包埋(FFPE)并制成切片,用发色IHC针对GFP染色,并且成像。鼠类启动子#1(SEQ ID NO:5)以高水平在椭圆囊和嵴中的支持细胞中表达(图7A-7D)。具体而言,在含有毛细胞(Pou4f3)和支持细胞(Sall2)的感觉上皮上可见GFP表达(图7A)。椭圆囊的横向视图显示与Sall2阳性支持细胞核一致、但不与Pou4f3阳性毛细胞核一致的GFP标记(图7B)。在外植嵴中也可见GFP表达(图7C)。嵴的横向视图显示主要与支持细胞共定位的GFP表达(图7D)。表达替代同功型的鼠类启动子#2(SEQ ID NO:6)仅在椭圆囊中产生弱表达(图8A-8D),并且在毛细胞和支持细胞中都检测到。仅在椭圆囊感觉上皮的小部分中可见GFP表达,所述小部分含有毛细胞(Pou4f3)和支持细胞(Sall2)(图8A)。椭圆囊的横向视图显示与Sall2阳性支持细胞核以及Pou4f3阳性毛细胞核的一部分一致的GFP标记(图8B)。在外植嵴中也可见低水平的GFP表达(图8C)。嵴的横向视图显示主要与支持细胞共定位、但也出现在非特异性区域中的GFP表达(图8D)。

[0195] 实施例7.测定体内鼠类前庭器官中的SLC6A14启动子活性

[0196] 为测定体内SLC6A14启动子的活性,将驱动包装至AAV8中的核GFP(来自质粒P372)的鼠类SLC6A14启动子#1(SEQ ID NO:5)以9.78×10^{9}vg/耳的剂量通过注射递送至成年小鼠的后半规管中。两周后,随后通过CO_2对动物实施安乐死并灌注PBS,接着灌注中性缓冲福尔马林(NBF)。移除颞骨并在室温(RT)下在NBF中固定过夜。从颞骨解剖前庭器官并在室温下在14%EDTA(BM-150A,Boston BioProducts)中脱钙过夜。在整个安装的椭圆囊(图9A)、

小囊(图9B)和嵴(图9C)中可见GFP表达。

[0197] 为测定表达的特异性,将整个耳固定,脱钙,石蜡包埋,并用苏木素和曙红(H&E)染色制成切片以使整个组织的横截面可视化。在小囊、椭圆囊和嵴的细胞核中可见稳健的GFP表达,而在耳蜗中未见GFP信号(图10)。在毛细胞核或间充质细胞核中存在低脱靶GFP信号,这指示此启动子的特异性。通过H&E染色和针对GFP蛋白复染来确认启动子活性的细胞类型特异性以鉴定表达GFP的细胞的核(图11A)和其中AAV载体基因组的WPRE元件经RNAScope探针标记的相邻切片(图11B)。染色显示前庭器官的支持细胞核中的特异性表达,其中在毛细胞中几乎没有检测到GFP。在感觉上皮下方的毛细胞、支持细胞和间充质细胞中检测到大量载体基因组,这指示表达GFP的载体转导多种细胞类型(图11B)。然而,仅在支持细胞中检测到GFP表达(图11A)。

[0198] 实施例8.经由支持细胞特异性启动子使新毛细胞中的Atoh1转基因表达沉默可驱动进一步成熟

[0199] 为评估启动子特异性对毛细胞成熟的效应,从雄性C57Bl/6J小鼠(6-8周龄)解剖椭圆囊并培养于37℃和5%CO_2下100μL含有DMEM/F12以及5%FBS和2.5μg/ml环丙沙星(ciprofloxacin)的基础培养基中。将庆大霉素(0.5mg/mL)添加至培养基中保持24小时以杀死毛细胞,然后洗掉庆大霉素并更换为含有剂量为1E12 gc的以下AAV中的一者的250μL新鲜培养基:AAV8-CMV-Atoh1-2A-H2BGFP(CMV启动子组)、AAV8-GFAP-Atoh1-2A-H2BGFP(SC特异性启动子组)、AAV8-RLBP1-Atoh1-2A-H2BGFP(SC特异性启动子组)。温育一天后,洗掉病毒并且将椭圆囊在2mL新鲜培养基中再培养3天、8天或16天。在培养时段结束时,使椭圆囊解离并且捕获单细胞并用10X Genomics Chromium系统制备以用于单细胞RNA-Seq。在IlluminaNovaSeq上进行测序,用CellRanger比对读数,并且用Seurat实施下游分析。在Seurat中通过与从胚胎第18天(E18)、出生后第12天(P12)和成年小鼠产生的椭圆囊毛细胞单细胞RNA-Seq特征的数据库比较产生预测评分。图12A-12D是显示经在普遍存在的CMV启动子或支持细胞(SC)特异性启动子(GFAP或RLBP1)控制下表达Atoh1的AAV治疗的成年椭圆囊外植体中的再生毛细胞的Atoh1转基因表达和成熟预测评分的小提琴图。Atoh1转基因在SC特异性启动子组中在再生毛细胞中以低水平或不可检测的水平表达(图12A),而其在来自CMV组的几乎所有毛细胞中以高水平表达。这些结果证实,Atoh1转基因在其由SC特异性启动子驱动时在再生毛细胞中自然下调。来自SC特异性启动子组的与P12(图12C)和成年毛细胞(图12D)强相关的单细胞RNA-Seq特征多于来自CMV组的单细胞RNA-Seq特征。相反,来自CMV组的与E18毛细胞(图12B)强相关的单细胞RNA-Seq特征多于来自SC特异性启动子组的单细胞RNA-Seq特征。因此,具有SC特异性启动子的Atoh1转基因的天然沉默驱动再生毛细胞的成熟。

[0200] 实施例9.构建含有可操作地连接至编码Atoh1的多核苷酸的SLC6A14启动子的AAV载体

[0201] 如下产生AAV8载体:将HEK293T细胞(获自ATCC,Manassas,VA)接种至细胞培养物处理的培养皿(15cm)中并且使其生长直至它们在容器中达到70-80%的汇合度。使用常规三重转染方法将质粒转染至293T细胞中:SEQ ID NO:7的转移质粒,其编码驱动人类ATOH1(由SEQ ID NO:7的核苷酸1083-2144编码)表达的SLC6A14启动子(SEQ ID NO:7的核苷酸233-1066),并且还含有土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE,SEQ ID NO:7的核苷酸

2155-2702),并将3'UTR中的牛生长激素(bGH)多聚腺苷酸化信号(SEQ ID NO:7的核苷酸2715-2922)与含有AAV2 rep/AAV8 cap的质粒pXR8(Addgene#112864)和腺病毒辅助质粒pXX6-80(X Xiao等人,J Virol 72(3),第2224-32页(1998))以1:1:1摩尔比组合,并且将52.3μg的所述混合物与PEIMax(Polysciences)组合。将总共52.3μg的所述质粒混合物递送至含有细胞的每个15cm板上。随后收集细胞培养基和细胞以提取并纯化AAV。经由三个冷冻解冻周期从细胞释放细胞的AAV并且收集细胞培养基以获得分泌的AAV。通过将PEG8000添加至溶液、在4℃下温育并离心来浓缩细胞培养基的AAV以收集AAV粒子。使所有AAV穿过碘克沙醇密度梯度离心以纯化AAV粒子,并且通过使经纯化AAV和缓冲液通过具有100kDa分子量截止值的离心柱将缓冲液更换为含有0.01%pluronic F68的PBS。以类似方式使用适当的转基因质粒(其提供启动子、转基因和转基因表达所需的其他元件)合成本文所述的其他AAV病毒载体。

[0202] 实施例10.测定体内鼠类前庭器官中的人类SLC6A14启动子活性

[0203] 为确定人类SLC6A14启动子是否也在体内前庭支持细胞中有活性,将含有驱动核定向H2B-GFP融合蛋白(SEQ ID NO:8的核苷酸1083-2198)的表达的人类SLC6A14启动子(核苷酸233-1066)的SEQ ID NO:8的转移质粒包装至AAV8中。将所得AAV8载体以3×10^{10}vg/耳的剂量通过注射递送至雄性8周龄C57BL/6小鼠的后半规管中。两周后,随后通过CO_2对动物实施安乐死并灌注PBS,接着灌注中性缓冲福尔马林(NBF)。移除颞骨,显微解剖出椭圆囊和嵴,并针对毛细胞标志物Pou4f3(1:200,sc-1980,Santa Cruz Biotechnology,Dallas,Texas,USA)和支持细胞标志物Sall2(1:200,HPA004162,Atlas Antibodies,Bromma,Sweden)实施荧光免疫标记。将器官安装在载玻片上并且使其在Zeiss LSM 800共焦显微镜上成像。在大多数支持细胞中检测到天然GFP表达(图13A-13B)。GFP似乎高度局限于支持细胞并且未在毛细胞或任何其他非感觉细胞类型中检测到。

[0204] 实施例11.测定体内非人类灵长类动物前庭器官中的人类SLC6A14启动子活性

[0205] 为测定体内非人类灵长类动物前庭器官中的SLC6A14启动子活性,将用于实施例10中的相同AAV8载体以1.5×10^{12}个病毒基因组(vg)/耳的剂量通过注射递送至圆窗膜中,所述圆窗膜具有为成年食蟹猕猴的侧半规管中的流体流出产生的开窗位点。四周后,随后用氯胺酮(10-15mg/kg,IM)或泰拉唑(Telazol)(5-8mg/kg,IM)使动物镇静并灌注含有肝素(100U/mL)的PBS,接着灌注中性缓冲福尔马林(10%NBF)。移除颞骨并在室温(RT)下在NBF中固定过夜并且然后在室温下在Immunocal(StatLab)溶液中脱钙。

[0206] 以两种方式检查GFP表达:显微解剖出前庭器官并使其成像,将整片或整耳用石蜡包埋并制成切片以使耳的所有区域中的表达可视化。对于整片器官,用DAPI对核进行复染,安装在载玻片上,并且在Zeiss LSM 880共焦显微镜上成像。对于各切片,实施免疫标记以检测GFP,这是因为石蜡包埋过程使天然GFP信号淬灭。脱蜡并抗原修复后,用针对GFP的兔一级抗体(Abcam,ab183734)和缀合至碱性磷酸酶的抗兔二级抗体标记切片以使用Fast-Red染料使发红色的染色显影。使用苏木素将切片复染成蓝色。实施例数据显示椭圆囊中的GFP表达。与在小鼠中所观察到的结果类似,GFP表达局限于感觉上皮,并且在非感觉细胞中未检测到表达(图14A)。在支持细胞中检测到稳健的GFP表达(图14B)。

[0207] 实施例12.在小鼠IDPN损伤模型中在体内经由SLC6A14启动子驱动的ATOH1过表达使前庭毛细胞再生

[0208] 我们接下来评价了在成年小鼠体内在杀死预先存在的毛细胞后,由人类SLC6A14启动子驱动的转录因子ATOH1的表达是否能够将前庭支持细胞转化成新毛细胞。为损伤毛细胞,对雄性8周龄C57BL/6小鼠称重并经腹膜内注射PBS中的4mg/kg无菌3,3'-亚氨基二丙腈(TCI America,I0010)。将含有编码驱动人类ATOH1(SEQ ID NO:9的核苷酸1083-2144)的表达并且共表达核靶向绿色荧光蛋白(GFP融合至组蛋白2b基因的H2B片段-SEQ ID NO:9的核苷酸2217-3332)的SEQ ID NO:4的人类SLC6A14启动子(SEQ ID NO:9的核苷酸233-1066)、土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE,SEQ ID NO:9的核苷酸3341-3888)和3'UTR中的牛生长激素(bGH)多聚腺苷酸化信号(SEQ ID NO:9的核苷酸3901-4108)的表达盒的SEQ ID NO:9的质粒以7.3×10^{12}vg/mL的滴度包装至AAV8中。将此AAV8载体以7.3×10^{9}vg/耳的剂量施用于雄性8周龄C57BL/6小鼠(n=6)的后半规管中。六周后,随后通过CO_2对动物实施安乐死并灌注PBS,接着灌注中性缓冲福尔马林(NBF)。移除颞骨,显微解剖出椭圆囊,并针对毛细胞标志物Pou4f3(1:200,sc-81980,Santa Cruz Biotechnology)和支持细胞标志物Sall2(1:200,HPA004162,AtlasAntibodies)实施荧光免疫标记。将器官安装在载玻片上并使其在Zeiss LSM 800共焦显微镜上成像。共焦图像的定性观察揭示与对侧耳的未经治疗的椭圆囊相比,经载体治疗的椭圆囊中的毛细胞数明显增加(如用Pou4f3标记所评价)(图15A)。使用Imaris软件中的3D计数自动化算法定量测量毛细胞数证实存在显著增加(图15B)。

[0209] 实施例13.在小鼠IDPN损伤模型中在体内编码SLC6A14启动子驱动的ATOH1表达盒的AAV载体的剂量反应

[0210] 利用实施例12中所述的相同方法和载体,我们也通过以1×10^{9}、5×10^{9}、1×10^{10}和2×10^{10}vg/耳的剂量递送载体来评价毛细胞再生效应的剂量依赖性(n=8只小鼠/剂量)。在所有测试剂量下,经治疗的(左)耳与未经治疗的(右)耳之间的动物内毛细胞数差异的量化揭示显著再生,并且明显剂量依赖性在2×10^{10}vg/耳达到稳定水平(图16)。

[0211] 实施例14.在小鼠庆大霉素损伤模型中在体内经由SLC6A14启动子驱动的ATOH1过表达使前庭毛细胞再生

[0212] 为确定在替代损伤模型中是否可观察到类似再生反应,将实施例12和13中所述的相同SLC6A14-ATOH-H2BGFPAAV8载体递送至成年小鼠,其中通过局部递送氨基糖苷抗生素庆大霉素损伤前庭毛细胞。具体而言,经由间隔三天的三次经鼓室注射将400mg/mL庆大霉素递送至8周龄雄性C57BL/6小鼠的中耳。两周后,将AAV8载体以2×10^{10}vg/耳的剂量递送至后半规管中(n=12只小鼠)。对于对照小鼠,将等体积的PBS(1μL)注射至后半规管中(n=14只小鼠)。在病毒递送后4周将小鼠杀死,并且如实施例12中所述处理耳并量化。为确认庆大霉素成功地损伤毛细胞,也处死原始小鼠(n=12)用于比较。Pou4f3+毛细胞的量化揭示庆大霉素显著减少椭圆囊中的毛细胞计数,并且表达ATOH1的AAV8载体显著增加毛细胞数(图17A-17B)。

[0213] 实施例15.向患有前庭功能障碍的受试者施用含有含SLC6A14启动子的核酸载体的组合物

[0214] 根据本文所公开的方法,本领域技术的医师可治疗患有前庭功能障碍的患者(例如人类患者)以改进或恢复前庭功能。为此,本领域技术的医师可向人类患者施用含有AAV载体(例如AAV1、AAV2、AAV2quad(Y-F)、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、Anc80、

7m8、PHP.B、PHP.eB或PHP.S)的组合物,所述AAV载体含有可操作地连接至编码治疗蛋白(例如无调BHLH转录因子1(Atoh1))的转基因的SLC6A14启动子(例如与表2中所列出的多核苷酸序列中的任一者(例如SEQ ID NO:1-6中任一者的多核苷酸)具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的多核苷酸)。在一个实施例中,载体具有AAV8衣壳并且含有SEQ ID NO:7的核苷酸233-2922。含有AAV载体的组合物可例如通过局部施用于内耳(例如注射至半规管中)来施用于患者,以治疗前庭功能障碍。

[0215] 在将组合物施用于患者后,本领域技术的专业人员可通过多种方法监测由转基因编码的治疗蛋白的表达和患者响应于疗法的改善。例如,医师可通过实施标准测试(例如眼震电图、视频眼震图、VOR测试(例如头部冲击测试(哈-克测试,例如VHIT)或热量反射测试)、旋转测试、前庭引发的肌源性电势或计算机化动态姿势仪)来监测患者的前庭功能。与施用组合物之前获得的测试结果相比,患者在施用组合物后在一个或多个测试中表现出改进的前庭功能指示患者对治疗的反应良好。可按需要确定和施用后续剂量。

[0216] 本发明的示例性实施方案阐述于以下所列举段落中。

[0217] E1.一种核酸载体,所述核酸载体包含与SEQ ID NO:1-6中的任一者具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)的多核苷酸。

[0218] E2.如E1所述的核酸载体,其中所述多核苷酸与SEQ ID NO:4具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。

[0219] E3.如E1所述的核酸载体,其中所述多核苷酸与SEQ ID NO:3具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。

[0220] E4.如E1所述的核酸载体,其中所述多核苷酸与SEQ ID NO:5具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。

[0221] E5.如E1所述的核酸载体,其中所述多核苷酸与SEQ ID NO:6具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。

[0222] E6.如E1所述的核酸载体,其中所述多核苷酸与SEQ ID NO:2具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。

[0223] E7.如E1所述的核酸载体,其中所述多核苷酸与SEQ ID NO:1具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。

[0224] E8.如E1-E7中任一项所述的核酸载体,其中所述多核苷酸可操作地连接至转基因。

[0225] E9.如E8所述的核酸载体,其中所述转基因是异源转基因。

[0226] E10.如E8或E9所述的核酸载体,其中所述转基因编码蛋白质、短干扰RNA(siRNA)、

反义寡核苷酸(ASO)、核酸酶,或者是微小RNA。

[0227] E11.如E10所述的核酸载体,其中所述多核苷酸能够引导蛋白质、siRNA、ASO、核酸酶或微小RNA在哺乳动物VSC中的前庭支持细胞(VSC)特异性表达。

[0228] E12.如E11所述的核酸载体,其中所述VSC是人类VSC。

[0229] E13.如E10-E12中任一项所述的核酸载体,其中所述蛋白质是治疗蛋白,并且其中所述治疗蛋白是婆罗双树样转录因子2(Sall2)、钙调蛋白结合转录激活因子1(Camta1)、具有YRPW基序2的Hes相关家族BHLH转录因子(Hey2)、Gata结合蛋白2(Gata2)、具有YRPW基序1的Hes相关家族BHLH转录因子(Hey1)、神经酰胺合酶2(Lass2)、SRY盒10(Sox10)、GATA结合蛋白3(Gata3)、Cut样同源异形盒1(Cux1)、核受体亚家族2F组成员(Nr2f1)、Hes相关家族BHLH转录因子(Hes1)、RAR相关孤儿受体B(Rorb)、Jun原癌基因AP-1转录因子亚基(Jun)、锌指蛋白667(Zfp667)、LIM同源异形盒3(Lhx3)、无义螺旋-环-螺旋1(Nhlh1)、MAX二聚化蛋白4(Mxd4)、MIZ-1型锌指(Zmiz1)、髓磷脂转录因子1(Myt1)、信号转导子和转录激活因子3(Stat3)、BarH样同源异形盒1(Barhl1)、胸腺细胞选择相关的高迁移率族盒(Tox)、Prospero同源异形盒1(Prox1)、核因子I A(Nfia)、甲状腺激素受体β(Thrb)、MYCL原癌基因BHLH转录因子(Mycl1)、赖氨酸去甲基酶5A(Kdm5a)、CAMP反应元件结合蛋白3样4(Creb3l4)、ETS变体1(Etv1)、父系表达的3(Peg3)、BTB结构域和CNC同源物2(Bach2)、ISLLIM同源异形盒1(Isl1)、锌指和含BTB结构域的38(Zbtb38)、肢芽和心脏发育(Lbh)、Tubby二分转录因子(Tub)、泛素C(Hmg20)、RE1沉默转录因子(Rest)、锌指蛋白827(Zfp827)、AF4/FMR2家族成员3(Aff3)、PBX/有节的1同源异形盒2(Pknox2)、富含AT的相互作用结构域3B(Arid3b)、MLX相互作用蛋白(Mlxip)、锌指蛋白(Zfp532)、IKAROS家族锌指2(Ikzf2)、婆罗双树样转录因子1(Sall1)、SIX同源异形盒2(Six2)、婆罗双树样转录因子3(Sall3)、Lin-28同源物B(Lin28b)、调节因子X7(Rfx7)、脑源性神经营养因子(Bdnf)、生长因子非依赖性1转录阻遏子(Gfi1)、POU4类同源异形盒3(Pou4f3)、MYC原癌基因BHLH转录因子(Myc)、β-连环蛋白(Ctnnb1)、SRY盒2(Sox2)、SRY盒4(Sox4)、SRY盒11(Sox11)、TEA结构域转录因子2(Tead2)、无调BHLH转录因子1(Atoh1)或Atoh1变体。

[0230] E14.如E13所述的核酸载体,其中所述治疗蛋白是Atoh1。

[0231] E15.如E13所述的核酸载体,其中所述Atoh1变体具有一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:S328A、S331A、S334A、S328A/S331A、S328A/S334A、S331A/S334A和S328A/S331A/S334。

[0232] E16.如E1-E15中任一项所述的核酸载体,其中所述核酸载体是病毒载体、质粒、粘粒或人工染色体。

[0233] E17.如E16所述的核酸载体,其中所述核酸载体是选自由以下组成的组的病毒载体:腺相关病毒(AAV)、腺病毒和慢病毒。

[0234] E18.如E17所述的核酸载体,其中所述病毒载体是AAV载体。

[0235] E19.如E18所述的核酸载体,其中所述AAV载体具有AAV1、AAV2、AAV2quad(Y-F)、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、rh10、rh39、rh43、rh74、Anc80、Anc80L65、DJ/8、DJ/9、7m8、PHP.B、PHP.eB或PHP.S衣壳。

[0236] E20.一种组合物,所述组合物包含如E1-E19中任一项所述的核酸载体。

[0237] E21.如E20所述的组合物,所述组合物还包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形

剂。

[0238] E22.一种多核苷酸,所述多核苷酸与可操作地连接至转基因的SEQ ID NO:1-6中的任一者具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。

[0239] E23.如E22所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸与SEQ ID NO:4具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。

[0240] E24.如E22所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸与SEQ ID NO:3具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。

[0241] E25.如E22所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸与SEQ ID NO:5具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。

[0242] E26.如E22所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸与SEQ ID NO:6具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。

[0243] E27.如E22所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸与SEQ ID NO:2具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。

[0244] E28.如E22所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸与SEQ ID NO:1具有至少85%序列同一性(例如85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的序列同一性)。

[0245] E29.如E22-E28中任一项所述的多核苷酸,其中所述转基因是异源转基因。

[0246] E30.如E29所述的多核苷酸,其中所述转基因编码蛋白质、siRNA、ASO、核酸酶,或者是微小RNA。

[0247] E31.如E30所述的多核苷酸,其中所述蛋白质是治疗蛋白,并且其中所述治疗蛋白是Sox9、Sall2、Camta1、Hey2、Gata2、Hey1、Lass2、Sox10、Gata3、Cux1、Nr2f1、Hes1、Rorb、Jun、Zfp667、Lhx3、Nhlh1、Mxd4、Zmiz1、Myt1、Stat3、Barhl1、Tox、Prox1、Nfia、Thrb、Mycl1、Kdm5a、Creb314、Etv1、Peg3、Bach2、Isl1、Zbtb38、Lbh、Tub、Hmg20、Rest、Zfp827、Aff3、Pknox2、Arid3b、Mlxip、Zfp532、Ikzf2、Sall1、Six2、Sall3、Lin28b、Rfx7、Bdnf、Gfi1、Pou4f3、Myc、Ctnnb1、Sox2、Sox4、Sox11、Tead2、Atoh1或Atoh1变体。

[0248] E32.如E31所述的多核苷酸,其中所述治疗蛋白是Atoh1。

[0249] E33.一种细胞,所述细胞包含如E22-E32中任一项所述的多核苷酸或如E1-E19中任一项所述的核酸载体。

[0250] E34.如E33所述的细胞,其中所述细胞是哺乳动物VSC。

[0251] E35.如E34所述的细胞,其中所述哺乳动物VSC是人类VSC。

[0252] E36.一种在哺乳动物VSC中表达转基因的方法,所述方法包括使所述哺乳动物VSC与如E1-E19中任一项所述的核酸载体或如E20或E21所述的组合物接触。

[0253] E37.如E36所述的方法,其中所述转基因在VSC中特异性表达。

[0254] E38.如E36或E37所述的方法,其中所述哺乳动物VSC是人类VSC。

[0255] E39.一种治疗患有前庭功能障碍或具有患上前庭功能障碍的风险的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如E1-E19中任一项所述的核酸载体或如E20或E21所述的组合物。

[0256] E40.如E39所述的方法,其中所述前庭功能障碍包括眩晕、头晕、失衡、双侧前庭病、双侧前庭功能低下、振动幻视或平衡障碍。

[0257] E41.如E39或E40所述的方法,其中所述前庭功能障碍是年龄相关的前庭功能障碍、头部创伤相关的前庭功能障碍、疾病或感染相关的前庭功能障碍或耳毒性药物诱导的前庭功能障碍。

[0258] E42.如E39-E41中任一项所述的方法,其中所述前庭功能障碍与遗传突变相关。

[0259] E43.一种诱导或增加有需要的受试者的前庭毛细胞再生的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如E1-E19中任一项所述的核酸载体或如E20或E21所述的组合物。

[0260] E44.一种诱导或增加有需要的受试者的VSC增殖的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如E1-E19中任一项所述的核酸载体或如E20或E21所述的组合物。

[0261] E45.一种诱导或增加有需要的受试者的前庭毛细胞增殖的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如E1-E19中任一项所述的核酸载体或如E20或E21所述的组合物。

[0262] E46.一种诱导或增加有需要的受试者的前庭毛细胞成熟(例如再生毛细胞的成熟)的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如E1-E19中任一项所述的核酸载体或如E20或E21所述的组合物。

[0263] E47.一种诱导或增加有需要的受试者的前庭毛细胞神经支配的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如E1-E19中任一项所述的核酸载体或如E20或E21所述的组合物。

[0264] E48.一种增加有需要的受试者的VSC和/或前庭毛细胞存活的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如E1-E19中任一项所述的核酸载体或如E20或E21所述的组合物。

[0265] E49.如E43-E48中任一项所述的方法,其中所述受试者患有前庭功能障碍(例如眩晕、头晕、失衡、双侧前庭病、双侧前庭功能低下、振动幻视或平衡障碍)或具有患上所述疾病的风险。

[0266] E50.一种治疗患有双侧前庭病或具有患上双侧前庭病的风险的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如E1-E19中任一项所述的核酸载体或如E20或E21所述的组合物。

[0267] E51.一种治疗患有双侧前庭功能低下或具有患上双侧前庭功能低下的风险的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如E1-E19中任一项所述的核酸载体或如E20或E21所述的组合物。

[0268] E52.如E51所述的方法,其中所述双侧前庭功能低下是耳毒性药物诱导的双侧前庭功能低下。

[0269] E53.如E41或E52所述的方法,其中所述耳毒性药物选自由以下组成的组:氨基糖苷、抗肿瘤药物、依他尼酸、呋塞米、水杨酸盐和奎宁。

[0270] E54.一种治疗患有振动幻视或具有患上振动幻视的风险的受试者的方法,所述方

法包括向所述受试者施用有效量的如E1-E19中任一项所述的核酸载体或如E20或E21所述的组合物。

[0271] E55.一种治疗患有平衡障碍或具有患上平衡障碍的风险的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如E1-E19中任一项所述的核酸载体或如E20或E21所述的组合物。

[0272] E56.如E39-E55中任一项所述的方法,其中所述方法还包括在施用所述核酸载体或组合物之前评估所述受试者的前庭功能。

[0273] E57.如E39-E56中任一项所述的方法,其中所述方法还包括在施用所述核酸载体或组合物之后评估所述受试者的前庭功能。

[0274] E58.如E39-E57中任一项所述的方法,其中所述核酸载体或组合物是经局部施用的。

[0275] E59.如E58所述的方法,其中所述核酸载体或组合物被施用于半规管。

[0276] E60.如E58所述的方法,其中所述核酸载体或组合物是经鼓室或鼓室内施用的。

[0277] E61.如E58所述的方法,其中所述核酸载体或组合物被施用于外淋巴中。

[0278] E62.如E58所述的方法,其中所述核酸载体或组合物被施用于内淋巴中。

[0279] E63.如E58所述的方法,其中所述核酸载体或组合物被施用于卵圆窗或经由卵圆窗施用。

[0280] E64.如E58所述的方法,其中所述核酸载体或组合物被施用于圆窗或经由圆窗施用。

[0281] E65.如E39-E64中任一项所述的方法,其中所述核酸载体或组合物是以足以预防或减轻前庭功能障碍、延迟前庭功能障碍的发生、减缓前庭功能障碍的进展、改进前庭功能、增加前庭毛细胞数、增加前庭毛细胞成熟(例如再生毛细胞的成熟)、增加前庭毛细胞增殖、增加前庭毛细胞再生、增加前庭毛细胞神经支配、增加VSC增殖、增加VSC数、增加VSC存活、增加前庭毛细胞存活或改进VSC功能的量施用。

[0282] E66.如E39-E65中任一项所述的方法,其中所述受试者是人类。

[0283] E67.一种试剂盒,所述试剂盒包含如E1-E19中任一项所述的核酸载体或如E20或E21所述的组合物。

[0284] 其他实施方案

[0285] 在不脱离本发明的范围和精神的情况下,所描述的发明的各种修改和变化对于本领域技术人员来说将是显而易见的。尽管已结合具体实施方案描述了本发明,但应理解,所要求保护的本发明不应不适当地限于这些具体实施方案。实际上,对本领域技术人员来说显而易见的用于实施本发明的所述模式的各种修改旨在落入本发明的范围内。其他实施方案在权利要求中。

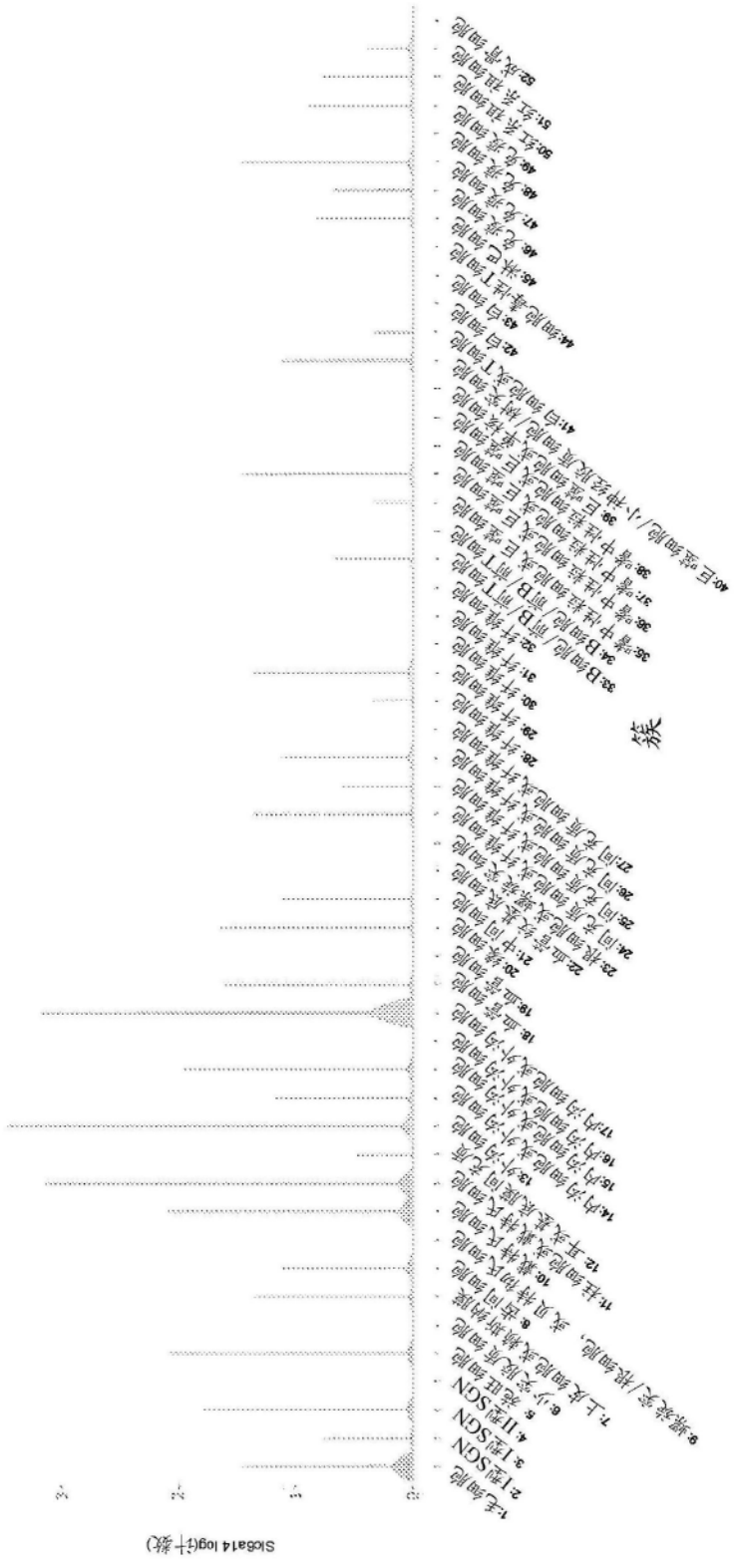


图1A

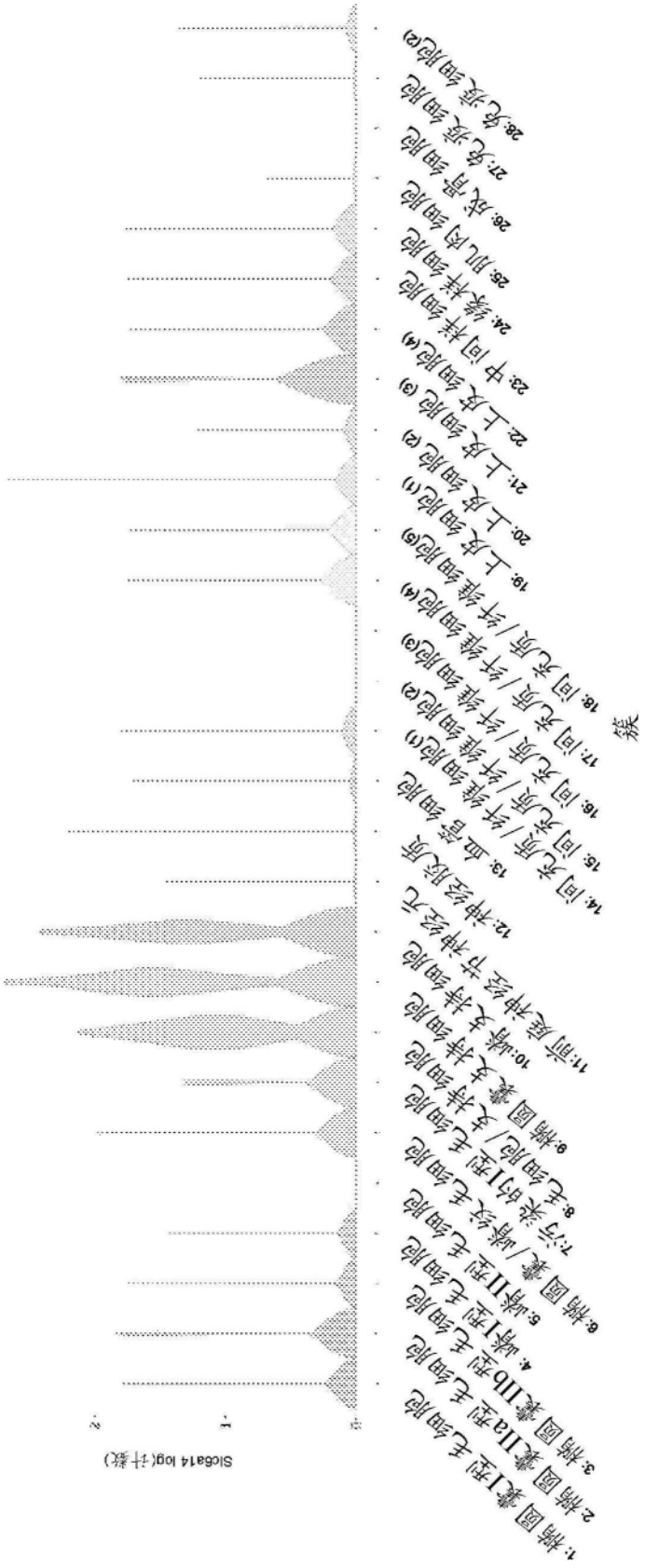

1: 椅圆囊I型毛细胞
2: 椅圆囊IIa型毛细胞
3: 椅圆囊IIb型毛细胞
4: 嵴I型毛细胞
5: 嵴II型毛细胞
6: 椅圆囊/嵴较毛细胞
7: 污染的I型毛细胞
8: 毛细胞/支持细胞
9: 椅圆囊支持细胞
10: 嵴支持细胞
11: 前庭神经节神经元
12: 神经胶质
13: 血管细胞
14: 间充质/软骨细胞(1)
15: 间充质/软骨细胞(2)
16: 间充质/软骨细胞(3)
17: 间充质/软骨细胞(4)
18: 间充质/软骨细胞(5)
19: 上皮细胞(1)
20: 上皮细胞(2)
21: 上皮细胞(3)
22: 上皮细胞(4)
23: 中间柱细胞
24: 终柱细胞
25: 肌内细胞
26: 成骨细胞
27: 免疫细胞
28: 免疫细胞(2)
簇
Sic6a14 log(计数)

图1B

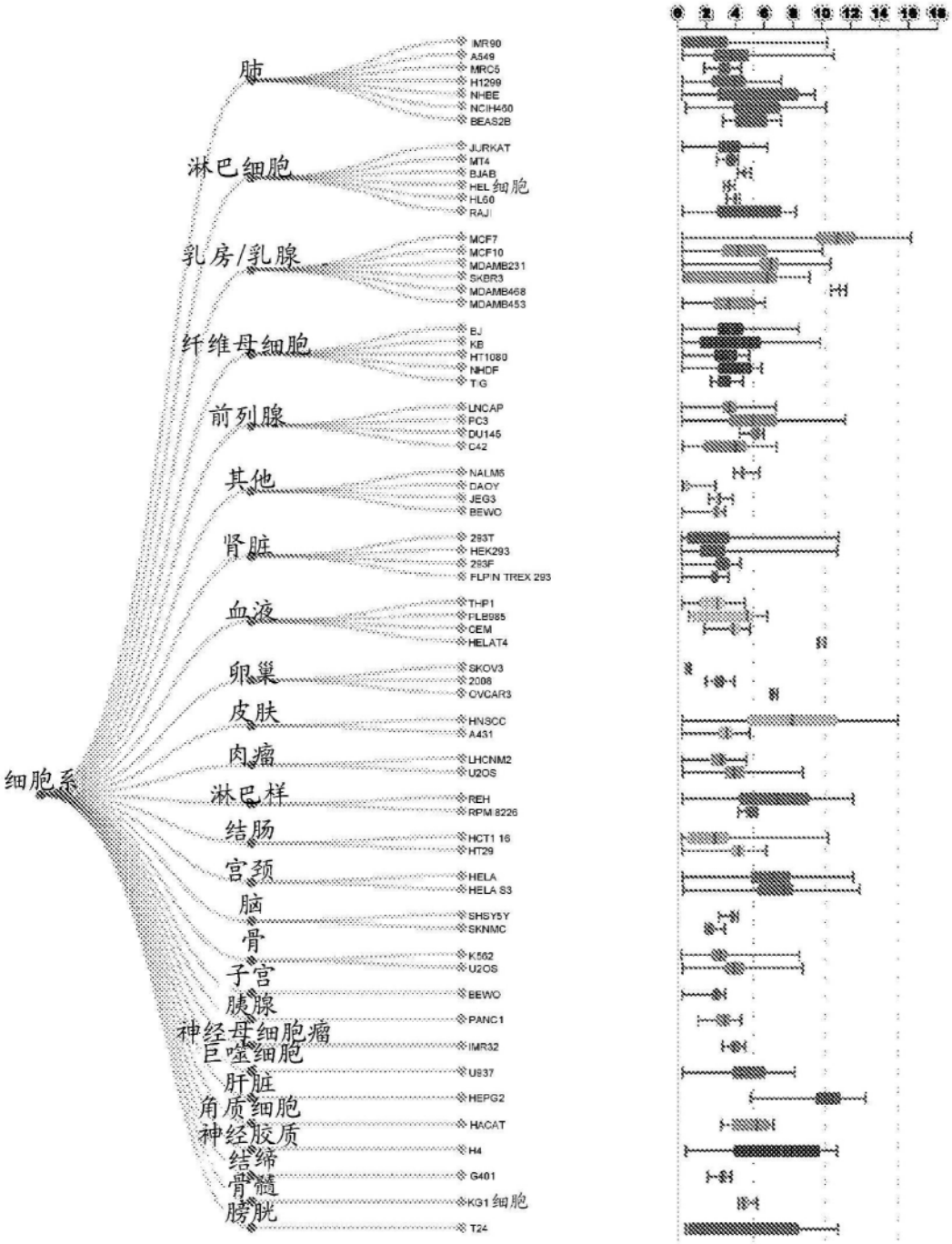

细胞系
肺
IMR90
A549
MRC5
H1299
NHBE
NCIH460
BEAS2B
淋巴细胞
JURKAT
MT4
BJAB
HEL细胞
HL60
RAJI
乳房/乳腺
MCF7
MCF10
MDAMB231
SKBR3
MDAMB468
MDAMB453
纤维母细胞
BJ
KB
HT1080
NHDF
TIG
前列腺
LNCAP
PC3
DU145
C42
其他
NALM6
DAOY
JEG3
BEWO
肾脏
293T
HEK293
293F
FLP'N TREX 293
血液
THP1
PLB985
CEM
HELAT4
卵巢
SKOV3
2008
OVCAR3
皮肤
HNSCC
A431
肉瘤
LHCNM2
U2OS
淋巴样
REH
RPMI 8226
结肠
HCT116
HT29
宫颈
HELA
HELA S3
脑
SHSY5Y
SKNMC
骨
K562
U2OS
子宫
BEWO
胰腺
PANC1
神经母细胞瘤
IMR32
巨噬细胞
U937
肝脏
HEPG2
角质细胞
HACAT
神经胶质
H4
结缔
G401
骨髓
KG1细胞
膀胱
T24
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18

图2

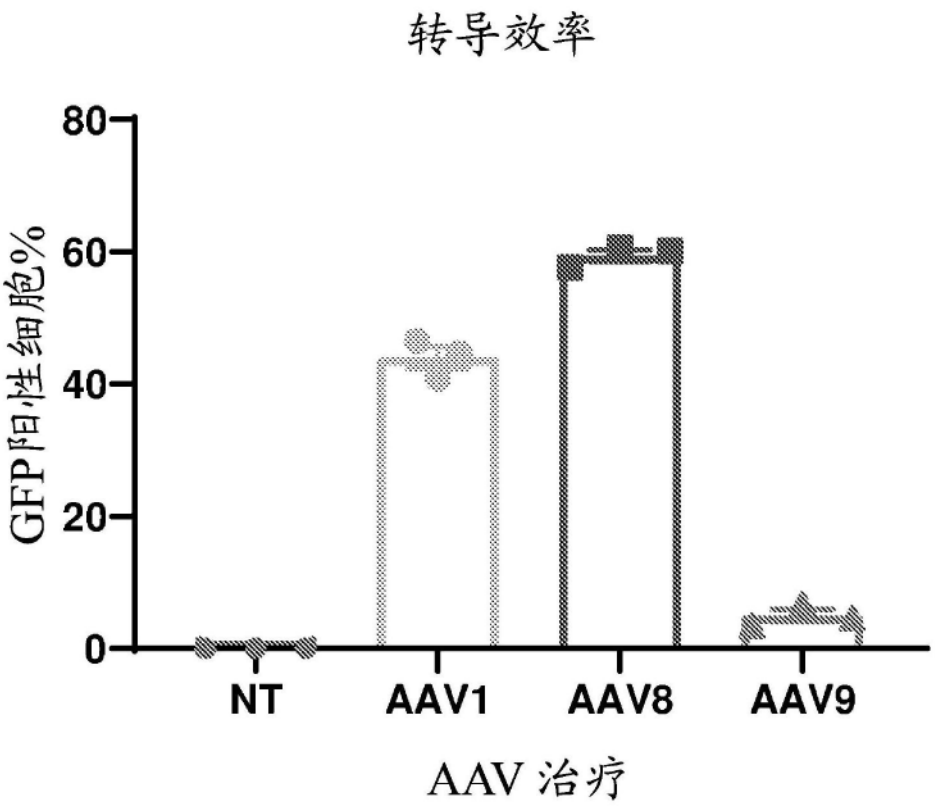


图3

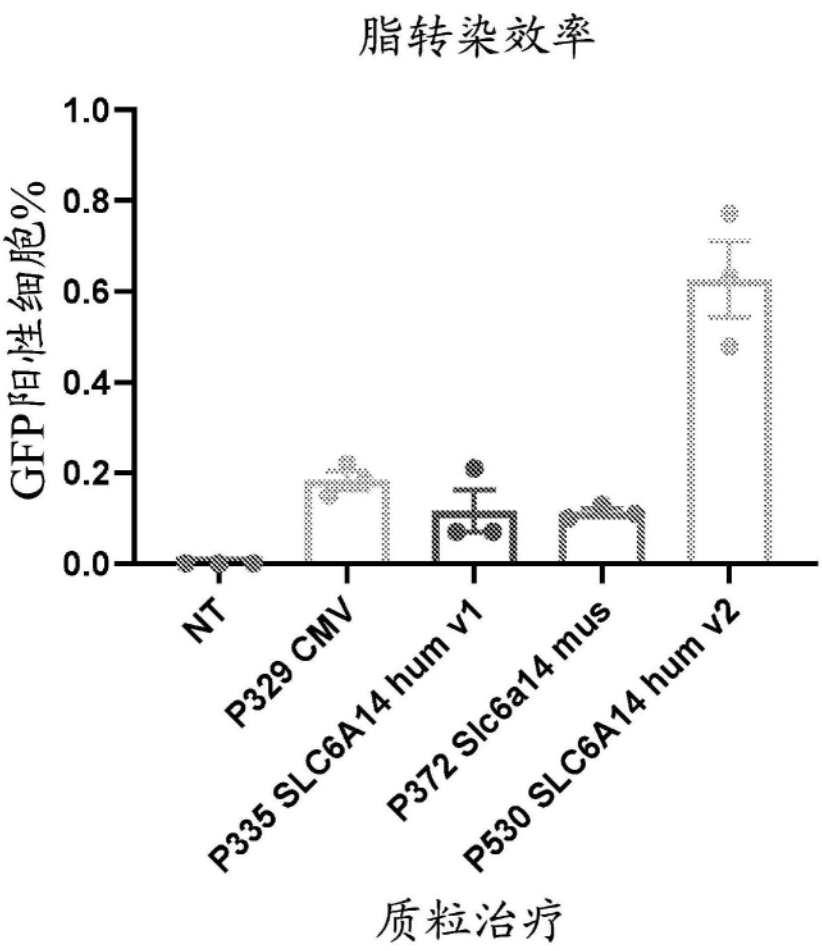

脂转染效率
GFP阳性细胞%
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
NT
P329 CMV
P335 SLC6A14 hum v1
P372 Slc6a14 mus
P530 SLC6A14 hum v2
质粒治疗

图4A

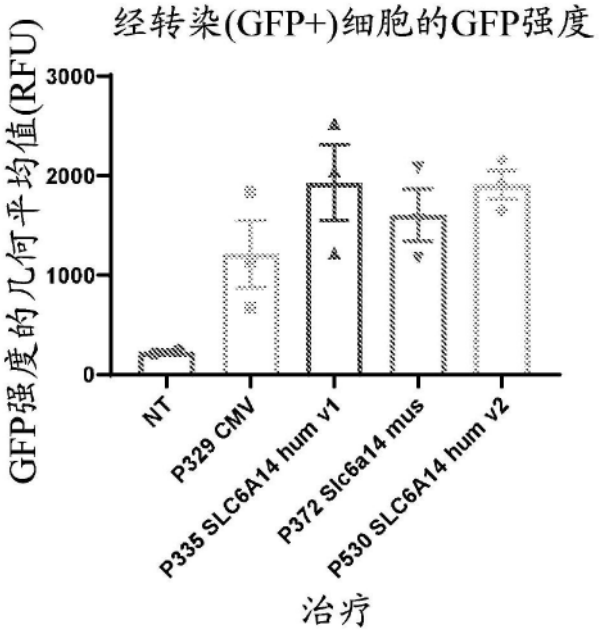

经转染(GFP+)细胞的GFP强度
GFP强度的几何平均值(RFU)
3000
2000
1000
0
NT
P329 CMV
P335 SLC6A14 hum v1
P372 Slc6a14 mus
P530 SLC6A14 hum v2
治疗

图4B

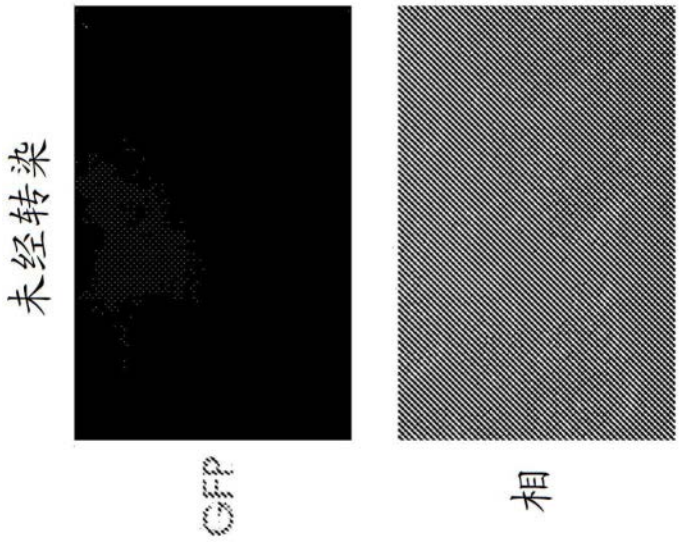


图5A

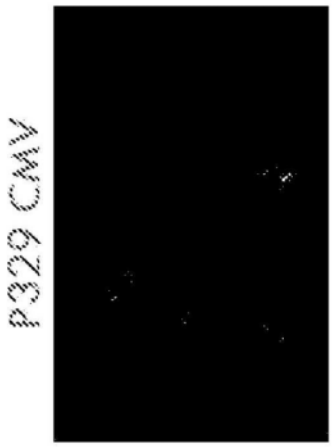


图5B

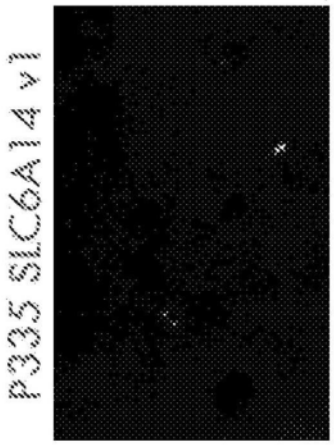


图5C



图5D

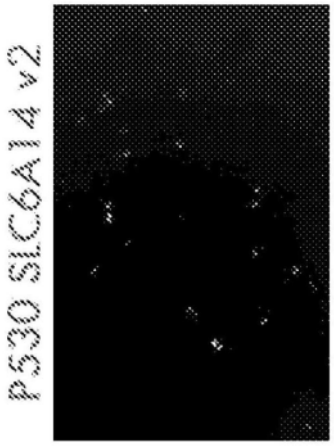


图5E

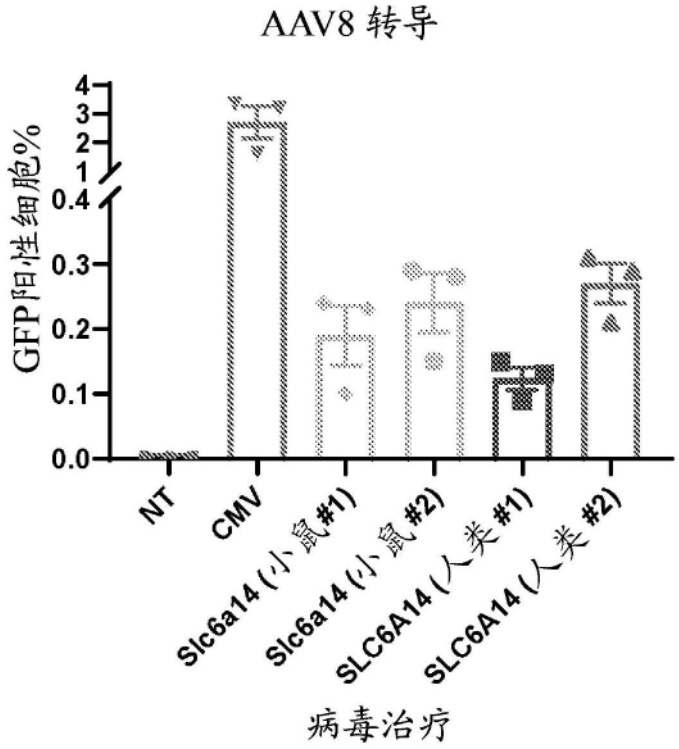

AAV8 转导
GFP阳性细胞%
4
3
2
1
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
NT
CMV
Slc6a14 (小鼠#1)
Slc6a14 (小鼠#2)
SLC6A14 (人类#1)
SLC6A14 (人类#2)
病毒治疗

图6

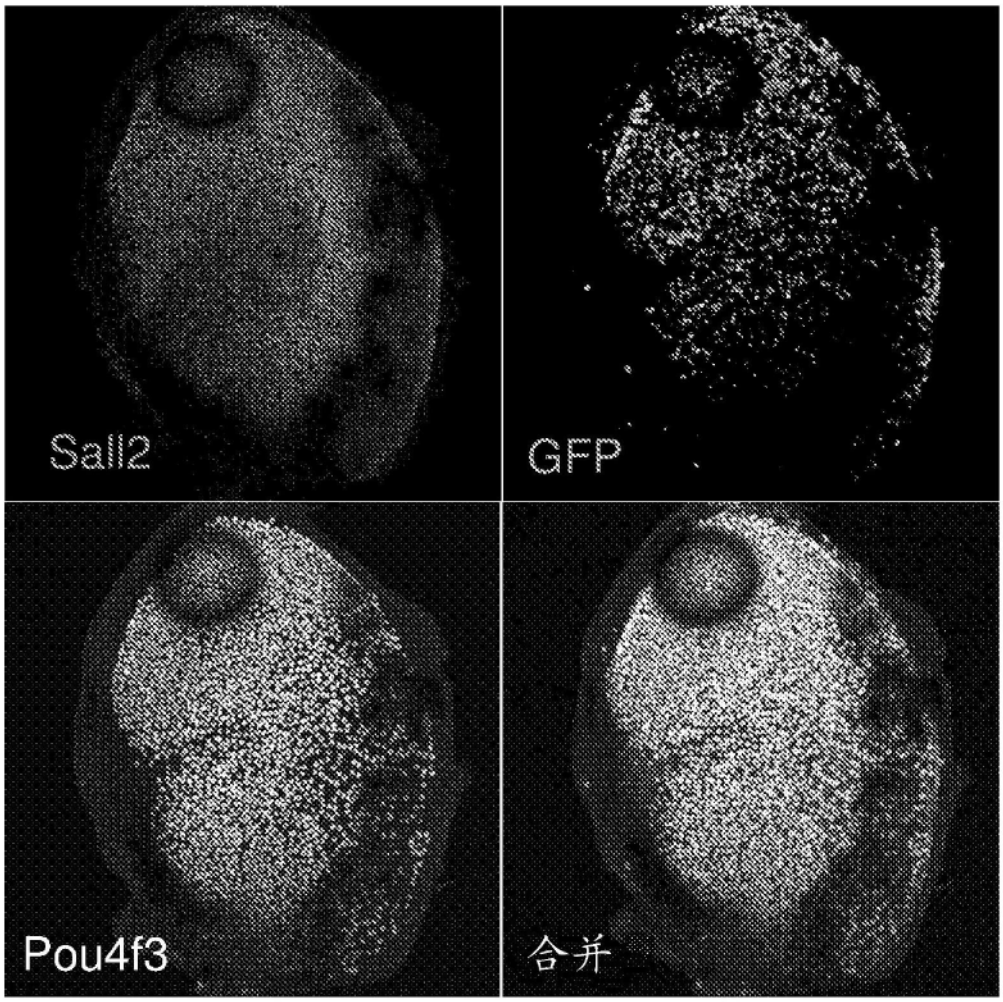


图7A

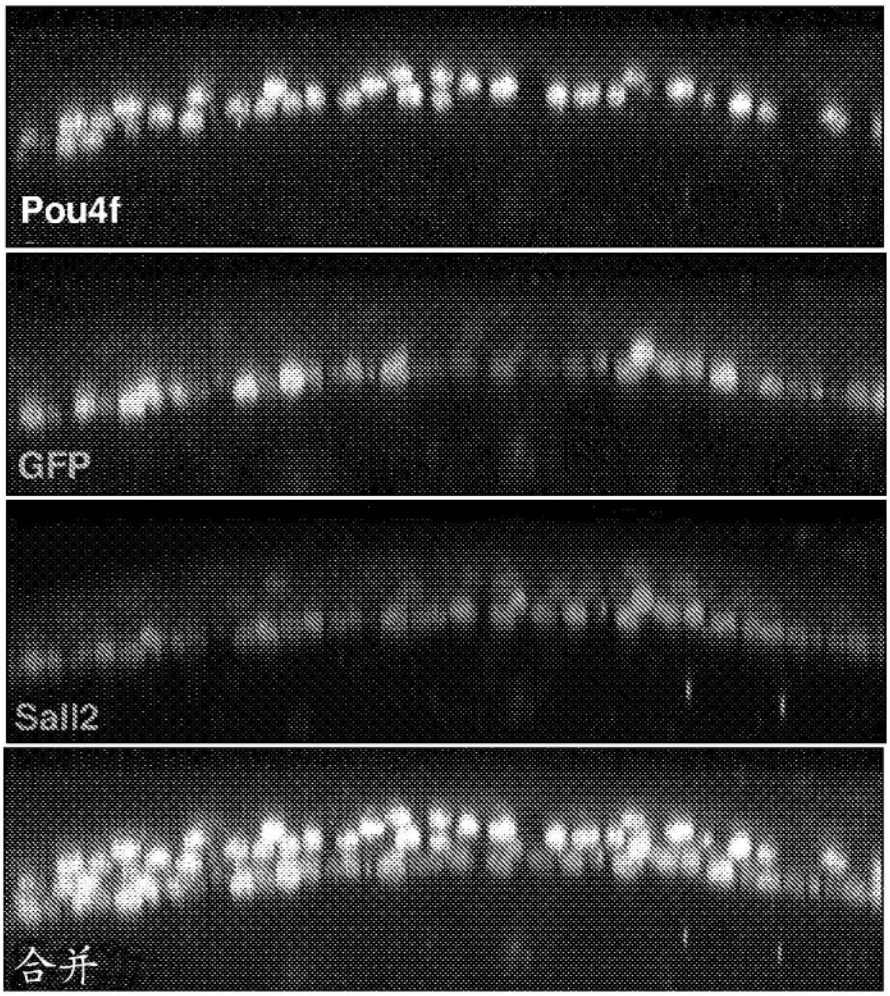


图7B

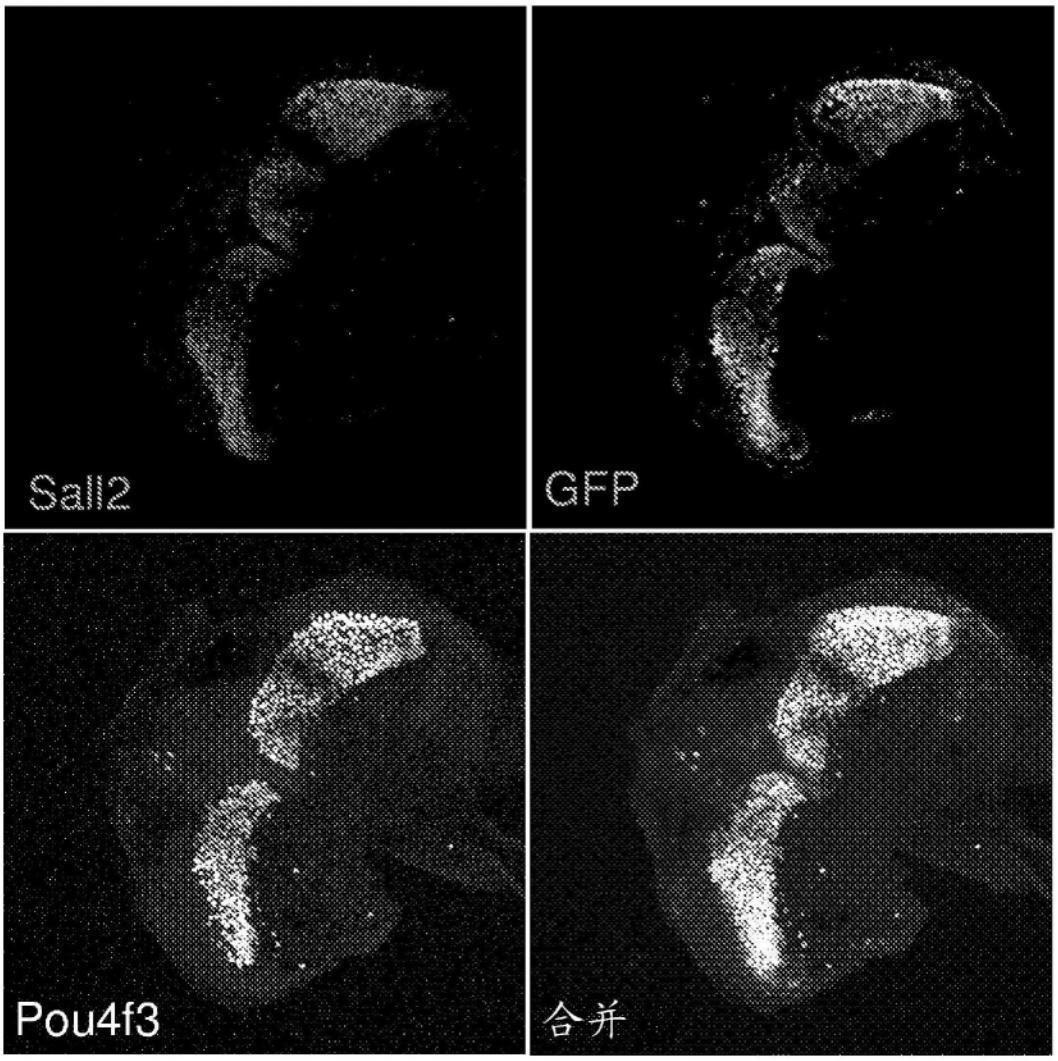


图7C

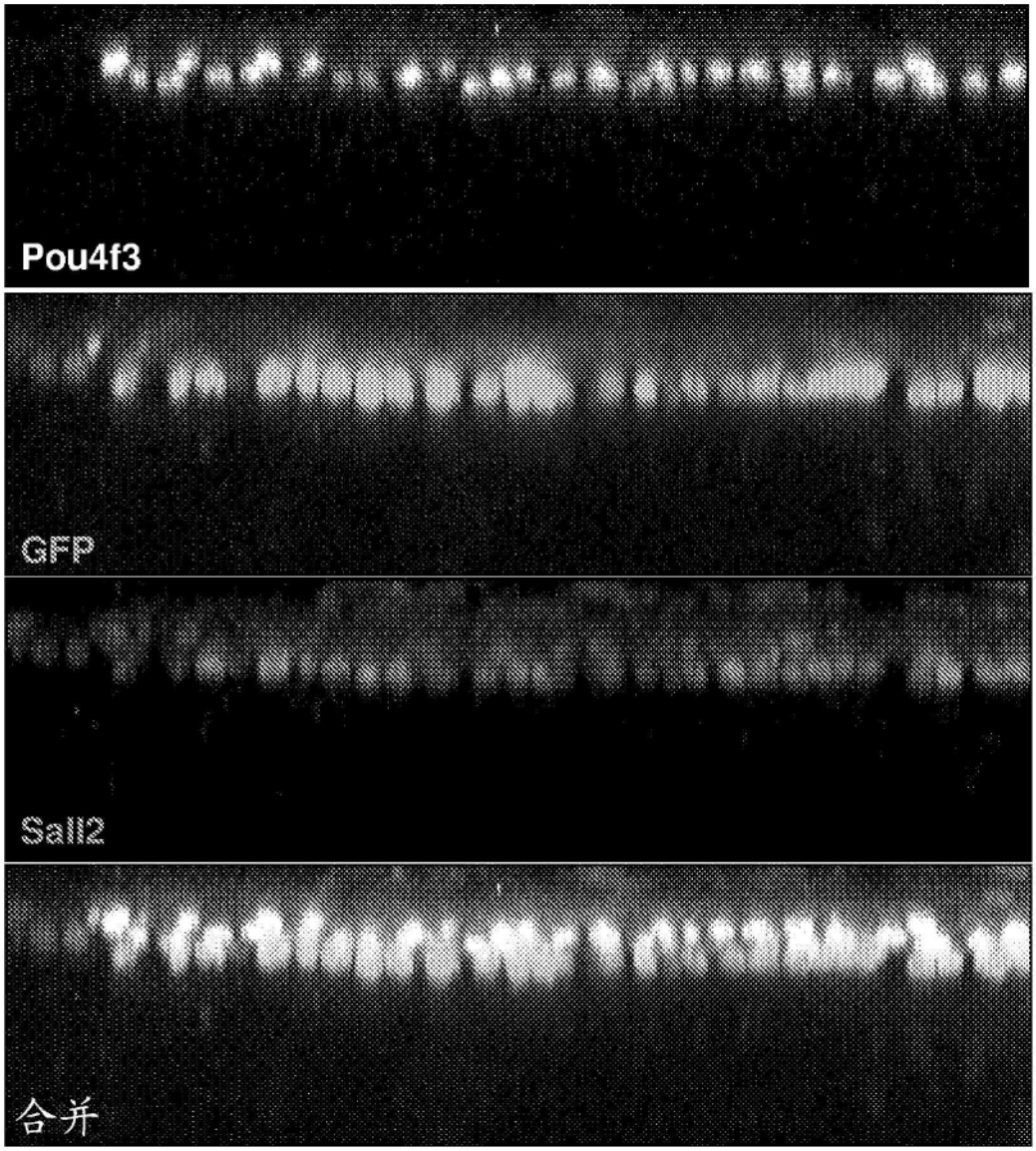


图7D

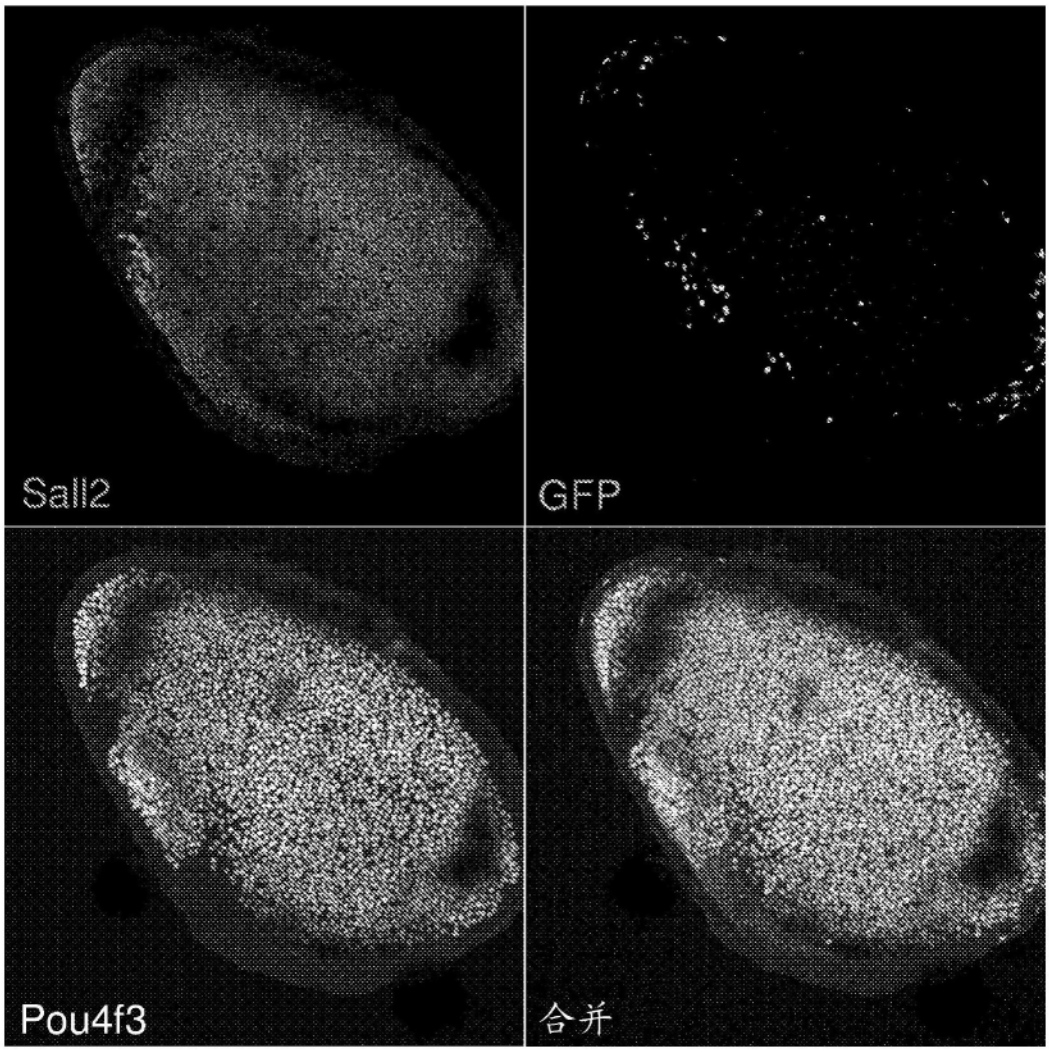


图8A

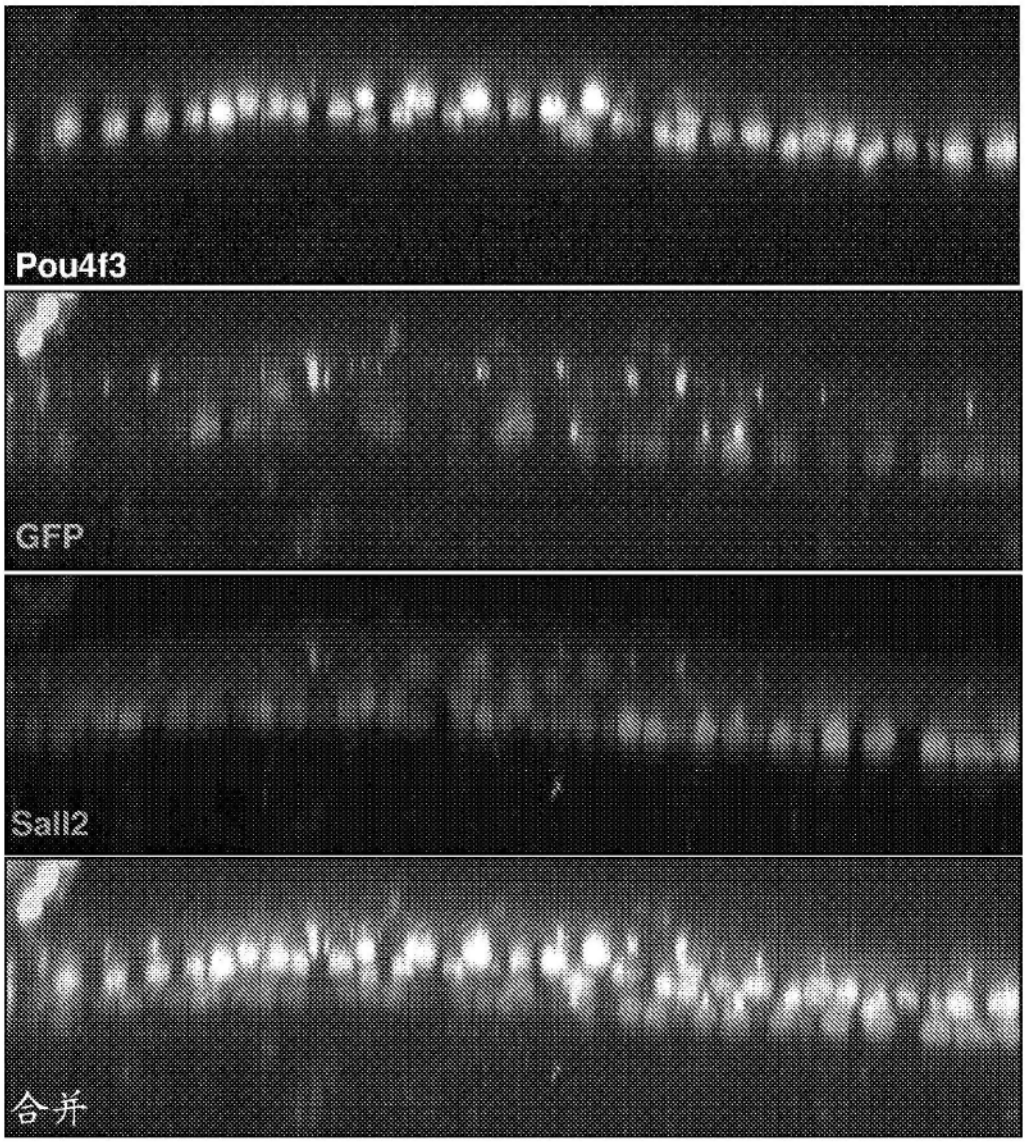


图8B

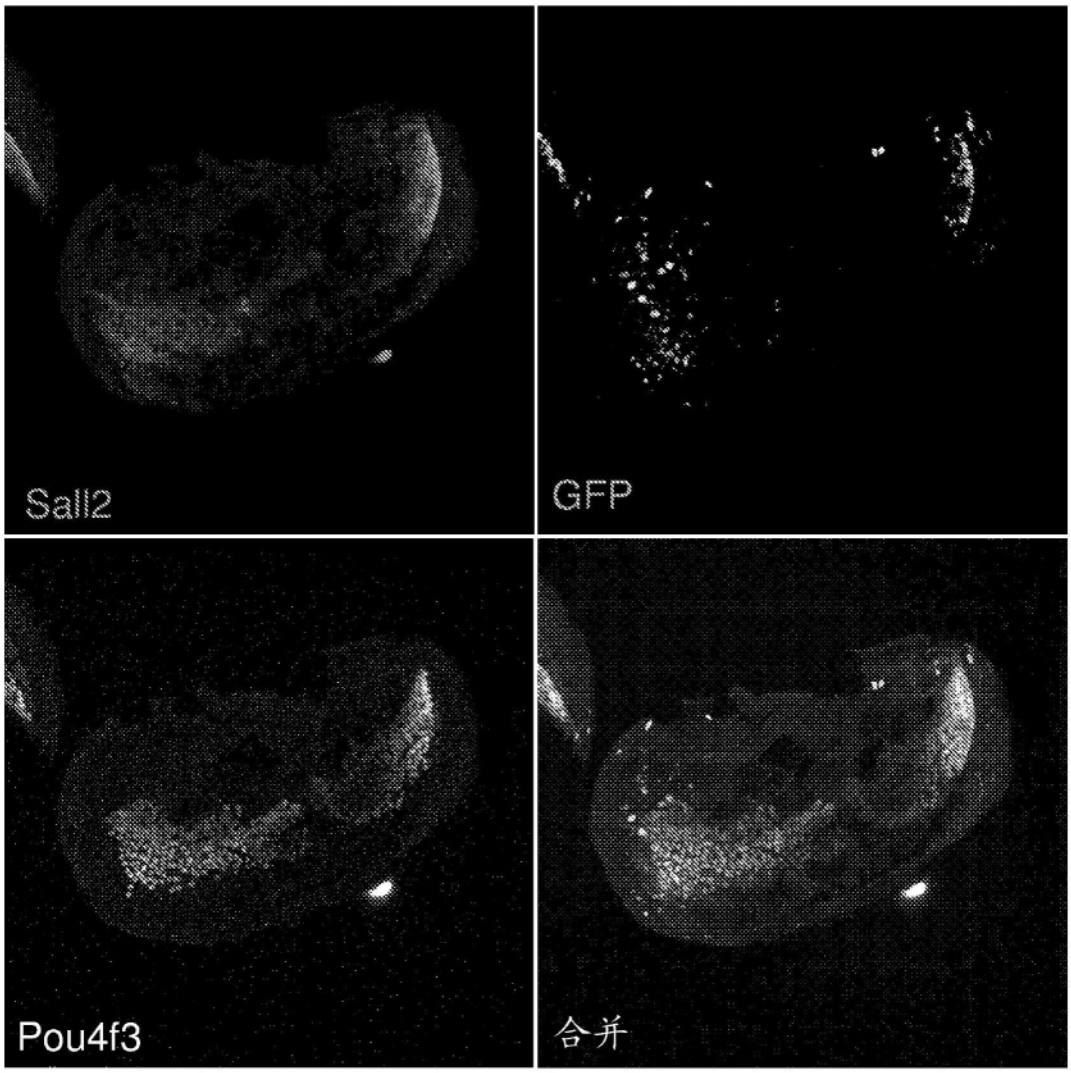


图8C

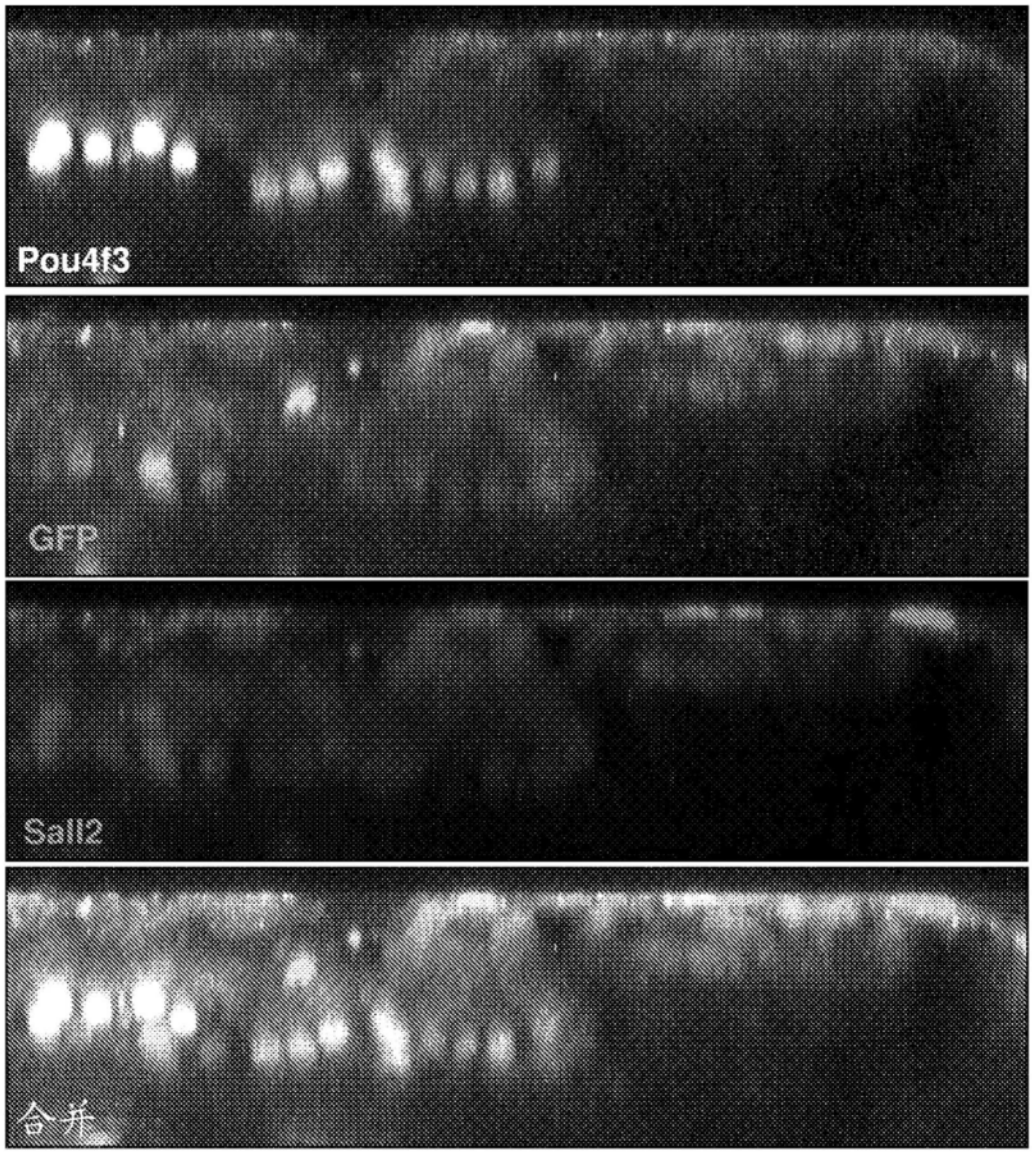


图8D

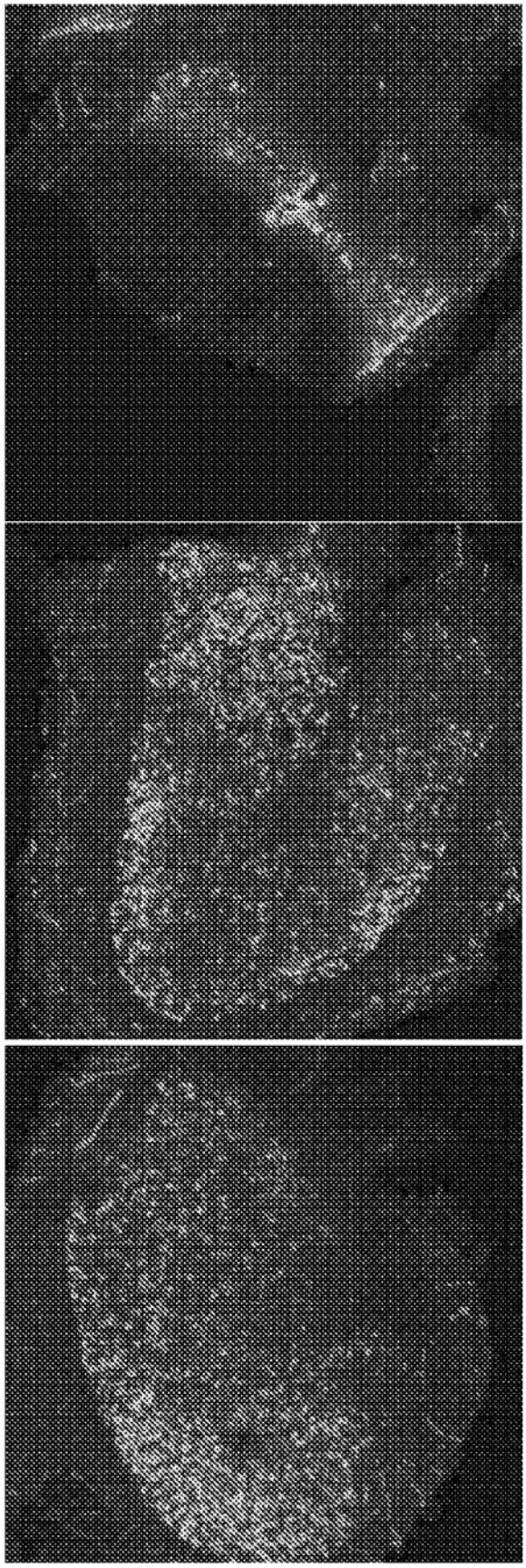


图 9C

图 9B

图 9A

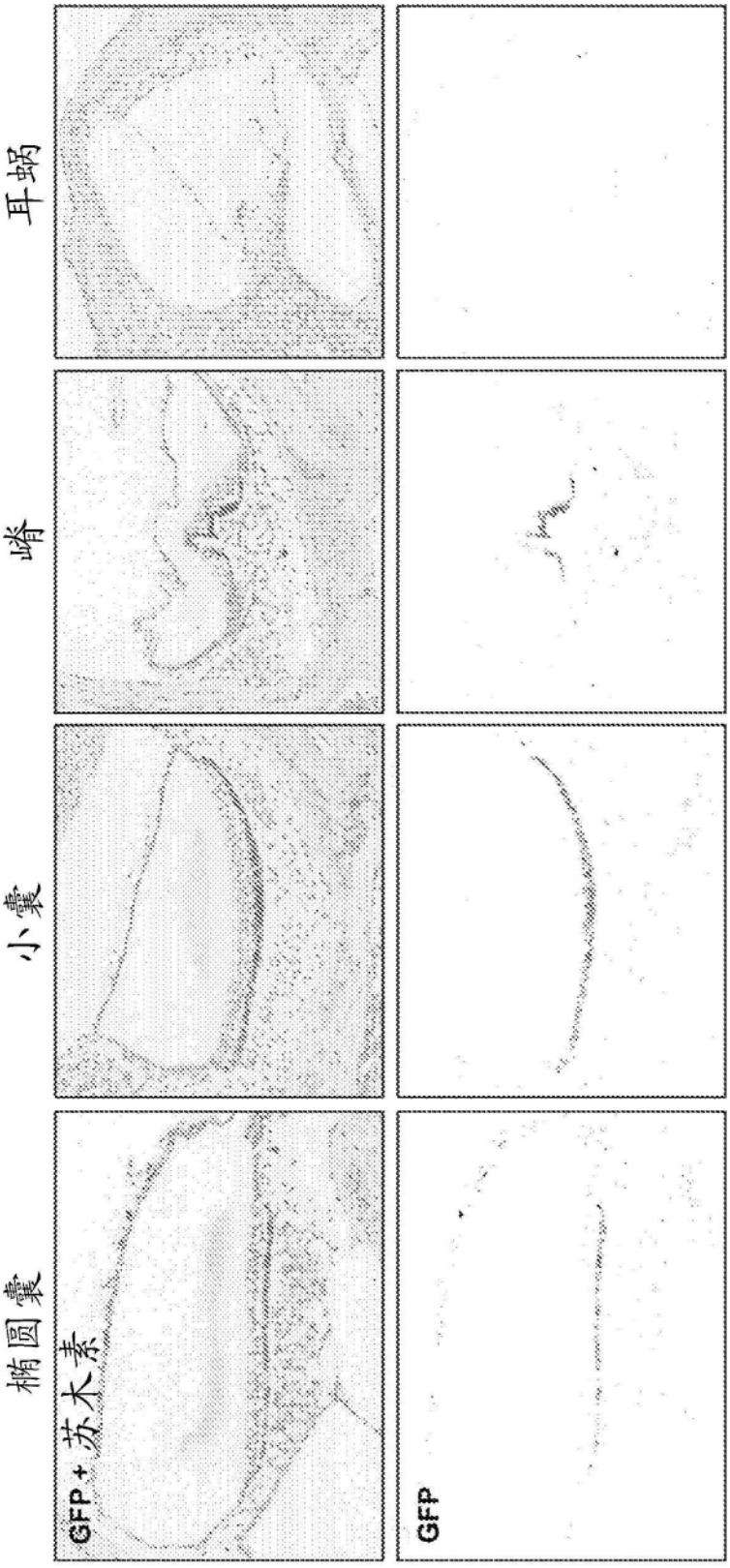


图10

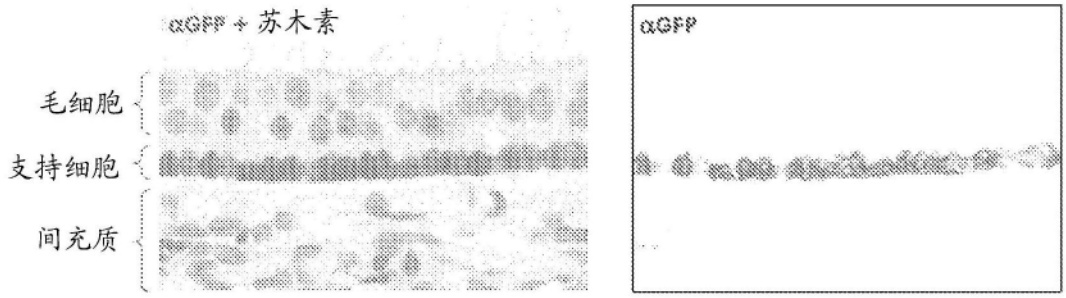


图11A

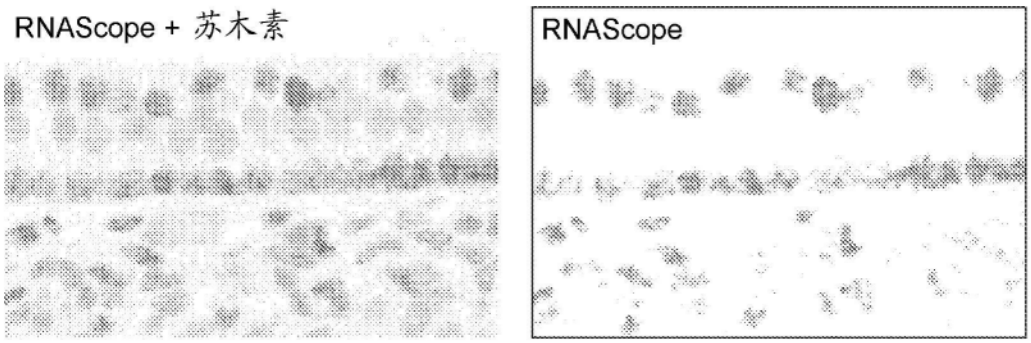


图11B

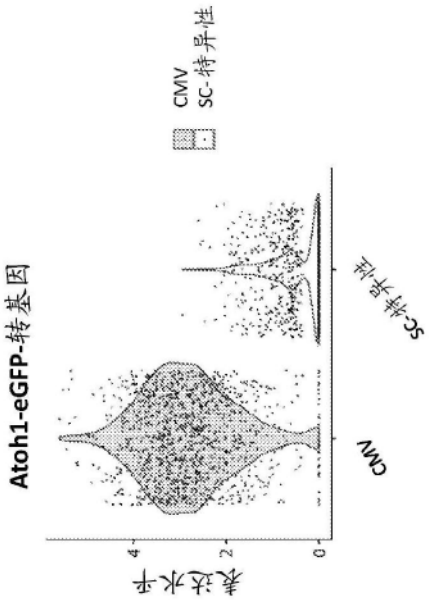


图12A

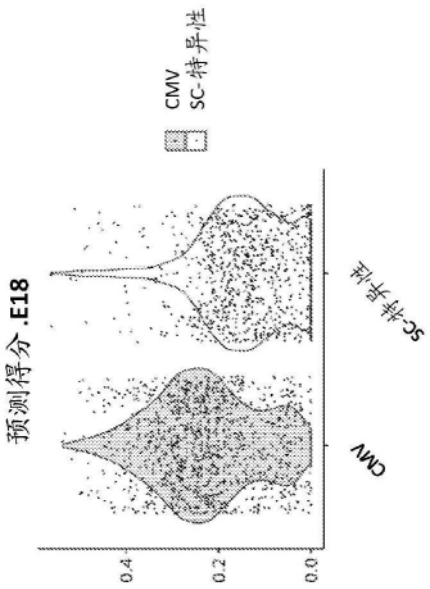

CMV
SC-特异性
预测得分.E18
0.4
0.2
0.0
CMV
SC-特异性

图12B

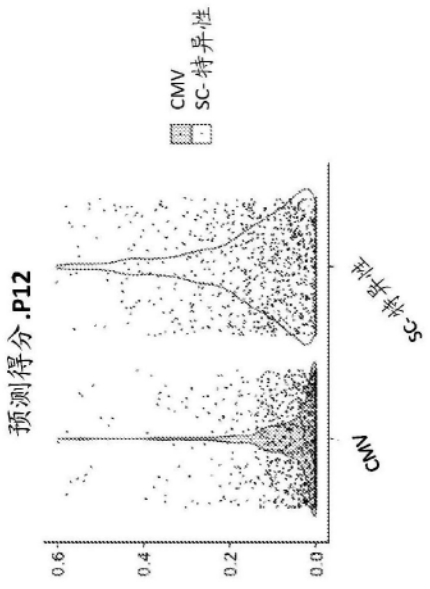

CMV
SC-特异性
预测得分.P12
0.6
0.4
0.2
0.0
CMV
SC-特异性

图12C

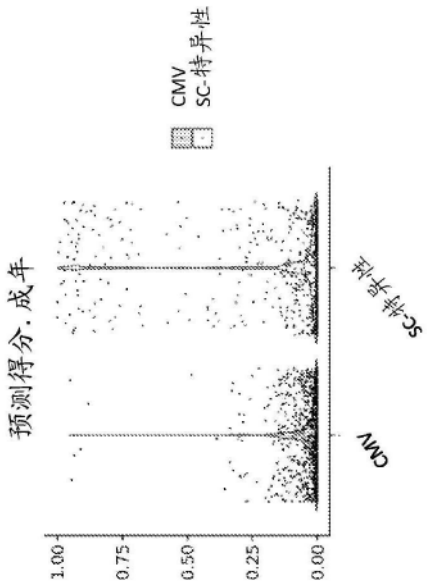

CMV
SC-特异性
预测得分：成年
SC-特异性
CMV
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00

图12D

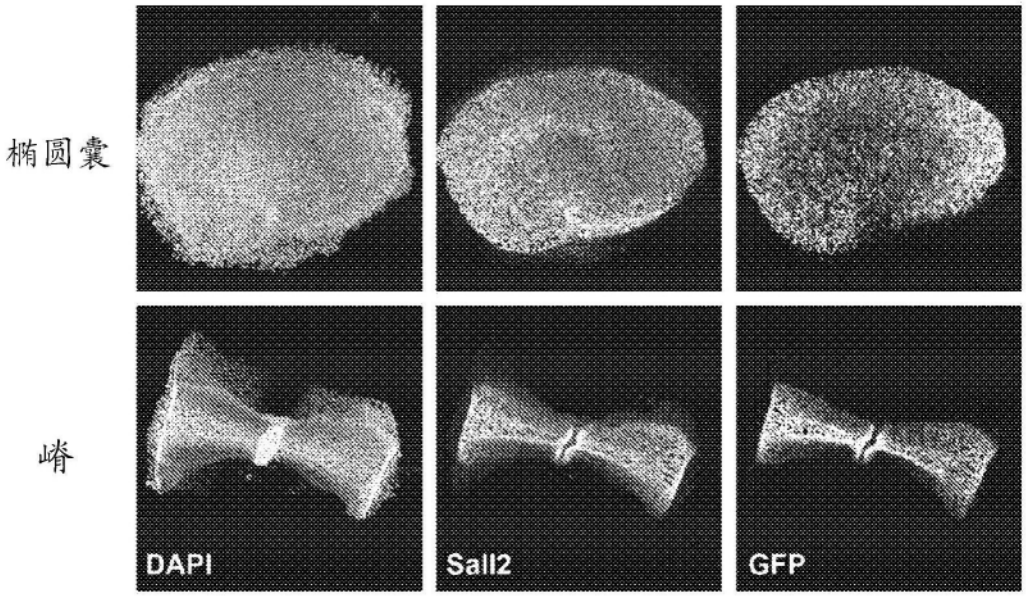

椭圆囊
嵴
DAPI
Sall2
GFP

图13A

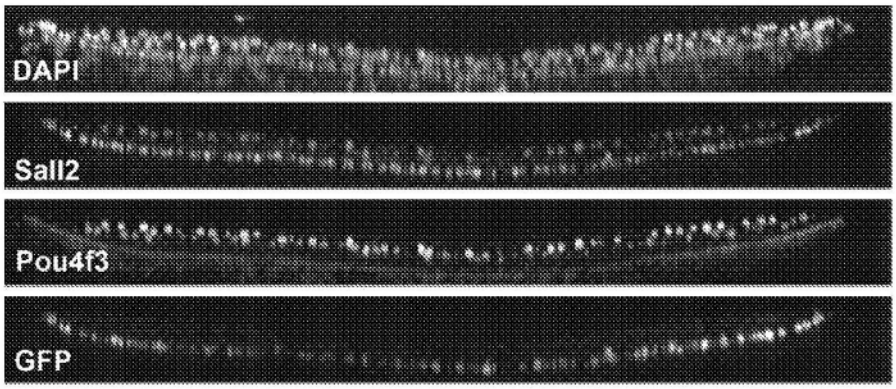


图13B

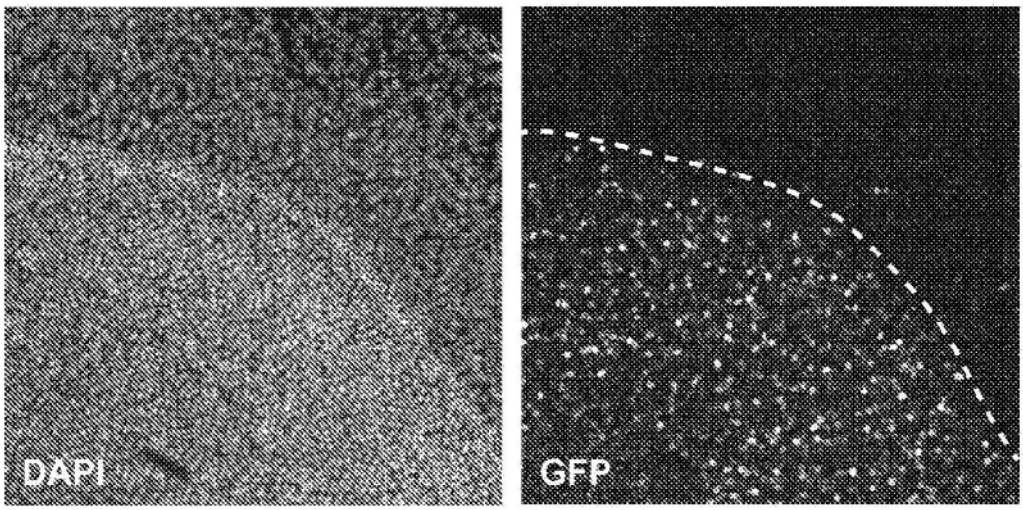


图14A

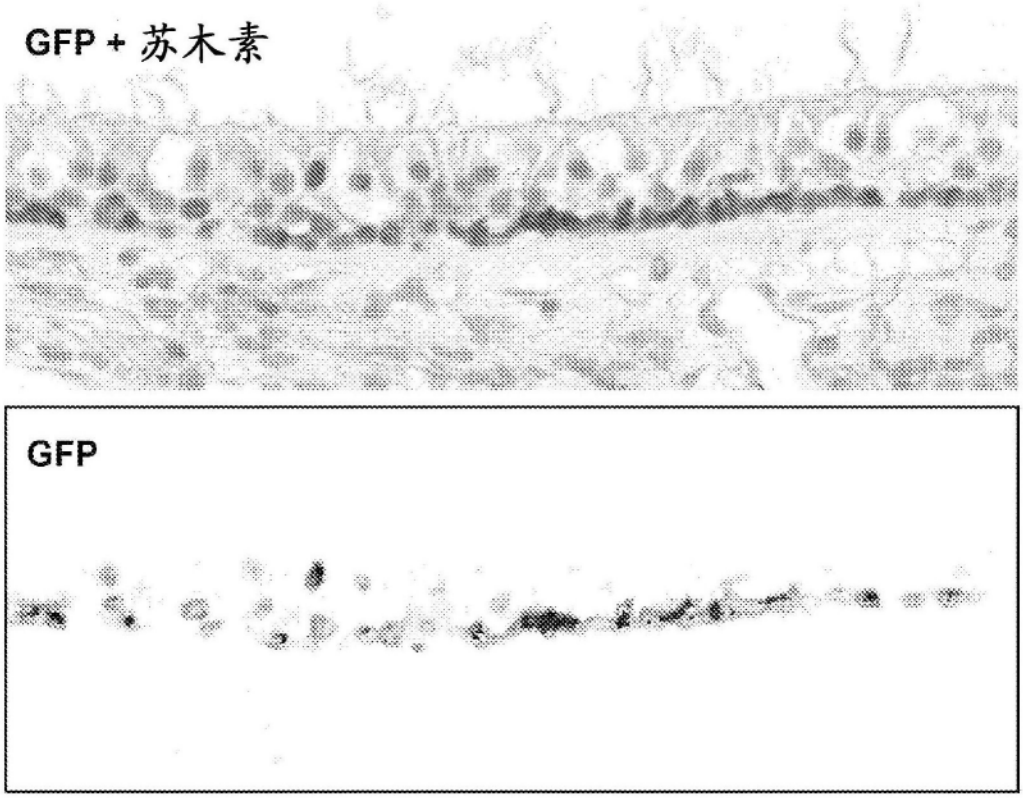


图14B

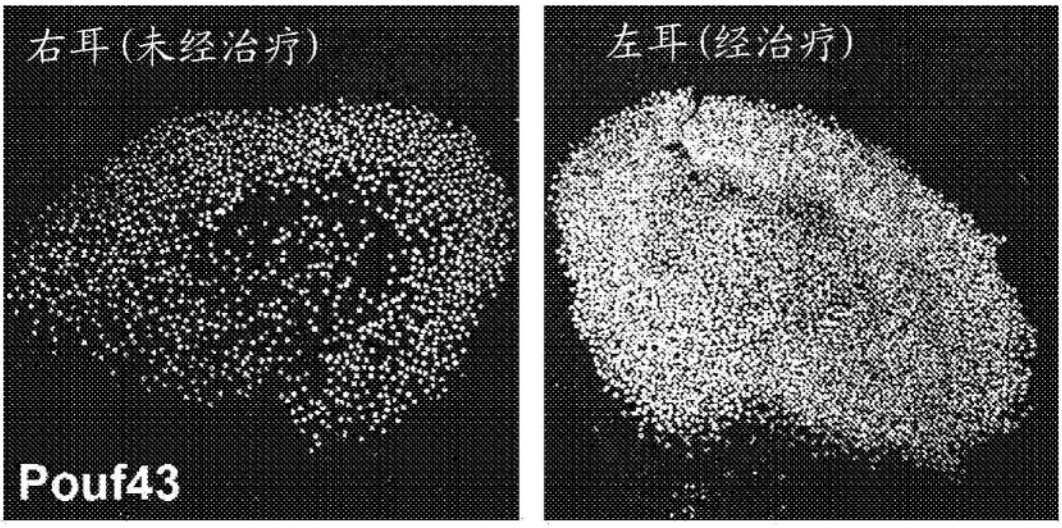


图15A

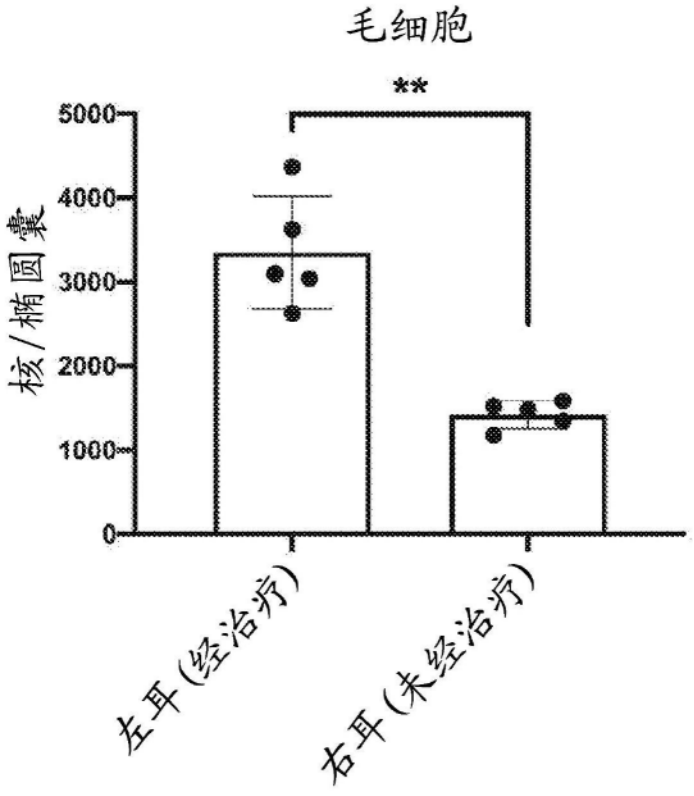


图15B

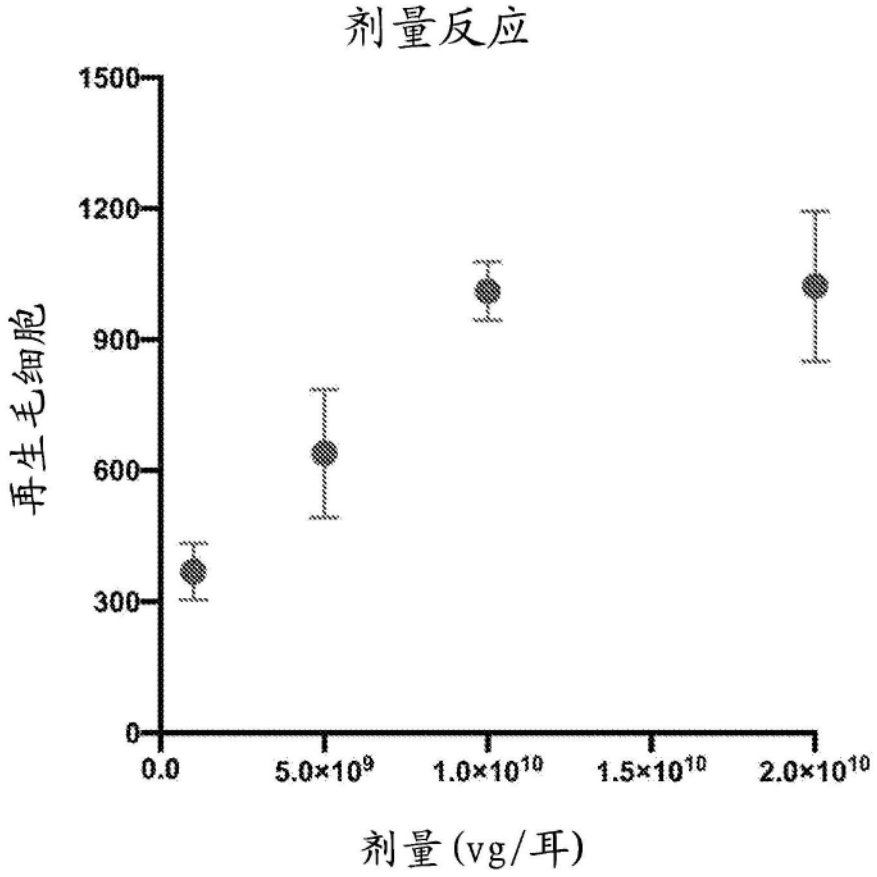

剂量反应
1500
1200
900
600
300
0
再生毛细胞
0.0
5.0×10^9
1.0×10^10
1.5×10^10
2.0×10^10
剂量(vg/耳)

图16

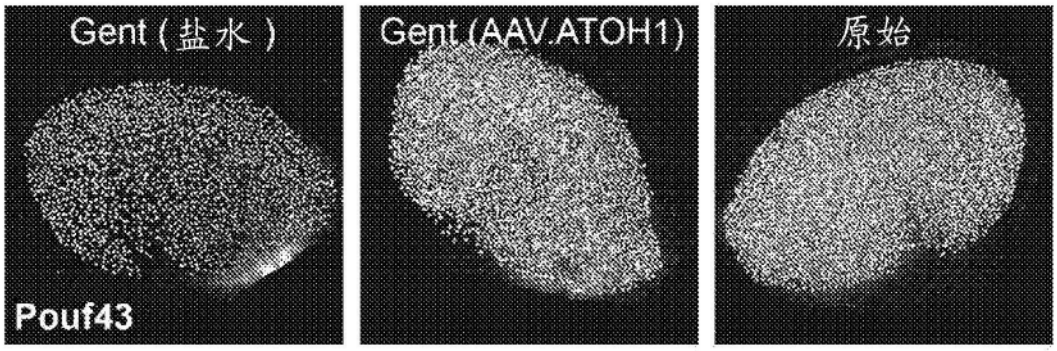

Gent(盐水)
Pouf43
Gent(AAV.ATOH1)
原始

图17A

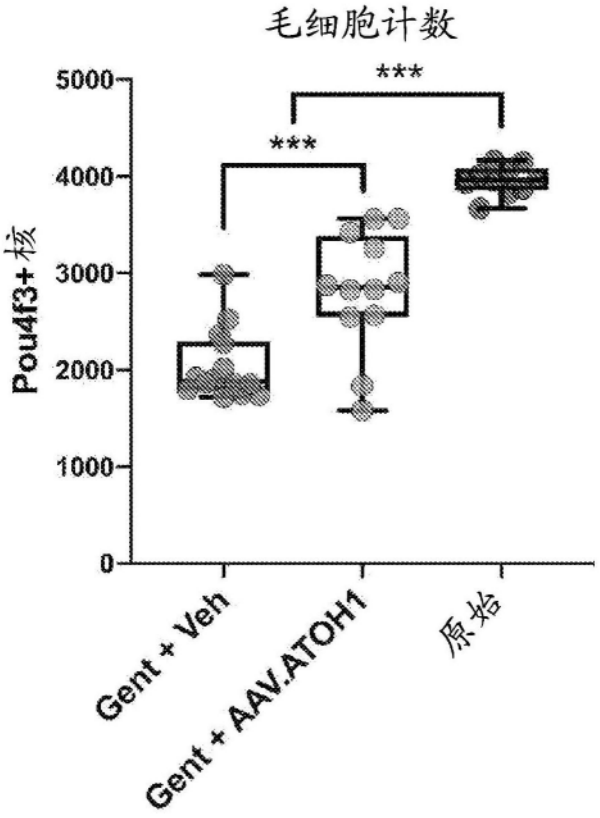

毛细胞计数
***
***
5000
4000
3000
2000
1000
0
Pou4f3+核
Gent + Veh
Gent + AAV.ATOH1
原始

图17B

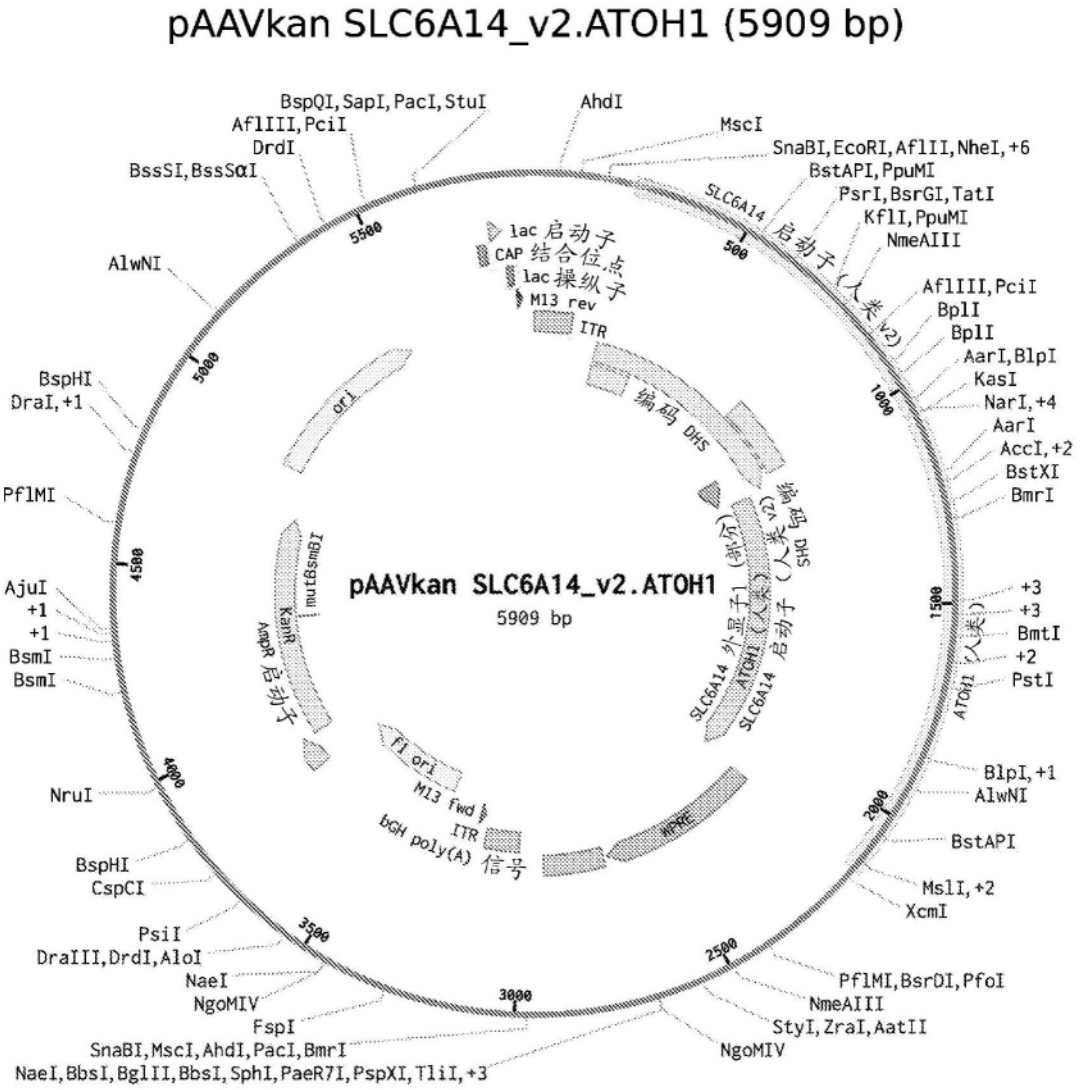

pAAVkan SLC6A14_v2.ATOH1 (5909 bp)
pAAVkan SLC6A14_v2.ATOH1
5909 bp
BspQI,SapI,PacI,StuI
AflIII,PciI
DrdI
BssSI,BssSαI
AhdI
MscI
SnaBI,EcoRI,AflII,NheI,+6
BstAPI,PpuMI
PsrI,BsrGI,TatI
KflI,PpuMI
NmeAIII
AflIII,PciI
BplI
BplI
AarI,BlpI
KasI
NarI,+4
AarI
AccI,+2
BstXI
BmrI
+3
+3
BmtI
+2
PstI
BlpI,+1
AlwNI
BstAPI
MslI,+2
XcmI
PflMI,BsrDI,PfoI
NmeAIII
StyI,ZraI,AatII
NgoMIV
SnaBI,MscI,AhdI,PacI,BmrI
NaeI,BbsI,BglII,BbsI,SphI,PaeR7I,PspXI,TliI,+3
FspI
NgoMIV
NaeI
DraIII,DrdI,AloI
PsiI
CspCI
BspHI
NruI
AjuI
+1
+1
BsmI
BsmI
PflMI
DraI,+1
BspHI
AlwNI
lac 启动子
CAP 结合位点
lac 操纵子
M13 rev
ITR
编码 DHS
SLC6A14 启动子（人类 v2）
SLC6A14 外显子1（部分）（人类 v2）
ATOH1（人类）
SLC6A14 启动子（人类 v2）
编码 DHS
WPRE
bGH poly(A) 信号
ITR
M13 fwd
f1 ori
AmpR 启动子
KanR
mutBsmBI
ori
5500
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500
5000

图18

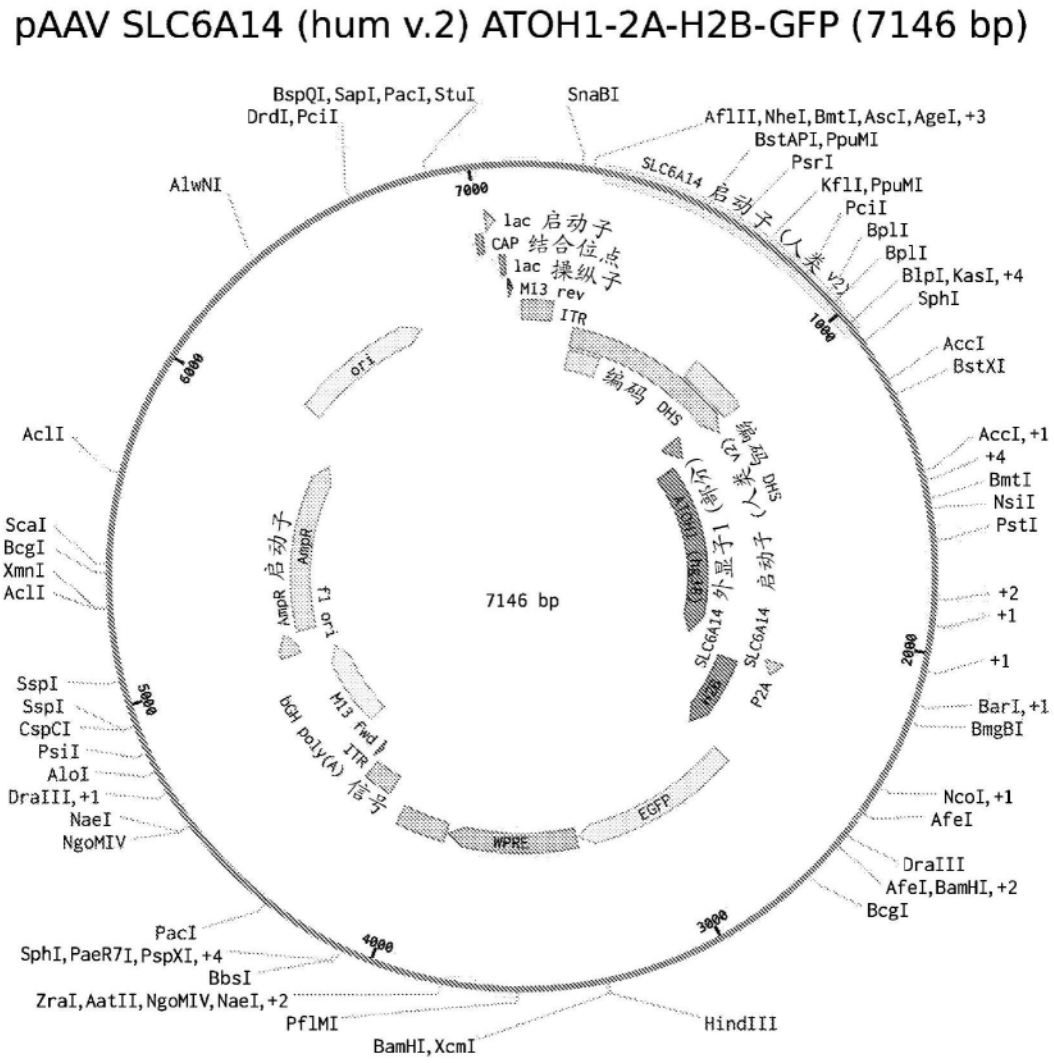

pAAV SLC6A14 (hum v.2) ATOH1-2A-H2B-GFP (7146 bp)
7146 bp
lac 启动子
CAP 结合位点
lac 操纵子
MI3 rev
ITR
ori
编码 DHS
SLC6A14 启动子 (人类 v2)
ATOH1 (部分) 外显子1
SLC6A14 外显子1 (人类) 编码 DHS
SLC6A14 启动子
P2A
H2B
EGFP
WPRE
bGH poly(A) 信号
ITR
M13 fwd
f1 ori
AmpR
AmpR 启动子
BspQI, SapI, PacI, StuI
DrdI, PciI
SnaBI
AflII, NheI, BmtI, AscI, AgeI, +3
BstAPI, PpuMI
PsrI
KflI, PpuMI
PciI
BplI
BplI
BlpI, KasI, +4
SphI
AccI
BstXI
AccI, +1
+4
BmtI
NsiI
PstI
+2
+1
+1
BarI, +1
BmgBI
NcoI, +1
AfeI
DraIII
AfeI, BamHI, +2
BcgI
HindIII
BamHI, XcmI
PflMI
ZraI, AatII, NgoMIV, NaeI, +2
BbsI
SphI, PaeR7I, PspXI, +4
PacI
DraIII, +1
NaeI
NgoMIV
AloI
PsiI
CspCI
SspI
SspI
AclI
ScaI
BcgI
XmnI
AclI
AlwNI
7000
1000
2000
3000
4000
5000
6000

图19

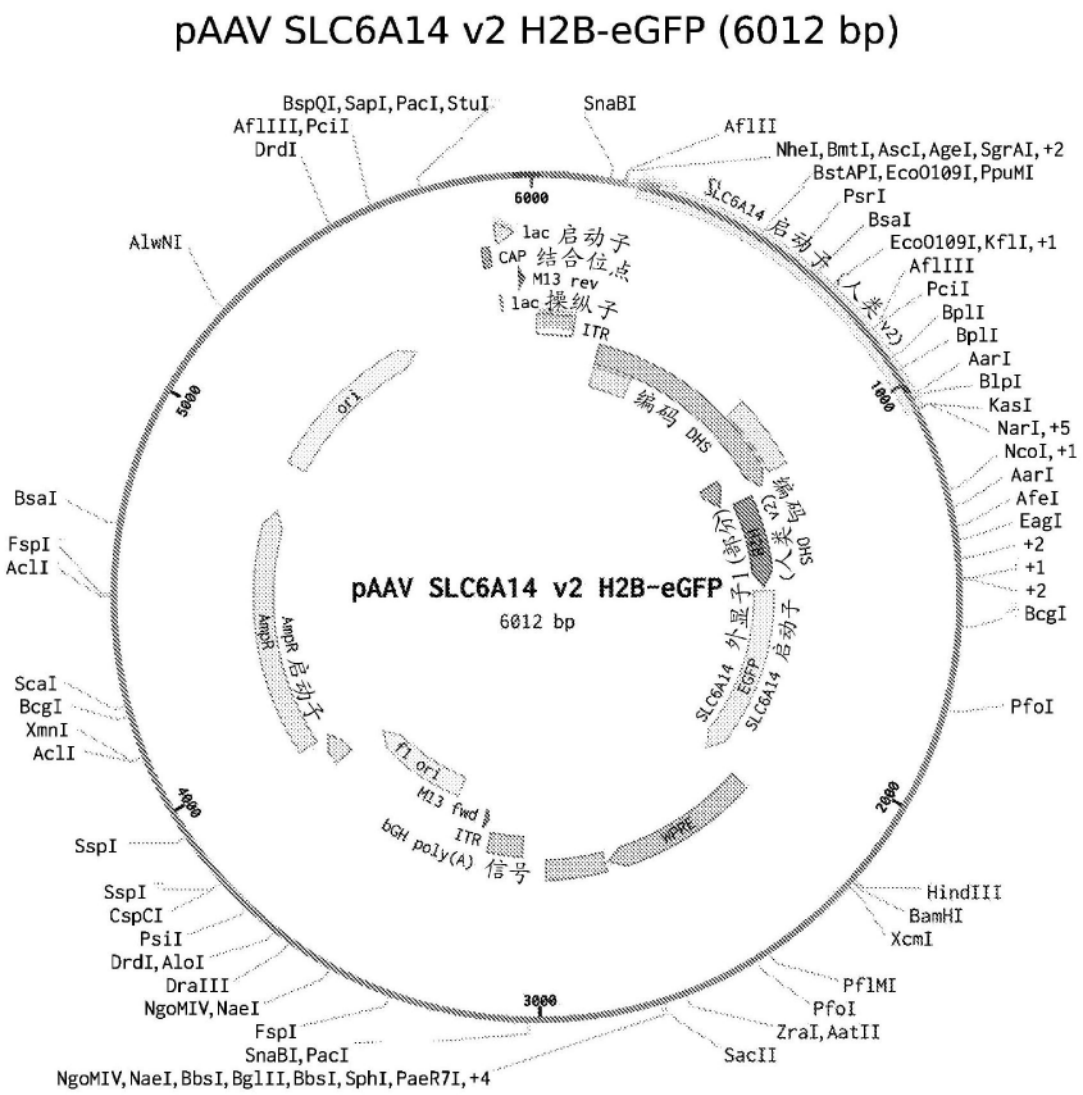

pAAV SLC6A14 v2 H2B-eGFP (6012 bp)
pAAV SLC6A14 v2 H2B-eGFP
6012 bp
BspQI,SapI,PacI,StuI
AflIII,PciI
DrdI
SnaBI
AflII
NheI,BmtI,AscI,AgeI,SgrAI,+2
BstAPI,Eco0109I,PpuMI
PsrI
BsaI
Eco0109I,KflI,+1
AflIII
PciI
BplI
BplI
AarI
BlpI
KasI
NarI,+5
NcoI,+1
AarI
AfeI
EagI
+2
+1
+2
BcgI
PfoI
HindIII
BamHI
XcmI
PflMI
PfoI
ZraI,AatII
SacII
NgoMIV,NaeI,BbsI,BglII,BbsI,SphI,PaeR7I,+4
SnaBI,PacI
FspI
NgoMIV,NaeI
DraIII
DrdI,AloI
PsiI
CspCI
SspI
SspI
ScaI
BcgI
XmnI
AclI
FspI
AclI
BsaI
AlwNI
6000
1000
2000
3000
4000
5000
lac 启动子
CAP 结合位点
M13 rev
lac 操纵子
ITR
ori
编码 DHS
编码 DHS (人类 v2)
SLC6A14 启动子 (人类 v2)
SLC6A14 外显子1 (5'UTR)
SLC6A14 外显子1 (5'UTR)
EGFP
SLC6A14 启动子
WPRE
bGH poly(A) 信号
ITR
M13 fwd
f1 ori
AmpR 启动子
AmpR

图20

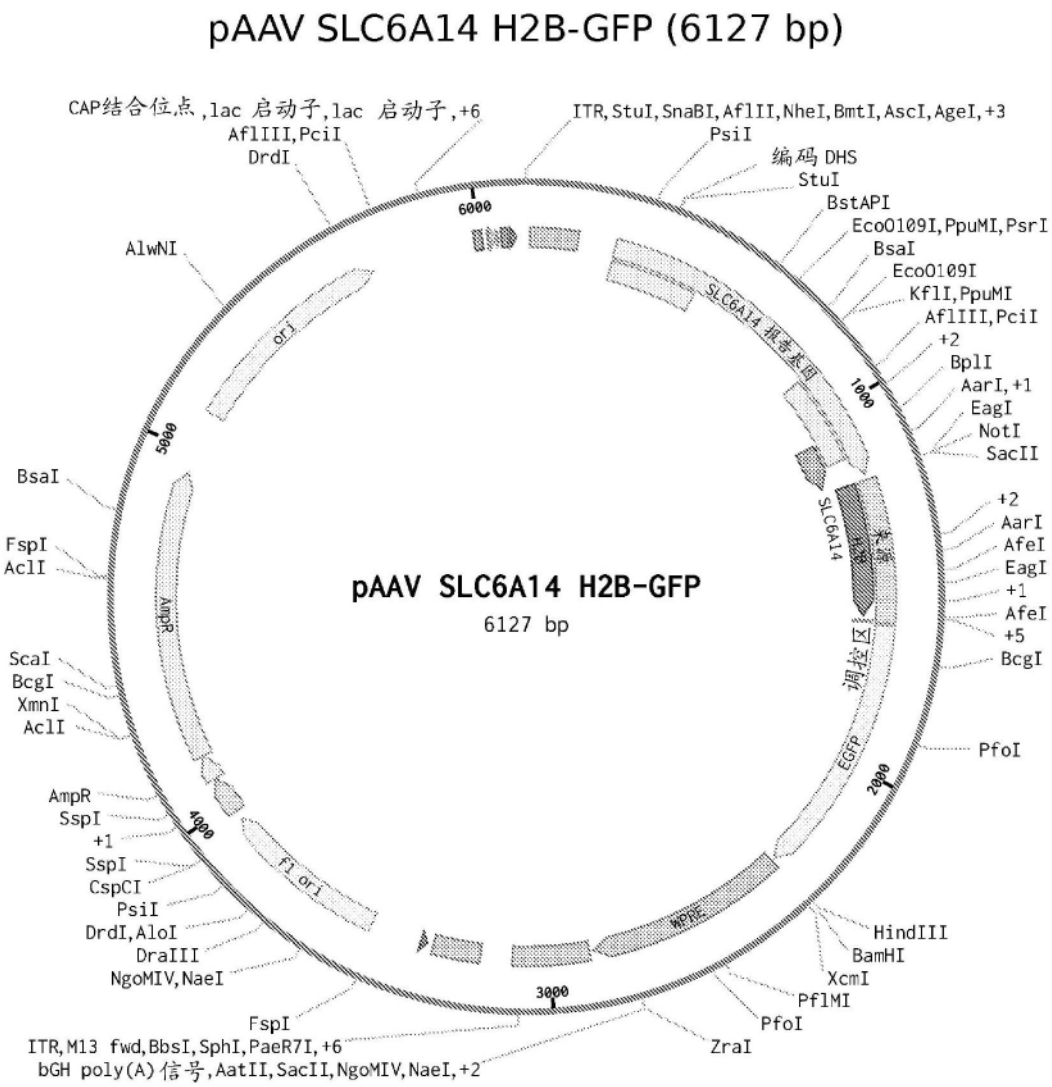

pAAV SLC6A14 H2B-GFP (6127 bp)
pAAV SLC6A14 H2B-GFP
6127 bp
CAP结合位点,lac 启动子,lac 启动子,+6
AflIII,PciI
DrdI
ITR,StuI,SnaBI,AflII,NheI,BmtI,AscI,AgeI,+3
PsiI
编码 DHS
StuI
BstAPI
EcoO109I,PpuMI,PsrI
BsaI
EcoO109I
KflI,PpuMI
AflIII,PciI
+2
BplI
AarI,+1
EagI
NotI
SacII
+2
AarI
AfeI
EagI
+1
AfeI
+5
BcgI
PfoI
HindIII
BamHI
XcmI
PflMI
PfoI
ZraI
FspI
ITR,M13 fwd,BbsI,SphI,PaeR7I,+6
bGH poly(A)信号,AatII,SacII,NgoMIV,NaeI,+2
NgoMIV,NaeI
DraIII
DrdI,AloI
PsiI
CspCI
SspI
+1
SspI
AmpR
ScaI
BcgI
XmnI
AclI
FspI
AclI
BsaI
AlwNI
6000
1000
2000
3000
4000
5000
ori
SLC6A14 报告基因
SLC6A14
H2B
f1 ori
WPRE
EGFP
调控区
AmpR

图21

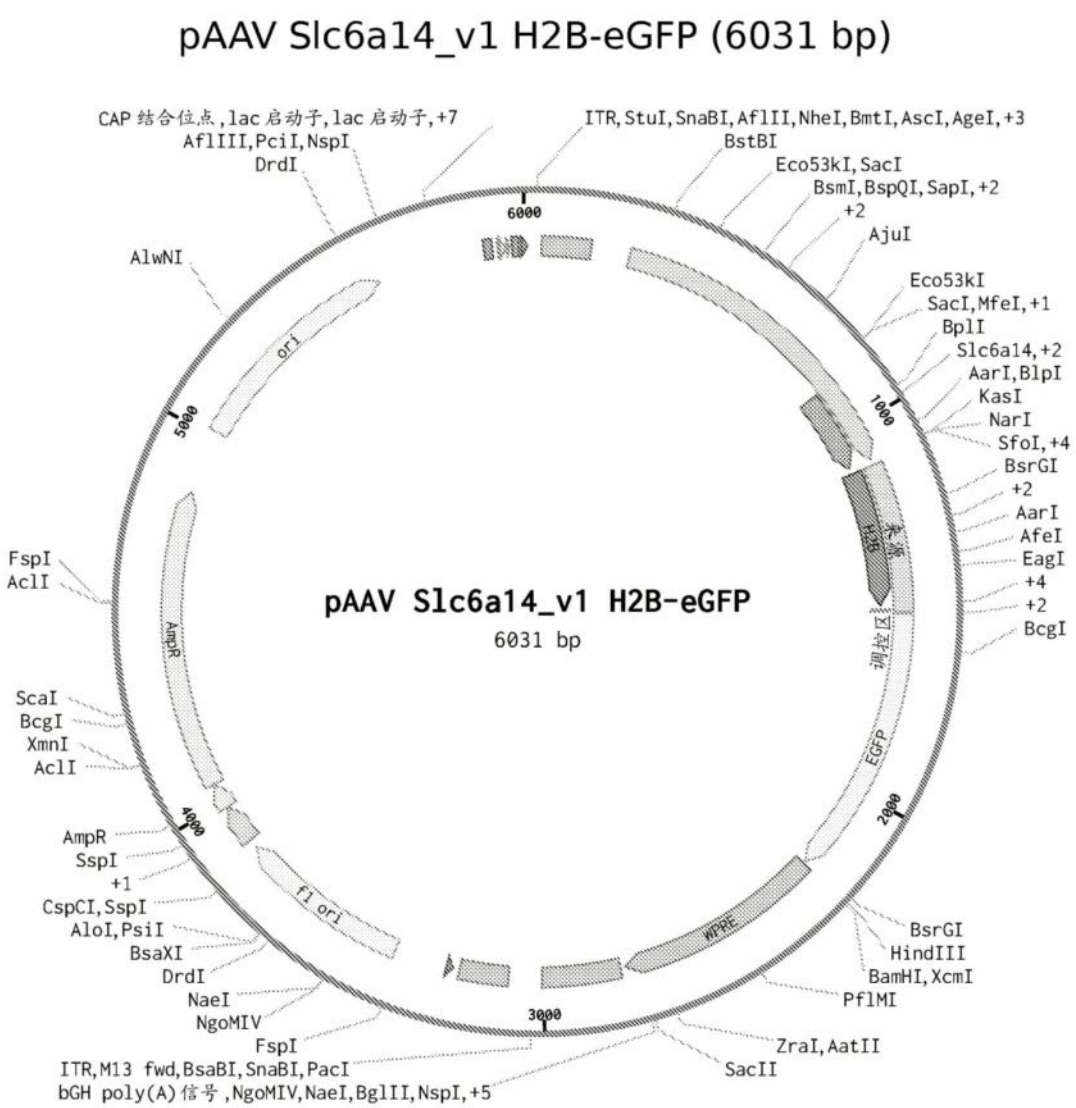

pAAV Slc6a14_v1 H2B-eGFP (6031 bp)
pAAV Slc6a14_v1 H2B-eGFP
6031 bp
CAP 结合位点,lac 启动子,lac 启动子,+7
AflIII,PciI,NspI
DrdI
AlwNI
ITR,StuI,SnaBI,AflII,NheI,BmtI,AscI,AgeI,+3
BstBI
Eco53kI,SacI
BsmI,BspQI,SapI,+2
+2
AjuI
Eco53kI
SacI,MfeI,+1
BplI
Slc6a14,+2
AarI,BlpI
KasI
NarI
SfoI,+4
BsrGI
+2
AarI
AfeI
EagI
+4
+2
BcgI
FspI
AclI
ScaI
BcgI
XmnI
AclI
AmpR
SspI
+1
CspCI,SspI
AloI,PsiI
BsaXI
DrdI
NaeI
NgoMIV
FspI
ITR,M13 fwd,BsaBI,SnaBI,PacI
bGH poly(A)信号,NgoMIV,NaeI,BglII,NspI,+5
SacII
ZraI,AatII
PflMI
BamHI,XcmI
HindIII
BsrGI
6000
1000
2000
3000
4000
5000
ori
AmpR
f1 ori
WPRE
EGFP
调控区
H2B
启动子

图22

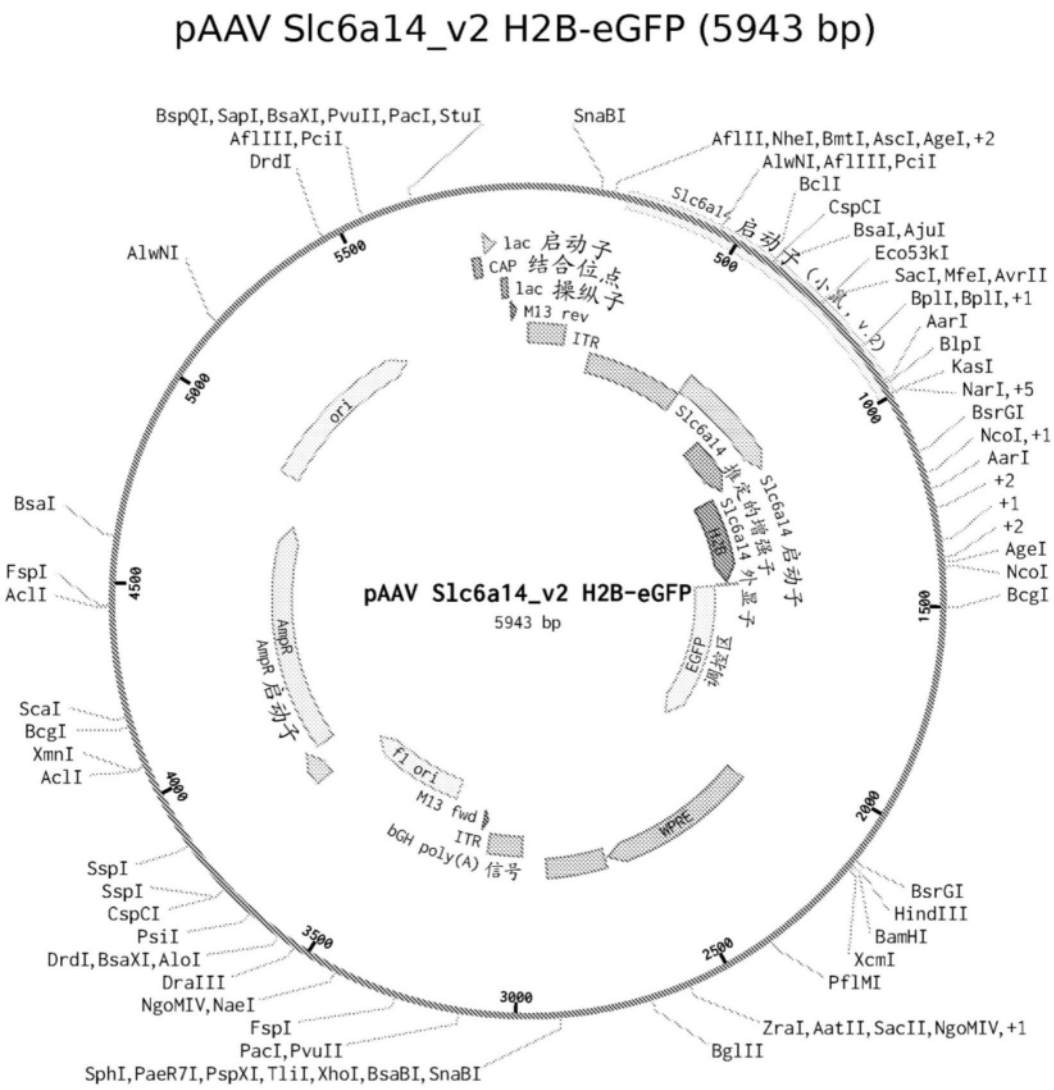

pAAV Slc6a14_v2 H2B-eGFP (5943 bp)
pAAV Slc6a14_v2 H2B-eGFP
5943 bp
BspQI, SapI, BsaXI, PvuII, PacI, StuI
AflIII, PciI
DrdI
SnaBI
AflII, NheI, BmtI, AscI, AgeI, +2
AlwNI, AflIII, PciI
BclI
CspCI
BsaI, AjuI
Eco53kI
SacI, MfeI, AvrII
BplI, BplI, +1
AarI
BlpI
KasI
NarI, +5
BsrGI
NcoI, +1
AarI
+2
+1
+2
AgeI
NcoI
BcgI
BsrGI
HindIII
BamHI
XcmI
PflMI
ZraI, AatII, SacII, NgoMIV, +1
BglII
SphI, PaeR7I, PspXI, TliI, XhoI, BsaBI, SnaBI
FspI
PacI, PvuII
NgoMIV, NaeI
DraIII
DrdI, BsaXI, AloI
PsiI
CspCI
SspI
SspI
ScaI
BcgI
XmnI
AclI
FspI
AclI
BsaI
AlwNI
lac 启动子
CAP 结合位点
lac 操纵子
M13 rev
ITR
ori
Slc6a14 启动子 (小鼠, v.2)
Slc6a14 肌发的增强子
Slc6a14 外显子
H2B
EGFP
反转录
WPRE
bGH poly(A) 信号
ITR
M13 fwd
f1 ori
AmpR
AmpR 启动子
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500
5000
5500

图23