(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113950526 B
(45)授权公告日 2025.03.21

(21)申请号 202080043232.9
(22)申请日 2020.04.09
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113950526 A
(43)申请公布日 2022.01.18
(30)优先权数据
62/831706 2019.04.09 US
62/877810 2019.07.23 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.12.03
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/027541 2020.04.09
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/210542 EN 2020.10.15
(73)专利权人 加利福尼亚大学董事会
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 普拉尚特·马利 阿纳·莫雷诺
(74)专利代理机构 青岛联智专利商标事务所有限公司 37101
专利代理师 阎斌斌 刘丹丹
(51)Int.Cl.
C12N 9/22(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
C12N 15/63(2006.01)
C12N 15/86(2006.01)
A61P 25/04(2006.01)
(56)对比文件
WO 2018007980 A1,2018.01.11
WO 2018035503 A1,2018.02.22
审查员 陈永强

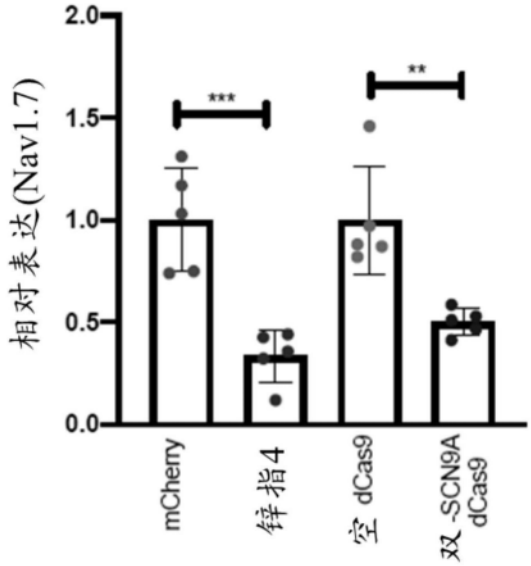
权利要求书2页 说明书38页
序列表59页 附图19页

(54)发明名称

通过靶向体内表观遗传阻遏实现的持久镇痛

(57)摘要

本公开内容提供了基于表观遗传的方案和方法,其使用基因组编辑构建体治疗和管理需要对其治疗的受试者中的疼痛,所述基因组编辑构建体包含与阻遏物结构域融合的锌指和/或与阻遏物结构域融合的dCas9。



CN 113950526 B

1.一种锌指阻遏物构建体,其包含与转录阻遏物偶联的工程改造的锌指DNA-结合结构域,其中所述锌指DNA-结合结构域包含1-6个锌指序列,或更多个手指,且其中所述锌指序列或手指结合编码以下基因产物的基因中的靶核酸序列:

SCN9A,其中所述基因产物的表达被抑制,

其中所述靶核酸序列选自SEQ ID NOs:108-122中的任一个,并且其中所述转录阻遏物选自由以下组成的组:mSin3相互作用结构域(SID)蛋白、甲基-CpG-结合结构域2 (MBD2)、MBD3、DNA甲基转移酶(DNMT) 1 (DNMT1)、DNMT2A、DNMT3A、DNMT3B DNMT3L、视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)、甲基CpG结合蛋白2 (Mecp2)、GATA朋友1 (Fog1)、MAT2调节剂(ROM2)、拟南芥HD2A蛋白(AtHD2A)、赖氨酸特异性的脱甲基酶1(LSD1)和Krüppel-相关盒(KRAB)或其组合。

2. 权利要求1的锌指阻遏物构建体,其中所述工程改造的锌指DNA-结合结构域包含SEQ ID NO:123-126中任一个的220-282残基。

3.一种多核苷酸,其编码权利要求1-2中任一项的锌指阻遏物构建体。

4.权利要求3的多核苷酸,其中所述多核苷酸是为在人细胞中表达而优化密码子的。

5.一种载体,其含有权利要求3的多核苷酸。

6.权利要求5的载体,其中所述多核苷酸可操作地连接至启动子。

7. 权利要求5的载体,其中所述启动子选自:人巨细胞病毒(CMV)启动子、CAG启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV) LTR启动子/增强子、SV40启动子、EF1-α启动子、CMV立即/早期基因增强子/CBA启动子、Nav1.7启动子、Nav1.8启动子、Nav1.9启动子、TRPV1启动子、突触蛋白启动子、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II启动子、微管蛋白αI启动子、神经元特异性的烯醇化酶启动子和神经胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)启动子。

8.权利要求5的载体,所述载体进一步包含调节性控制序列。

9.权利要求8的载体,其中所述调节性控制序列是土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE)。

10.权利要求5的载体,其中所述载体是重组腺相关病毒载体(rAAV载体)。

11.权利要求10的载体,其中所述rAAV选自:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12和自互补的载体(scAAV)。

12.权利要求5的载体,其中所述多核苷酸包括一个或多个反向重复(ITR)。

13.权利要求5的载体,其中所述多核苷酸包括聚腺苷酸序列。

14.权利要求5的载体,其中所述多核苷酸被工程改造成在细胞中表达一种或多种组分。

15.权利要求5的载体,其中所述载体是慢病毒载体、γ逆转录病毒载体或单纯疱疹病毒载体。

16. 权利要求5的载体,其中所述载体包含编码SEQ ID NO:7的KRAB序列的核酸。

17.权利要求1-2中任一项所述的锌指阻遏物构建体在制备用于种治疗或管理受试者中的慢性疼痛的药物中的用途。

18. 权利要求17的用途,其中所述锌指阻遏物构建体包含工程改造的锌指DNA-结合结构域,所述工程改造的锌指DNA-结合结构域包含SEQ ID NO:123-126中任一个的220-282残基。

19.权利要求1-2中任一项所述的锌指阻遏物构建体在制备用于治疗或管理有此需要

的受试者中的疼痛的药物中的用途。

20.权利要求19的用途,其中所述疼痛选自神经性疼痛。

21.权利要求19的用途,其中所述疼痛选自伤害性疼痛、糖尿病性神经病、风湿样关节炎疼痛、癌症痛、偏头痛和坐骨神经痛。

22.根据权利要求19所述的用途,其中所述疼痛与选自以下的疾病或病症相关:神经病性周围神经病、糖尿病性神经病、疱疹后神经痛、三叉神经痛、背部损伤、癌症神经病、HIV神经病、肢体缺失、腕管综合征、中风、酒精中毒、甲状腺功能减退、尿毒症、多发性硬化、脊髓损伤、帕金森病和癫痫。

23.权利要求19的用途,其中所述药物用于治疗具有慢性疼痛的受试者。

24. 权利要求19的用途,其中所述锌指-阻遏物构建体包含选自以下的阻遏物结构域:mSin3相互作用结构域(SID)蛋白、甲基-CpG-结合结构域2 (MBD2)、MBD3、DNA甲基转移酶(DNMT) 1 (DNMT1)、DNMT2A、DNMT3A、DNMT3B DNMT3L、视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)、甲基CpG结合蛋白2 (Mecp2)、GATA朋友1 (Fog1)、MAT2调节剂(ROM2)、拟南芥HD2A蛋白(AtHD2A)、赖氨酸特异性的脱甲基酶1(LSD1)和Krüppel-相关盒(KRAB)。

25.权利要求24的用途,其中所述阻遏物结构域包含KRAB。

26. 权利要求19的用途,其中所述锌指-阻遏物构建体结合选自SEQ ID NO:108-122的靶标。

27.权利要求19的用途,其中所述锌指-阻遏物构建体提供电压门控钠通道的非持久基因阻遏。

28.权利要求27的用途,其中所述电压门控钠通道是NaV1.7。

29.权利要求19的用途,其中所述锌指-阻遏物构建体由重组病毒包装和递送。

30.权利要求29的用途,其中所述重组病毒是腺病毒、γ逆转录病毒、腺相关病毒(AAV)、单纯疱疹病毒(HSV)或慢病毒。

31.权利要求29的用途,其中所述重组病毒选自:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12和自互补的载体(scAAV)。

32.权利要求19的用途,其中静脉内、腹膜内、鞘内、神经节内、神经内、颅内或肌肉内施用所述锌指-阻遏物构建体。

33. 权利要求19的用途,其中所述锌指阻遏物构建体包含工程改造的锌指DNA-结合结构域,所述工程改造的锌指DNA-结合结构域包含SEQ ID NO:123-126中任一个的220-282残基。

通过靶向体内表观遗传阻遏实现的持久镇痛

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年4月9日提交的临时申请系列号62/831,706和2019年7月23日提交的临时申请系列号62/877,810在美国法典第35篇第119条下的优先权,其公开内容通过引用以其整体并入本文用于所有目的。

[0003] 关于联邦资助研究的声明

[0004] 在美国国立卫生研究院颁布的CA222826、GM123313和HG009285的政府支持下完成本发明。政府具有本发明的某些权利。

技术领域

[0005] 本公开内容提供了基于表观遗传的方案和方法,其使用基因组编辑构建体治疗和管理需要对其治疗的受试者中的疼痛,所述基因组编辑构建体包含与阻遏物结构域融合的锌指和/或与阻遏物结构域融合的dCas9。

[0006] 序列表的通过引用并入

[0007] 伴随本申请的是标题为“Sequence-Listing_ST25.txt”的序列表,其创建于2020年4月9日且具有121,918字节的数据,在IBM-PC、MS-Windows操作系统上进行机器格式化。该序列表通过引用以其整体并入本文用于所有目的。

[0008] 背景

[0009] 慢性疼痛影响了19％到50％的世界人口,其中仅在美国就有超过1亿人受到影响。此外,由于全球人口老龄化和慢性病流行,预计报告慢性疼痛的人数到2035年增加。虽然慢性疼痛比癌症、糖尿病和心血管疾病的总和更为普遍,但药物开发并没有在这些其它治疗领域取得显著进展。此外,慢性疼痛的当前护理标准经常依赖于阿片样物质,其可能具有不良副作用和显著的成瘾风险。尽管经过数十年研究,但是实现广泛有效的、持久的、不会上瘾的慢性疼痛治疗剂的目标仍然难以达到。

发明内容

[0010] 本公开内容提供了重组基因阻遏物复合物,其包含与转录阻遏物融合并与至少一种指导RNA(gRNA)相关的核酸酶失活的Cas9(dCas9)蛋白,其中所述gRNA与靶核酸序列特异性地杂交,所述靶核酸序列编码选自TRPV1/2/3/4、P2XR3、TRPM8、TRPA1、P23X2、P2RY、BDKRB1/2、Hlr3A、ACCNs、TRPV4、TRPC/P、ACCN1/2、SCN1/3/8A/9A、SCN10A、SCN11A、KCNQ、BDNF、OPRD1/K1/M1、CNR1、GABRs、TNF、PLA2、IL1/6/12/18、COX-2、NTRK1、NGF、GDNF、TNF、LIF、CCL1、CNR2、TLR2/4、P2RX47、CCL2、CX3CR1、BDNF、NR1/2、GR1A1-4、GRC1-5、NK1R、CACNA1A-S和CACNA2D1的基因产物,其中所述基因产物的表达被抑制。在一个实施方案中,所述靶核酸序列位于染色体2上的位置2q24.3。在另一个或其它实施方案中,gRNA包含由11-107中任一个所示的序列编码的序列。在另一个或其它实施方案中,所述gRNA与编码SCN9A产物的核酸序列(Nav1.7)特异性地杂交。在另一个或其它实施方案中,所述转录阻遏物选自:mSin3相互作用结构域(SID)蛋白、甲基-CpG-结合结构域2(MBD2)、MBD3、DNA甲基转

移酶(DNMT)1(DNMT1)、DNMT2A、DNMT3A、DNMT3B DNMT3L、视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)、甲基CpG结合蛋白2(Mecp2)、GATA朋友1(Fog1)、MAT2调节剂(ROM2)、拟南芥(Arabidopsis thaliana)HD2A蛋白(AtHD2A)、赖氨酸特异性的脱甲基酶1(LSD1)和Krüppel-相关盒(KRAB)。在另一个实施方案中,所述转录阻遏物结构域是KRAB结构域。

[0011] 本公开内容还提供了一种多核苷酸,其编码上文和本文所述的重组基因阻遏物复合物的一种或多种组分。在一个实施方案中,所述多核苷酸是为在人细胞中表达而优化的密码子。

[0012] 本公开内容还提供了包含本公开内容的多核苷酸的载体或载体系统,所述多核苷酸编码一种或多种组分以产生本公开内容的重组基因阻遏物复合物。在一个实施方案中,所述多核苷酸可操作地连接至启动子。在另一个实施方案中,所述启动子选自:人巨细胞病毒(CMV)启动子、CAG启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)LTR启动子/增强子、SV40启动子、EF1-α启动子、CMV立即/早期基因增强子/CBA启动子、Nav1.7启动子、Nav1.8启动子、Nav1.9启动子、TRPV1启动子、突触蛋白启动子、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II启动子、微管蛋白αI启动子、神经元特异性的烯醇化酶启动子和神经胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)启动子。在另一个实施方案中,所述载体包含在至少一种指导RNA编码序列上游的polIII启动子。在另一个实施方案中,所述polIII启动子选自U6和H1启动子。在另一个实施方案中,所述载体进一步包含调节性控制序列。在另一个实施方案中,所述调节性控制序列是土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE)。在另一个实施方案中,所述载体是重组腺相关病毒载体(rAAV载体)。在另一个实施方案中,所述rAAV选自:AAV1、AAV1(Y705+731F+T492V)、AAV2、AAV2(Y444+500+730F+T491V)、AAV3、AAV3(Y705+731F)、AAV4、AAV5、AAV5(Y436+693+719F)、AAV6、AAV6(VP3变体Y705F/Y731F/T492V)、AAV7、AAV-7m8、AAV8、AAV8(Y733F)、AAV9、AAV9(VP3变体Y731F)、AAV10、AAV10(Y733F)、AAV-ShH10、AAV11、AAV12和自互补的载体(scAAV)。在再另一个或其它实施方案中,所述多核苷酸包括一个或多个反向重复(ITR)。在再另一个或其它实施方案中,所述多核苷酸包括聚腺苷酸序列。在另一个实施方案中,所述载体和多核苷酸经工程改造以在细胞中表达。在另一个实施方案中,所述载体是慢病毒载体、γ逆转录病毒载体或单纯疱疹病毒载体。在另一个实施方案中,所述载体包含分裂的dCas9载体系统。在另一个实施方案中,所述载体包含编码dCas9的核酸,所述dCas9具有在SEQ ID NO:2中所示的序列或与其具有至少90%同一性的序列且可以与gRNA形成复合物且缺少核酸酶活性。在另一个实施方案中,所述载体包含编码SEQ ID NO:7的KRAB序列或与其具有至少90%同一性的序列的核酸且可以阻遏转录。在另一个实施方案中,所述分裂的载体系统包含选自SEQ ID NO:3、4和10的载体序列或与其具有至少90%至99%同一性的序列。

[0013] 本公开内容提供了一种锌指阻遏物构建体,其包含与转录阻遏物偶联的工程改造的锌指DNA-结合结构域,其中所述锌指DNA-结合结构域包含1-6个锌指序列且其中所述锌指序列结合编码基因产物的基因中的靶核酸序列,所述基因产物选自:TRPV1/2/3/4、P2XR3、TRPM8、TRPA1、P23X2、P2RY、BDKRB1/2、Hlr3A、ACCNs、TRPV4、TRPC/P、ACCN1/2、SCN1/3/8A/9A、SCN10A、SCN11A、KCNQ、BDNF、OPRD1/K1/M1、CNR1、GABRs、TNF、PLA2、IL1/6/12/18、COX-2、NTRK1、NGF、GDNF、TNF、LIF、CCL1、CNR2、TLR2/4、P2RX47、CCL2、CX3CR1、BDNF、NR1/2、GR1A1-4、GRC1-5、NK1R、CACNA1A-S和CACNA2D1,其中所述基因产物的表达被抑制。在一个实施方案中,所述靶核酸序列是在表2中所示的序列。在另一个实施方案中,所述转录阻遏物

选自:mSin3相互作用结构域(SID)蛋白、甲基-CpG-结合结构域2(MBD2)、MBD3、DNA甲基转移酶(DNMT)1(DNMT1)、DNMT2A、DNMT3A、DNMT3B DNMT3L、视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)、甲基CpG结合蛋白2(Mecp2)、GATA朋友1(Fog1)、MAT2调节剂(ROM2)、拟南芥HD2A蛋白(AtHD2A)、赖氨酸特异性的脱甲基酶1(LSD1)和Krüppel-相关盒(KRAB)。

[0014] 本公开内容还提供了一种多核苷酸,其编码上面和本文所述的锌指阻遏物构建体。在一个实施方案中,所述多核苷酸是为在人细胞中表达而优化的密码子。

[0015] 本公开内容还提供了一种载体,其含有本公开内容的编码锌指阻遏物构建体的多核苷酸。在一个实施方案中,所述多核苷酸可操作地连接至启动子。在另一个实施方案中,所述启动子选自:人巨细胞病毒(CMV)启动子、CAG启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)LTR启动子/增强子、SV40启动子、EF1-α启动子、CMV立即/早期基因增强子/CBA启动子、Nav1.7启动子、Nav1.8启动子、Nav1.9启动子、TRPV1启动子、突触蛋白启动子、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II启动子、微管蛋白αI启动子、神经元特异性的烯醇化酶启动子和神经胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)启动子。在另一个实施方案中,所述载体进一步包含调节性控制序列。在另一个实施方案中,所述调节性控制序列是土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE)。在另一个实施方案中,所述载体是重组腺相关病毒载体(rAAV载体)。在另一个实施方案中,所述rAAV选自:AAV1、AAV1(Y705+731F+T492V)、AAV2、AAV2(Y444+500+730F+T491V)、AAV3、AAV3(Y705+731F)、AAV4、AAV5、AAV5(Y436+693+719F)、AAV6、AAV6(VP3变体Y705F/Y731F/T492V)、AAV7、AAV-7m8、AAV8、AAV8(Y733F)、AAV9、AAV9(VP3变体Y731F)、AAV10、AAV10(Y733F)、AAV-ShH10、AAV11、AAV12和自互补的载体(scAAV)。在另一个实施方案中,所述载体或多核苷酸包括一个或多个反向重复(ITR)。在另一个实施方案中,所述载体或多核苷酸包括聚腺苷酸序列。在另一个实施方案中,所述核酸经工程改造以在细胞中表达一种或多种组分。在另一个实施方案中,所述载体是慢病毒载体、γ逆转录病毒载体或单纯疱疹病毒载体。在另一个实施方案中,所述载体包含编码SEQ ID NO:7的KRAB序列或与其具有至少90%至99%同一性的序列的核酸。

[0016] 本公开内容还提供了一种治疗或管理受试者中的慢性疼痛的基于表观遗传的方法,所述方法包括施用有效量的如本文和上面所述的复合物或构建体。

[0017] 本公开内容还提供了一种治疗或管理有此需要的受试者中的疼痛的基于表观遗传的方法,所述方法包括给受试者施用有效量的锌指-阻遏物构建体和/或dCas9-阻遏物结构域复合物,其中dCas9是催化地失活的Cas9,其不会切割DNA,但是维持它的通过指导-RNA(gRNA)结合基因组的能力。在一个实施方案中,所述疼痛选自神经性疼痛、伤害性疼痛、痛觉超敏、炎症性疼痛、炎症性痛觉过敏、神经病、神经痛、糖尿病性神经病、人免疫缺陷病毒相关的神经病、神经损伤、风湿样关节炎疼痛、骨关节炎疼痛、烧伤、背痛、眼痛、内脏痛、癌症痛、骨癌症痛、偏头痛、腕管综合征引起的疼痛、纤维肌痛、神经炎痛、坐骨神经痛、骨盆超敏反应痛、骨盆痛、疱疹后神经痛、手术后疼痛、中风后疼痛和月经痛。在另一个实施方案中,所述疼痛与选自以下的疾病或病症有关:神经病性周围神经病、糖尿病性神经病、疱疹后神经痛、三叉神经痛、背部损伤、癌症神经病、HIV神经病、肢体缺失、腕管综合征、中风、酒精中毒、甲状腺功能减退、尿毒症、多发性硬化、脊髓损伤、帕金森病和癫痫。在另一个实施方案中,所述方法用于治疗具有慢性疼痛的受试者。在另一个实施方案中,所述锌指-阻遏物构建体包含选自以下的阻遏物结构域:mSin3相互作用结构域(SID)蛋白、甲基-CpG-结合

结构域2(MBD2)、MBD3、DNA甲基转移酶(DNMT)1(DNMT1)、DNMT2A、DNMT3A、DNMT3B DNMT3L、视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)、甲基CpG结合蛋白2(Mecp2)、GATA朋友1(Fog1)、MAT2调节剂(ROM2)、拟南芥HD2A蛋白(AtHD2A)、赖氨酸特异性的脱甲基酶1(LSD1)和Krüppel-相关盒(KRAB)。在另一个实施方案中,所述阻遏物结构域包含KRAB。在另一个实施方案中,所述锌指-阻遏物构建体结合表2的靶标。在另一个实施方案中,所述dCas9-阻遏物结构域复合物包含选自以下的阻遏物结构域:mSin3相互作用结构域(SID)蛋白、甲基-CpG-结合结构域2(MBD2)、MBD3、DNA甲基转移酶(DNMT)1(DNMT1)、DNMT2A、DNMT3A、DNMT3B DNMT3L、视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)、甲基CpG结合蛋白2(Mecp2)、GATA朋友1(Fog1)、MAT2调节剂(ROM2)、拟南芥HD2A蛋白(AtHD2A)、赖氨酸特异性的脱甲基酶1(LSD1)和Krüppel-相关盒(KRAB)。在另一个实施方案中,所述阻遏物结构域包含KRAB。在另一个实施方案中,所述dCas9-阻遏物结构域构建体包含具有选自SEQ ID NO:11-106和107的序列的指导RNA间隔序列。在另一个实施方案中,所述锌指-阻遏物构建体和/或所述dCas9-阻遏物结构域构建体提供电压门控钠通道的非持久基因阻遏。在另一个实施方案中,所述电压门控钠通道选自NaV1.7、NaV1.8和NaV1.9。在再另一个实施方案中,所述电压门控钠通道是NaV1.7。在另一个实施方案中,所述锌指-阻遏物构建体和/或所述dCas9-阻遏物结构域构建体由重组病毒包装和递送。在另一个实施方案中,所述重组病毒是腺病毒、γ逆转录病毒、腺相关病毒(AAV)、单纯疱疹病毒(HSV)或慢病毒。在另一个实施方案中,所述重组病毒选自:AAV1、AAV1(Y705+731F+T492V)、AAV2、AAV2(Y444+500+730F+T491V)、AAV3、AAV3(Y705+731F)、AAV4、AAV5、AAV5(Y436+693+719F)、AAV6、AAV6(VP3变体Y705F/Y731F/T492V)、AAV7、AAV-7m8、AAV8、AAV8(Y733F)、AAV9、AAV9(VP3变体Y731F)、AAV10、AAV10(Y733F)、AAV-ShH10、AAV11、AAV12和自互补的载体(scAAV)。在另一个实施方案中,静脉内、腹膜内、鞘内、神经节内、神经内、颅内或肌肉内施用所述锌指-阻遏物构建体和/或所述dCas9-阻遏物结构域构建体。

附图说明

[0018] 图1A-D显示了在炎症性疼痛的角叉菜胶模型中,NaV1.7的原位阻遏导致疼痛改善。(A)使用ZFP-KRAB和KRAB-dCas9的用于原位NaV1.7阻遏的总体策略的示意图。NaV1.7是参与将有害刺激转导为在DRG神经元的外围末端处的电脉冲的DRG通道。通过鞘内注射实现经由AAV-ZFP-KRAB和AAV-KRAB-dCas9对NaV1.7的原位阻遏,从而导致疼痛信号在到达脑之前的破坏。(B)角叉菜胶诱导的炎症性疼痛模型的示意图。在第0天,给小鼠鞘内注射AAV9-锌指-4-KRAB、AAV9-mCherry、AAV9-KRAB-dCas9-双-gRNA或AAV9-KRAB-dCas9-无-gRNA。21天后,用Hargreaves测定在所有小鼠中测量热疼痛敏感性。为了建立灵敏度的基线水平,在角叉菜胶注射之前使用von Frey细丝测试小鼠的触觉阈值。然后在其左爪(同侧)给小鼠注射角叉菜胶,而给右爪(对侧)注射盐水作为小鼠内对照。然后在角叉菜胶施用后30min、1、2、4和24小时,测试它们的热爪子缩回潜伏期。(C)体内NaV1.7阻遏效率:在角叉菜胶施用后24小时,收获小鼠DRG(L4-L6),并通过qPCR确定NaV1.7阻遏效力。(n＝5;误差条是SEM;Student氏t-检验;***p＝0.0008,**p＝0.0033)。(D)将总爪子缩回潜伏期计算为角叉菜胶和盐水注射爪子的曲线下面积(AUC)。用锌指-4-KRAB和KRAB-dCas9-双-gRNA处理的小鼠在角叉菜胶注射的爪子中具有显著增加的爪子缩回潜伏期(n＝10;误差条是SEM;Student氏t-检验,****p<0.0001)。

[0019] 图2A-C显示了使用锌指-KRAB和确定的小分子药物加巴喷丁对NaV1.7的原位阻遏的基准建立。(A)实验方案的示意图。(B-C)绘制了在用加巴喷丁(100mg/kg)和mCherry和锌指-4-KRAB注射的小鼠后爪中注射角叉菜胶(实线)或盐水(虚线)之后热痛觉过敏的时程。显示了平均爪子缩回潜伏期(PWL)。热痛觉过敏时程的AUC绘制在右侧小图上。在用加巴喷丁和锌指-4-KRAB注射的小鼠的角叉菜胶注射的爪子中看到PWL的显著增加(对于mCherry和加巴喷丁为n＝5,和对于锌指-4-KRAB为n＝6;误差条是SEM;Student氏t-检验,*p＝0.0208,**p＝0.0021)。

[0020] 图3A-E显示了锌指-KRAB和KRAB-dCas9在两种神经性疼痛模型中的体内效力。(A)紫杉醇诱导的神经性疼痛模型的示意图。给小鼠鞘内注射AAV9-mCherry、AAV9-锌指-4-KRAB、AAV9-KRAB-dCas9-无-gRNA、AAV9-KRAB-dCas9-双-gRNA或盐水。在第14天进行基线von Frey阈值测试后,然后在鞘内注射后14、16、18、20天给小鼠腹膜内注射8mg/kg紫杉醇。鞘内注射后21天,通过von Frey细丝测试小鼠的触觉痛觉超敏,并通过应用丙酮测试冷痛觉超敏。(B)通过锌指-4-KRAB和KRAB-dCas9-双-gRNA对NaV1.7的原位阻遏减轻紫杉醇诱导的触觉痛觉超敏(n＝8;误差条是SEM;Student氏t-检验;***p＝0.0007,***p＝0.0004)。(C)通过锌指-4-KRAB和KRAB-dCas9-双-gRNA对NaV1.7的原位阻遏减轻紫杉醇诱导的冷痛觉超敏(n＝8;误差条是SEM;Student氏t-检验;****p<0.0001,**p＝0.008)。(D)BzATP疼痛模型的示意图。在第0天给小鼠注射AAV9-mCherry、AAV9-KRAB-dCas9-无-gRNA或AAV9-KRAB-dCas9-双-gRNA。21天后,将小鼠的von Frey触觉阈值设为基线,且然后鞘内注射30nmol BzATP。在BzATP施用后30分钟、1、2、3、6和24小时,测试小鼠的触觉痛觉超敏。(E)通过KRAB-dCas9-双-gRNA对Nav1.7的原位阻遏减轻神经性疼痛的BzATP模型中的触觉痛觉超敏(对于KRAB-dCas9-无-gRNA为n＝5,和对于其它组为n＝6,具有Bonferonni事后检验的双因素方差分析;****p<0.0001,*p＝0.0469)。

[0021] 图4A-E显示了两个独立疼痛模型中锌指-KRAB和KRAB-dCas9的长期效力。(A)角叉菜胶诱导的炎症性疼痛模型的时间线。(B)绘制了在鞘内注射AAV9-mCherry和AAV9-锌指-4-KRAB之后42天向小鼠后爪中注射角叉菜胶(实线)或盐水(虚线)之后热痛觉过敏的时程。显示了平均爪子缩回潜伏期。热痛觉过敏时程的AUC绘制在右侧小图上。在用AAV9-锌指-4-KRAB注射的小鼠的注射角叉菜胶的爪子中看到PWL的显著增加(n＝8;误差条是SEM;Student氏t-检验;****p<0.0001)。(C)紫杉醇诱导的神经性疼痛模型的示意图。(D)在最后一次紫杉醇注射后49天,通过锌指-4-KRAB和KRAB-dCas9-双-gRNA对NaV1.7的原位阻遏减轻紫杉醇诱导的触觉痛觉超敏(对于锌指-4-KRAB为n＝7,和对于其它组为n＝8;误差条是SEM;Student氏t-检验;****p<0.0001)。(E)通过锌指-4-KRAB和KRAB-dCas9-双-gRNA对NaV1.7的原位阻遏减轻紫杉醇诱导的冷痛觉超敏(对于锌指-4-KRAB为n＝7,和对于其它组为n＝8;误差条是SEM;Student氏t-检验;****p<0.0001,***p＝0.0001)。

[0022] 图5A-B显示了表观遗传基因组工程改造工具的体外优化,以实现NaV1.7阻遏。(A)一组四个锌指蛋白和十个gRNA被设计为靶向小鼠神经母细胞瘤细胞系(Neuro2a)中的NaV1.7,并通过qPCR筛选阻遏效力。非靶向gRNA(无gRNA)用作靶向NaV1.7的KRAB-dCas9构建体的对照,而mCherry用作靶向NaV1.7的ZFP-KRAB构建体的对照(n＝3;误差条是SEM;单因素方差分析;****p<0.0001)。(B)在用mCherry、锌指-2-KRAB、锌指-4-KRAB、KRAB-dCas9-无-gRNA、KRAB-dCas9-双-gRNA(1+2)和KRAB-dCas9-gRNA-8+10转染的Neuro2a细胞中的

NaV1.7的体外蛋白质印迹法。

[0023] 图6A-D显示了NaV1.7的原位阻遏导致炎症性疼痛的角叉菜胶模型中的疼痛改善。(A)通过RNAFISH确认小鼠DRG中的AAV9-mCherry转导(红色＝mCherry,粉色＝NaV1.7,绿色＝NeuN;比例条＝50μm)。(B)绘制了在鞘内注射AAV9-KRAB-dCas9-无-gRNA和AAV9-KRAB-dCas9-双-gRNA之后21天向小鼠后爪中注射角叉菜胶(实线)或盐水(虚线)之后的热痛觉过敏的时程。显示了平均爪子缩回潜伏期(n＝10;误差条是SEM)。(C)绘制了在鞘内注射AAV9-mCherry和AAV9-锌指-4-KRAB之后21天向小鼠后爪中注射角叉菜胶(实线)或盐水(虚线)之后的热痛觉过敏的时程。显示了平均爪子缩回潜伏期(n＝10;误差条是SEM)。(D)绘制了在基线和角叉菜胶注射后四小时的同侧爪子的爪子厚度(n＝10)。

[0024] 图7A-D显示了在炎症性疼痛模型中锌指-KRAB的评价。(A)来自处理的小鼠DRG的体内NaV1.7阻遏效率。在角叉菜胶施用后24小时,收获小鼠DRG(L4-L6),并通过qPCR确定NaV1.7阻遏效力(对于mCherry和加巴喷丁组为n＝5,和对于锌指-4-KRAB组为n＝6;误差条是SEM;具有Dunnet氏事后检验的单因素方差分析;***p＝0.0007,*p＝0.0121)。(B)绘制了在基线和角叉菜胶注射后四小时的同侧爪子的爪子厚度。(C)与AAV9-mCherry角叉菜胶注射的爪子(阴性对照)相比,接受AAV9-锌指-4-KRAB和加巴喷丁(100mg/kg)的小鼠的爪子缩回潜伏期的显著性。具有Bonferroni事后检验的双因素方差分析。(D)在(a)中的实验的独立重复:绘制了在鞘内注射AAV9-mCherry和AAV9-锌指-4-KRAB之后21天向小鼠后爪中注射角叉菜胶(实线)或盐水(虚线)之后的热痛觉过敏的时程。显示了平均爪子缩回潜伏期。热痛觉过敏时程的AUC绘制在右侧小图上。在AAV9-锌指-4-KRAB注射的小鼠的注射角叉菜胶的爪子中看到PWL的显著增加(n＝8;误差条是SEM;Student氏t-检验;****p<0.0001)。

[0025] 图8A-C显示了在本公开内容的方法和组合物中使用的质粒构建体。(A)提供了AAV,dNCas9的质粒构建体(SEQ ID NO:3);(B)提供了AAV,dNCas9-KRAB的质粒构建体(SEQ ID NO:10);和(C)提供了AAV,dCCas9的质粒构建体(SEQ ID NO:4)。

[0026] 图9显示了在本公开内容的方法和组合物中使用的锌指质粒构建体(SEQ ID NO:5)。

[0027] 图10A-B显示了NaV1.7的原位阻遏可以逆转化疗诱导的神经性疼痛。(A)紫杉醇诱导的慢性神经性疼痛模型的治疗的示意图。为了建立灵敏度的基线水平,使用von Frey细丝测试了小鼠的触觉阈值。然后在第1、3、5和7天给小鼠腹膜内注射8mg/kg紫杉醇。在通过von Frey细丝确认触觉痛觉超敏后,在第9天给小鼠鞘内注射(1E+11或1E+12vg/小鼠)AAV9-锌指-4-KRAB或AAV9-mCherry(1E+11或1E+12vg/小鼠)。在14和21天后,通过von Frey细丝测试小鼠的触觉痛觉超敏。(B)通过锌指-4-KRAB对NaV1.7的原位阻遏减轻紫杉醇诱导的触觉痛觉超敏(n＝8;误差条是SEM;Student氏t-检验;第2周****p<0.0001,*p＝0.0029;第3周****p<0.0001,***p＝0.0012)。

[0028] 图11提供了参与疼痛感知的基因的精选列表,还突出了潜在治疗干预的多种模式。

具体实施方式

[0029] 如在本文中和在所附权利要求书中所使用的,单数形式“一个/种(a)”、“一个/种(an)”和“该/所述”包括复数指示物,除非上下文另外清楚地指明。因而,例如,提及的“一个

锌指”包括多个这样的锌指,且提及的“所述腺相关病毒”包括提及的一个或多个腺相关病毒和本领域技术人员已知的其等效物,诸如此类。

[0030] 并且,除非另外说明,否则“或”的使用是指“和/或”。类似地,“包含(comprise)”、“包含(comprises)”、“包含(comprising)”、“包括(include)”、“包括(includes)”和“包括(including)”是可互换的,并不旨在进行限制。

[0031] 还应当理解,在各个实施方案的描述使用术语“包含”的情况下,本领域技术人员会理解,在一些具体情况下,可以可替换地使用语言“基本上由……组成”或“由……组成”描述一个实施方案。

[0032] 除非另外定义,否则在本文中使用的所有技术和科学术语具有与本公开内容所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。尽管许多方法和试剂类似于或等同于本文描述的那些,但本文中公开了示例性的方法和材料。

[0033] 为了描述和公开方法的目的,本文提及的所有出版物通过引用全文并入本文,其可能与本文的描述结合使用。此外,关于在一篇或多篇出版物中呈现的与在本公开内容中已经明确定义的术语相似或相同的任何术语,将在所有方面以在本公开内容中明确提供的术语的定义为准。

[0034] 本文中使用的“慢性疼痛”是指以持续时间和/或复发频率为标志的疼痛,其排除仅有限持续时间且无复发的急性疼痛。在一些情况下,“慢性疼痛”持续六个月或更长的持续时间,或比可能在其它方面与特定损伤、病况或疾病相关的自然愈合过程的时程更长。“慢性疼痛”包括、但不限于神经性疼痛、炎症性疼痛、癌症痛、热痛和机械痛或前述中的两种或更多种的组合。

[0035] 术语“编码”在应用于核酸序列时表示,如果在其天然状态或当通过本领域技术人员众所周知的方法操作时可以被转录和/或翻译以产生多肽和/或其片段的mRNA则被说成“编码”多肽的多核苷酸。反义链是这样的核酸的互补链,且可以从它推导出编码序列。

[0036] 术语“等效物”或“生物等效物”在指特定分子、生物或细胞材料时互换使用,且意指具有最小同源性、同时仍维持期望的结构或功能的那些。

[0037] 本文中使用的术语“表达”表示将多核苷酸转录成mRNA的过程和/或随后将转录的mRNA翻译成肽、多肽或蛋白的过程。如果多核苷酸源自基因组DNA,表达可以包括在真核细胞中的mRNA的剪接。通过测量细胞或组织样品中mRNA或蛋白的量,可以确定基因的表达水平;此外,可以确定多个基因的表达水平以建立特定样品的表达概况。

[0038] 本文中使用的术语“功能性的”可用于修饰任何分子、生物或细胞材料以使其实现特定的、指定的效果。

[0039] “融合分子”是其中两个或更多个亚基分子通常共价连接的分子。亚基分子可以是相同化学类型的分子,或可以是不同化学类型的分子。第一类融合分子的例子包括、但不限于融合多肽(例如,ZFP DNA-结合结构域和转录阻遏结构域之间的融合;或Cas9或dCas9和转录阻遏结构域之间的融合)和融合核酸(例如,编码上述融合多肽的核酸)。

[0040] “基因阻遏”和“基因表达的抑制”表示导致基因产物的产生减少的任何过程。基因产物可以是RNA(包括、但不限于,mRNA、rRNA、tRNA和结构RNA)或蛋白。因此,基因阻遏包括减少基因转录和/或mRNA翻译的那些过程。减少转录的基因阻遏过程的例子包括、但不限于抑制转录起始复合物的形成的那些、降低转录起始速率的那些、降低转录延伸速率的那些、

降低转录的持续合成能力的那些和拮抗转录激活的那些(例如通过阻断转录激活剂的结合)。基因阻遏可以构成例如激活的阻止以及低于现有水平的表达的抑制。降低翻译的基因阻遏过程的例子包括降低翻译起始的那些、降低翻译延伸的那些和降低mRNA稳定性的那些。转录阻遏包括基因转录的可逆和不可逆失活。一般而言,基因阻遏包括基因产物产生的任何可检测减少,在一些情况下,基因产物产生减少约2倍,在其它情况下约2倍至约5倍或其间的任何整数,在再其它情况下在约5倍和约10倍之间或其间的任何整数,在其它情况下在约10倍和约20倍之间或其间的任何整数,有时在约20倍和约50倍之间或其间的任何整数,在其它情况下在约50倍和约100倍之间或其间的任何整数,和在其它情况下100倍或更多倍。在再其它情况下,基因阻遏导致基因表达的完全抑制,使得无法检测到基因产物。

[0041] “杂交”表示这样的反应:其中一个或多个多核苷酸反应以形成复合物,所述复合物经由核苷酸残基的碱基之间的氢键合而稳定化。所述氢键合可以通过沃森-克里克碱基配对、Hoogstein结合或以任意其它序列特异性的方式发生。所述复合物可以包含2条形成双链体结构的链、3条或更多条形成多链复合物的链、单个自杂交链或这些的任意组合。杂交反应可以构成更广泛过程中的一个步骤,诸如PC反应的起始,或多核苷酸的酶切割。严谨杂交条件的例子包括:约25℃至约37℃的孵育温度;约6x SSC至约10x SSC的杂交缓冲液浓度;约0%至约25%的甲酰胺浓度;和约4x SSC至约8x SSC的洗涤溶液。中等杂交条件的例子包括:约40℃至约50℃的孵育温度;约9x SSC至约2x SSC的缓冲液浓度;约30%至约50%的甲酰胺浓度;和约5x SSC至约2x SSC的洗涤溶液。高严谨性条件的例子包括:约55℃至约68℃的孵育温度;约1x SSC至约0.1x SSC的缓冲液浓度;约55%至约75%的甲酰胺浓度;和约1x SSC、0.1x SSC或去离子水的洗涤溶液。一般而言,杂交孵育时间是5分钟至24小时,具有1、2或更多个洗涤步骤,且洗涤孵育时间是约1、2或15分钟。SSC是0.15M NaCl和15mM柠檬酸盐缓冲液。应当理解,可以采用使用其它缓冲液系统的SSC的等效物。

[0042] “同源性”或“同一性”或“相似性”表示两个肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性。可以通过对比每个序列中的位置来确定同源性,所述位置可以为了对比的目的而比对。当对比的序列中的位置被相同的碱基或氨基酸占据时,那么分子在该位置是同源的。序列之间的同源性程度是序列共享的匹配或同源位置的数目的函数。“无关的”或“不同源的”序列与本公开内容的序列之一具有小于40%同一性或可替换地小于25%同一性。可用于确定两个多肽之间或两个核酸分子之间的“同一性”或“同源性”的方法和算法是本领域众所周知的,并且可通过万维网在线获得。

[0043] 本文中使用的术语“分离的”表示基本上不含有其它材料的分子或生物制品或细胞材料。

[0044] “Nav1.7”(也称作SCN9A、ETHA、FEB3B、GEFSP7、HSAN2D、NE-NA、NENA、PN1、SFNP和钠电压-门控通道α亚基9)是在人类中由SCN9A基因编码的钠离子通道。它通常在两种类型的神经元中以高水平表达:在背根神经节(DRG)和三叉神经节处的伤害性(疼痛)神经元,以及交感神经节神经元,它们是自主(不随意)神经系统的一部分。Nav1.7通道产生对河豚毒素水平敏感的快速激活和失活的电流。SCN9A基因的序列和染色体位置是已知的。

[0045] 本文中使用的术语“核酸序列”和“多核苷酸”互换使用以表示任何长度的核苷酸的聚合形式,无论是核糖核苷酸还是脱氧核糖核苷酸。因此,该术语包括、但不限于单链、双链或多链DNA或RNA、基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂交体,或包含嘌呤和嘧啶碱基或其它天然

的、化学或生物化学修饰的、非天然的或衍生的核苷酸碱基的聚合物。在一些情况下,本公开内容提供了序列表形式的核酸序列。在序列表提供DNA序列的情况下,本公开内容进一步涵盖RNA(即,其中在本文提供的任何序列中'T'被'U'替换)。

[0046] 本文中使用的术语"启动子"表示调节编码序列(诸如基因)的表达的任何序列。例如,启动子可以是组成型的、诱导型的、阻遏型的或组织特异性的。该术语包括50-500个碱基对之间的微型启动子和核心启动子,并包括polII和polIII启动子两者。"启动子"是一种控制序列,它是多核苷酸序列的一个区域,在该区域处转录的起始和速率受到控制。它可能含有调节性蛋白和分子(诸如RNA聚合酶和其它转录因子)可以结合的遗传元件。非限制性的示例性启动子包括CMV启动子和U6启动子。合适的polIII启动子包括、但不限于U6(小鼠和人)、H1(小鼠和人)。PolIII启动子适用于处理小RNA链(例如shRNA等)。本公开内容涵盖使用各种启动子(polII)来驱动CRISPRi、CRISPRi-阻遏物等的转录。例如,可以使用非特异性的启动子,诸如,但不限于,CMV、CAG、SV40、RSV、EF1α等。或者,可以使用细胞-特异性的启动子,包括、但不限于Nav1.7-、Nav1.8-、Nav1.9-特异性的启动子、TPRV1启动子等。在另一个实施方案中,可以使用神经元特异性的启动子,包括、但不限于突触蛋白I启动子、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II启动子、微管蛋白α1启动子和神经元特异性的烯醇化酶启动子。

[0047] 术语"蛋白"、"肽"和"多肽"互换地且以其最宽的含义用于表示氨基酸、氨基酸类似物或肽拟似物的两个或更多个亚基的化合物。所述亚基可以通过肽键连接。在另一个方面,所述亚基可以通过其它键(例如,酯、醚等)连接。蛋白或肽必须含有至少两个氨基酸,并且对于可以构成蛋白序列或肽序列的氨基酸的最大数目没有限制。本文中使用的术语"氨基酸"表示天然的和/或非天然的或合成的氨基酸(包括甘氨酸以及D和L光学异构体两者)、氨基酸类似物和肽拟似物。

[0048] 本文中使用的术语"重组表达系统"表示用于表达通过重组形成的某些遗传物质的遗传构建体。重组表达系统的例子包括本公开内容的AAV载体,其包含用于表达本公开内容的组分的多个重组结构域(参见,例如,图8A-C和9)。

[0049] 本文中使用的术语"受试者"意图指任何动物。在一些实施方案中,受试者可以是哺乳动物;在其它实施方案中,受试者可以是牛、马、猫、鼠、猪、犬、人或大鼠。

[0050] 本文中使用的术语"载体"意指保留感染和转导非分裂细胞和/或缓慢分裂细胞并整合进靶细胞的基因组中或保持表观遗传的能力的重组载体。载体可以源自或基于野生型病毒。本公开内容的方面涉及腺相关病毒载体(参见,例如,图8A-C和9)。

[0051] 由躯体或神经损伤/病理引起的疼痛通常由初级传入神经元群的激活引起,其特征在于与组织损害相关的激活阈值以及对局部组织损害和炎症所释放的产物的敏感性。这些传入神经终止于脊髓背侧角,在那里该输入被编码并通过长的上行束传输到脑,在那里它被处理成疼痛感受。初级传入神经的细胞体位于其背根神经节(DRG)中。这些神经元细胞体合成用于启动和传播动作电位的电压门控钠通道。尽管局部麻醉剂可以产生致密的麻醉,但之前的工作实际上已经显示,以亚麻醉浓度全身递送的非特异性的钠通道阻滞剂(诸如利多卡因)能够对动物模型和人类中的痛觉过度具有选择性作用。

[0052] 现在已知,存在九种电压门控钠通道亚型以及众多剪接变体。值得注意的是,已经发现这些同种型中的三种($Na_V1.7$、$Na_V1.8$和$Na_V1.9$)主要在初级传入伤害感受器中表达。这些同种型与人类疼痛的关联性已经由以下观察提示:$Na_V1.7$(SCN9A)中的功能缺失突变导

致对疼痛的先天性不敏感性(CIP),这是一种罕见的遗传性病症。相反,功能获得突变产生异常的多病状态。基于这些观察,$Na_V1.7$通道已经被认为是解决病理性疼痛状态和开发慢性疼痛疗法的有吸引力的靶标。但是,由于Na_V亚型之间的序列相似性,开发选择性小分子抑制剂的努力已经受到阻碍。由于靶向特异性的缺乏或全身途径的其生物利用度引起的副作用,许多靶向$Na_V1.7$的小分子药物已经相应地失败。此外,抗体已经面临类似的情况,因为由于通道的特定(开放或关闭)构象的结合,在选择性和功效之间存在折中,而结合并不总是转化为成功的通道抑制。此外,尚不清楚此类抗体可以进入适当的$Na_V1.7$通道并对其功能产生可靠的阻断。因此,尽管临床前研究表明降低的$Na_V1.7$活性导致炎症性和神经性疼痛的减轻,但没有靶向该基因产物的分子到达临床试验的最后阶段。

[0053] 本公开内容提供了通过如下实现的前述内容的替代方案:使用两个基因组工程改造工具成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)-Cas9(CRISPR-Cas9)和锌指蛋白(ZFP)表观遗传地调节$Na_V1.7$的表达,使得人们可以工程改造高特异性的、持久的和可逆的疼痛治疗。

[0054] 通过它的精确靶向致病DNA突变的能力,CRISPR-Cas9系统已成为基因组操作的有力工具,并已在人类疾病的多种动物模型中显示治疗效力。但是,导致疼痛知觉的永久改变的永久基因组编辑可能是不可取的。例如,疼痛可以是一种令人不适的感觉和情绪体验,但它在提醒组织损伤方面起着关键作用。因此,永久性消融可能具有有害的后果。因为这些原因,本文已经采用了一种催化失活的“死”Cas9(dCas9,也被称作CRISPRi),它不切割DNA,但是维持它的通过指导-RNA(gRNA)结合基因组的能力,并进一步将失活的Cas9融合至阻遏物结构域(Krüppel-相关盒,KRAB)以实现对$Na_V1.7$的非永久基因阻遏。

[0055] 如本文所示,通过向dCas9添加KRAB表观遗传阻遏物基序,可以在体外和在体内以高水平的特异性增强基因阻遏。该转录调节系统利用了CRISPR-Cas9的高特异性,而同时提高了安全性概况,因为没有对基因组进行永久性修饰。

[0056] 作为$Na_V1.7$的原位表观基因组阻遏的第二方案,已在本文中利用锌指-KRAB蛋白(ZFP-KRAB),其包含由与KRAB阻遏物融合的Cys_2His_2锌指组成的DNA-结合结构域。ZFP构成由高等生物的基因组编码的转录调节剂的最大个体家族,并且在人类蛋白框架上工程改造的流行合成版本代表潜在低免疫原性体内靶向方案。通过在腺相关病毒(AAV)构建体(例如,AAV1-9、rh.8、rh.10、rh.39和rh.43)中将两种表观遗传的工具(本文描述)递送进脊柱鞘内空间,本公开内容进一步提供了基因调节的特异性解剖学靶向。值得注意的是,许多AAV已被显示产生稳健的背根神经节转导。该方案具有几个优点,因为它允许使用最小的病毒载量并降低全身免疫原性的可能性。

[0057] 术语“CRISPR系统”、“Cas系统”或“CRISPR/Cas系统”表示包含RNA-指导的核酸酶或其它效应分子和gRNA分子的一组分子,它们一起指导和影响RNA-指导的核酸酶或其它效应分子在靶序列处对核酸的修饰。在一个实施方案中,CRISPR系统包含gRNA和Cas蛋白,例如,Cas9蛋白。包含Cas9或修饰的Cas9分子的此类系统在本文中被称作“Cas9系统”或“CRISPR/Cas9系统”。在一个实例中,gRNA分子和Cas分子可以形成复合物,以形成核糖核蛋白(RNP)复合物。

[0058] 术语“Cas9”或“Cas9分子”表示来自细菌II型CRISPR/Cas系统的负责DNA切割的酶。Cas9还包括野生型蛋白及其功能性和非功能性突变体。在实施方案中,Cas9是化脓链球

菌(S.pyogenes)或空肠弯曲杆菌(C.jejuni)的Cas9。在另一个实施方案中,Cas9是修饰的或“死的”Cas9(dCas9)。在另一个实施方案中,Cas9是已被进一步截短以限制其大小的死Cas9。本公开内容涵盖来自金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)、化脓链球菌(Streptococcus pyogenes)、嗜热链球菌(Streptococcus thermophilis)、齿垢密螺旋体(Treponema denticola)、脑膜炎奈瑟球菌(Neisseria meningitidis)、空肠弯曲杆菌(Campylobacter jejuni)等的Cas9核酸酶-无效直系同源物的应用。

[0059] 在一些实施方案中,Cas蛋白被修饰(例如遗传工程改造)成缺乏核酸酶活性。例如,死Cas9(dCas9)蛋白结合靶基因座,但不会在该基因座处切割核酸。在一些实施方案中,dCas9蛋白包含SEQ ID NO:2的序列(核酸序列提供在SEQ ID NO:1中)。在其它实施方案中,dCas9包含与SEQ ID NO:2具有至少70%、80%、85%、87%、90%、92%、95%、98%或99%同一性的序列且能够结合靶序列、但是缺乏核酸酶活性。

[0060] 在一些实施方案中,催化上的死Cas9蛋白(例如,死Cas9、“dCas9”)与转录调节结构域融合(例如,共价地结合)以调节(例如,抑制)靶基因(例如,Nav1.7)的表达。在一些实施方案中,dCas9包含与SEQ ID NO:2具有70%至100%同一性的序列。不希望受任何特定理论约束,dCas9(或另一种催化上的死Cas蛋白)介导转录阻遏,在一些实施方案中,通过空间阻碍转录机构(例如,RNA聚合酶复合物)与靶序列的结合。

[0061] 在一些实施方案中,本公开内容提供了一种分裂的Cas9系统,其中N-和C-结构域被分离在不同的载体中并且与内含肽分子上的N-和C-结构域共表达。例如,将Cas9的两个或更多个部分或区段提供给细胞,诸如通过从引入细胞中的相应核酸表达。两个或更多个部分在细胞内组合以形成Cas9,其具有与指导RNA共定位于靶核酸处的能力。应当理解,Cas9可能具有来自本领域技术人员已知的全长Cas9(例如,dCas9)的一个或多个修饰,但仍保留或具有与指导RNA共定位于靶核酸处的能力。因此,当连接在一起时,两个或更多个部分或区段仅需要产生或导致具有与指导RNA共定位于靶核酸处的能力的Cas9。在一个实施方案中,第一核酸编码具有第一分裂-内含肽的Cas9蛋白的第一部分,并且其中第二核酸编码具有与第一分裂-内含肽互补的第二分裂-内含肽的Cas9蛋白的第二部分,且其中Cas9蛋白的第一部分和Cas9蛋白的第二部分连接在一起以形成Cas9蛋白。在一个实施方案中,C-内含肽-dCCas9包含SEQ ID NO:8的序列或与SEQ ID NO:8具有70-99%同一性的序列,并且dNCas9-N-内含肽包含SEQ ID NO:9的序列或与SEQ ID NO:9具有70-99%同一性的序列。

[0062] 在一些实施方案中,Cas蛋白(例如,dCas9)与转录调节结构域融合。本文中使用的“转录调节结构域”是一种蛋白结构域,其催化染色质分子中的结构或化学变化,所述变化导致改变的转录活性(例如,转录激活或转录阻遏)。在一些实施方案中,所述转录调节结构域是转录阻遏物结构域。在一些实施方案中,所述阻遏结构域包含Kruppel相关盒结构域(KRAB结构域)。KRAB结构域的非限制性例子包括KOX1KRAB结构域、KOX8KRAB结构域、ZNF43KRAB结构域和ZNF184KRAB结构域。在一些实施方案中,所述KRAB结构域是KOX1KRAB结构域。阻遏结构域的其它非限制性例子包括Chromo Shadow(CS)结构域(例如,HP1α的CS结构域)和WRPW结构域(例如,Hes1的WRPW结构域)。在一个特定实施方案中,所述KRAB结构域包含SEQ ID NO:6的核酸序列和SEQ ID NO:7的多肽序列或与其具有至少70%、80%、85%、87%、90%、92%、95%、98%或99%同一性的序列)。

[0063] 在一些实施方案中,所述dCas9包含一个或多个转录阻遏物。例如,在一些实施方

案中,具有转录阻遏物结构域的示例性dCas9融合蛋白的一般体系结构包含结构:[NH_2]-[NLS]-[dCas9或Cas9]-[(转录阻遏物)$_n$]-[COOH]、[NH_2]-[NLS]-[(转录阻遏物)$_n$]-[dCas9或Cas9]-[COOH]、[NH_2]-[dCas9或Cas9]-[(转录阻遏物)$_n$]-[COOH]或[NH_2]-[(转录阻遏物)$_n$]-[dCas9或Cas9]-[COOH];其中NLS是核定位信号,NH_2是融合蛋白的N-端,且COOH是融合蛋白的C-端。在一些实施方案中,所述融合蛋白包含转录阻遏物的一个或多个重复,例如其中n=1-10(例如,n是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)。在一些实施方案中,n=1-20。在一些实施方案中,将接头插入在dCas9和转录阻遏物结构域之间。在一些实施方案中,将接头插入在核定位信号(NLS)和转录阻遏物和/或dCas9结构域之间。在一些实施方案中,所述NLS位于转录阻遏物的C-端和/或dCas9结构域。在一些实施方案中,所述NLS位于转录阻遏物结构域和dCas9结构域之间。也可以存在额外的特征,诸如序列标签。在一些实施方案中,所述转录阻遏物选自:Kox1的KRAB(Kruppel相关盒)结构域、SID(mSin3相互作用结构域)、HP1α的CS(Chromo Shadow)结构域、Hes1的WRPW结构域、MBD2、MBD3、DNMT家族(DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、DNMT2A)、Rb、Mecp2、Fog1、ROM2、AtHD2A和LSD1。这些和其它阻遏物结构域是本领域已知的,且在一些实施方案中对应于在以下文献中描述的那些:Urrutia,KRAB-containing zinc-finger repressor proteins.Genome Biol.2003;4(10):231;Gilbert等人.CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes.Cell.2013;154,442-451;Konermann等人,Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states.Nature.2013;500,472-476;和公开的美国专利申请系列号14/105,017,公开为U.S.2014/0186958A1,其整个内容通过引用并入本文。在一些实施方案中,所述转录阻遏物结构域包含KRAB结构域的一个或多个重复(例如,2、3、4、5、6、7、8、9或10个重复)。在一些实施方案中,所述KRAB结构域包含选自SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述转录阻遏物结构域包含SID蛋白的一个或多个重复。在一些实施方案中,所述阻遏物结构域包含SID蛋白的2、3、4、5、6、7、8、9或10个重复。在一些实施方案中,所述阻遏物结构域包含SID的4个重复。

[0064] 在一些实施方案中,所述转录调节剂存在于分裂-Cas9系统的一个或两个构建体中。例如,KRAB结构域可以存在于SEQ ID NO:3和/或4中的任一个或两个中。例如,当KRAB序列存在于SEQ ID NO:3中时,所得构建体提供在图8B和SEQ ID NO:10中。

[0065] 术语“指导RNA”、“指导RNA分子”、“gRNA分子”或“gRNA”可互换使用,并表示促进RNA-指导的核酸酶或其它效应分子(通常与gRNA分子形成复合物)靶向特定序列的一组核酸分子。为靶标特异性设计gRNA和供体治疗性多核苷酸的技术是本领域众所周知的。例如,Doench,J.,等人.Nature biotechnology 2014;32(12):1262-7,Mohr,S.等人(2016)FEBS Journal 283:3232-38,and Graham,D.,等人.Genome Biol.2015;16:260。gRNA包含以下多核苷酸,或可替换地基本上由其组成,或者再进一步由其组成:包含CRISPR RNA(crRNA)和反式激活CRIPSPR RNA(tracrRNA)的融合多核苷酸;或包含CRISPR RNA(crRNA)和反式激活CRIPSPR RNA(tracrRNA)的多核苷酸。在一些方面,gRNA是合成的(Kelley,M.等人(2016)J of Biotechnology 233(2016)74-83)。在一些实施方案中,通过gRNA的一部分与DNA的杂交(例如,通过gRNA靶向结构域),以及通过gRNA分子的一部分与RNA-指导的核酸酶或其它效应分子的结合,实现靶向。在实施方案中,gRNA分子由单个连续多核苷酸分子组成,在本文中被称作“单个指导RNA”或“sgRNA”等。在其它实施方案中,gRNA分子由多个、通常两个多核

苷酸分子组成,所述多核苷酸分子本身能够结合(通常通过杂交),在本文中被称作“双指导RNA”或“dgRNA”等。gRNA分子通常包括靶向结构域和tracr。在实施方案中,靶向结构域和tracr位于单个多核苷酸上。在其它实施方案中,靶向结构域和tracr位于分开的多核苷酸上。

[0066] 作为与gRNA结合使用的术语,术语“靶向结构域”是gRNA分子的识别靶序列(例如,与靶序列互补)(例如在细胞的核酸内的靶序列,例如,在基因内)的部分。

[0067] 术语“靶序列”表示与gRNA靶向结构域互补(例如完全互补)的核酸序列。在实施方案中,靶序列位于基因组DNA上。在一个实施方案中,靶序列邻近(在相同链上或在DNA的互补链上)被具有核酸酶或其它效应物活性的蛋白识别的前间隔区序列邻近基序(PAM)序列,例如被Cas9识别的PAM序列。在实施方案中,靶序列是影响Nav1.7基因表达的基因或基因座内的靶序列,例如其影响电压门控钠通道1.7的表达。

[0068] 本公开内容提供了表1中的gRNA靶向序列。应当认识到,表1中的gRNA靶向序列可以通过置换约1-5个碱基对(例如,1、2、3、4或5个碱基对)而变化,只要靶向序列能够与基因组中SCN9A基因中的靶序列杂交。

[0069] 表1:

[0070]

靶向序列(gRNA)
ACAGTGGGCAGGATTGAAA (SEQ ID NO:11)
GCAGGTGCACTCACCGGGT (SEQ ID NO:12)
GAGCTCAGGGAGCATCGAGG(SEQ ID NO:13)
AGAGTCGCAATTGGAGCGC (SEQ ID NO:14)
CCAGACCAGCCTGCACAGT (SEQ ID NO:15)
GAGCGCAGGCTAGGCCTGCA(SEQ ID NO:16)
CTAGGAGTCCGGGATACCC (SEQ ID NO:17)
GAATCCGCAGGTGCACTCAC(SEQ ID NO:18)
GACCAGCCTGCACAGTGGGC(SEQ ID NO:19)
GCGACGCGGTTGGCAGCCGA(SEQ ID NO:20)
GGTCGCCAGCGCTCCAGCGG(SEQ ID NO:21)
GCTTTCCAATTCCGCCAGCT(SEQ ID NO:22)
CAATTCCGCCAGCTCGGCTG(SEQ ID NO:23)

CCCAGCCTCAGCCGAGCTGG(SEQ ID NO:24)
CCGCCAGCTCGGCTGAGGCT(SEQ ID NO:25)
GGAAAGCCGACAGCCGCCGC(SEQ ID NO:26)
AGCGCTCCAGCGGCGGCTGT(SEQ ID NO:27)
GGCGGTCGCCAGCGCTCCAG(SEQ ID NO:28)
CTCAGCCGAGCTGGCGGAAT(SEQ ID NO:29)
TAGCCCAGCCTCAGCCGAGC(SEQ ID NO:30)
GGCGGTCGCCAGCGCTCCAG(SEQ ID NO:31)
GCCACCTGGAAAGAAGAGAG(SEQ ID NO:32)
GGTCGCCAGCGCTCCAGCGG(SEQ ID NO:33)
GCCAGCAATGGGAGGAAGAA(SEQ ID NO:34)
GTTCCAGGTGGCGTAATACA(SEQ ID NO:35)
GGCGGGGCTGCTACCTCCAC(SEQ ID NO:36)
GGGCGCAGTCTGCTTGCAGG(SEQ ID NO:37)
GGCGCTCCAGCGGCGGCTGT(SEQ ID NO:38)
[0071] GACCGGGTGGTTCCAGCAAT(SEQ ID NO:39)
GGGGTGGTTCCAGCAATGGG(SEQ ID NO:40)
GGGCGCAGTCTGCTTGCAGG(SEQ ID NO:41)
TGGGTGCCAGTGGCTGCTAG(SEQ ID NO:42)
TCTGGGCTCCTGTTGCTCAG(SEQ ID NO:43)
GCAGCCCTGAGAGAGCGCCG(SEQ ID NO:44)
GAGCACGGGCGAAAGACCGA(SEQ ID NO:45)
ATAGACACAGGTGGGTGTGG(SEQ ID NO:46)
ATGTGAAAATAGACACAGGT(SEQ ID NO:47)
GATGTGAAAATAGACACAGG(SEQ ID NO:48)
CGAGATGTGAAAATAGACAC(SEQ ID NO:49)
GCCACCTGGAAAGAAGAGAG(SEQ ID NO:50)
AGGGGAGAAGCTTGACCGGG(SEQ ID NO:51)
CGGGTGGTTCCAGCAATGGG(SEQ ID NO:52)
ATAGCTGGGCAGCTCCTGTG(SEQ ID NO:53)
CCACAGAGTCAAAACCGCAC(SEQ ID NO:54)

[0072]

GCTGCCAGGTTCTGAAACTG(SEQ ID NO:55)
CAGGTTCTGAAACTGTGGAA(SEQ ID NO:56)
AAAGGAAGGGTAGCAATGCC(SEQ ID NO:57)
GGAAGGGTAGCAATGCCTGG(SEQ ID NO:58)
ATAAAAGACAGTAAACCACC(SEQ ID NO:59)
TAGATGGACTTCAATTCAAG(SEQ ID NO:60)
GCTTAGCAGATACAACCTGT(SEQ ID NO:61)
CTTAGCAGATACAACCTGTG(SEQ ID NO:62)
AATTTACATGAGAAACTTAG(SEQ ID NO:63)
ATTTACATGAGAAACTTAGG(SEQ ID NO:64)
TTTACATGAGAAACTTAGGG(SEQ ID NO:65)
TCATGAAAATTTGCGACACA(SEQ ID NO:66)
TGATTATATGCAGGCCCTAG(SEQ ID NO:67)
TAATCATGGGAGCCCTTCTG(SEQ ID NO:68)
ATAGAAGCATTACCACAGAA(SEQ ID NO:69)
TAATCAACCCACTTTCTCTG(SEQ ID NO:70)
AACCCACTTTCTCTGTGGCA(SEQ ID NO:71)
gccgtgtagatacagaaaag(SEQ ID NO:72)
gtatagagaatgaattgcag(SEQ ID NO:73)
tgtatagagaatgaattgca(SEQ ID NO:74)
ATTTaaaaaaaaaaaaaaG(SEQ ID NO:75)
AGAGAGTAAACCATATGCTG(SEQ ID NO:76)
gaagagaataggttctggtg(SEQ ID NO:77)
atgtgttttagccacgacct(SEQ ID NO:78)
TCCAACATCAAGACCAACAC(SEQ ID NO:79)
TTCCAACATCAAGACCAACA(SEQ ID NO:80)
TTTGCATACCAAATACTCCA(SEQ ID NO:81)
TTGCATACCAAATACTCCAA(SEQ ID NO:82)
gcctggcatcaagtagtagg(SEQ ID NO:83)
ATCATGGTATGATATTGAGG(SEQ ID NO:84)
AGAAATGTAGTCAGATGAGG(SEQ ID NO:85)

[0073]

CCATAAGTTAGGTTTCCACA(SEQ ID NO:86)
AAACATCAATTTAGACCGTG(SEQ ID NO:87)
TCTCTAAGGAAGGTTCAGAG(SEQ ID NO:88)
GAAGGTTCAGAGAGGCAATG(SEQ ID NO:89)
ATAGTCTGCAAAAATAAAGG(SEQ ID NO:90)
AATTATTTACCAAAAATCTG(SEQ ID NO:91)
ATTGTGGATGTTGTATTGGA(SEQ ID NO:92)
AGGAATGAAACCCTTCTGGG(SEQ ID NO:93)
TGCCAGGCCATGATAAAGTG(SEQ ID NO:94)
ACAGGAGCCCAGAGAAAAAG(SEQ ID NO:95)
GGAGCCCAGAGAAAAAGAAG(SEQ ID NO:96)
ACAGAGTCAAAACCGCACAG(SEQ ID NO:97)
GCGTAAACAGAAATAAAAGA(SEQ ID NO:98)
TCTGCGCTGAGAAATAGGGG(SEQ ID NO:99)
TTTGCTTCTGAAACTCAGCA(SEQ ID NO:100)
GTTGCTGTGCTGAGTTTCAG(SEQ ID NO:101)
CTACTTTTTTCCTTGCCACA(SEQ ID NO:102)
gctgaaatggagtaataagg(SEQ ID NO:103)
atagagaatgaattgcaggg(SEQ ID NO:104)
gaatagtgcctggcatcaag(SEQ ID NO:105)
GTAATGCATTCTTAGAAAGG(SEQ ID NO:106)
GTAGAGTTAGATTACCACTT(SEQ ID NO:107)

[0074] 在一个实施方案中,本公开内容提供了一种重组基因阻遏物复合物,其包含与转录阻遏物融合的核酸酶失活的Cas9蛋白,并且其中所述核酸酶失活的Cas9与指导RNA相关,其中所述指导RNA具有选自SEQ ID NO:11-107的序列,以及具有1-5(例如,1、2、3、4或5)个碱基对置换的SEQ ID NO:11-107中任一个的序列,其中gRNA可以结合SCN9A基因中的靶序列以阻遏该基因的表达。在一个实施方案中,所述核酸酶失活的Cas9呈分裂的Cas9的形式。失活的Cas9可以得自和/或衍生自任何Cas9蛋白。在另一个实施方案中,从空肠弯曲杆菌工程改造核酸酶失活的Cas9。在另一个实施方案中,所述核酸酶失活的Cas9包含SEQ ID NO:2或与其具有至少70%、至少90%-99%同一性的序列。在另一个或其它实施方案中,所述转录阻遏物是KRAB。在另一个实施方案中,所述KRAB包含在SEQ ID NO:7中所示的序列或与SEQ ID NO:7具有70%-99%同一性且可以阻遏基因转录的序列。

[0075] 参考图8A-C中的构建体,将表1的gRNA序列中的至少一个克隆进U6启动子下游紧邻处的AgeI位点。

[0076] 如在下面进一步讨论的,使用包括慢病毒载体和腺病毒载体在内的各种病毒载体,可以递送重组基因阻遏物复合物。

[0077] 本公开内容还提供了包含锌指DNA结合蛋白的重组基因阻遏物复合物。

[0078] 本文中使用的"聚腺苷酸"表示腺苷的聚合物。聚腺苷酸序列可以得自,例如,SV40聚腺苷酸、牛生长激素聚腺苷酸(bGHpA)、兔β-珠蛋白聚腺苷酸等。

[0079] "调节元件"可以用于所述方法和组合物中以改善从病毒载体的表达。例如,土拨鼠肝炎病毒调节元件(WPRE)可以用于增强来自病毒载体的dCas9构建体的表达。WPRE的序列是已知的(参见,例如,WIKIPEDIA中的"WHP Posttranscriptional Response Element";[https://]en.wikipedia.org/wiki/WHP_Posttranscriptional_Response_Element)。

[0080] 参考在图8A-C和9中呈现的构建体,本领域技术人员会注意到所述结构是模块化的,且因此可以将本文提供的不同"聚腺苷酸"序列克隆进本公开内容的载体中;可以将不同的启动子置换到载体中以代替图8A-C和9中的"CMV"(例如,CMV启动子可以被另一种polII启动子诸如RSV启动子替换);不同的polIII启动子可以置换图8A-C等中的U6启动子。

[0081] "锌指DNA结合蛋白"(或结合结构域)是一种蛋白或在较大蛋白内的结构域,其通过一个或多个锌指以序列特异性方式结合DNA,所述锌指是在结合结构域内的氨基酸序列区域,所述结合结构域的结构通过锌离子的配位而稳定。术语锌指DNA结合蛋白经常缩写为锌指蛋白、ZF或ZFP。单个DNA结合结构域通常被称为"手指"。ZFP具有至少一个手指,通常2、3、4、5、6个或更多个手指。每个手指结合2-4个DNA碱基对,通常3或4个DNA碱基对。ZFP结合被称为靶位点或靶区段的核酸序列。每个手指通常包含大约30个氨基酸的锌螯合DNA结合子结构域。表征这些蛋白中的一类(C_2H_2类)的示例性基序是-Cys-$(X)_{2-4}$-Cys-$(X)_{12}$-His-$(X)_{3-5}$-His(其中X是任意氨基酸)(SEQ ID NO:143)。其它类别的锌指蛋白是已知的,并且可用于方法的实践以及本文公开的组合物的制备和使用(参见,例如,Rhodes等人(1993)Scientific American 268:56-65和美国专利申请公开号2003/0108880)。研究已经证实,此类的单个锌指由含有与锌配位的两个不变组氨酸残基的α螺旋以及单个β转角的两个半胱氨酸残基组成(参见,例如,Berg和Shi,Science 271:1081-1085(1996))。ZFP的单个靶位点通常具有约四个到约十个碱基对。通常,两指ZFP识别四到七个碱基对的靶位点,三指ZFP识别六到十个碱基对的靶位点,四指ZFP识别12到14个碱基对的靶位点,且六指ZFP识别18到20个碱基对的靶位点,其可以包含两个相邻的9-10个碱基对的靶位点或三个相邻的6-7个碱基对的靶位点。

[0082] 对于包含经工程改造的锌指结合结构域的那些实施方案,锌指结构域被工程改造以结合特定靶位点。结合结构域含有多个锌指(例如,2、3、4、5、6个或更多个锌指)。一般而言,单个锌指结合3-4个核苷酸的亚位点。亚位点在靶位点中可以是连续的(并且在一些情况下是重叠的);或者,一个亚位点与相邻亚位点之间可以有一个、两个、三个或更多个核苷酸的间隙。通过在相邻的锌指之间使用非规范的、较长的接头序列,促进与被一个或多个核苷酸的间隙隔开的亚位点的结合。

[0083] 本公开内容提供了如表2中所列的锌指靶标。表2提供了在SCN9A基因序列中的鼠和人靶位点。

[0084] 表2:

[0085]

名称	靶序列
mScn10a_1 (ZF-1)	tgAGTGACGGACGGGTGAGGtttccgtc (SEQ ID NO:108)
mScn10a_2 (ZF-2)	ttCGTGGAGGAGCCCCGGACaagtnnnn(SEQ ID NO:109)
mScn10a_3 (ZF-3)	atGGTGCTCCAGAAAGTACActctgaat(SEQ ID NO:110)
mScn10a_4 (ZF-4)	tgAGTGACGGACGGGTGAGGtttccgtc(SEQ ID NO:111)
hSCN9A_1	AGTCTGCTTGCAGGCGGT(SEQ ID NO:112)
hSCN9A_2	CCAGCGGCGGCTGTCGGC(SEQ ID NO:113)
hSCN9A_3	GCCTGGGTGCCAGTGGCT(SEQ ID NO:114)
hSCN9A_4	TGGCTGCTAGCGGCAGGC(SEQ ID NO:115)
hSCN9A_5	GCGTCCCCTGAGCAACAG(SEQ ID NO:116)

[0086]

hSCN9A_6	AAGGAGAGGCCCGCGCCC(SEQ ID NO:117)
hSCN9A_7	GCAGGTGCACTGGGTGGG(SEQ ID NO:118)
hSCN9A_8	GCGCCCGTGGAGGTAGCA(SEQ ID NO:119)
hSCN9A_9	TGCCAGGGCGCGCCCGTG(SEQ ID NO:120)
hSCN9A_10	ACAGCCGCCGCTGGAGCG(SEQ ID NO:121)
hSCN9A_11	CCAGGAGAGGGCGCGGGC(SEQ ID NO:122)

[0087] 使用上述靶向序列,本领域技术人员可以设计锌指蛋白以结合这些序列。例如,使用本领域已知的方法,设计锌指阻遏物构建体以结合SEQ ID NO:108、109、110或111。锌指阻遏物构建体包含如下表3中列出的6个锌指,其中锌指的靶向氨基酸包含6-12个氨基酸。

[0088] 表3(粗体/下划线=KRAB阻遏物序列;双下划线区域是锌指靶区域):

SEQ NO:123

MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKKRKVGIHGVPAAMAERPFQCRICMRNFSRSDH 60

SEQ NO:124

MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKKRKVGIHGVPAAMAERPFQCRICMRNFSDRSN 60

SEQ NO:125

MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKKRKVGIHGVPAAMAERPFQCRICMRNFSQSGD 60

SEQ NO:126

MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKKRKVGIHGVPAAMAERPFQCRICMRNFSQSGN 60

[0089]

123	LSQHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSAVRKNHTKIHTGSQKPFQCRICMRNFSRSDHLSE	120
124	LSRHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDDRKTHTKIHTGSQKPFQCRICMRNFSERGTLAR	120
125	LTRHIRTHTGEKPFACDICGRKFALAHHLVQHTKIHTGSQKPFQCRICMRNFSQSGNLAR	120
126	LARHIRTHTGEKPFACDICGRKFARLDILQQHTKIHTGSQKPFQCRICMRNFSRSDVLSE	120

123	HIRTHTGEKPFACDICGRKFAQSHHRKTHTKIHTGSQKPFQCRICMRNFSDRSNLSRHIR	180
124	HIRTHTGEKPFACDICGRKFAQSGHLSRHTKIHTGSQKPFQCRICMRNFSQSGHLARHIR	180
125	HIRTHTGEKPFACDICGRKFAQRIDLTRHTKIHTGSQKPFQCRICMRNFSQSSDLSRHIR	180
126	HIRTHTGEKPFACDICGRKFATRNGLKYHTKIHTGSQKPFQCRICMRNFSQSSDLSRHIR	180

123 THTGEKPFACDICGRKFALKQHLNEHTKIHLRQKDAARG**SRTLVTFKDVFVDFTREEWKL**

240

124 THTGEKPFACDICGRKFAVSHHLRDHTKIHLRQKDAARG**SRTLVTFKDVFVDFTREEWKL**

240

125 THTGEKPFACDICGRKFAWHSSLHQHTKIHLRQKDAARG**SRTLVTFKDVFVDFTREEWKL**

240

126 THTGEKPFACDICGRKFARKYYLAKHTKIHLRQKDAARG**SRTLVTFKDVFVDFTREEWKL**

[0090] 240

**********____*_**********

123 **LDTAQQIVYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEP**WLVDYKDDDDKRS 295

124 **LDTAQQIVYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEP**WLVDYKDDDDKRS 295

125 **LDTAQQIVYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEP**WLVDYKDDDDKRS 295

126 **LDTAQQIVYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEP**WLVDYKDDDDKRS 295

****

[0091] 人Nav1.7表达由ZFP通过与具有表2中所列核酸序列(例如,SEQ ID NO:108-122或其子序列)的靶位点结合来调节。鼠Nav1.7表达由ZFP通过与具有SEQ ID NO:108、109、110或111的序列的靶位点结合来调节。NAV1.7的物种变体(诸如鼠SCN10A)可以在该物种中与SEQ ID NO:108、109、110或111的相应位点(即具有最大序列同一性的位点)进行调节。包含单个锌指所主要接触的亚位点的核苷酸以大写字母显示。在亚位点之间的核苷酸以小写字母显示。

[0092] 可以阻遏小鼠同系物(SCN10A)中的Nav1.7表达的示例性ZFP-KRAB序列提供于SEQ ID NO:123-126,其中每个序列包括6个手指结构域和从氨基酸220到282的KRAB序列。

[0093] 使用含有编码一种或多种锌指或CRISPR/Cas蛋白的序列的载体,可以递送如本文所述的锌指或CRISPR/Cas蛋白。可以使用任何载体系统,包括、但不限于,质粒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、痘病毒载体、疱疹病毒载体和腺相关病毒载体等。也参见,美国专利号6,534,261、6,607,882、6,824,978、6,933,113、6,979,539、7,013,219和7,163,824,其通过引用整体并入本文。此外,显而易见,这些载体中的任何一种可以包含一个或多个锌指蛋白编码序列。因此,当将一种或多种ZFP或CRISPR/Cas蛋白引入细胞时,编码ZFP或CRISPR/Cas蛋白的序列可以承载在同一载体或不同载体上。当使用多个载体时,每个载体可以包含编码一个或多个ZFP或CRISPR/Cas系统的序列。

[0094] 常规的基于病毒和非病毒的基因转移方法可以用于将编码经工程改造的ZFP或CRISPR/Cas系统的核酸引入细胞(例如,哺乳动物细胞)和靶组织中。此类方法还可以用于向体外细胞施用编码ZFP或CRISPR/Cas系统的核酸。在某些实施方案中,为了体内或离体基因治疗用途,施用编码ZFP或CRISPR/Cas系统的核酸。非病毒载体递送系统包括DNA质粒、裸露核酸和与递送媒介物(诸如脂质体或泊洛沙姆)形成复合物的核酸。病毒载体递送系统包括DNA和RNA病毒,它们在递送给细胞后具有附加的或整合的基因组。基因疗法程序是已知

的,参见Anderson(1992)Science 256:808-813;Nabel和Felgner(1993)TIBTECH 11:211-217;Mitani和Caskey(1993)TIBTECH 11:162-166;Dillon(1993)TIBTECH 11:167-175;Miller(1992)Nature 357:455-460;Van Brunt(1988)Biotechnology 6(10):1149-1154;Vigne(1995)Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36;Kremer和Perricaudet(1995)British Medical Bulletin 51(1):31-44;Haddada,等人,Current Topics in Microbiology and Immunology Doerfler和Bohm(编)(1995);和Yu,等人(1994)Gene Therapy 1:13-26。

[0095] 核酸的非病毒递送方法包括电穿孔、脂转染、显微注射、生物弹道技术、病毒体、脂质体、免疫脂质体、外核体、聚阳离子或脂质:核酸缀合物、裸露DNA、裸露RNA、人工病毒粒子和试剂增强的DNA摄取。使用例如Sonitron 2000系统(Rich-Mar)的声致穿孔也可用于递送核酸。在一个实施方案中,一种或多种核酸作为mRNA递送。同样在一些实施方案中,加帽的mRNA可用于增加翻译效率和/或mRNA稳定性。

[0096] 其它示例性核酸递送系统包括由Amaxa Biosystems(Cologne,Germany)、Maxcyte,Inc.(Rockville,Md.)、BTX Molecular Delivery Systems(Holliston,Mass.)和Copernicus Therapeutics Inc提供的那些(参见例如美国专利号6,008,336)。脂转染描述于例如美国专利号5,049,386、4,946,787和4,897,355中,且脂转染试剂是商业销售的(例如,Transfectam™和Lipofectin™和Lipofectamine™ RNAiMAX)。适用于多核苷酸的有效受体-识别脂转染的阳离子和中性脂质包括Felgner、国际专利公开号WO 91/17424和WO 91/16024的那些。递送可以是向细胞(离体施用)或靶组织(体内施用)。

[0097] 脂质:核酸复合物(包括靶向脂质体诸如免疫脂质复合物)的制备是本领域技术人员众所周知的(参见,例如,Crystal(1995)Science 270:404-410(1995);Blaese,等人(1995)Cancer Gene Ther.2:291-297;Behr,等人(1994)Bioconjugate Chem.5:382-389;Remy,等人(1994)Bioconjugate Chem.5:647-654;Gao,等人(1995)Gene Therapy 2:710-722;Ahmad,等人(1992)Cancer Res.52:4817-4820;美国专利号4,186,183;4,217,344;4,235,871;4,261,975;4,485,054;4,501,728;4,774,085;4,837,028;和4,946,787)。

[0098] 其它递送方法包括将待递送的核酸包装到EnGenelC递送媒介物(EDV)中。使用双特异性抗体将这些EDV特异性地递送至靶组织,其中抗体的一个臂对靶组织具有特异性,且另一个臂对EDV具有特异性。抗体将EDV带到靶细胞表面,且然后通过胞吞作用将EDV带入细胞。一旦进入细胞,内容物就被释放(参见MacDiarmid,等人(2009)Nature Biotechnology 27(7):643)。

[0099] 基于RNA或DNA病毒的系统用于递送编码经工程改造的ZFP或CRISPR/Cas系统的核酸的应用,利用了高度进化的过程将病毒靶向至体内的特定细胞并将病毒有效负载运送到细胞核。病毒载体可以直接施用于患者(体内),或者它们可以用于处理体外细胞,并将修饰的细胞施用于患者(离体)。用于递送ZFP或CRISPR/Cas系统的常规的基于病毒的系统包括、但不限于用于基因转移的逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒、痘苗病毒和单纯疱疹病毒载体。

[0100] 对于逆转录病毒、慢病毒和腺相关病毒基因转移方法,整合到宿主基因组中是可能的,经常导致插入的转基因的长期表达。此外,在许多不同的细胞类型和靶组织中已经观察到了高转导效率。

[0101] 通过整合外源包膜蛋白、扩大靶细胞的潜在靶标群体,可以改变逆转录病毒的趋向性。慢病毒载体是能够转导或感染非分裂细胞并且通常产生高病毒滴度的逆转录病毒载体。逆转录病毒基因转移系统的选择取决于靶组织。逆转录病毒载体包含具有高达6-10kb外源序列的包装能力的顺式作用长末端重复序列。最小的顺式作用LTR足够用于载体的复制和包装,其然后被用于将治疗性基因整合到靶细胞中以提供永久的转基因表达。广泛使用的逆转录病毒载体包括基于小鼠白血病病毒(MuLV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)、人免疫缺陷病毒(HIV)及其组合的那些(参见,例如,Buchscher,等人(1992)J.Virol.66:2731-2739;Johann,等人(1992)J.Virol.66:1635-1640;Sommerfelt,等人(1990)Virol.176:58-59;Wilson,等人(1989)J.Virol.63:2374-2378;Miller,等人(1991)J.Virol.65:2220-2224(1991);PCT/US94/05700)。

[0102] 在其中期望瞬时表达的应用中,可以使用基于腺病毒的系统。基于腺病毒的载体在许多细胞类型中能够具有非常高的转导效率,并且不需要细胞分裂。使用此类载体,已获得高滴度和高表达水平。在相对简单的系统中,可大量产生该载体。还使用腺相关病毒("AAV")载体以用靶核酸转导细胞,例如,在核酸和肽的体外产生中和用于体内和离体基因治疗程序(参见,例如,West,等人(1987)Virology 160:38-47;美国专利号4,797,368;国际专利公开号WO 93/24641;Kotin(1994)Human Gene Therapy 5:793-801;Muzyczka(1994)J.Clin.Invest.94:1351)。重组AAV载体的构建描述于许多出版物中,包括美国专利号5,173,414;Tratschin,等人(1985)Mol.Cell.Biol.5:3251-3260;Tratschin,等人(1984)Mol.Cell.Biol.4:2072-2081;Hermonat和Muzyczka(1984)PNAS 81:6466-6470;和Samulski,等人(1989)J.Virol.63:3822-3828。

[0103] 至少6种病毒载体方案目前可在临床试验中用于基因转移,其利用涉及插入辅助细胞系的基因与缺陷型载体的互补来产生转导剂的方案。

[0104] pLASN和MFG-S是已用于临床试验中的逆转录病毒载体的例子(Dunbar,等人(1995)Blood 85:3048-305;Kohn,等人(1995)Nat.Med.1:1017-102;Malech,等人(1997)PNAS 94(22):12133-12138)。PA317/pLASN是用于基因治疗试验中的第一种治疗性载体(Blaese,等人(1995)Science 270:475-480)。关于MFG-S包装的载体,已观察到50%或更大的转导效率(Ellem,等人(1997)Immunol Immunother 44(1):10-20;Dranoff,等人(1997)Hum.Gene Ther.1:111-112。

[0105] 重组腺相关病毒载体(rAAV)是基于缺陷型和非病原性细小病毒腺相关2型病毒的有前途的替代基因递送系统。所有载体都衍生自仅保留侧接转基因表达盒的AAV 145bp反向末端重复(ITR)的质粒。由向转导细胞的基因组中的整合引起的有效基因转移和稳定转基因递送是该载体系统的关键特征(Wagner,等人(1998)Lancet 351(9117):1702-1703;Kearns,等人(1996)Gene Ther.9:748-55)。根据本公开内容还可以使用其它AAV血清型,包括AAV1、AAV3、AAV4、AAVS、AAV6、AAV8AAV 8.2、AAV9和AAV rh10和假型AAV诸如AAV2/8、AAV2/5和AAV2/6。

[0106] 可以以高滴度产生复制缺陷型重组腺病毒载体(Ad),并且容易地感染许多不同的细胞类型。大多数腺病毒载体被工程改造,使得转基因替代Ad E1a、E1b和/或E3基因;随后复制缺陷型载体在以反式提供缺失基因功能的人293细胞中增殖。Ad载体可以在体内转导多种类型的组织,包括非分裂的、分化的细胞,诸如在肝、肾和肌肉中的发现的那些。常规Ad

载体具有大的运载容量。Ad载体在临床试验中的应用的一个例子涉及用于通过肌肉内注射的抗肿瘤免疫接种的多核苷酸治疗(Sterman,等人(1998)Hum.Gene Ther.7:1083-1089)。腺病毒载体在临床试验中用于基因转移的应用的其它例子包括Rosenecker,等人(1996)Infection 24(1):5-10;Sterman,等人(1998)Hum.Gene Ther.9(7):1083-1089;Welsh,等人(1995)Hum.Gene Ther.2:205-218;Alvarez,等人(1997)Hum.Gene Ther.5:597-613;Topf,等人(1998)Gene Ther.5:507-513;Sterman,等人(1998)Hum.Gene Ther.7:1083-1089。

[0107] 包装细胞用于形成能够感染宿主细胞的病毒颗粒。此类细胞包括包装腺病毒的293细胞以及包装逆转录病毒的Ψ2细胞或PA317细胞。用于基因疗法中的病毒载体通常由将核酸载体包装到病毒颗粒中的生产细胞系产生。所述载体通常含有包装和随后整合到宿主中(如果适用的话)所需的最小病毒序列、被编码待表达的蛋白的表达盒替代的其它病毒序列。缺失的病毒功能由包装细胞系以反式提供。例如,用于基因疗法中的AAV载体通常仅具有包装和整合进宿主基因组中所需的来自AAV基因组的反向末端重复(ITR)序列。病毒DNA被包装到含有编码其它AAV基因(即rep和cap)、但缺少ITR序列的辅助质粒的细胞系中。还用腺病毒作为辅助病毒感染该细胞系。辅助病毒促进AAV载体的复制和来自辅助质粒的AAV基因的表达。由于缺少ITR序列,不以显著的量包装辅助质粒。通过例如热处理(腺病毒对热处理比AAV更敏感),可以减少腺病毒的污染。

[0108] 在许多基因治疗应用中,合乎需要的是,将基因治疗载体以高度特异性递送至特定组织类型。相应地,通过表达配体作为与病毒外表面上的病毒外壳蛋白的融合蛋白,可以将病毒载体修饰成具有对给定细胞类型的特异性。选择对已知存在于感兴趣的细胞类型上的受体具有亲和力的配体。例如,Han,等人(1995)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:9747-9751报道,莫洛尼小鼠白血病病毒可被修饰成表达与gp70融合的人类调蛋白,并且重组病毒感染表达人类表皮生长因子受体的某些人类乳腺癌细胞。该原理可以扩展至其它病毒-靶细胞对,其中靶细胞表达受体且病毒表达融合蛋白,所述融合蛋白包含细胞-表面受体的配体。例如,丝状噬菌体可被工程改造成展示对基本上任何选择的细胞受体具有特异性结合亲和力的抗体片段(例如,FAB或Fv)。尽管上述描述主要应用于病毒载体,但同样的原理可应用于非病毒载体。此类载体可被工程改造成含有促进特定靶细胞摄取的特定摄取序列。

[0109] 通过施用于单个患者,通常如下文所述通过全身施用(例如,静脉内、腹膜内、肌肉内、真皮下、鞘内或颅内输注)或局部应用,可在体内递送基因疗法载体。或者,可以将载体递送至离体细胞,诸如从单个患者移出的细胞(例如,淋巴细胞、骨髓抽吸物、组织活组织检查样品)或通用供体造血干细胞,然后将细胞重新植入患者,通常在选择已经整合载体的细胞之后。

[0110] 含有治疗性ZFP核酸或CRISPRi的载体(例如,逆转录病毒、腺病毒、脂质体等)还可以直接施用于生物体用于转导体内细胞。或者,可以施用裸露DNA。施用是通过正常用于将分子引入最终与血细胞或组织细胞接触的任何途径,包括、但不限于注射、输注、局部应用和电穿孔。施用此类核酸的合适方法是本领域技术人员可得的和众所周知的,并且尽管可以使用超过一种途径来施用特定组合物,但是特定途径经常可以提供比另一种途径更立即和更有效的反应。

[0111] 药学上可接受的载体部分地通过要施用的特定组合物以及用于施用所述组合物

的特定方法来确定。因此,存在广泛的多种可得的药物组合物的合适制剂,如下文所述(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,第17版)。

[0112] 将本公开内容的Cas9复合物和锌指-融合构建体用于在不同的动物模型中抑制痛知觉。由于痛知觉在病因学上是多样的和多因素的,因此利用几种啮齿动物疼痛模型来研究疼痛信号传导和疼痛行为。本文所述的研究使用三种在机制上不同的模型评价了CRISPR介导的$Na_V1.7$敲低的影响:(i)对照(正常)和单侧炎症致敏的后爪的热敏感性;(ii)由化疗剂诱导的多发性神经病,从而产生两侧后爪触觉痛觉超敏,以及(iii)由嘌呤受体的脊髓激活诱导的、脊髓诱发的两侧后爪触觉痛觉超敏。由组织损害和炎症引起的疼痛源自使伤害性传入神经元的外周末梢敏感的因子的释放。通过在爪子上局部应用角叉菜胶从而导致炎症、肿胀、增加的$Na_V1.7$表达以及热和机械敏感性的稳健增加(痛觉过敏),可以研究这种表型。用于治疗癌症的化疗经常导致多发性神经病,其特征在于增加的对轻触(例如触觉痛觉超敏)和寒冷的敏感性。紫杉醇是一种常用的化疗剂,其增加伤害性传入神经中$Na_V1.7$的表达并在动物模型中诱导稳健的痛觉超敏。最后,ATP(腺苷三磷酸)通过作用于在传入末梢和二级神经元和非神经元细胞上表达的多种嘌呤受体,已经广泛涉及炎症性、内脏和神经性疼痛状态。因而,稳定的ATP类似物(BzATP:2',3'-O-(4-苯甲酰基苯甲酰基)-ATP)的鞘内递送导致小鼠中持久的痛觉超敏。

[0113] 本文提供了各种KRAB-CRISPR-dCas9和ZFP-KRAB构建体,并研究了它们在小鼠神经母细胞瘤细胞系中阻遏$Na_V1.7$(Neuro2a)的表达。这些构建体可以包装到逆转录病毒系统中进行递送。例如,将经测试具有体外阻遏的构建体包装到AAV9中并鞘内地注射到成年C57BL/6J小鼠中。21天后,通过注射角叉菜胶诱导爪炎症。然后评价热痛觉过敏。在本文呈现的示例性研究中,使用本公开内容的构建体对$Na_V1.7$的体内阻遏提供了热痛觉过敏的降低。在两种神经性疼痛模型中进一步测试了所述构建体:化疗诱导的(紫杉醇)和BzATP诱导的神经性疼痛。在紫杉醇诱导的神经性疼痛模型中的结果指示,使用本公开内容的构建体对$Na_V1.7$的阻遏导致减少的触觉和冷痛觉超敏。此外,KRAB-CRISPR-dCas9注射的小鼠在施用ATP类似物BzATP后显示减少的触觉痛觉超敏。由于许多疼痛状态发生在导致持久病况的慢性炎症和神经损伤之后,通常需要不断的重新用药,本公开内容的遗传方案提供了对这种异常处理和持久疼痛的持续和可控调节。本文描述的原位表观遗传方案代表了阿片样物质的可行替代品,并充当长期慢性疼痛的潜在治疗方案。

[0114] 在本文呈现的实验中,使用两种不同的本公开内容的基因组工程改造构建体KRAB-dCas9和锌指-KRAB蛋白评价了在背根神经节中的$Na_V1.7$阻遏的效力。发现本公开内容的基因组编辑构建体可有效阻遏在周围炎症和多发性神经病的动物模型中产生的急性和持久伤害性处理。本公开内容的基因组编辑构建体从测试使用计算机芯片上工具合理设计的多个指导-RNA(gRNA)克隆而发现,所述工具基于染色质位置和序列特征预测有效gRNA进入分裂-dCas9平台。类似地,还开发了多个ZFP-KRAB $Na_V1.7$DNA靶向构建体。将本公开内容的基因组编辑构建体转染到表达$Na_V1.7$(Neuro2a)的鼠神经母细胞瘤细胞系中。证实了$Na_V1.7$的阻遏。选择显示最高阻遏水平的构建体用于随后的体内研究。

[0115] 尽管其它技术(诸如RNAi)已被用于靶向$Na_V1.7$,但研究已经显示,与CRISPRi相比,RNAi的脱靶效远比人们通常预期的更强大和更普遍。此外,作为外源系统,CRISPR和ZFP(与RNAi不同)不与内源机制(诸如微RNA或RISC复杂功能)竞争。因此,RNAi可以对RNA合成

和降解的常规稳态机制产生影响。另外,CRISPR和ZFP方法靶向基因组DNA而不是RNA,这意味着要达到效果,RNAi方法需要更高的剂量且具有更差的药代动力学前景,因为通常存在高RNA周转率。

[0116] 研究已经显示,$Na_V1.7$的部分阻遏足以减轻疼痛。这种敲低用于产生由后爪炎症诱导的痛觉过敏的显著逆转。使用反义寡核苷酸,可以以30-80%$Na_V1.7$阻遏水平改善机械疼痛。使用微RNA 30b,$Na_V1.7$的约50%阻遏解除神经性疼痛,而最近微RNA182改善了疼痛,从而防止多余的神经损伤大鼠中的$Na_V1.7$过表达。类似地,shRNA介导的$Na_V1.7$敲低阻止了其在减轻疼痛的烧伤损伤中的过表达。其它研究没有定量减轻疼痛所需的$Na_V1.7$阻遏水平。此外,shRNA慢病毒载体可以通过使$Na_V1.7$阻遏40-60%来减轻骨癌疼痛。

[0117] $Na_V1.7$的作用已经涉及多种临床前模型,包括与啮齿动物角叉菜胶和CFA模型中的稳健炎症相关的那些。因此,使用本公开内容的基因组编辑构建体研究了在紫杉醇诱导的多发性神经病中敲低$Na_V1.7$的效果。以前的研究已经显示,这种处理会诱导$Na_V1.7$。两种表观遗传阻遏物都在与内部比较物加巴喷丁相同的程度上改善触觉痛觉超敏。最后,评估了使用本公开内容的基因组编辑构建体敲低的$Na_V1.7$在通过鞘内注射BzATP诱导的痛觉过度中的作用。已显示脊髓嘌呤受体在各种刺激条件(包括炎症性/切口疼痛和多种神经病)引发的伤害性处理中发挥重要作用。本研究指示,在伤害感受器中的传入$Na_V1.7$表达的阻遏导致中枢诱导的增强的触觉敏感性的抑制。这些结果背后的机制可能反映了以下观察结果:传入神经中$Na_V1.7$的下调可能有助于使小胶质细胞和星形胶质细胞的激活最小化。这些结果至少部分地提示,通过$Na_V1.7$的疼痛信号转导是ATP信号传导的下游。加巴喷丁被选为阳性对照,因为有证据表明它减少啮齿动物中角叉菜胶诱导的热痛觉过敏,并且因为已知它阻遏$Na_V1.7$。使用本公开内容的基因组编辑构建体的结果与以前的研究一致,以前的研究已经显示加巴喷丁对$Na_V1.7$表达水平的抑制作用,最终导致神经元兴奋性的降低。

[0118] 本文公开的方法使用本文公开的基因组编辑构建体证明了$Na_V1.7$的脊髓减少在三种痛觉过度模型中的效力。本文呈现的研究清楚地确立了显著的靶标接合和明确的治疗效果,当使用本公开内容的基因组编辑构建体时在$Na_V1.7$的鞘内敲低之后没有明显的不利事件。$Na_V1.7$所起的作用是在伤害性传入神经中,并且它们的细胞体是在各自的节段DRG神经元中。因此,DRG代表该转染基序的靶标。鞘内递送途径有效地将AAV放置到DRG神经元,这使脱靶生物分布的可能性最小,并减少了获得转导所需的病毒载量。在一个特定实施方案中,鞘内施用本公开内容的基因组编辑构建体。重要的是,B和T细胞在脑脊液中的相对缺失使潜在的免疫应答最小。在这点上,由于ZFP是在人类蛋白载体上工程改造的,因此它们固有地构成了一种具有甚至更低潜在免疫原性的靶向方案。实际上,在非人灵长类动物(NHP)中的研究发现,非自身蛋白(AAV9-GFP)的鞘内递送产生免疫应答,而这在自体蛋白的递送中是看不到的。

[0119] 本文呈现的结果指示,本公开内容的基因组编辑构建体对于短期和长期时间段而言都具有有利的靶标结合特性和效力。因此,清楚地指出了使用本公开内容的基因组编辑构建体进行持续疼痛控制的方法。作为一种潜在的临床治疗,本公开内容的基因组编辑构建体(例如,KRAB-dCas9和ZFP-KRAB)显示用于治疗慢性炎症性和神经性疼痛的前景。这些系统允许瞬时基因疗法,这在慢性疼痛的框架中是有利的,因为不期望永久的疼痛不敏感性。虽然治疗是短暂的,但与必须每天或每小时服用且可能具有不希望的成瘾作用的现有

药物相比,长达数周的持续时间仍然呈现显著优势。总之,这些研究的结果显示了有前途的用于治疗慢性疼痛的新途径,所述慢性疼痛是我们的社会中的一个重要且日益紧迫的问题。应当指出,该治疗方案解决了一个关键的疼痛表型:持久但可逆的疼痛状态。被定义为持续超过3个月的疼痛状态的慢性疼痛不一定是不可逆的。由于医学的进步,癌症存活者的数量在过去几十年中稳步增加。这种增加已经导致癌症相关副作用的数量的随后增加,并且化疗诱导的多发性神经病是最常见的不良事件之一。在这种情况下,持续数月的治疗方案比不可逆的治疗方案优选。此外,随着时间的推移,多次轴索干预的应用是临床干预的常见主题,如硬膜外类固醇,其中可能以几个月的间隔在一年中进行重复硬膜外递送。

[0120] 因此,本公开内容提供了一种表观遗传的方案来治疗具有疼痛的受试者,其使用包含与阻遏物结构域融合的锌指(ZF)和/或与阻遏物结构域融合的dCas9的构建体,其中dCas9是催化失活的Cas9,其不会切割DNA,但是维持它的通过指导-RNA(gRNA)结合基因组的能力。本文描述的表观遗传方案允许瞬时基因疗法,这在慢性疼痛的框架中是有利的,因为不需要永久性疼痛不敏感性。虽然治疗是短暂的,但与必须每天或每小时服用且可能具有不希望的成瘾作用的现有药物相比,长达数周的持续时间仍然具有显著优势。总之,使用本文描述的ZF-阻遏物结构域构建体和/或dCas9-阻遏物结构域构建体的表观遗传方案为慢性疼痛的治疗提供了新的途径,所述慢性疼痛是社会上一个重要且日益紧迫的问题。

[0121] 在另一个实施方案中,ZF-阻遏物结构域构建体和/或dCas9-阻遏物结构域构建体由腺相关病毒(AAV)包装和表达。此类AAV系统的应用非常适合将在外科手术前施用病毒的患者,或用于慢性疼痛患者,在这种情况下,患者的疼痛每次减轻约一个月。在一个特定实施方案中,AAV是AAV9。如本文的结果所示,使用本公开内容的ZF-阻遏物结构域构建体和/或dCas9-阻遏物结构域构建体的表观遗传方案在炎症性慢性疼痛模型中是有效的,并且可用于其它疼痛模态,包括、但不限于神经性疼痛、手术后疼痛、偏头痛和癌症诱导的疼痛。在另一个实施方案中,本文所述的ZF-阻遏物结构域构建体和/或dCas9-阻遏物结构域构建体可以设计为调节额外的基因,包括、但不限于Nav1.3、Nav1.9、TRPV1/2/3/4、Nav1.8、P2X4、P2X7、Atp1b3、Mapk8、Avpr1a、Calca、Htr1b、Oprm1、Mc1r、Kcnk9、KCNQ、TLR2/3。

[0122] 本公开内容进一步提供了用于指定施用模式的包含本文所述的ZF-阻遏物结构域构建体和/或dCas9-阻遏物结构域构建体的药物组合物和制剂。在一个实施方案中,本文所述的ZF-阻遏物结构域构建体和/或dCas9-阻遏物结构域构建体是包含药学上可接受的载体的组合物中的活性成分。这样的组合物在本文中被称作药物组合物。“药学上可接受的载体”是指将靶向递送组合物混合和/或递送至受试者的任何药学上可接受的方式。本文中使用的术语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或媒介物,诸如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包囊材料,其参与将主题药剂从一个器官或身体部分携带或运输到另一个器官或身体部分。每种载体必须是“可接受的”,其含义是,与组合物的其它成分相容并且与施用给受试者(例如人)相容。此类组合物可以专门配制用于通过多种途径中的一种或多种施用,诸如本文所述的施用途径。补充性活性成分也可以掺入组合物中。当向受试者施用本文所述的药剂、制剂或药物组合物时,优选地,施用治疗有效量。本文中使用的术语“治疗有效量”表示,导致病况的改善或补救的量。

[0123] 药物组合物向受试者的施用是通过其中包含的ZF-阻遏物结构域构建体和/或dCas9-阻遏物结构域构建体将接触靶细胞的方式。具体途径将取决于某些变量,诸如靶细

胞,并且可以由技术人员确定。向患者施用本文所述的ZF-阻遏物结构域构建体和/或dCas9-阻遏物结构域构建体的合适方法包括适合向患者递送本文描述的ZF-阻遏物结构域构建体和/或dCas9-阻遏物结构域构建体的任何体内施用途径。优选的施用途径将是本领域技术人员显而易见的,取决于所使用的病毒基因疗法的制剂类型、靶细胞群体和受试者所经历的疾病或病况。体内施用的典型方法包括、但不限于静脉内施用、腹膜内施用、鞘内施用、肌肉内施用、冠状动脉内施用、颅内施用、动脉内施用(例如,向颈动脉中)、皮下施用、透皮递送、气管内施用、皮下施用、关节内施用、心室内施用、吸入(例如,气雾剂)、大脑内、鼻、口服、肺施用、导管浸渍和直接注射到组织中。在靶细胞位于肿瘤中或肿瘤附近的实施方案中,优选的施用途径是通过直接注射到肿瘤或肿瘤周围的组织中。例如,当肿瘤是乳腺肿瘤时,优选的施用方法包括导管浸渍和直接注射到肿瘤中。

[0124] 可以使用本领域的标准方法进行静脉内、腹膜内、鞘内、神经节内、神经内、颅内和肌肉内施用。也可以使用本领域的标准方法进行气雾剂(吸入)递送(参见,例如,Stribling等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 189:11277-11281,1992,其通过引用整体并入本文)。通过将本文所述的锌指-阻遏物结构域构建体与能够耐受动物肠道中消化酶的降解的载体复合,可以进行口服递送。此类载体的例子包括塑料胶囊或片剂,诸如本领域已知的那些。

[0125] 局部施用的一种方法是通过直接注射。直接注射技术对于将本文所述的ZF-阻遏物结构域构建体和/或dCas9-阻遏物结构域构建体施用给通过外科手术可接近的细胞或组织(且具体地,在身体表面上或附近)是特别有用的。组合物在靶细胞区域内的局部施用表示,在离靶细胞或组织几厘米且优选几毫米处注射组合物。例如,本文发现,鞘内施用途径提供有利的结果。

[0126] 本文描述的治疗方法的适当剂量和治疗方案将随正在治疗的特定疾病、正在递送的本文所述的ZF-阻遏物结构域构建体和/或dCas9-阻遏物结构域构建体、以及受试者的具体状况而变化。熟练的从业人员将基于个例确定施用的量和频率。在一个实施方案中,施用持续一段时间直至期望的效果(例如,实现症状的减轻)。在一个特定实施方案中,施用是每周1、2、3、4、5、6或7次。在一个特定实施方案中,施用是在1、2、3、4、5、6、7、8、9或10周的时段中。在另一个实施方案中,施用是在2、3、4、5、6或更多月的时段中。在另一个实施方案中,在缓解期后恢复治疗。

[0127] 本文描述的ZF-阻遏物结构域构建体和/或dCas9-阻遏物结构域构建体可以与一种或多种抑制伤害性疼痛信号传导的另外活性剂联合施用。例如,通过递送单个或多个gRNA,或通过设计附着于单个或多个基因的ZF,可以将ZF-阻遏物结构域构建体和/或dCas9-阻遏物结构域构建体与一种或多种靶向单个或多个基因的另外药剂一起施用。另外的基因靶标包括、但不限于P2x3、P2x4、P2x7、Nav1.3、辣椒素受体(TRPV1/2/3/4)、TRPA1、SHANK3、电压门控钙通道(Cav2.2、Cav3.1、Cav3.2)。图11提供了可以与本公开内容的ZF-阻遏物结构域构建体和/或dCas9-阻遏物结构域构建体靶标组合抑制的额外靶标。可替换地或另外,可以与本公开内容的ZF-阻遏物结构域构建体和/或dCas9-阻遏物结构域构建体疗法组合使用各种镇痛剂。此类镇痛剂和其它疼痛缓解药是本领域已知的。

[0128] 为了用于本文描述的治疗应用中,本文还描述了试剂盒和制品。此类试剂盒可以包含载体、包装或容器,其被分隔以容纳一个或多个容器诸如管形瓶、试管等,每个容器包含要在本文描述的方法中使用的单独元件之一。合适的容器包括,例如,瓶子、管形瓶、注射

器和试管。所述容器可以由多种材料诸如玻璃或塑料形成。

[0129] 例如,容器可以包含一种或多种本文描述的ZF-阻遏物结构域构建体和/或dCas9-阻遏物结构域构建体,任选地在组合物中或与如本文公开的另一种药剂组合。容器任选地具有无菌进入端口(例如容器可以是静脉内的溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的瓶)。此类试剂盒任选地包含本文中公开的化合物,其伴有标识描述或标签或关于其在本文所述的方法中的应用的说明书。

[0130] 试剂盒通常包含一个或多个另外的容器,每个具有从商业和用户立场看本文描述的化合物的应用所需的各种材料(诸如试剂,任选地呈浓缩的形式,和/或装置)中的一种或多种。此类材料的非限制性例子包括、但不限于缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头、注射器;载体、包装、容器、管形瓶和/或试管标签(列出内容物和/或使用说明)、以及具有使用说明的包装插页。通常还将包括一组指令。

[0131] 标签可以是在容器上或伴随容器。当形成标签的字母、数字或其它字符附着、模制或蚀刻到容器本身时,标签可以是在容器上;当它存在于也容纳容器的托架或载体内(例如作为包装插页)时,标签可以伴随容器。标签可以用于指示,内容物将被用于特定的治疗用途。标签也可以指示使用内容物的用法说明,诸如在本文描述的方法中。例如,可以以在Physicians'Desk Reference(PDR)中指示的量或由本领域普通技术人员以其它方式确定的量使用这些其它治疗剂。

[0132] 考虑到前述和下述实施例,本公开内容提供了在下面举例说明的许多方面:

[0133] 方面1.一种重组基因阻遏物复合物,其包含与转录阻遏物融合且与至少一种指导RNA(gRNA)相关的核酸酶失活的Cas9(dCas9)蛋白,其中所述gRNA与靶核酸序列特异性地杂交,所述靶核酸序列编码选自TRPV1/2/3/4、P2XR3、TRPM8、TRPA1、P23X2、P2RY、BDKRB1/2、Hlr3A、ACCNs、TRPV4、TRPC/P、ACCN1/2、SCN1/3/8A/9A、SCN10A、SCN11A、KCNQ、BDNF、OPRD1/K1/M1、CNR1、GABRs、TNF、PLA2、IL1/6/12/18、COX-2、NTRK1、NGF、GDNF、TNF、LIF、CCL1、CNR2、TLR2/4、P2RX47、CCL2、CX3CR1、BDNF、NR1/2、GR1A1-4、GRC1-5、NK1R、CACNA1A-S和CACNA2D1的基因产物,其中所述基因产物的表达被抑制。

[0134] 方面2.方面1的重组基因阻遏物复合物,其中所述靶核酸序列位于染色体2上的位置2q24.3。

[0135] 方面3.方面1或2的重组基因阻遏物复合物,其中所述gRNA包含由11-107中任一个中所示的序列编码的序列。

[0136] 方面4.方面1-3中的任一项的重组基因阻遏物复合物,其中所述gRNA与编码SCN9A产物(Nav1.7)的核酸序列特异性地杂交。

[0137] 方面5.方面1-4中的任一项的重组基因阻遏物复合物,其中所述转录阻遏物选自:mSin3相互作用结构域(SID)蛋白、甲基-CpG-结合结构域2(MBD2)、MBD3、DNA甲基转移酶(DNMT)1(DNMT1)、DNMT2A、DNMT3A、DNMT3B DNMT3L、视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)、甲基CpG结合蛋白2(Mecp2)、GATA朋友1(Fog1)、MAT2调节剂(ROM2)、拟南芥HD2A蛋白(AtHD2A)、赖氨酸特异性的脱甲基酶1(LSD1)和Krüppel-相关盒(KRAB)。

[0138] 方面6.方面5的重组基因阻遏物复合物,其中所述转录阻遏物结构域是KRAB结构域。

[0139] 方面7.一种多核苷酸,其编码方面1-6中的任一项的重组基因阻遏物复合物的一

种或多种组分。

[0140] 方面8.方面7的多核苷酸,其中所述多核苷酸是为在人细胞中表达而优化的密码子。

[0141] 方面9.一种载体,其包含方面7或8的多核苷酸。

[0142] 方面10.方面9的载体,其中所述多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0143] 方面11.方面10的载体,其中所述启动子选自:人巨细胞病毒(CMV)启动子、CAG启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)LTR启动子/增强子、SV40启动子、EF1-α启动子、CMV立即/早期基因增强子/CBA启动子、Nav1.7启动子、Nav1.8启动子、Nav1.9启动子、TRPV1启动子、突触蛋白启动子、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II启动子、微管蛋白αI启动子、神经元特异性的烯醇化酶启动子和神经胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)启动子。

[0144] 方面12.方面9的载体,其中所述载体包含在至少一种指导RNA编码序列上游的polIII启动子。

[0145] 方面13.方面12的载体,其中所述polIII启动子选自U6和H1启动子。

[0146] 方面14.方面9-13中的任一项的载体,所述载体进一步包含调节性控制序列。

[0147] 方面15.方面14的载体,其中所述调节性控制序列是土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE)。

[0148] 方面16.方面9-15中的任一项的载体,其中所述载体是重组腺相关病毒载体(rAAV载体)。

[0149] 方面17.方面16的载体,其中所述rAAV选自:AAV1、AAV1(Y705+731F+T492V)、AAV2、AAV2(Y444+500+730F+T491V)、AAV3、AAV3(Y705+731F)、AAV4、AAV5、AAV5(Y436+693+719F)、AAV6、AAV6(VP3变体Y705F/Y731F/T492V)、AAV7、AAV-7m8、AAV8、AAV8(Y733F)、AAV9、AAV9(VP3变体Y731F)、AAV10、AAV10(Y733F)、AAV-ShH10、AAV11、AAV12和自互补的载体(scAAV)。

[0150] 方面18.方面16的载体,其中所述多核苷酸包括一个或多个反向重复(ITR)。

[0151] 方面19.方面9-18中的任一项的载体,其中所述多核苷酸或载体包括聚腺苷酸序列。

[0152] 方面20.方面9的载体,其中所述多核苷酸被工程改造成在细胞中表达一种或多种组分。

[0153] 方面21.方面9的载体,其中所述载体是慢病毒载体、γ逆转录病毒载体或单纯疱疹病毒载体。

[0154] 方面22.方面9的载体,其中所述载体包含分裂的dCas9载体系统。

[0155] 方面23.方面9或22的载体,其中所述载体包含编码dCas9的核酸,所述dCas9具有在SEQ ID NO:2中所示的序列。

[0156] 方面24.方面9或23的载体,其中所述载体包含编码SEQ ID NO:7的KRAB序列的核酸。

[0157] 方面25.方面22-24中的任一项的载体,其中所述分裂的载体系统包含选自SEQ ID NO:3、4和10的载体序列。

[0158] 方面26.一种锌指阻遏物构建体,其包含与转录阻遏物偶联的经工程改造的锌指DNA-结合结构域,其中所述锌指DNA-结合结构域包含1-6个锌指序列,且其中所述锌指序列结合编码选自TRPV1/2/3/4、P2XR3、TRPM8、TRPA1、P23X2、P2RY、BDKRB1/2、Hlr3A、ACCNs、

TRPV4、TRPC/P、ACCN1/2、SCN1/3/8A/9A、SCN10A、SCN11A、KCNQ、BDNF、OPRD1/K1/M1、CNR1、GABRs、TNF、PLA2、IL1/6/12/18、COX-2、NTRK1、NGF、GDNF、TNF、LIF、CCL1、CNR2、TLR2/4、P2RX47、CCL2、CX3CR1、BDNF、NR1/2、GR1A1-4、GRC1-5、NK1R、CACNA1A-S和CACNA2D1的基因产物的基因中的靶核酸序列,其中所述基因产物的表达被抑制。

[0159] 方面27.方面26的锌指阻遏物构建体,其中所述靶核酸序列是在表2中所示的序列。

[0160] 方面28.方面26或27的锌指阻遏物构建体,其中所述转录阻遏物选自:mSin3相互作用结构域(SID)蛋白、甲基-CpG-结合结构域2(MBD2)、MBD3、DNA甲基转移酶(DNMT)1(DNMT1)、DNMT2A、DNMT3A、DNMT3BDNMT3L、视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)、甲基CpG结合蛋白2(Mecp2)、GATA朋友1(Fog1)、MAT2调节剂(ROM2)、拟南芥HD2A蛋白(AtHD2A)、赖氨酸特异性的脱甲基酶1(LSD1)和Krüppel-相关盒(KRAB)。

[0161] 方面29.一种多核苷酸,其编码方面26、27或28的锌指阻遏物构建体。

[0162] 方面30.方面29的多核苷酸,其中所述多核苷酸是为在人细胞中表达而优化的密码子。

[0163] 方面31.一种载体,其含有方面29或30的多核苷酸。

[0164] 方面32.方面31的载体,其中所述多核苷酸可操作地连接至启动子。

[0165] 方面33.方面32的载体,其中所述启动子选自:人巨细胞病毒(CMV)启动子、CAG启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)LTR启动子/增强子、SV40启动子、EF1-α启动子、CMV立即/早期基因增强子/CBA启动子、Nav1.7启动子、Nav1.8启动子、Nav1.9启动子、TRPV1启动子、突触蛋白启动子、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶II启动子、微管蛋白αI启动子、神经元特异性的烯醇化酶启动子和神经胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)启动子。

[0166] 方面34.方面31、32或33的载体,所述载体进一步包含调节性控制序列。

[0167] 方面35.方面34的载体,其中所述调节性控制序列是土拨鼠肝炎病毒转录后调节元件(WPRE)。

[0168] 方面36.方面31-35中的任一项的载体,其中所述载体是重组腺相关病毒载体(rAAV载体)。

[0169] 方面37.方面36的载体,其中所述rAAV选自:AAV1、AAV1(Y705+731F+T492V)、AAV2、AAV2(Y444+500+730F+T491V)、AAV3、AAV3(Y705+731F)、AAV4、AAV5、AAV5(Y436+693+719F)、AAV6、AAV6(VP3变体Y705F/Y731F/T492V)、AAV7、AAV-7m8、AAV8、AAV8(Y733F)、AAV9、AAV9(VP3变体Y731F)、AAV10、AAV10(Y733F)、AAV-ShH10、AAV11、AAV12和自互补的载体(scAAV)。

[0170] 方面38.方面31-37中的任一项的载体,其中所述多核苷酸包括一个或多个反向重复(ITR)。

[0171] 方面39.方面31-38中的任一项的载体,其中所述多核苷酸包括聚腺苷酸序列。

[0172] 方面40.方面31的载体,其中所述核酸被工程改造成在细胞中表达一种或多种组分。

[0173] 方面41.方面31的载体,其中所述载体是慢病毒载体、γ逆转录病毒载体或单纯疱疹病毒载体。

[0174] 方面42.方面31的载体,其中所述载体包含编码SEQ ID NO:7的KRAB序列的核酸。

[0175] 方面43.一种治疗或管理受试者中的慢性疼痛的基于表观遗传的方法,所述方法

包括施用有效量的方面1-6中的任一项的复合物、方面9-25中的任一项的载体、方面26-28中的任一项的构建体或方面31-42中的任一项的载体。

[0176] 方面44.一种治疗或管理有此需要的受试者中的疼痛的基于表观遗传的方法,所述方法包括给受试者施用有效量的锌指-阻遏物构建体和/或dCas9-阻遏物结构域复合物,其中dCas9是催化地失活的Cas9,其不切割DNA,但是维持它的通过指导-RNA(gRNA)结合基因组的能力。

[0177] 方面45.方面44的方法,其中所述疼痛选自神经性疼痛、伤害性疼痛、痛觉超敏、炎症性疼痛、炎症性痛觉过敏、神经病、神经痛、糖尿病性神经病、人免疫缺陷病毒相关的神经病、神经损伤、风湿样关节炎疼痛、骨关节炎疼痛、烧伤、背痛、眼痛、内脏痛、癌症痛、骨癌症痛、偏头痛、腕管综合征引起的疼痛、纤维肌痛、神经炎痛、坐骨神经痛、骨盆超敏反应痛、骨盆痛、疱疹后神经痛、手术后疼痛、中风后疼痛和月经痛。

[0178] 方面46.方面44的方法,其中所述疼痛与选自以下的疾病或病症相关:神经病性周围神经病、糖尿病性神经病、疱疹后神经痛、三叉神经痛、背部损伤、癌症神经病、HIV神经病、肢体缺失、腕管综合征、中风、酒精中毒、甲状腺功能减退、尿毒症、多发性硬化、脊髓损伤、帕金森病和癫痫。

[0179] 方面47.方面44的表观遗传方法,其中所述方法用于治疗具有慢性疼痛的受试者。

[0180] 方面48.方面44-47中的任一项的表观遗传方法,其中所述锌指-阻遏物构建体包含选自以下的阻遏物结构域:mSin3相互作用结构域(SID)蛋白、甲基-CpG-结合结构域2(MBD2)、MBD3、DNA甲基转移酶(DNMT)1(DNMT1)、DNMT2A、DNMT3A、DNMT3B DNMT3L、视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)、甲基CpG结合蛋白2(Mecp2)、GATA朋友1(Fog1)、MAT2调节剂(ROM2)、拟南芥HD2A蛋白(AtHD2A)、赖氨酸特异性的脱甲基酶1(LSD1)和Krüppel-相关盒(KRAB)。

[0181] 方面49.方面48的表观遗传方法,其中所述阻遏物结构域包含KRAB。

[0182] 方面50.方面44-49中的任一项的表观遗传方法,其中所述锌指-阻遏物构建体结合表2的靶标。

[0183] 方面51.方面44-47中的任一项的表观遗传方法,其中所述dCas9-阻遏物结构域复合物包含选自以下的阻遏物结构域:mSin3相互作用结构域(SID)蛋白、甲基-CpG-结合结构域2(MBD2)、MBD3、DNA甲基转移酶(DNMT)1(DNMT1)、DNMT2A、DNMT3A、DNMT3B DNMT3L、视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)、甲基CpG结合蛋白2(Mecp2)、GATA朋友1(Fog1)、MAT2调节剂(ROM2)、拟南芥HD2A蛋白(AtHD2A)、赖氨酸特异性的脱甲基酶1(LSD1)和Krüppel-相关盒(KRAB)。

[0184] 方面52.方面51的表观遗传方法,其中所述阻遏物结构域包含KRAB。

[0185] 方面53.方面44-47或51-52中的任一项的表观遗传方法,其中所述dCas9-阻遏物结构域构建体包含具有选自SEQ ID NO:11-106和107的序列的指导RNA间隔序列。

[0186] 方面54.方面44-53中的任一项的表观遗传方法,其中所述锌指-阻遏物构建体和/或dCas9-阻遏物结构域构建体提供电压门控钠通道的非持久基因阻遏。

[0187] 方面55.方面54的表观遗传方法,其中所述电压门控钠通道选自NaV1.7、NaV1.8和NaV1.9。

[0188] 方面56.方面55的表观遗传方法,其中所述电压门控钠通道是NaV1.7。

[0189] 方面57.方面44-56中的任一项的表观遗传方法,其中所述锌指-阻遏物构建体和/或dCas9-阻遏物结构域构建体由重组病毒或载体包装和递送。

[0190] 方面58.方面57的表观遗传方法,其中所述重组病毒是腺病毒、γ逆转录病毒、腺相关病毒(AAV)、单纯疱疹病毒(HSV)或慢病毒。

[0191] 方面59.方面57的表观遗传方法,其中所述重组病毒选自:AAV1、AAV1(Y705+731F+T492V)、AAV2、AAV2(Y444+500+730F+T491V)、AAV3、AAV3(Y705+731F)、AAV4、AAV5、AAV5(Y436+693+719F)、AAV6、AAV6(VP3变体Y705F/Y731F/T492V)、AAV7、AAV-7m8、AAV8、AAV8(Y733F)、AAV9、AAV9(VP3变体Y731F)、AAV10、AAV10(Y733F)、AAV-ShH10、AAV11、AAV12和自互补的载体(scAAV)。

[0192] 方面60.方面44-59中的任一项的表观遗传方法,其中静脉内、腹膜内、鞘内、神经节内、神经内、颅内或肌肉内施用所述锌指-阻遏物构建体和/或dCas9-阻遏物结构域构建体。

[0193] 下述实施例意图举例说明而不是限制本公开内容。尽管它们是可能使用的那些的典型,但可以可替换地使用本领域技术人员已知的其它程序。

[0194] 实施例

[0195] 实施例1

[0196] 载体设计和构建.通过将相应的基因块(Integrated DNA Technologies)依次组装到定制合成的rAAV2载体骨架中,构建Cas9和锌指AAV载体。通过经由Gibson组装将编码间隔物的寡核苷酸(IDT)克隆进AgeI克隆位点中,将gRNA序列插入dNCas9质粒中。利用计算机芯片上工具预测gRNA73,设计gRNA。

[0197] 哺乳动物细胞培养.在培养箱中,使Neuro2a细胞在37℃和5%CO2气氛下在补充了10%胎牛血清(FBS)和1%抗生素-抗真菌剂(Thermo Fisher Scientific)的EMEM中生长。

[0198] 脂质介导的细胞转染.在转染前1天,将Neuro2a细胞以1或2E+5个细胞/孔的细胞密度接种在24-孔板中。将0.5μg每种质粒加入25μL Opti-MEM培养基,随后加入含有2μL Lipofectamine 2000的25μL Opti-MEM。将混合物在室温孵育15min。然后将整个溶液加入24-孔板中的细胞,并通过轻轻涡旋平板进行混合。24h后更换培养基,并将平板在5%CO2培养箱中在37℃孵育72h。将细胞收获,离心,并在-80℃冷冻。

[0199] AAV的生产.由在Salk Institute of Biological Studies(La Jolla,CA)的Gene Transfer,Targeting and Therapeutics(GT3)中心制备病毒,或者利用GT3中心方案自制病毒。简而言之,通过三重转染方法使用HEK293T细胞生产AAV2/1、AAV2/5和AAV2/9病毒颗粒,并通过碘克沙醇梯度纯化。在转染时汇合度在80%至90%之间。在转染前2小时用预温热的培养基替换培养基。在5个15cm平板中生产每种病毒,其中每个平板用10μg pXR-衣壳(pXR-1、pXR-5和pXR-9)、10μg重组转移载体和10μg pHelper载体转染,其中使用聚乙烯亚胺(PEI;在DPBS[pH 4.5]中的1mg/mL线性PEI,使用HCl),PEI:DNA质量比为4:1。将混合物在室温孵育10分钟,且然后逐滴施加至培养基上。72小时后收获病毒,并使用碘克沙醇密度梯度超速离心方法纯化。然后使用50-kDa过滤器(Millipore)用补充了50mM NaCl和0.0001%Pluronic F68(Thermo Fisher Scientific)的1x PBS(pH 7.2)将病毒透析至约100μL的终体积,并使用以下对ITR区域特异性的引物相对于标准品(ATCC VR-1616)通过qPCR进行定量:AAV-ITR-F:5'-CGGCCTCAGTGAGCGA-3'(SEQ ID NO:127)和AAV-ITR-R:5'-GGAACCCCTAGTGATGGAGTT-3'(SEQ ID NO:128)。

[0200] 动物实验.根据加州大学圣地亚哥分校(University of California,San Diego)

的机构动物护理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee,IACUC)批准的方案,进行所有动物程序。所有小鼠均从Jackson Laboratory获得。将2月龄成年雄性C57BL/6小鼠(25-30g)在12h光照/黑暗周期下圈养,随意提供食品和水,每笼最多5只小鼠。在光照周期阶段中进行所有行为试验。

[0201] 鞘内AAV注射.用在密闭室中以等份O2和室内空气递送的2.5%异氟烷诱导麻醉,直到观察到翻正反射消失。将小鼠的下背部剃毛并用70%乙醇擦拭。然后如以前所述[104]使用Hamilton注射器和30G针头在椎骨L4和L5之间鞘内地(i.t.)用5μL AAV注射小鼠,总共1E+12vg/小鼠。甩尾被认为是适当的针头放置的指示。在注射后,所有小鼠都恢复了与鞘内注射前所观察到的一致的运动活动。

[0202] 疼痛模型.足底内角叉菜胶注射:角叉菜胶诱导的炎症是水肿形成和痛觉过敏的经典模型[105-107]。在AAV预处理后21天,如上所述诱导麻醉。用30G针头将溶解在0.9%(W/V)NaCl溶液中,20μL)的λ角叉菜胶(Sigma Aldrich;2%(W/V)皮下注射进同侧爪的足底(腹侧)表面。将等量的等渗盐水注射进对侧爪中。在角叉菜胶/盐水注射之前和之后4小时,用卡尺测量爪厚度作为水肿/炎症的指标。在注射前(t=0)和注射后(t=30、60、120、240分钟和24小时)进行Hargreaves试验。实验者对治疗组的组成不知情。在24小时时间点后将小鼠安乐死。

[0203] 紫杉醇诱导的神经病:将紫杉醇(Tocris Biosciences,1097)溶解在1:1:18[1体积的乙醇/1体积的Cremophor EL(Millipore,238470)/18体积的灭菌0.9%(W/V)NaCl溶液]的混合物中。每隔一天以1mL体积/100g体重腹膜内地(i.p.)施用紫杉醇注射液(8mg/kg),共4次注射以诱导神经病(32mg/kg),从而导致28.4-113.5mg/m2的累积人等效剂量,如以前所述[67]。在最后剂量后24小时进行行为试验。

[0204] 鞘内BzATP注射:BzATP(2′(3′)-O-(4-苯甲酰基苯甲酰基)腺苷5′-三磷酸三乙基铵盐)购自Millipore Sigma,且基于以前的测试,溶解在盐水(NaCl0.9%)中至30nmol的最终浓度。盐水溶液也用作媒介物对照,并且两者以5μL体积递送。在异氟烷麻醉(2.5%)下使用连接到Hamilton注射器的30号针头通过腰椎穿刺术进行鞘内注射。

[0205] 行为试验.在测试之前,使小鼠习惯行为和实验室至少30分钟。作为阳性对照,将加巴喷丁(Sigma,G154)溶解在盐水溶液中并以100mg/kg/小鼠腹膜内注射。

[0206] 热缩回潜伏期(Hargreaves测试):为了确定急性伤害性热阈值,使用足底测试装置(Ugo Basile,意大利)进行Hargreaves氏测试[108]。在测试前40分钟,允许动物在玻璃地板上的透明塑料外壳(6cm直径×16cm高度)内自由移动。然后将移动辐射热源放置在玻璃地板下并聚焦在后爪上。用30秒的截止时间测量爪子缩回潜伏期。采用40的IR强度。在每只后爪上重复热刺激3次,间隔10分钟,以获得爪子缩回的平均潜伏期。实验者对治疗组的组成不知情。

[0207] 触觉痛觉超敏:对于BzATP疼痛模型,在BzATP注射后30分钟、1、2、3、6、24小时评估触觉阈值(痛觉超敏)。对于紫杉醇模型,在最后一次紫杉醇注射后24小时和29天评估触觉阈值(痛觉超敏)。在测试前45分钟,将小鼠置于透明塑料丝网底笼中进行适应。如以前所述[107],在上下方法中使用范围为2.44-4.31(0.04-2.00g)的von Frey细丝(Seemes Weinstein von Frey anesthesiometer;Stoelting Co.,Wood Dale,IL,USA)评估缩回阈值的50%概率。

[0208] 冷痛觉超敏:通过将数滴丙酮施加到后爪的足底表面来测量冷痛觉超敏。将小鼠放置在高架平台上的单个塑料笼中,并习惯至少30分钟,直到探究行为停止。将丙酮装入没有针尖的1mL注射器筒中。然后穿过网状平台将一滴丙酮(大约20μL)施加到后爪的足底表面上。小心地将丙酮泡轻轻地施加到爪子上的皮肤上,而不会通过注射器筒与爪子的接触引起机械刺激。记录丙酮施加之后60秒观察期中的爪子缩回时间。爪子缩回行为与继发性动物应答有关,诸如快速挥动爪子、颤抖、咬和/或舔爪子。在爪子之间交替测试顺序(即右和左),直到对每个爪子进行五次测量。右爪和左爪的测试之间允许5分钟的刺激之间间隔。

[0209] 组织收集.在24小时角叉菜胶时间点后,通过水力挤压(通过在斩首后放入椎管中的短钝的20号针头注射2mL冰盐水)收集脊髓。在脊髓组织收获后,像脊髓一样将每侧的L4-L6DRG合并并冷冻。将样品放置在无DNase/Rnase的1.5mL离心管中,在干冰上快速冷冻,然后在-80℃储存以用于将来分析。

[0210] 基因表达分析和qPCR.使用Rneasy Kit(QIAGEN;74104)从Neuro2a细胞提取RNA,并使用Rneasy Micro Kit(QIAGEN;74004)从DRG提取RNA。使用Protoscript II逆转录酶试剂盒(NEB;E6560L)从RNA合成cDNA。使用KAPA SYBR快速qPCR试剂盒(Kapa Biosystems;KK4601)进行实时PCR(qPCR)反应,其中使用技术一式三份和生物学一式三份(Neuro2a细胞)的基因特异性引物。将相对mRNA表达针对GAPDH水平归一化,并使用比较CT(ΔΔCT)方法计算倍数变化并针对GAPDH归一化。使用Microsoft Excel计算平均倍数变化和SD。

[0211] 蛋白质印迹.将Neuro2a细胞解冻,并用补充了蛋白酶抑制剂(Sigma P8849)的RIPA缓冲液(25mM Tris·HCl pH 7.6,150mM NaCl,1%NP-40,1%脱氧胆酸钠,0.1%SDS;Thermo Fisher 89900)进行蛋白提取。用BCA蛋白测定试剂盒(Thermo Fisher 23225)定量总蛋白,并将40μg蛋白装入4-15%聚丙烯酰胺凝胶(BioRad 4561085)中。将蛋白转移到PVDF膜(Thermo Fisher IB401001),并用溶解在TBS-T(Thermo Fisher,28358,其补充了0.1%(V/V)吐温-20;BioRad 1610781)中的5%(W/V)印迹级封闭剂(Biorad 1706404)封闭膜。然后将膜与第一抗体在4℃孵育过夜:1:1000稀释的抗-NaV1.7(Abcam;ab85015)和1:4000稀释的抗-GAPDH(Cell Signaling,2118)。然后将膜用TBS-T洗涤3次,并在室温与1:20000稀释的抗-兔辣根-过氧化物酶-缀合的第二抗体(Cell Signaling,7074)孵育1小时。用TBST洗涤后,将印迹用SuperSignal West Femto化学发光底物(Thermo Fisher)显影,并在X-射线胶片上显影。

[0212] RNAscope ISH检测.mCherry、NaV1.7和NeuN探针由Advanced Cell Diagnostics(Hayward,CA)设计。将mCherry探针(ACD目录号404491)设计成检测1480-2138bp(KF450807.1,C1通道),将NaV1.7(ACD目录号313341)设计成检测小家鼠NaV1.7mRNA序列的3404-4576bp(NM_018852.2,C3通道),并将NeuN探针(ACD目录号313311)设计成靶向小家鼠Neun基因的1827-3068bp(NM_001039167.1,C2通道)。在切片前,将DRG在室温置于4%PFA中2小时,然后在30%蔗糖中在4℃孵育过夜。将组织切片(12μm厚)并固定在带正电荷的显微载玻片(Fisher Scientific)上。按照ACD RNAscope V2固定组织方案进行所有杂交和扩增步骤。染色的载玻片用荧光封固介质(ProLong Gold Anti-fade Reagent P36930;Life Technologies)盖住,并用Zeiss 880Airyscan Confocal以20倍放大率扫描成数字图像。使用ZEN软件(制造商提供的软件)处理数据。

[0213] 统计分析.将结果表示为平均值±标准误差(SE)。使用GraphPad Prism(8.0版,

GraphPad Software,San Diego,CA,USA)进行统计分析。使用Student氏t-检验(对于两组之间的差异)、单因素方差分析(对于多组)或具有Bonferroni事后检验的双因素方差分析(对于多组时-程实验),分析结果。具有$p<0.05$的组间差异被认为是统计上显著的。

[0214] 分裂的载体设计和构建.通过将相应的基因块(Integrated DNA Technologies)依次组装到定制合成的rAAV2载体骨架中,构建分裂-Cas9/dCas9AAV载体。通过经由Gibson组装将编码间隔物的寡核苷酸(IDT)克隆进AgeI克隆位点中,将gRNA序列插入NCas9或dNCas9质粒中。

[0215] AAV生产.简而言之,通过三重转染方法使用HEK293T细胞生产AAV2/9病毒颗粒,并通过碘克沙醇梯度纯化。在转染时汇合度在80%和90%之间。在转染前2小时用预温热的培养基替换培养基。在5x15cm平板中生产每种病毒,其中每个平板用7.5mg pXR-衣壳(pXR-9)、7.5mg重组转移载体和22.5mg pAd5辅助载体转染,其中使用聚乙烯亚胺(PEI;在1DPBS[pH 4.5]中的1mg/mL线性PEI,使用HCl),PEI:DNA质量比为4:1。将混合物在室温孵育10分钟,且然后逐滴施加到培养基上。72小时后收获病毒,并使用碘克沙醇密度梯度超速离心方法纯化。然后使用100-kDa过滤器(Millipore)用补充了50mM NaCl和0.0001%Pluronic F68(Thermo Fisher Scientific)的1PBS(pH 7.2)将病毒透析至1mL的终体积。

[0216] AAV注射.使用1E+12vg/小鼠的每种分裂-Cas9(2E+12vg/小鼠的总病毒)或1E+12(对于ZF注射),通过鞘内注射在成年C57BL/6J小鼠(10周)中进行AAV注射。

[0217] 为了建立稳健的$Na_V1.7$阻遏,对比了使用KRAB-dCas9和ZFP-KRAB构建体的$Na_V1.7$的体外阻遏效力。为此,将10个指导-RNA(gRNA;表3)-通过计算机芯片上工具设计,其基于染色质位置和序列特征预测高效gRNA--克隆进分裂-dCas9平台中。此外,将预测具有最高效率的两种gRNA(SCN9A-1和SCN9A-2)也克隆到单个构建体中,因为使用多个gRNA可以实现更高的效力。接下来,设计了四种靶向$Na_V1.7$DNA序列的ZFP-KRAB构建体(表4)。将这些构建体转染到表达$Na_V1.7$(Neuro2a)的小鼠神经母细胞瘤细胞系中,并且通过qPCR确认$Na_V1.7$相对于GAPDH被阻遏。与非靶向gRNA对照相比,10种gRNA中的6种使$Na_V1.7$转录物阻遏>50%,其中gRNA-2是具有最高阻遏(56%)的单个gRNA,而双-gRNA具有71%的阻遏水平($p<0.0001$);这些被用于随后的体内研究(图5A)。在ZFP-KRAB设计中,锌指-4-KRAB构建体具有与阴性对照(mCherry)相比最高的阻遏(88%;$p<0.0001$),其被选择用于后续的体内研究(图5A)。蛋白质印迹证实了锌指-4-KRAB和KRAB-dCas9-双-gRNA组的蛋白水平的相应降低(图5B)。

[0218] 表3:CRISPR-Cas9指导RNA间隔序列

[0219]

gRNA	序列
SCN9A-1	ACAGTGGGCAGGATTGAAA (SEQ ID NO:129)

[0220]

SCN9A-2	GCAGGTGCACTCACCGGGT (SEQ ID NO:130)
SCN9A-3	GAGCTCAGGGAGCATCGAGG (SEQ ID NO:131)
SCN9A-4	AGAGTCGCAATTGGAGCGC (SEQ ID NO:132)
SCN9A-5	CCAGACCAGCCTGCACAGT (SEQ ID NO:133)
SCN9A-6	GAGCGCAGGCTAGGCCTGCA (SEQ ID NO:134)
SCN9A-7	CTAGGAGTCCGGGATACCC (SEQ ID NO:135)
SCN9A-8	GAATCCGCAGGTGCACTCAC (SEQ ID NO:136)
SCN9A-9	GACCAGCCTGCACAGTGGGC (SEQ ID NO:137)
SCN9A-10	GCGACGCGGTTGGCAGCCGA (SEQ ID NO:138)

[0221] 表4:锌指蛋白基因组靶序列

[0222]

ZF名称	ZF靶序列
ZF1	GGCGAGGTGATGGAAGGG(SEQ ID NO:139)
ZF2	GAGGGAGCTAGGGGTGGG(SEQ ID NO:140)
ZF3	AGTGCTAATGTTTCCGAG(SEQ ID NO:141)
ZF4	TAGACGGTGCAGGGCGGA(SEQ ID NO:142)

[0223] 已经建立了体外$Na_V1.7$阻遏后,测试了来自体外筛选的最佳ZFP-KRAB和KRAB-dCas9构建体(锌指-4-KRAB和KRAB-dCas9-双-gRNA)在角叉菜胶诱导的炎症性疼痛模型中的有效性。给小鼠鞘内地(鞘内)注射1E+12vg/小鼠的AAV9-mCherry(阴性对照;n=10)、AAV9-锌指-4-KRAB(n=10)、AAV9-KRAB-dCas9-无-gRNA(阴性对照;n=10)和AAV9-KRAB-dCas9-双-gRNA(n=10)。具有显著的神经元趋向性的AAV9的鞘内递送用于有效地靶向DRG(图6A)。21天后,测量热疼痛敏感性以确定基线应答阈值。通过向一只后爪注射角叉菜胶(同侧),在所有四组小鼠中诱导炎症,而向另一只后爪(对侧)注射盐水以充当小鼠内对照。然后在角叉菜胶注射后30分钟、1、2、4和24小时,测试小鼠的热疼痛敏感性(图1B)。在角叉菜胶施用后24小时,将小鼠安乐死并提取DRG(L4-L6)。通过qPCR确定$Na_V1.7$的表达水平,且与注射AAV9-mCherry的小鼠相比在注射AAV9-锌指-4-KRAB的小鼠中(67%;p=0.0008),以及与注射AAV9-KRAB-dCas9-无-gRNA的小鼠相比在注射AAV9-KRAB-dCas9-双-gRNA的小鼠中(50%;p=0.0033),观察到显著的$Na_V1.7$阻遏(图1C)。计算注射角叉菜胶和盐水的爪子的平均爪子缩回潜伏期(PWL)(图6B-C),并计算总平均PWL的曲线下面积(AUC)。正如预期的那样,与注射盐水的爪子相比,注射角叉菜胶的爪子发生热痛觉过敏,这通过施加热刺激后PWL的减少来衡量(图1D)。另外,观察到注射AAV9-锌指-4-KRAB或AAV9-KRAB-dCas9-双-gRNA的小鼠的PWL的显著增加,表明小鼠DRG中的$Na_V1.7$阻遏导致在炎症性疼痛状态中较低的热痛觉过敏。对照(未发炎的爪子)的热潜伏期在AAV治疗组之间没有显著差异,表明$Na_V1.7$的敲低对正常热敏感性的影响很小。作为水肿/炎症的指标,在角叉菜胶注射之前和之后4小时(这是具有最高热痛觉过敏的时间点)用卡尺测量同侧和对侧爪。在实验组和对照组中均观察到显著的水肿形成,表明$Na_V1.7$阻遏对炎症没有影响(图6D)。

[0224] 为了验证ZFP-KRAB的改善炎症性疼痛的角叉菜胶模型中的热痛觉过敏的效力,进

行了单独的实验以测试小分子药物加巴喷丁作为阳性对照。给小鼠鞘内注射1E+12vg/小鼠的AAV9-mCherry(n＝5)、AAV9-锌指-4-KRAB(n＝6)或盐水(n＝5)。21天后,如以前所述测量所有小鼠的热伤害感受。在角叉菜胶施用前1小时,给接受鞘内盐水的小鼠腹膜内(i.p.)注射加巴喷丁(100mg/kg)作为阳性比较物。已知该试剂通过结合电压门控钙通道的脊髓α2δ亚基来减少啮齿动物中角叉菜胶诱导的热痛觉过敏。在角叉菜胶施用后24小时,将小鼠安乐死并提取DRG(L4-L6)。通过qPCR确定$Na_V1.7$的表达水平,并在AAV9-锌指-4-KRAB(***p＝0.0007)和加巴喷丁组(*p＝0.0121)中观察到$Na_V1.7$的显著阻遏(图7A)。在角叉菜胶注射之前和之后4小时用卡尺测量同侧和对侧爪,并确认与所有组中的未注射爪相比所有组的注射爪的显著水肿形成(图7B)。计算角叉菜胶和盐水注射的爪子的平均PWL(图2B-C)。然后使用双因素方差分析计算,在每个时间点将AAV9-锌指-4-KRAB和加巴喷丁组的角叉菜胶注射的爪子的爪子缩回潜伏期与AAV9-mCherry角叉菜胶注射的对照进行对比,以确定是否存在热痛觉过敏的任何显著降低(图7C)。当对比角叉菜胶注射的后爪时,观察到,与AAV9-mCherry对照相比,只有AAV9-锌指-4-KRAB在角叉菜胶注射后的所有时间点具有显著更高的PWL。此外,在30分钟、1小时和4小时时间点,在加巴喷丁阳性对照组的PWL中观察到显著性,但是在24小时时间点没有观察到。该结果反映了加巴喷丁的半衰期(3-5小时)。然后计算热痛觉过敏的曲线下面积(AUC)。与角叉菜胶注射的AAV9-mCherry对照相比,在角叉菜胶注射的加巴喷丁组(p＝0.0208)(图2B)和锌指-4-KRAB组(115％改善,p＝0.0021)(图2C)中观察到PWL的显著增加。此外,AAV9-锌指-4-KRAB组具有比加巴喷丁阳性对照组高31％的PWL。值得注意的是,对侧非发炎爪子的热缩回潜伏期在各组之间没有显著差异。

[0225] 在炎症性疼痛模型中确立体内效力之后,使用通过化疗紫杉醇的多发性神经病模型进行实验以验证神经性疼痛的表观基因组阻遏策略。为了建立这个模型,首先给小鼠注射1E+12vg/小鼠的AAV9-mCherry(n＝8)、AAV9-锌指-4-KRAB(n＝8)、AAV9-KRAB-dCas9-双-gRNA(n＝8)、AAV9-KRAB-dCas9-无-gRNA(n＝8)或盐水(n＝16)。在14天后和在紫杉醇施用前,建立了触觉阈值的基线(von Frey细丝)。然后在第14、16、18和20天给小鼠施用紫杉醇,剂量为8mg/kg(总累积剂量为32mg/kg),一组盐水注射的小鼠未接受任何紫杉醇(n＝8)以建立由化疗剂诱导的触觉痛觉超敏。在初次注射后21天和测试前1小时,一组盐水注射的小鼠(n＝8)被腹膜内注射加巴喷丁(100mg/kg)。然后通过von Frey细丝测试小鼠的触觉痛觉超敏,并通过丙酮测试测试冷痛觉超敏(图3A)。计算了50％触觉阈值。在接受AAV9-mCherry和AAV9-KRAB-dCas9-无-gRNA的小鼠中观察到触觉阈值降低,而接受加巴喷丁、AAV9-锌指-4-KRAB和AAV9-KRAB-dCas9-双-gRNA的小鼠具有增加的缩回阈值,表明原位$Na_V1.7$阻遏导致化疗诱导的触觉痛觉超敏的改善(图3B)。类似地,在阴性对照组(AAV9-mCherry和AAV9-KRAB-dCas9-无-gRNA)中在测试冷痛觉超敏的小鼠中观察到缩回应答的数量的增加,而AAV9-锌指-4-KRAB和AAV9-KRAB-dCas9-双-gRNA组具有缩回应答的减少,表明$Na_V1.7$的原位阻遏也导致化疗诱导的冷痛觉超敏的减少(图3C)。

[0226] 然后进行实验以测试通过KRAB-dCas9对$Na_V1.7$的原位阻遏是否可以改善由BzATP诱导的神经性疼痛。该分子激活位于中枢末端的P2X受体,从而导致中枢介导的痛觉过敏状态。首先给小鼠注射1E+12vg/小鼠的AAV9-mCherry(n＝6)、AAV9-KRAB-dCas9-无-gRNA(n＝5)和AAV9-KRAB-dCas9-双-gRNA(n＝6)。21天后,用von Frey细丝确定触觉阈值,并给小鼠鞘内注射BzATP(30nmol)。然后在BzATP施用后30分钟、1、2、3、6和24小时,测量触觉痛觉超

敏(图3D)。在用AAV9-KRAB-dCas9-双-gRNA注射的小鼠中,在30分钟、1和2小时时间点观察到触觉痛觉超敏的显著减少,并且在所有时间点触觉阈值总体增加(图3E)。

[0227] 为了确定$Na_V1.7$的原位阻遏是否长期有效,在鞘内AAV注射后21天和42天用热痛觉过敏重复角叉菜胶炎症性疼痛模型(n=8/组)(图4A)。在第21天(图7D)和第42天(图4B),观察到锌指-4-KRAB组中角叉菜胶注射的爪子的PWL的显著改善,从而证明了这种方法的持久性。为了确定$Na_V1.7$的原位阻遏在多发性神经性疼痛模型中是否也长期有效,在初始AAV注射后49天和最后一次紫杉醇注射后29天,测量触觉和冷痛觉超敏(总累积剂量为32mg/kg;图4C)。与较早的时间点(图3B-C)相比,来自AAV9-mCherry(n=8)和AAV9-KRAB-dCas9-双-gRNA(n=8)组的小鼠在第49天具有与第21天相比增加的触觉痛觉超敏,并且对所检查的最低von Frey细丝(0.04g)有应答。相比之下,接受AAV9-锌指-4-KRAB和AAV9-KRAB-dCas9-双-gRNA的小鼠具有增加的缩回阈值,表明原位$Na_V1.7$阻遏导致化疗诱导的触觉痛觉超敏的长期改善(图4C)。和以前一样,在阴性对照组(AAV9-mCherry和AAV9-KRAB-dCas9-无-gRNA)中在测试冷痛觉超敏的小鼠中观察到缩回应答的数量的增加,而AAV9-锌指-4-KRAB和AAV9-KRAB-dCas9-双-gRNA组具有缩回应答的减少,表明$Na_V1.7$的原位阻遏也导致化疗诱导的冷痛觉超敏的长期改善(图4E)。

[0228] 本公开内容也证实,所述方法和组合物可以逆转慢性疼痛状态。在这些实验中,首先用紫杉醇处理小鼠以诱发慢性疼痛。在用von Frey细丝确认机械痛觉超敏后,然后给小鼠注射基因阻遏疗法,并且在此后两周和三周,接受ZF基因阻遏疗法的小鼠组存在机械痛觉超敏的逆转(图10A-B)。

[0229] 应该理解,在不脱离本公开内容的精神和范围的情况下,可以做出各种修改。因此,其它实施方案在下述权利要求的范围内。

[0001] 序列表

[0002] <110> 加利福尼亚大学董事会

[0003] <120> 通过靶向体内表观遗传阻遏实现的持久镇痛

[0004] <130> 00015-369WO1

[0005] <140> 尚未分配

[0006] <141> 2020-04-09

[0007] <150> US 62/831,706

[0008] <151> 2019-04-09

[0009] <150> US 62/877,810

[0010] <151> 2019-07-23

[0011] <160> 143

[0012] <170> PatentIn 3.5版

[0013] <210> 1

[0014] <211> 4164

[0015] <212> DNA

[0016] <213> 人工序列

[0017] <220>

[0018] <223> dCas9

[0019] <220>

[0020] <221> CDS

[0021] <222> (1)..(4164)

[0022] <400> 1

[0023] atg ggc ccc aag aaa aaa cgc aag gtg gcc gca gca gac tat aag gat 48

[0024] Met Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ala Ala Ala Asp Tyr Lys Asp

[0025] 1 5 10 15

[0026] gac gac gat aag ggg atc cat ggt gtg cct gct gca gat aaa aaa tac 96

[0027] Asp Asp Asp Lys Gly Ile His Gly Val Pro Ala Ala Asp Lys Lys Tyr

[0028] 20 25 30

[0029] agc atc ggc ctg gct atc gga act aac tcc gtc ggc tgg gcc gtc att 144

[0030] Ser Ile Gly Leu Ala Ile Gly Thr Asn Ser Val Gly Trp Ala Val Ile

[0031] 35 40 45

[0032] acc gac gaa tac aaa gta cct agc aaa aag ttc aag gtg ctt ggc aac 192

[0033] Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe Lys Val Leu Gly Asn

[0034] 50 55 60

[0035] aca gat cgc cac tca atc aag aaa aac ctt atc gga gcc ctg ctg ttt 240

[0036] Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile Gly Ala Leu Leu Phe

[0037] 65 70 75 80

[0038] gac tca ggc gaa acc gcc gag gct aca cgc ctg aaa aga aca gct aga 288

[0039] Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Arg Thr Ala Arg

[0040] 85 90 95

[0041] cgg cgg tac acc aga agg aag aac cgg atc tgt tat ctt cag gag att 336

[0042] Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys Tyr Leu Gln Glu Ile
[0043] 100 105 110
[0044] ttc tcc aat gag atg gct aag gtg gac gat tct ttc ttc cat cga ctc 384
[0045] Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser Phe Phe His Arg Leu
[0046] 115 120 125
[0047] gaa gaa tct ttc ttg gtg gag gaa gat aag aaa cac gag agg cat cct 432
[0048] Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys His Glu Arg His Pro
[0049] 130 135 140
[0050] att ttc gga aac att gtc gat gaa gtg gcc tat cat gag aaa tac ccc 480
[0051] Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr His Glu Lys Tyr Pro
[0052] 145 150 155 160
[0053] acg atc tac cat ctg cga aaa aag ttg gtt gac tct acc gac aag gcg 528
[0054] Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp Ser Thr Asp Lys Ala
[0055] 165 170 175
[0056] gac ctg agg ctt att tat ctg gcc ctg gcc cat atg atc aaa ttc agg 576
[0057] Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His Met Ile Lys Phe Arg
[0058] 180 185 190
[0059] ggg cac ttc ttg atc gag ggg gac ctt aat ccc gac aac tct gac gtg 624
[0060] Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro Asp Asn Ser Asp Val
[0061] 195 200 205
[0062] gat aag ttg ttc ata cag ctt gtg cag acc tac aac cag ctg ttc gag 672
[0063] Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr Asn Gln Leu Phe Glu
[0064] 210 215 220
[0065] gag aat cca atc aac gcc agc gga gtg gac gct aaa gcc att ctg agc 720
[0066] Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala Lys Ala Ile Leu Ser
[0067] 225 230 235 240
[0068] gcg aga ttg agc aag tct aga aga ttg gaa aac ctt ata gcc cag ctg 768
[0069] Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn Leu Ile Ala Gln Leu
[0070] 245 250 255
[0071] cca ggt gag aag aag aac gga ctg ttt ggc aat ctc att gcg ctt agc 816
[0072] Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn Leu Ile Ala Leu Ser
[0073] 260 265 270
[0074] ctc gga ctc acc ccg aac ttc aaa tcc aac ttc gac ctc gcc gaa gat 864
[0075] Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe Asp Leu Ala Glu Asp
[0076] 275 280 285
[0077] gcc aaa ttg cag ctc agt aag gat acg tat gac gat gat ctt gac aat 912
[0078] Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp Asp Asp Leu Asp Asn
[0079] 290 295 300
[0080] ctg ctg gcg cag atc ggg gac cag tac gcc gat ctt ttc ttg gca gca 960
[0081] Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp Leu Phe Leu Ala Ala
[0082] 305 310 315 320
[0083] aaa aat ctc tca gat gca ata ctc ttg tca gac ata ctg cga gtt aat 1008

[0084] Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp Ile Leu Arg Val Asn
[0085] 325 330 335
[0086] acc gag att act aag gct ccg ctt tct gcc tcc atg atc aag cgc tac 1056
[0087] Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser Met Ile Lys Arg Tyr
[0088] 340 345 350
[0089] gat gag cat cac cag gat ctg aca ctg ttg aaa gcc ctg gtg cgc caa 1104
[0090] Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys Ala Leu Val Arg Gln
[0091] 355 360 365
[0092] cag ctg cca gag aaa tac aag gaa atc ttt ttt gac cag tcc aag aat 1152
[0093] Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe Asp Gln Ser Lys Asn
[0094] 370 375 380
[0095] ggc tac gca gga tac atc gat gga gga gcc agt cag gag gaa ttt tac 1200
[0096] Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser Gln Glu Glu Phe Tyr
[0097] 385 390 395 400
[0098] aag ttt att aag cct atc ctg gag aag atg gat ggt acc gaa gaa ctc 1248
[0099] Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp Gly Thr Glu Glu Leu
[0100] 405 410 415
[0101] ctg gtc aag ctc aac cga gaa gat ttg ctt cgc aag caa agg act ttt 1296
[0102] Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg Lys Gln Arg Thr Phe
[0103] 420 425 430
[0104] gac aac ggc tcc att ccg cat cag att cat ctg ggc gag ctg cat gcc 1344
[0105] Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu Gly Glu Leu His Ala
[0106] 435 440 445
[0107] att ctg cga aga cag gag gat ttt tac cca ttt ctg aag gac aac cga 1392
[0108] Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe Leu Lys Asp Asn Arg
[0109] 450 455 460
[0110] gag aag atc gag aaa ata ctg aca ttc agg ata cca tat tac gtg ggt 1440
[0111] Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile Pro Tyr Tyr Val Gly
[0112] 465 470 475 480
[0113] cca ctc gcc agg ggc aac tcc cga ttc gcc tgg atg aca agg aaa agc 1488
[0114] Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp Met Thr Arg Lys Ser
[0115] 485 490 495
[0116] gaa gag acg atc act cca tgg aac ttc gag gag gtc gtg gac aag ggg 1536
[0117] Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu Val Val Asp Lys Gly
[0118] 500 505 510
[0119] gcc tcc gcg cag agc ttt atc gag agg atg acg aac ttt gac aaa aat 1584
[0120] Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr Asn Phe Asp Lys Asn
[0121] 515 520 525
[0122] ctc cct aac gag aag gtg ctg cca aaa cat tct ctg ctc tac gag tat 1632
[0123] Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser Leu Leu Tyr Glu Tyr
[0124] 530 535 540
[0125] ttc acc gtt tat aat gag ctc aca aag gtg aag tac gtg acc gaa ggg 1680

[0126] Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys Tyr Val Thr Glu Gly
[0127] 545 550 555 560
[0128] tgc ttc gac agc gtt gag att tcc ggc gtg gag gat aga ttc aac gct 1728
[0129] Cys Phe Asp Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala
[0130] 565 570 575
[0131] tct ctc ggc act tat cac gac ctt ctg aag att atc aag gat aag gat 1776
[0132] Ser Leu Gly Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp
[0133] 580 585 590
[0134] ttc ctg gac aac gaa gag aat gaa gac atc ctg gag gac atc gtc ctg 1824
[0135] Phe Leu Asp Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu
[0136] 595 600 605
[0137] acc ttg acc ctg ttc gag gac aga gag atg atc gag gag agg ctt aag 1872
[0138] Thr Leu Thr Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys
[0139] 610 615 620
[0140] acc tac gcc cac ctg ttt gat gac aaa gtg atg aaa cag ctg aaa cgg 1920
[0141] Thr Tyr Ala His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg
[0142] 625 630 635 640
[0143] aga cgg tat act ggt tgg ggc agg ctg tcc cgg aag ctt att aac gga 1968
[0144] Arg Arg Tyr Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly
[0145] 645 650 655
[0146] ata cgg gat aag caa agt gga aag aca ata ctt gac ttc ctg aag tct 2016
[0147] Ile Arg Asp Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser
[0148] 660 665 670
[0149] gat ggt ttt gct aac agg aat ttc atg cag ctg att cac gac gac tcc 2064
[0150] Asp Gly Phe Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser
[0151] 675 680 685
[0152] ctt aca ttt aag gag gac att cag aag gcc cag gtg tct gga caa ggg 2112
[0153] Leu Thr Phe Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly
[0154] 690 695 700
[0155] gac tct ctc cat gag cac atc gcc aac ctg gcc ggc agc cca gcc atc 2160
[0156] Asp Ser Leu His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile
[0157] 705 710 715 720
[0158] aaa aaa gga att ctt caa act gta aag gtg gtg gat gag ctg gtt aaa 2208
[0159] Lys Lys Gly Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys
[0160] 725 730 735
[0161] gtc atg gga cgg cac aag cct gag aat atc gtc att gag atg gcc agg 2256
[0162] Val Met Gly Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg
[0163] 740 745 750
[0164] gag aat cag acg aca cag aaa gga cag aag aac tca cgc gag agg atg 2304
[0165] Glu Asn Gln Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met
[0166] 755 760 765
[0167] aag aga att gag gaa ggg ata aag gag ctg gga agt cag att ctg aag 2352

[0168] Lys Arg Ile Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys
[0169] 770 775 780
[0170] gaa cac cca gtt gaa aat acc cag ctg cag aat gaa aag ctg tat ctg 2400
[0171] Glu His Pro Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu
[0172] 785 790 795 800
[0173] tac tat ctg cag aat gga cga gac atg tat gtt gat cag gag ctg gac 2448
[0174] Tyr Tyr Leu Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp
[0175] 805 810 815
[0176] att aac cga ctc tca gat tat gac gtg gat gct ata gtc cct cag agt 2496
[0177] Ile Asn Arg Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp Ala Ile Val Pro Gln Ser
[0178] 820 825 830
[0179] ttc ctc aag gac gat tca atc gat aat aaa gtg ttg acc cgc agc gac 2544
[0180] Phe Leu Lys Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp
[0181] 835 840 845
[0182] aaa aac agg ggc aaa agc gat aat gtg ccc tca gag gaa gtg gtc aag 2592
[0183] Lys Asn Arg Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys
[0184] 850 855 860
[0185] aaa atg aag aat tac tgg aga cag ctg ctc aac gct aag ctt att acc 2640
[0186] Lys Met Lys Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr
[0187] 865 870 875 880
[0188] cag agg aaa ttc gat aat ttg aca aaa gct gaa agg ggt ggg ctt agc 2688
[0189] Gln Arg Lys Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser
[0190] 885 890 895
[0191] gag ctg gat aaa gca gga ttc atc aag cgg cag ctt gtc gag acg cgc 2736
[0192] Glu Leu Asp Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg
[0193] 900 905 910
[0194] cag atc aca aag cac gtg gca cag att ttg gat tcc cgc atg aac act 2784
[0195] Gln Ile Thr Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr
[0196] 915 920 925
[0197] aag tat gac gag aac gat aag ctg atc cgc gag gtg aag gtg atc acg 2832
[0198] Lys Tyr Asp Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr
[0199] 930 935 940
[0200] ctg aag tcc aag ctg gta agt gat ttc cgg aaa gat ttc cag ttc tac 2880
[0201] Leu Lys Ser Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr
[0202] 945 950 955 960
[0203] aaa gtg agg gag att aac aac tat cac cac gcc cac gac gct tac ttg 2928
[0204] Lys Val Arg Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu
[0205] 965 970 975
[0206] aat gcc gtt gtg ggt aca gca ttg atc aaa aaa tat cca aag ctg gaa 2976
[0207] Asn Ala Val Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu
[0208] 980 985 990
[0209] agt gag ttt gtt tac gga gac tat aaa gtc tat gac gtg cgg aag atg 3024

[0210] Ser Glu Phe Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met
[0211] 995 1000 1005
[0212] atc gcc aag agc gag cag gag atc ggg aaa gca aca gct aaa tat 3069
[0213] Ile Ala Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr
[0214] 1010 1015 1020
[0215] ttc ttc tat tcc aat atc atg aat ttt ttc aaa act gag ata aca 3114
[0216] Phe Phe Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr
[0217] 1025 1030 1035
[0218] ctt gct aat ggt gag ata aga aag cga ccg ctg ata gag acg aat 3159
[0219] Leu Ala Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn
[0220] 1040 1045 1050
[0221] ggc gag act ggc gag atc gtg tgg gac aaa ggg agg gac ttc gca 3204
[0222] Gly Glu Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala
[0223] 1055 1060 1065
[0224] acc gtc cgc aag gtc ttg agc atg ccg cag gtg aat ata gtt aag 3249
[0225] Thr Val Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys
[0226] 1070 1075 1080
[0227] aaa acc gaa gtg caa aca ggc ggc ttc agt aag gag tcc ata ttg 3294
[0228] Lys Thr Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu
[0229] 1085 1090 1095
[0230] ccg aag agg aac tct gac aag ctg atc gct agg aaa aag gat tgg 3339
[0231] Pro Lys Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp
[0232] 1100 1105 1110
[0233] gat cca aaa aaa tac ggc ggg ttc gac tcc cct acc gtt gca tac 3384
[0234] Asp Pro Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr
[0235] 1115 1120 1125
[0236] agc gtg ctt gtg gtc gcg aag gtc gaa aag ggc aag tct aag aag 3429
[0237] Ser Val Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys
[0238] 1130 1135 1140
[0239] ctc aag agt gtc aaa gaa ttg ctg ggt atc aca att atg gag cgc 3474
[0240] Leu Lys Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg
[0241] 1145 1150 1155
[0242] agt agt ttc gag aag aat ccg ata gat ttt ctg gag gca aag gga 3519
[0243] Ser Ser Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly
[0244] 1160 1165 1170
[0245] tac aag gag gtg aag aag gat ctg atc atc aaa ctg cct aag tac 3564
[0246] Tyr Lys Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr
[0247] 1175 1180 1185
[0248] tcc ctg ttc gag ctt gag aat ggt aga aag cgc atg ctt gcc tca 3609
[0249] Ser Leu Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser
[0250] 1190 1195 1200
[0251] gcc ggc gaa ttg cag aag ggc aat gag ctc gcc ctg cct tca aaa 3654

[0252] Ala Gly Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys

[0253] 1205 1210 1215

[0254] tac gtg aac ttc ctg tac ttg gca tca cac tac gaa aag ctg aaa 3699

[0255] Tyr Val Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys

[0256] 1220 1225 1230

[0257] gga tcc cct gag gat aat gag caa aaa caa ctt ttt gtg gag cag 3744

[0258] Gly Ser Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln

[0259] 1235 1240 1245

[0260] cat aag cac tat ctc gat gaa att att gag cag att tct gaa ttc 3789

[0261] His Lys His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe

[0262] 1250 1255 1260

[0263] agc aag cgc gtc atc ctc gcg gac gcc aat ctg gat aaa gtg ctg 3834

[0264] Ser Lys Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu

[0265] 1265 1270 1275

[0266] agc gcc tac aat aaa cac cga gac aag ccc att cgg gaa cag gcc 3879

[0267] Ser Ala Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala

[0268] 1280 1285 1290

[0269] gag aac atc att cac ctc ttc act ctg act aat ctc ggg gcc ccg 3924

[0270] Glu Asn Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro

[0271] 1295 1300 1305

[0272] gcc gca ttc aaa tac ttc gac act act atc gac agg aaa cgc tat 3969

[0273] Ala Ala Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr

[0274] 1310 1315 1320

[0275] act tca acg aag gag gtg ctg gac gct act ttg atc cac cag tcc 4014

[0276] Thr Ser Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser

[0277] 1325 1330 1335

[0278] att acg ggg ctc tat gag aca cga atc gat ctt tct caa ctt gga 4059

[0279] Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly

[0280] 1340 1345 1350

[0281] ggt gat gcc tac cca tat gac gtg cct gac tat gcc tcc ctg ggc 4104

[0282] Gly Asp Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly

[0283] 1355 1360 1365

[0284] tct ggg agc cct aag aaa aag agg aag gta gag gat cca aaa aaa 4149

[0285] Ser Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp Pro Lys Lys

[0286] 1370 1375 1380

[0287] aag cga aaa gtc gat 4164

[0288] Lys Arg Lys Val Asp

[0289] 1385

[0290] <210> 2

[0291] <211> 1388

[0292] <212> PRT

[0293] <213> 人工序列

[0294] <220>

[0295] <223> 合成的构建体

[0296] <400> 2

[0297] Met Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ala Ala Ala Asp Tyr Lys Asp

[0298] 1 5 10 15

[0299] Asp Asp Asp Lys Gly Ile His Gly Val Pro Ala Ala Asp Lys Lys Tyr

[0300] 20 25 30

[0301] Ser Ile Gly Leu Ala Ile Gly Thr Asn Ser Val Gly Trp Ala Val Ile

[0302] 35 40 45

[0303] Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe Lys Val Leu Gly Asn

[0304] 50 55 60

[0305] Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile Gly Ala Leu Leu Phe

[0306] 65 70 75 80

[0307] Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Arg Thr Ala Arg

[0308] 85 90 95

[0309] Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys Tyr Leu Gln Glu Ile

[0310] 100 105 110

[0311] Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser Phe Phe His Arg Leu

[0312] 115 120 125

[0313] Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys His Glu Arg His Pro

[0314] 130 135 140

[0315] Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr His Glu Lys Tyr Pro

[0316] 145 150 155 160

[0317] Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp Ser Thr Asp Lys Ala

[0318] 165 170 175

[0319] Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His Met Ile Lys Phe Arg

[0320] 180 185 190

[0321] Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro Asp Asn Ser Asp Val

[0322] 195 200 205

[0323] Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr Asn Gln Leu Phe Glu

[0324] 210 215 220

[0325] Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala Lys Ala Ile Leu Ser

[0326] 225 230 235 240

[0327] Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn Leu Ile Ala Gln Leu

[0328] 245 250 255

[0329] Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn Leu Ile Ala Leu Ser

[0330] 260 265 270

[0331] Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe Asp Leu Ala Glu Asp

[0332] 275 280 285

[0333] Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp Asp Asp Leu Asp Asn

[0334] 290 295 300

[0335] Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp Leu Phe Leu Ala Ala

[0336] 305 310 315 320
[0337] Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp Ile Leu Arg Val Asn
[0338] 325 330 335
[0339] Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser Met Ile Lys Arg Tyr
[0340] 340 345 350
[0341] Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys Ala Leu Val Arg Gln
[0342] 355 360 365
[0343] Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe Asp Gln Ser Lys Asn
[0344] 370 375 380
[0345] Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser Gln Glu Glu Phe Tyr
[0346] 385 390 395 400
[0347] Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp Gly Thr Glu Glu Leu
[0348] 405 410 415
[0349] Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg Lys Gln Arg Thr Phe
[0350] 420 425 430
[0351] Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu Gly Glu Leu His Ala
[0352] 435 440 445
[0353] Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe Leu Lys Asp Asn Arg
[0354] 450 455 460
[0355] Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile Pro Tyr Tyr Val Gly
[0356] 465 470 475 480
[0357] Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp Met Thr Arg Lys Ser
[0358] 485 490 495
[0359] Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu Val Val Asp Lys Gly
[0360] 500 505 510
[0361] Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr Asn Phe Asp Lys Asn
[0362] 515 520 525
[0363] Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser Leu Leu Tyr Glu Tyr
[0364] 530 535 540
[0365] Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys Tyr Val Thr Glu Gly
[0366] 545 550 555 560
[0367] Cys Phe Asp Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala
[0368] 565 570 575
[0369] Ser Leu Gly Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp
[0370] 580 585 590
[0371] Phe Leu Asp Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu
[0372] 595 600 605
[0373] Thr Leu Thr Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys
[0374] 610 615 620
[0375] Thr Tyr Ala His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg
[0376] 625 630 635 640
[0377] Arg Arg Tyr Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly

[0378] 645 650 655

[0379] Ile Arg Asp Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser

[0380] 660 665 670

[0381] Asp Gly Phe Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser

[0382] 675 680 685

[0383] Leu Thr Phe Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly

[0384] 690 695 700

[0385] Asp Ser Leu His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile

[0386] 705 710 715 720

[0387] Lys Lys Gly Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys

[0388] 725 730 735

[0389] Val Met Gly Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg

[0390] 740 745 750

[0391] Glu Asn Gln Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met

[0392] 755 760 765

[0393] Lys Arg Ile Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys

[0394] 770 775 780

[0395] Glu His Pro Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu

[0396] 785 790 795 800

[0397] Tyr Tyr Leu Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp

[0398] 805 810 815

[0399] Ile Asn Arg Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp Ala Ile Val Pro Gln Ser

[0400] 820 825 830

[0401] Phe Leu Lys Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp

[0402] 835 840 845

[0403] Lys Asn Arg Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys

[0404] 850 855 860

[0405] Lys Met Lys Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr

[0406] 865 870 875 880

[0407] Gln Arg Lys Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser

[0408] 885 890 895

[0409] Glu Leu Asp Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg

[0410] 900 905 910

[0411] Gln Ile Thr Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr

[0412] 915 920 925

[0413] Lys Tyr Asp Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr

[0414] 930 935 940

[0415] Leu Lys Ser Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr

[0416] 945 950 955 960

[0417] Lys Val Arg Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu

[0418] 965 970 975

[0419] Asn Ala Val Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu

[0420] 980 985 990

[0421] Ser Glu Phe Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met

[0422] 995 1000 1005

[0423] Ile Ala Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr

[0424] 1010 1015 1020

[0425] Phe Phe Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr

[0426] 1025 1030 1035

[0427] Leu Ala Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn

[0428] 1040 1045 1050

[0429] Gly Glu Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala

[0430] 1055 1060 1065

[0431] Thr Val Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys

[0432] 1070 1075 1080

[0433] Lys Thr Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu

[0434] 1085 1090 1095

[0435] Pro Lys Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp

[0436] 1100 1105 1110

[0437] Asp Pro Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr

[0438] 1115 1120 1125

[0439] Ser Val Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys

[0440] 1130 1135 1140

[0441] Leu Lys Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg

[0442] 1145 1150 1155

[0443] Ser Ser Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly

[0444] 1160 1165 1170

[0445] Tyr Lys Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr

[0446] 1175 1180 1185

[0447] Ser Leu Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser

[0448] 1190 1195 1200

[0449] Ala Gly Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys

[0450] 1205 1210 1215

[0451] Tyr Val Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys

[0452] 1220 1225 1230

[0453] Gly Ser Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln

[0454] 1235 1240 1245

[0455] His Lys His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe

[0456] 1250 1255 1260

[0457] Ser Lys Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu

[0458] 1265 1270 1275

[0459] Ser Ala Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala

[0460] 1280 1285 1290

[0461] Glu Asn Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro

[0462] 1295 1300 1305

[0463] Ala Ala Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr

[0464] 1310 1315 1320

[0465] Thr Ser Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser

[0466] 1325 1330 1335

[0467] Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly

[0468] 1340 1345 1350

[0469] Gly Asp Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly

[0470] 1355 1360 1365

[0471] Ser Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp Pro Lys Lys

[0472] 1370 1375 1380

[0473] Lys Arg Lys Val Asp

[0474] 1385

[0475] <210> 3

[0476] <211> 7256

[0477] <212> DNA

[0478] <213> 人工序列

[0479] <220>

[0480] <223> AAV, dNCas9

[0481] <400> 3

[0482] ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60

[0483] ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120

[0484] aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctacgta gccatgctct 180

[0485] aggaagatcg gaattcgccc ttaagctagc tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc 240

[0486] attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc 300

[0487] tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt 360

[0488] aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca 420

[0489] cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg 480

[0490] taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca 540

[0491] gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa 600

[0492] tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa 660

[0493] tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc 720

[0494] cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctgg 780

[0495] tttagtgaac cgtcagatcc tgcagaagtt ggtcgtgagg cactgggcag gtaagtatca 840

[0496] aggttacaag acaggtttaa ggagaccaat agaaactggg cttgtcgaga cagagaagac 900

[0497] tcttgcgttt ctgataggca cctattggtc ttactgacat ccactttgcc tttctctcca 960

[0498] caggtgtcca ggcggccgcc atggatatca tcatgggccc caagaaaaaa cgcaaggtgg 1020

[0499] ccgcagcaga ctataaggat gacgacgata aggggatcca tggtgtgcct gctgcagata 1080

[0500] aaaaatacag catcggcctg gctatcggaa ctaactccgt cggctgggcc gtcattaccg 1140

[0501] acgaatacaa agtacctagc aaaaagttca aggtgcttgg caacacagat cgccactcaa 1200

[0502] tcaagaaaaa ccttatcgga gccctgctgt ttgactcagg cgaaaccgcc gaggctacac 1260

[0503] gcctgaaaag aacagctaga cggcggtaca ccagaaggaa gaaccggatc tgttatcttc 1320

[0504] aggagatttt ctccaatgag atggctaagg tggacgattc tttcttccat cgactcgaag 1380
[0505] aatctttctt ggtggaggaa gataagaaac acgagaggca tcctattttc ggaaacattg 1440
[0506] tcgatgaagt ggcctatcat gagaaatacc ccacgatcta ccatctgcga aaaaagttgg 1500
[0507] ttgactctac cgacaaggcg gacctgaggc ttatttatct ggccctggcc catatgatca 1560
[0508] aattcagggg gcacttcttg atcgaggggg accttaatcc cgacaactct gacgtggata 1620
[0509] agttgttcat acagcttgtg cagacctaca accagctgtt cgaggagaat ccaatcaacg 1680
[0510] ccagcggagt ggacgctaaa gccattctga gcgcgagatt gagcaagtct agaagattgg 1740
[0511] aaaaccttat agcccagctg ccaggtgaga agaagaacgg actgtttggc aatctcattg 1800
[0512] cgcttagcct cggactcacc ccgaacttca aatccaactt cgacctcgcc gaagatgcca 1860
[0513] aattgcagct cagtaaggat acgtatgacg atgatcttga caatctgctg gcgcagatcg 1920
[0514] gggaccagta cgccgatctt ttcttggcag caaaaaatct ctcagatgca atactcttgt 1980
[0515] cagacatact gcgagttaat accgagatta ctaaggctcc gctttctgcc tccatgatca 2040
[0516] agcgctacga tgagcatcac caggatctga cactgttgaa agccctggtg cgccaacagc 2100
[0517] tgccagagaa atacaaggaa atctttttg accagtccaa gaatggctac gcaggataca 2160
[0518] tcgatggagg agccagtcag gaggaatttt acaagtttat taagcctatc ctggagaaga 2220
[0519] tggatggtac cgaagaactc ctggtcaagc tcaaccgaga agatttgctt cgcaagcaaa 2280
[0520] ggacttttga caacggctcc attccgcatc agattcatct gggcgagctg catgccattc 2340
[0521] tgcgaagaca ggaggatttt tacccatttc tgaaggacaa ccgagagaag atcgagaaaa 2400
[0522] tactgacatt caggatacca tattacgtgg gtccactcgc caggggcaac tcccgattcg 2460
[0523] cctggatgac aaggaaaagc gaagagacga tcactccatg gaacttcgag gaggtcgtgg 2520
[0524] acaaggggc ctccgcgcag agctttatcg agaggatgac gaactttgac aaaaatctcc 2580
[0525] ctaacgagaa ggtgctgcca aaacattctc tgctctacga gtatttcacc gtttataatg 2640
[0526] agctcacaaa ggtgaagtac gtgaccgaag ggatgcggaa gcccgctttt ctgtccggag 2700
[0527] agcagaagaa ggctatcgtg gatttgctct ttaagactaa ccgcaaggta acagtcaagc 2760
[0528] agctgaagga agactacttc aagaagatcg aatgcttgtc ctacgaaacg gaaatcttga 2820
[0529] cagttgagta cgggctcctg ccaatcggga agatagtaga gaagaggatt gaatgtaccg 2880
[0530] tctattctgt tgataacaac ggtaacatat acacccagcc cgtcgcccaa tggcacgatc 2940
[0531] gcggtgagca ggaggtgttc gaatactgtc tggaggacgg gtcattgatt cgggcgacta 3000
[0532] aggaccataa gtttatgacg gtagacggcc agatgttgcc catagatgag atctttgagc 3060
[0533] gggaactcga cttgatgaga gtcgataatc ttcctaatta aaccggagct tggatccaat 3120
[0534] caacctctgg attacaaaat ttgtgaaaga ttgactggta ttcttaacta tgttgctcct 3180
[0535] tttacgctat gtggatacgc tgctttaatg cctttgtatc atgctattgc ttcccgtatg 3240
[0536] gctttcattt tctcctcctt gtataaatcc tggttgctgt ctctttatga ggagttgtgg 3300
[0537] cccgttgtca ggcaacgtgg cgtggtgtgc actgtgtttg ctgacgcaac ccccactggt 3360
[0538] tggggcattg ccaccacctg tcagctcctt tccgggactt tcgctttccc cctccctatt 3420
[0539] gccacggcgg aactcatcgc cgcctgcctt gcccgctgct ggacaggggc tcggctgttg 3480
[0540] ggcactgaca attccgtggt gttgtcgggg aaatcatcgt cctttccttg gctgctcgcc 3540
[0541] tgtgttgcca cctggattct gcgcgggacg tccttctgct acgtcccttc ggccctcaat 3600
[0542] ccagcggacc ttccttcccg cggcctgctg ccggctctgc ggcctcttcc gcgtcttcga 3660
[0543] gatctgcctc gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc tcccccgtgc 3720
[0544] cttccttgac cctggaaggt gccactccca ctgtcctttc ctaataaaat gaggaaattg 3780
[0545] catcgcattg tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca 3840

[0546] agggggagga ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga ctcgagacgc gtggaggagg 3900
[0547] gcctatttcc catgattcct tcatatttgc atatacgata caaggctgtt agagagataa 3960
[0548] ttagaattaa tttgactgta aacacaaaga tattagtaca aaatacgtga cgtagaaagt 4020
[0549] aataatttct tgggtagttt gcagttttaa aattatgttt taaaatggac tatcatatgc 4080
[0550] ttaccgtaac ttgaaagtat ttcgatttct tggctttata tatcttgtgg aaaggacgaa 4140
[0551] acaccggttt tagagctaga aatagcaagt taaaataagg ctagtccgtt atcaacttga 4200
[0552] aaaagtggca ccgagtcggt gctttttttct cgagttaagg gcgaattccc gataaggatc 4260
[0553] ttcctagagc atggctacgt agataagtag catggcgggt taatcattaa ctacaaggaa 4320
[0554] cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccggg 4380
[0555] cgaccaaagg tcgcccgacg cccgggcttt gcccgggcgg cctcagtgag cgagcgagcg 4440
[0556] cgcagcctta attaacctaa ttcactggcc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac 4500
[0557] cctggcgtta cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat 4560
[0558] agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg 4620
[0559] gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc 4680
[0560] gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt tcttcccttc ctttctcgcc 4740
[0561] acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg gttccgattt 4800
[0562] agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc acgtagtggg 4860
[0563] ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt ctttaatagt 4920
[0564] ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggtctattc ttttgattta 4980
[0565] taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt 5040
[0566] aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt ataatttcag gtggcatctt tcggggaaat 5100
[0567] gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg 5160
[0568] agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa 5220
[0569] catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac 5280
[0570] ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac 5340
[0571] atcgaactgg atctcaatag tggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt 5400
[0572] ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc 5460
[0573] gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggt tgagtactca 5520
[0574] ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgctgcc 5580
[0575] ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag 5640
[0576] gagctaaccg ctttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctcgccttga tcgttgggaa 5700
[0577] ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagtaatg 5760
[0578] gtaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa 5820
[0579] ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg 5880
[0580] gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt 5940
[0581] gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt 6000
[0582] caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag 6060
[0583] cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat 6120
[0584] ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct 6180
[0585] taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct 6240
[0586] tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca 6300
[0587] gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc 6360

[0588] agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc 6420
[0589] aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct 6480
[0590] gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag 6540
[0591] gcgcagcggt cgggctgaac gggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc 6600
[0592] tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg 6660
[0593] agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgagggag 6720
[0594] cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt 6780
[0595] gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac 6840
[0596] gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc tgcggttttg ctcacatgtt ctttcctgcg 6900
[0597] ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc 6960
[0598] cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga gcgcccaata 7020
[0599] cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca cgacaggttt 7080
[0600] cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct cactcattag 7140
[0601] gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcgga 7200
[0602] taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg ccagatttaa ttaagg 7256
[0603] <210> 4
[0604] <211> 7736
[0605] <212> DNA
[0606] <213> 人工序列
[0607] <220>
[0608] <223> AAV, dCCas9
[0609] <400> 4
[0610] ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60
[0611] ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120
[0612] aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctacgta gccatgctct 180
[0613] aggaagatcg gaattcgccc ttaagctagc tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc 240
[0614] attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc 300
[0615] tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt 360
[0616] aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca 420
[0617] cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg 480
[0618] taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca 540
[0619] gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa 600
[0620] tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa 660
[0621] tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc 720
[0622] cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctgg 780
[0623] tttagtgaac cgtcagatcc tgcagaagtt ggtcgtgagg cactgggcag gtaagtatca 840
[0624] aggttacaag acaggtttaa ggagaccaat agaaactggg cttgtcgaga cagagaagac 900
[0625] tcttgcgttt ctgataggca cctattggtc ttactgacat ccactttgcc tttctctcca 960
[0626] caggtgtcca ggcggccgcc atggatatca tgattaagat cgcaacccga aaatacctgg 1020
[0627] gaaagcagaa cgtctacgat attggtgtag agagagacca taactttgct ctgaagaacg 1080
[0628] gctttattgc ctcatgcttc gacagcgttg agatttccgg cgtggaggat agattcaacg 1140
[0629] cttctctcgg cacttatcac gaccttctga agattatcaa ggataaggat ttcctggaca 1200

[0630] acgaagagaa tgaagacatc ctggaggaca tcgtcctgac cttgaccctg ttcgaggaca 1260
[0631] gagagatgat cgaggagagg cttaagacct acgcccacct gtttgatgac aaagtgatga 1320
[0632] aacagctgaa acggagacgg tatactggtt ggggcaggct gtcccggaag cttattaacg 1380
[0633] gaatacggga taagcaaagt ggaaagacaa tacttgactt cctgaagtct gatggttttg 1440
[0634] ctaacaggaa tttcatgcag ctgattcacg acgactccct tacatttaag gaggacattc 1500
[0635] agaaggccca ggtgtctgga caaggggact ctctccatga gcacatcgcc aacctggccg 1560
[0636] gcagcccagc catcaaaaaa ggaattcttc aaactgtaaa ggtggtggat gagctggtta 1620
[0637] aagtcatggg acggcacaag cctgagaata tcgtcattga gatggccagg gagaatcaga 1680
[0638] cgacacagaa aggacagaag aactcacgcg agaggatgaa gagaattgag gaagggataa 1740
[0639] aggagctggg aagtcagatt ctgaaggaac acccagttga aaatacccag ctgcagaatg 1800
[0640] aaaagctgta tctgtactat ctgcagaatg gacgagacat gtatgttgat caggagctgg 1860
[0641] acattaaccg actctcagat tatgacgtgg atgctatagt ccctcagagt ttcctcaagg 1920
[0642] acgattcaat cgataataaa gtgttgaccc gcagcgacaa aaacaggggc aaaagcgata 1980
[0643] atgtgccctc agaggaagtg gtcaagaaaa tgaagaatta ctggagacag ctgctcaacg 2040
[0644] ctaagcttat tacccagagg aaattcgata atttgacaaa agctgaaagg ggtgggctta 2100
[0645] gcgagctgga taaagcagga ttcatcaagc ggcagcttgt cgagacgcgc cagatcacaa 2160
[0646] agcacgtggc acagattttg gattcccgca tgaacactaa gtatgacgag aacgataagc 2220
[0647] tgatccgcga ggtgaaggtg atcacgctga agtccaagct ggtaagtgat ttccggaaag 2280
[0648] atttccagtt ctacaaagtg agggagatta acaactatca ccacgcccac gacgcttact 2340
[0649] tgaatgccgt tgtgggtaca gcattgatca aaaaatatcc aaagctggaa agtgagtttg 2400
[0650] tttacggaga ctataaagtc tatgacgtgc ggaagatgat cgccaagagc gagcaggaga 2460
[0651] tcgggaaagc aacagctaaa tatttcttct attccaatat catgaatttt ttcaaaactg 2520
[0652] agataacact tgctaatggt gagataagaa agcgaccgct gatagagacg aatggcgaga 2580
[0653] ctggcgagat cgtgtgggac aaagggaggg acttcgcaac cgtccgcaag gtcttgagca 2640
[0654] tgccgcaggt gaatatagtt aagaaaaccg aagtgcaaac aggcggcttc agtaaggagt 2700
[0655] ccatattgcc gaagaggaac tctgacaagc tgatcgctag gaaaaaggat tgggatccaa 2760
[0656] aaaaatacgg cgggttcgac tcccctaccg ttgcatacag cgtgcttgtg gtcgcgaagg 2820
[0657] tcgaaaaggg caagtctaag aagctcaaga gtgtcaaaga attgctgggt atcacaatta 2880
[0658] tggagcgcag tagtttcgag aagaatccga tagattttct ggaggcaaag ggatacaagg 2940
[0659] aggtgaagaa ggatctgatc atcaaactgc ctaagtactc cctgttcgag cttgagaatg 3000
[0660] gtagaaagcg catgcttgcc tcagccggcg aattgcagaa gggcaatgag ctcgccctgc 3060
[0661] cttcaaaata cgtgaacttc ctgtacttgg catcacacta cgaaaagctg aaaggatccc 3120
[0662] ctgaggataa tgagcaaaaa caacttttg tggagcagca taagcactat ctcgatgaaa 3180
[0663] ttattgagca gatttctgaa ttcagcaagc gcgtcatcct cgcggacgcc aatctggata 3240
[0664] aagtgctgag cgcctacaat aaacaccgag acaagcccat tcgggaacag gccgagaaca 3300
[0665] tcattcacct cttcactctg actaatctcg gggccccggc cgcattcaaa tacttcgaca 3360
[0666] ctactatcga caggaaacgc tatacttcaa cgaaggaggt gctggacgct actttgatcc 3420
[0667] accagtccat tacggggctc tatgagacac gaatcgatct ttctcaactt ggaggtgatg 3480
[0668] cctacccata tgacgtgcct gactatgcct ccctgggctc tgggagccct aagaaaaaga 3540
[0669] ggaaggtaga ggatccaaaa aaaaagcgaa aagtcgatta aaccggagct tggatccaat 3600
[0670] caacctctgg attacaaaat ttgtgaaaga ttgactggta ttcttaacta tgttgctcct 3660
[0671] tttacgctat gtggatacgc tgctttaatg cctttgtatc atgctattgc ttcccgtatg 3720

[0672] gctttcattt tctcctcctt gtataaatcc tggttgctgt ctctttatga ggagttgtgg 3780
[0673] cccgttgtca ggcaacgtgg cgtggtgtgc actgtgtttg ctgacgcaac ccccactggt 3840
[0674] tggggcattg ccaccacctg tcagctcctt tccgggactt tcgctttccc cctccctatt 3900
[0675] gccacggcgg aactcatcgc cgcctgcctt gcccgctgct ggacaggggc tcggctgttg 3960
[0676] ggcactgaca attccgtggt gttgtcgggg aaatcatcgt cctttccttg gctgctcgcc 4020
[0677] tgtgttgcca cctggattct gcgcgggacg tccttctgct acgtcccttc ggccctcaat 4080
[0678] ccagcggacc ttccttcccg cggcctgctg ccggctctgc ggcctcttcc gcgtcttcga 4140
[0679] gatctgcctc gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc tcccccgtgc 4200
[0680] cttccttgac cctggaaggt gccactccca ctgtcctttc ctaataaaat gaggaaattg 4260
[0681] catcgcattg tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca 4320
[0682] agggggagga ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga ctcgagacgc gtggaggagg 4380
[0683] gcctatttcc catgattcct tcatatttgc atatacgata caaggctgtt agagagataa 4440
[0684] ttagaattaa tttgactgta aacacaaaga tattagtaca aaatacgtga cgtagaaagt 4500
[0685] aataatttct tgggtagttt gcagttttaa aattatgttt taaaatggac tatcatatgc 4560
[0686] ttaccgtaac ttgaaagtat ttcgatttct tggctttata tatcttgtgg aaaggacgaa 4620
[0687] acaccggttt tagagctaga aatagcaagt taaaataagg ctagtccgtt atcaacttga 4680
[0688] aaaagtggca ccgagtcggt gctttttttct cgagttaagg gcgaattccc gataaggatc 4740
[0689] ttcctagagc atggctacgt agataagtag catggcgggt taatcattaa ctacaaggaa 4800
[0690] cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccggg 4860
[0691] cgaccaaagg tcgcccgacg cccgggcttt gcccgggcgg cctcagtgag cgagcgagcg 4920
[0692] cgcagcctta attaacctaa ttcactggcc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac 4980
[0693] cctggcgtta cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat 5040
[0694] agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg 5100
[0695] gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc 5160
[0696] gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt tcttcccttc ctttctcgcc 5220
[0697] acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg gttccgattt 5280
[0698] agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc acgtagtggg 5340
[0699] ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt ctttaatagt 5400
[0700] ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggtctattc ttttgattta 5460
[0701] taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt 5520
[0702] aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt ataatttcag gtggcatctt tcggggaaat 5580
[0703] gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg 5640
[0704] agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa 5700
[0705] catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac 5760
[0706] ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac 5820
[0707] atcgaactgg atctcaatag tggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt 5880
[0708] ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc 5940
[0709] gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggt tgagtactca 6000
[0710] ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgctgcc 6060
[0711] ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag 6120
[0712] gagctaaccg ctttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctcgccttga tcgttgggaa 6180
[0713] ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagtaatg 6240

[0714] gtaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa 6300
[0715] ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg 6360
[0716] gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt 6420
[0717] gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt 6480
[0718] caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag 6540
[0719] cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat 6600
[0720] ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct 6660
[0721] taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct 6720
[0722] tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca 6780
[0723] gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc 6840
[0724] agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc 6900
[0725] aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct 6960
[0726] gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag 7020
[0727] gcgcagcggt cgggctgaac gggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc 7080
[0728] tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg 7140
[0729] agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgagggag 7200
[0730] cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt 7260
[0731] gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac 7320
[0732] gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc tgcggttttg ctcacatgtt ctttcctgcg 7380
[0733] ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc 7440
[0734] cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga gcgcccaata 7500
[0735] cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca cgacaggttt 7560
[0736] cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct cactcattag 7620
[0737] gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcgga 7680
[0738] taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg ccagatttaa ttaagg 7736
[0739] <210> 5
[0740] <211> 5704
[0741] <212> DNA
[0742] <213> 人工序列
[0743] <220>
[0744] <223> AAV, ZF
[0745] <400> 5
[0746] ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60
[0747] ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120
[0748] aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctacgta gccatgctct 180
[0749] aggaagatcg gaattcgccc ttaagctagc tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc 240
[0750] attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc 300
[0751] tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt 360
[0752] aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca 420
[0753] cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg 480
[0754] taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca 540
[0755] gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa 600

[0756] tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa 660
[0757] tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc 720
[0758] cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctgg 780
[0759] tttagtgaac cgtcagatcc tgcagaagtt ggtcgtgagg cactgggcag gtaagtatca 840
[0760] aggttacaag acaggtttaa ggagaccaat agaaactggg cttgtcgaga cagagaagac 900
[0761] tcttgcgttt ctgataggca cctattggtc ttactgacat ccactttgcc tttctctcca 960
[0762] caggtgtcca ggcggccgcc atgaggagca tgcacgatta caaagaccac gatggtgact 1020
[0763] ataaagacca tgatatagac tataaggacg acgacgacaa aatggcacct aaaaaaaagc 1080
[0764] gcaaggtagg cattcatggc gtacccgcgg cgatggctga gaggcctttt cagtgccgga 1140
[0765] tctgtatgag aaacttcagt gaccgcagtc atctcaccag gcacatccgc acacacacgg 1200
[0766] gggagaaacc cttcgcatgt gacatttgcg gccgaaagtt cgccgatcga agtcatcttg 1260
[0767] cgagacacac caaaattcac accgggagcc aaaagccctt tcaatgtcga atttgtatgc 1320
[0768] gaaatttttc ccgcagcgat aatctgtctg agcatattag gacgcatacc ggggagaagc 1380
[0769] ccttcgcatg cgatatatgt ggtcggaagt tcgctaggtc tgccgctctg gcgcggcata 1440
[0770] ctaaaataca cacggggagt caaaaaccct ttcagtgccg gatctgcatg cggaattttt 1500
[0771] cccgatccga tacattgtca caacacattc ggacacacac aggagaaaaa cctttcgcct 1560
[0772] gtgatatttg cggacgcaag tttgccacga gggatcaccg gataaaacac acgaaaatcc 1620
[0773] acctgcgcca aaaagacgcc gcgagagggt cacgcacctt ggtgacattt aaagatgttt 1680
[0774] tcgtagattt cacacgagag gaatggaaac tcttggacac cgcgcaacag attgtatacc 1740
[0775] ggaacgttat gctggaaaac tataagaacc tggtctctct gggttaccag ttgactaaac 1800
[0776] ccgatgtcat tctgagactg gagaaaggcg aggagccgtg gctggtggac tacaaggatg 1860
[0777] acgatgacaa gcggagctaa acaaattttg taatccaggc ggccgccgga tccaatcaac 1920
[0778] ctctggatta caaaatttgt gaaagattga ctggtattct taactatgtt gctcctttta 1980
[0779] cgctatgtgg atacgctgct ttaatgcctt tgtatcatgc tattgcttcc cgtatggctt 2040
[0780] tcattttctc ctccttgtat aaatcctggt tgctgtctct ttatgaggag ttgtggcccg 2100
[0781] ttgtcaggca acgtggcgtg gtgtgcactg tgtttgctga cgcaaccccc actggttggg 2160
[0782] gcattgccac cacctgtcag ctcctttccg ggactttcgc tttccccctc cctattgcca 2220
[0783] cggcggaact catcgccgcc tgccttgccc gctgctggac aggggctcgg ctgttgggca 2280
[0784] ctgacaattc cgtggtgttg tcggggaaat catcgtcctt tccttggctg ctcgcctgtg 2340
[0785] ttgccacctg gattctgcgc gggacgtcct tctgctacgt cccttcggcc ctcaatccag 2400
[0786] cggaccttcc ttcccgcggc ctgctgccgg ctctgcggcc tcttccgcgt cttcgagatc 2460
[0787] tgcctcgact gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt tgcccctccc ccgtgccttc 2520
[0788] cttgaccctg gaaggtgcca ctcccactgt cctttcctaa taaaatgagg aaattgcatc 2580
[0789] gcattgtctg agtaggtgtc attctattct ggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg 2640
[0790] ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggactcg agttaagggc gaattcccga 2700
[0791] taaggatctt cctagagcat ggctacgtag ataagtagca tggcgggtta atcattaact 2760
[0792] acaaggaacc cctagtgatg gagttggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg 2820
[0793] aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc cgggctttgc ccgggcggcc tcagtgagcg 2880
[0794] agcgagcgcg cagccttaat taacctaatt cactggccgt cgttttacaa cgtcgtgact 2940
[0795] gggaaaaccc tggcgttacc caacttaatc gccttgcagc acatcccccc ttcgccagct 3000
[0796] ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg 3060
[0797] gcgaatggga cgcgccctgt agcggcgcat taagcgcggc gggtgtggtg gttacgcgca 3120

[0798] gcgtgaccgc tacacttgcc agcgccctag cgcccgctcc tttcgctttc ttcccttcct 3180
[0799] ttctcgccac gttcgccggc tttccccgtc aagctctaaa tcgggggctc cctttagggt 3240
[0800] tccgatttag tgctttacgg cacctcgacc ccaaaaaact tgattagggt gatggttcac 3300
[0801] gtagtgggcc atcgccctga tagacggttt ttcgcccttt gacgttggag tccacgttct 3360
[0802] ttaatagtgg actcttgttc caaactggaa caacactcaa ccctatctcg gtctattctt 3420
[0803] ttgatttata agggattttg ccgatttcgg cctattggtt aaaaaatgag ctgatttaac 3480
[0804] aaaaatttaa cgcgaatttt aacaaaatat taacgtttat aatttcaggt ggcatctttc 3540
[0805] ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttgtt tatttttcta aatacattca aatatgtatc 3600
[0806] cgctcatgag acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga 3660
[0807] gtattcaaca tttccgtgtc gcccttattc cctttttgc ggcattttgc cttcctgttt 3720
[0808] ttgctcaccc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag 3780
[0809] tgggttacat cgaactggat ctcaatagtg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag 3840
[0810] aacgttttcc aatgatgagc acttttaaag ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgta 3900
[0811] ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg 3960
[0812] agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca 4020
[0813] gtgctgccat aaccatgagt gataacactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag 4080
[0814] gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatgggggа tcatgtaact cgccttgatc 4140
[0815] gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg 4200
[0816] tagtaatggt aacaacgttg cgcaaactat taactggcga actacttact ctagcttccc 4260
[0817] ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg 4320
[0818] cccttccggc tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggtctcgcg 4380
[0819] gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga 4440
[0820] cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac 4500
[0821] tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag tttactcata tatactttag attgatttaa 4560
[0822] aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca 4620
[0823] aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag 4680
[0824] gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac 4740
[0825] cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa 4800
[0826] ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc 4860
[0827] accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaatc ctgttaccag 4920
[0828] tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac 4980
[0829] cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc 5040
[0830] gaacgaccta caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc 5100
[0831] ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca 5160
[0832] cgagggagct tccagggggа aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc 5220
[0833] tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg 5280
[0834] ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg cggttttgct cacatgttct 5340
[0835] ttcctgcgtt atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata 5400
[0836] ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc 5460
[0837] gcccaatacg caaaccgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agctggcacg 5520
[0838] acaggtttcc cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc aattaatgtg agttagctca 5580
[0839] ctcattaggc accccaggct ttacacttta tgcttccggc tcgtatgttg tgtggaattg 5640

[0840] tgagcggata acaatttcac acaggaaaca gctatgacca tgattacgcc agatttaatt 5700

[0841] aagg 5704

[0842] <210> 6

[0843] <211> 210

[0844] <212> DNA

[0845] <213> 人工序列

[0846] <220>

[0847] <223> KRAB结构域

[0848] <220>

[0849] <221> CDS

[0850] <222> (1)..(210)

[0851] <400> 6

[0852] gct aag tca cta act gcc tgg tcc cgg aca ctg gtg acc ttc aag gat 48

[0853] Ala Lys Ser Leu Thr Ala Trp Ser Arg Thr Leu Val Thr Phe Lys Asp

[0854] 1 5 10 15

[0855] gta ttt gtg gac ttc acc agg gag gag tgg aag ctg ctg gac act gct 96

[0856] Val Phe Val Asp Phe Thr Arg Glu Glu Trp Lys Leu Leu Asp Thr Ala

[0857] 20 25 30

[0858] cag cag atc gtg tac aga aat gtg atg ctg gag aac tat aag aac ctg 144

[0859] Gln Gln Ile Val Tyr Arg Asn Val Met Leu Glu Asn Tyr Lys Asn Leu

[0860] 35 40 45

[0861] gtt tcc ttg ggt tat cag ctt act aag cca gat gtg atc ctc cgg ttg 192

[0862] Val Ser Leu Gly Tyr Gln Leu Thr Lys Pro Asp Val Ile Leu Arg Leu

[0863] 50 55 60

[0864] gag aag gga gaa gag ccc 210

[0865] Glu Lys Gly Glu Glu Pro

[0866] 65 70

[0867] <210> 7

[0868] <211> 70

[0869] <212> PRT

[0870] <213> 人工序列

[0871] <220>

[0872] <223> 合成的构建体

[0873] <400> 7

[0874] Ala Lys Ser Leu Thr Ala Trp Ser Arg Thr Leu Val Thr Phe Lys Asp

[0875] 1 5 10 15

[0876] Val Phe Val Asp Phe Thr Arg Glu Glu Trp Lys Leu Leu Asp Thr Ala

[0877] 20 25 30

[0878] Gln Gln Ile Val Tyr Arg Asn Val Met Leu Glu Asn Tyr Lys Asn Leu

[0879] 35 40 45

[0880] Val Ser Leu Gly Tyr Gln Leu Thr Lys Pro Asp Val Ile Leu Arg Leu

[0881] 50 55 60

[0882] Glu Lys Gly Glu Glu Pro
[0883] 65 70
[0884] <210> 8
[0885] <211> 863
[0886] <212> PRT
[0887] <213> 人工序列
[0888] <220>
[0889] <223> C-内含肽-dCCas9
[0890] <400> 8
[0891] Met Ile Lys Ile Ala Thr Arg Lys Tyr Leu Gly Lys Gln Asn Val Tyr
[0892] 1 5 10 15
[0893] Asp Ile Gly Val Glu Arg Asp His Asn Phe Ala Leu Lys Asn Gly Phe
[0894] 20 25 30
[0895] Ile Ala Ser Cys Phe Asp Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg
[0896] 35 40 45
[0897] Phe Asn Ala Ser Leu Gly Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys
[0898] 50 55 60
[0899] Asp Lys Asp Phe Leu Asp Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp
[0900] 65 70 75 80
[0901] Ile Val Leu Thr Leu Thr Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu
[0902] 85 90 95
[0903] Arg Leu Lys Thr Tyr Ala His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln
[0904] 100 105 110
[0905] Leu Lys Arg Arg Arg Tyr Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu
[0906] 115 120 125
[0907] Ile Asn Gly Ile Arg Asp Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe
[0908] 130 135 140
[0909] Leu Lys Ser Asp Gly Phe Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His
[0910] 145 150 155 160
[0911] Asp Asp Ser Leu Thr Phe Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser
[0912] 165 170 175
[0913] Gly Gln Gly Asp Ser Leu His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser
[0914] 180 185 190
[0915] Pro Ala Ile Lys Lys Gly Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu
[0916] 195 200 205
[0917] Leu Val Lys Val Met Gly Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu
[0918] 210 215 220
[0919] Met Ala Arg Glu Asn Gln Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg
[0920] 225 230 235 240
[0921] Glu Arg Met Lys Arg Ile Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln
[0922] 245 250 255
[0923] Ile Leu Lys Glu His Pro Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys

[0924] 260 265 270

[0925] Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln

[0926] 275 280 285

[0927] Glu Leu Asp Ile Asn Arg Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp Ala Ile Val

[0928] 290 295 300

[0929] Pro Gln Ser Phe Leu Lys Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr

[0930] 305 310 315 320

[0931] Arg Ser Asp Lys Asn Arg Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu

[0932] 325 330 335

[0933] Val Val Lys Lys Met Lys Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys

[0934] 340 345 350

[0935] Leu Ile Thr Gln Arg Lys Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly

[0936] 355 360 365

[0937] Gly Leu Ser Glu Leu Asp Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val

[0938] 370 375 380

[0939] Glu Thr Arg Gln Ile Thr Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg

[0940] 385 390 395 400

[0941] Met Asn Thr Lys Tyr Asp Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys

[0942] 405 410 415

[0943] Val Ile Thr Leu Lys Ser Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe

[0944] 420 425 430

[0945] Gln Phe Tyr Lys Val Arg Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp

[0946] 435 440 445

[0947] Ala Tyr Leu Asn Ala Val Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro

[0948] 450 455 460

[0949] Lys Leu Glu Ser Glu Phe Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val

[0950] 465 470 475 480

[0951] Arg Lys Met Ile Ala Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala

[0952] 485 490 495

[0953] Lys Tyr Phe Phe Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile

[0954] 500 505 510

[0955] Thr Leu Ala Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn

[0956] 515 520 525

[0957] Gly Glu Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr

[0958] 530 535 540

[0959] Val Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr

[0960] 545 550 555 560

[0961] Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys Arg

[0962] 565 570 575

[0963] Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro Lys Lys

[0964] 580 585 590

[0965] Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val Leu Val Val

[0966] 595 600 605
[0967] Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys Ser Val Lys Glu
[0968] 610 615 620
[0969] Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser Phe Glu Lys Asn Pro
[0970] 625 630 635 640
[0971] Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys Glu Val Lys Lys Asp Leu
[0972] 645 650 655
[0973] Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg
[0974] 660 665 670
[0975] Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu
[0976] 675 680 685
[0977] Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr
[0978] 690 695 700
[0979] Glu Lys Leu Lys Gly Ser Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe
[0980] 705 710 715 720
[0981] Val Glu Gln His Lys His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser
[0982] 725 730 735
[0983] Glu Phe Ser Lys Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val
[0984] 740 745 750
[0985] Leu Ser Ala Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala
[0986] 755 760 765
[0987] Glu Asn Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala
[0988] 770 775 780
[0989] Ala Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser
[0990] 785 790 795 800
[0991] Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr Gly
[0992] 805 810 815
[0993] Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp Ala Tyr
[0994] 820 825 830
[0995] Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Ser Gly Ser Pro Lys
[0996] 835 840 845
[0997] Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Asp
[0998] 850 855 860
[0999] <210> 9
[1000] <211> 702
[1001] <212> PRT
[1002] <213> 人工序列
[1003] <220>
[1004] <223> dNCas9-N-内含肽
[1005] <400> 9
[1006] Met Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ala Ala Ala Asp Tyr Lys Asp
[1007] 1 5 10 15

[1008] Asp Asp Asp Lys Gly Ile His Gly Val Pro Ala Ala Asp Lys Lys Tyr
[1009] 20 25 30
[1010] Ser Ile Gly Leu Ala Ile Gly Thr Asn Ser Val Gly Trp Ala Val Ile
[1011] 35 40 45
[1012] Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe Lys Val Leu Gly Asn
[1013] 50 55 60
[1014] Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile Gly Ala Leu Leu Phe
[1015] 65 70 75 80
[1016] Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Arg Thr Ala Arg
[1017] 85 90 95
[1018] Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys Tyr Leu Gln Glu Ile
[1019] 100 105 110
[1020] Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser Phe Phe His Arg Leu
[1021] 115 120 125
[1022] Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys His Glu Arg His Pro
[1023] 130 135 140
[1024] Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr His Glu Lys Tyr Pro
[1025] 145 150 155 160
[1026] Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp Ser Thr Asp Lys Ala
[1027] 165 170 175
[1028] Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His Met Ile Lys Phe Arg
[1029] 180 185 190
[1030] Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro Asp Asn Ser Asp Val
[1031] 195 200 205
[1032] Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr Asn Gln Leu Phe Glu
[1033] 210 215 220
[1034] Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala Lys Ala Ile Leu Ser
[1035] 225 230 235 240
[1036] Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn Leu Ile Ala Gln Leu
[1037] 245 250 255
[1038] Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn Leu Ile Ala Leu Ser
[1039] 260 265 270
[1040] Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe Asp Leu Ala Glu Asp
[1041] 275 280 285
[1042] Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp Asp Asp Leu Asp Asn
[1043] 290 295 300
[1044] Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp Leu Phe Leu Ala Ala
[1045] 305 310 315 320
[1046] Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp Ile Leu Arg Val Asn
[1047] 325 330 335
[1048] Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser Met Ile Lys Arg Tyr
[1049] 340 345 350

[1050] Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys Ala Leu Val Arg Gln
[1051] 355 360 365
[1052] Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe Asp Gln Ser Lys Asn
[1053] 370 375 380
[1054] Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser Gln Glu Glu Phe Tyr
[1055] 385 390 395 400
[1056] Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp Gly Thr Glu Glu Leu
[1057] 405 410 415
[1058] Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg Lys Gln Arg Thr Phe
[1059] 420 425 430
[1060] Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu Gly Glu Leu His Ala
[1061] 435 440 445
[1062] Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe Leu Lys Asp Asn Arg
[1063] 450 455 460
[1064] Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile Pro Tyr Tyr Val Gly
[1065] 465 470 475 480
[1066] Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp Met Thr Arg Lys Ser
[1067] 485 490 495
[1068] Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu Val Val Asp Lys Gly
[1069] 500 505 510
[1070] Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr Asn Phe Asp Lys Asn
[1071] 515 520 525
[1072] Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser Leu Leu Tyr Glu Tyr
[1073] 530 535 540
[1074] Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys Tyr Val Thr Glu Gly
[1075] 545 550 555 560
[1076] Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln Lys Lys Ala Ile Val
[1077] 565 570 575
[1078] Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr Val Lys Gln Leu Lys
[1079] 580 585 590
[1080] Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Leu Ser Tyr Glu Thr Glu Ile
[1081] 595 600 605
[1082] Leu Thr Val Glu Tyr Gly Leu Leu Pro Ile Gly Lys Ile Val Glu Lys
[1083] 610 615 620
[1084] Arg Ile Glu Cys Thr Val Tyr Ser Val Asp Asn Asn Gly Asn Ile Tyr
[1085] 625 630 635 640
[1086] Thr Gln Pro Val Ala Gln Trp His Asp Arg Gly Glu Gln Glu Val Phe
[1087] 645 650 655
[1088] Glu Tyr Cys Leu Glu Asp Gly Ser Leu Ile Arg Ala Thr Lys Asp His
[1089] 660 665 670
[1090] Lys Phe Met Thr Val Asp Gly Gln Met Leu Pro Ile Asp Glu Ile Phe
[1091] 675 680 685

[1092] Glu Arg Glu Leu Asp Leu Met Arg Val Asp Asn Leu Pro Asn
[1093] 690 695 700
[1094] <210> 10
[1095] <211> 7501
[1096] <212> DNA
[1097] <213> 人工序列
[1098] <220>
[1099] <223> AAV,dNCas9-KRAB
[1100] <400> 10
[1101] ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60
[1102] ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120
[1103] aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctacgta gccatgctct 180
[1104] aggaagatcg gaattcgccc ttaagctagc tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc 240
[1105] attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc 300
[1106] tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt 360
[1107] aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca 420
[1108] cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg 480
[1109] taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca 540
[1110] gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa 600
[1111] tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa 660
[1112] tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc 720
[1113] cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctgg 780
[1114] tttagtgaac cgtcagatcc tgcagaagtt ggtcgtgagg cactgggcag gtaagtatca 840
[1115] aggttacaag acaggtttaa ggagaccaat agaaactggg cttgtcgaga cagagaagac 900
[1116] tcttgcgttt ctgataggca cctattggtc ttactgacat ccactttgcc tttctctcca 960
[1117] caggtgtcca ggcggccgca tggatatcgc caccatggat gctaagtcac taactgcctg 1020
[1118] gtcccggaca ctggtgacct tcaaggatgt atttgtggac ttcaccaggg aggagtggaa 1080
[1119] gctgctggac actgctcagc agatcgtgta cagaaatgtg atgctggaga actataagaa 1140
[1120] cctggtttcc ttgggttatc agcttactaa gccagatgtg atcctccggt tggagaaggg 1200
[1121] agaagagccc ggcggttccg gcggagggtc ggatatcatg ggccccaaga aaaaacgcaa 1260
[1122] ggtggccgca gcagactata aggatgacga cgataagggg atccatggtg tgcctgctgc 1320
[1123] agataaaaaa tacagcatcg gcctggctat cggaactaac tccgtcggct gggccgtcat 1380
[1124] taccgacgaa tacaaagtac ctagcaaaaa gttcaaggtg cttggcaaca cagatcgcca 1440
[1125] ctcaatcaag aaaaacctta tcggagccct gctgtttgac tcaggcgaaa ccgccgaggc 1500
[1126] tacacgcctg aaaagaacag ctagacggcg gtacaccaga aggaagaacc ggatctgtta 1560
[1127] tcttcaggag attttctcca atgagatggc taaggtggac gattctttct tccatcgact 1620
[1128] cgaagaatct ttcttggtgg aggaagataa gaaacacgag aggcatccta ttttcggaaa 1680
[1129] cattgtcgat gaagtggcct atcatgagaa ataccccacg atctaccatc tgcgaaaaaa 1740
[1130] gttggttgac tctaccgaca aggcggacct gaggcttatt tatctggccc tggcccatat 1800
[1131] gatcaaattc agggggcact tcttgatcga gggggacctt aatcccgaca actctgacgt 1860
[1132] ggataagttg ttcatacagc ttgtgcagac ctacaaccag ctgttcgagg agaatccaat 1920
[1133] caacgccagc ggagtggacg ctaaagccat tctgagcgcg agattgagca agtctagaag 1980

[1134] attggaaaac cttatagccc agctgccagg tgagaagaag aacggactgt ttggcaatct 2040
[1135] cattgcgctt agcctcggac tcaccccgaa cttcaaatcc aacttcgacc tcgccgaaga 2100
[1136] tgccaaattg cagctcagta aggatacgta tgacgatgat cttgacaatc tgctggcgca 2160
[1137] gatcggggac cagtacgccg atcttttctt ggcagcaaaa aatctctcag atgcaatact 2220
[1138] cttgtcagac atactgcgag ttaataccga gattactaag gctccgcttt ctgcctccat 2280
[1139] gatcaagcgc tacgatgagc atcaccagga tctgacactg ttgaaagccc tggtgcgcca 2340
[1140] acagctgcca gagaaataca aggaaatctt ttttgaccag tccaagaatg gctacgcagg 2400
[1141] atacatcgat ggaggagcca gtcaggagga attttacaag tttattaagc ctatcctgga 2460
[1142] gaagatggat ggtaccgaag aactcctggt caagctcaac cgagaagatt tgcttcgcaa 2520
[1143] gcaaaggact tttgacaacg gctccattcc gcatcagatt catctgggcg agctgcatgc 2580
[1144] cattctgcga agacaggagg atttttaccc atttctgaag gacaaccgag agaagatcga 2640
[1145] gaaaatactg acattcagga taccatatta cgtgggtcca ctcgccaggg gcaactcccg 2700
[1146] attcgcctgg atgacaagga aaagcgaaga gacgatcact ccatggaact tcgaggaggt 2760
[1147] cgtggacaag ggggcctccg cgcagagctt tatcgagagg atgacgaact ttgacaaaaa 2820
[1148] tctccctaac gagaaggtgc tgccaaaaca ttctctgctc tacgagtatt tcaccgttta 2880
[1149] taatgagctc acaaaggtga agtacgtgac cgaagggatg cggaagcccg cttttctgtc 2940
[1150] cggagagcag aagaaggcta tcgtggattt gctctttaag actaaccgca aggtaacagt 3000
[1151] caagcagctg aaggaagact acttcaagaa gatcgaatgc ttgtcctacg aaacggaaat 3060
[1152] cttgacagtt gagtacgggc tcctgccaat cgggaagata gtagagaaga ggattgaatg 3120
[1153] taccgtctat tctgttgata acaacggtaa catatacacc cagcccgtcg cccaatggca 3180
[1154] cgatcgcggt gagcaggagg tgttcgaata ctgtctggag gacgggtcat tgattcgggc 3240
[1155] gactaaggac cataagttta tgacggtaga cggccagatg ttgcccatag atgagatctt 3300
[1156] tgagcgggaa ctcgacttga tgagagtcga taatcttcct aattaaaccg gagcttggat 3360
[1157] ccaatcaacc tctggattac aaaatttgtg aaagattgac tggtattctt aactatgttg 3420
[1158] ctccttttac gctatgtgga tacgctgctt taatgccttt gtatcatgct attgcttccc 3480
[1159] gtatggcttt cattttctcc tccttgtata aatcctggtt gctgtctctt tatgaggagt 3540
[1160] tgtggcccgt tgtcaggcaa cgtggcgtgg tgtgcactgt gtttgctgac gcaaccccca 3600
[1161] ctggttgggg cattgccacc acctgtcagc tcctttccgg gactttcgct ttccccctcc 3660
[1162] ctattgccac ggcggaactc atcgccgcct gccttgcccg ctgctggaca ggggctcggc 3720
[1163] tgttgggcac tgacaattcc gtggtgttgt cggggaaatc atcgtccttt ccttggctgc 3780
[1164] tcgcctgtgt tgccacctgg attctgcgcg ggacgtcctt ctgctacgtc ccttcggccc 3840
[1165] tcaatccagc ggaccttcct tcccgcggcc tgctgccggc tctgcggcct cttccgcgtc 3900
[1166] ttcgagatct gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt gcccctcccc 3960
[1167] cgtgccttcc ttgaccctgg aaggtgccac tcccactgtc ctttcctaat aaaatgagga 4020
[1168] aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg gggggtgggg tggggcagga 4080
[1169] cagcaagggg gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggactcga gacgcgtgga 4140
[1170] ggagggccta tttcccatga ttccttcata tttgcatata cgatacaagg ctgttagaga 4200
[1171] gataattaga attaatttga ctgtaaacac aaagatatta gtacaaaata cgtgacgtag 4260
[1172] aaagtaataa tttcttgggt agtttgcagt tttaaaatta tgttttaaaa tggactatca 4320
[1173] tatgcttacc gtaacttgaa agtatttcga tttcttggct ttatatatct tgtggaaagg 4380
[1174] acgaaacacc ggttttagag ctagaaatag caagttaaaa taaggctagt ccgttatcaa 4440
[1175] cttgaaaaag tggcaccgag tcggtgcttt tttctcgagt taagggcgaa ttcccgataa 4500

[1176] ggatcttcct agagcatggc tacgtagata agtagcatgg cgggttaatc attaactaca 4560
[1177] aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 4620
[1178] ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 4680
[1179] gagcgcgcag ccttaattaa cctaattcac tggccgtcgt tttacaacgt cgtgactggg 4740
[1180] aaaaccctgg cgttacccaa cttaatcgcc ttgcagcaca tccccctttc gccagctggc 4800
[1181] gtaatagcga agaggcccgc accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg 4860
[1182] aatgggacgc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg 4920
[1183] tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc ccttcctttc 4980
[1184] tcgccacgtt cgccggcttt ccccgtcaag ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc 5040
[1185] gatttagtgc tttacggcac ctcgacccca aaaaacttga ttagggtgat ggttcacgta 5100
[1186] gtgggccatc gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtcc acgttcttta 5160
[1187] atagtggact cttgttccaa actggaacaa cactcaaccc tatctcggtc tattcttttg 5220
[1188] atttataagg gattttgccg atttcggcct attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa 5280
[1189] aatttaacgc gaattttaac aaaatattaa cgtttataat ttcaggtggc atctttcggg 5340
[1190] gaaatgtgcg cggaacccct atttgtttat ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc 5400
[1191] tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta 5460
[1192] ttcaacattt ccgtgtcgcc cttattccct tttttgcggc attttgcctt cctgtttttg 5520
[1193] ctcacccaga aacgctggtg aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg 5580
[1194] gttacatcga actggatctc aatagtggta agatccttga gagttttcgc cccgaagaac 5640
[1195] gttttccaat gatgagcact tttaaagttc tgctatgtgg cgcggtatta tcccgtattg 5700
[1196] acgccgggca agagcaactc ggtcgccgca tacactattc tcagaatgac ttggttgagt 5760
[1197] actcaccagt cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg 5820
[1198] ctgccataac catgagtgat aacactgcgg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac 5880
[1199] cgaaggagct aaccgctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt 5940
[1200] gggaaccgga gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag 6000
[1201] taatggtaac aacgttgcgc aaactattaa ctggcgaact acttactcta gcttcccggc 6060
[1202] aacaattaat agactggatg gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcggccc 6120
[1203] ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta 6180
[1204] tcattgcagc actggggcca gatggtaagc cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg 6240
[1205] ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga 6300
[1206] ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt actcatatat actttagatt gatttaaaac 6360
[1207] ttcattttta atttaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgaccaaaa 6420
[1208] tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat 6480
[1209] cttcttgaga tccttttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc 6540
[1210] taccagcggt ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg 6600
[1211] gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc 6660
[1212] acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgctct gctaatcctg ttaccagtgg 6720
[1213] ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg 6780
[1214] ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa 6840
[1215] cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg 6900
[1216] aagggagaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga 6960
[1217] gggagcttcc agggggaaac gcctggtatc tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct 7020

[1218] gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt cagggggcg gagcctatgg aaaaacgcca 7080
[1219] gcaacgcggc ctttttacgg ttcctggcct tttgctgcgg ttttgctcac atgttctttc 7140
[1220] ctgcgttatc ccctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg 7200
[1221] ctcgccgcag ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagtgag cgaggaagcg gaagagcgcc 7260
[1222] caatacgcaa accgcctctc cccgcgcgtt ggccgattca ttaatgcagc tggcacgaca 7320
[1223] ggtttcccga ctggaaagcg ggcagtgagc gcaacgcaat taatgtgagt tagctcactc 7380
[1224] attaggcacc ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg tatgttgtgt ggaattgtga 7440
[1225] gcggataaca atttcacaca ggaaacagct atgaccatga ttacgccaga tttaattaag 7500
[1226] g 7501
[1227] <210> 11
[1228] <211> 19
[1229] <212> DNA
[1230] <213> 人工序列
[1231] <220>
[1232] <223> gRNA间隔序列
[1233] <400> 11
[1234] acagtgggca ggattgaaa 19
[1235] <210> 12
[1236] <211> 19
[1237] <212> DNA
[1238] <213> 人工序列
[1239] <220>
[1240] <223> gRNA间隔序列
[1241] <400> 12
[1242] gcaggtgcac tcaccgggt 19
[1243] <210> 13
[1244] <211> 20
[1245] <212> DNA
[1246] <213> 人工序列
[1247] <220>
[1248] <223> gRNA间隔序列
[1249] <400> 13
[1250] gagctcaggg agcatcgagg 20
[1251] <210> 14
[1252] <211> 19
[1253] <212> DNA
[1254] <213> 人工序列
[1255] <220>
[1256] <223> gRNA间隔序列
[1257] <400> 14
[1258] agagtcgcaa ttggagcgc 19
[1259] <210> 15

[1260] <211> 19
[1261] <212> DNA
[1262] <213> 人工序列
[1263] <220>
[1264] <223> gRNA间隔序列
[1265] <400> 15
[1266] ccagaccagc ctgcacagt 19
[1267] <210> 16
[1268] <211> 20
[1269] <212> DNA
[1270] <213> 人工序列
[1271] <220>
[1272] <223> gRNA间隔序列
[1273] <400> 16
[1274] gagcgcaggc taggcctgca 20
[1275] <210> 17
[1276] <211> 19
[1277] <212> DNA
[1278] <213> 人工序列
[1279] <220>
[1280] <223> gRNA间隔序列
[1281] <400> 17
[1282] ctaggagtcc gggataccc 19
[1283] <210> 18
[1284] <211> 20
[1285] <212> DNA
[1286] <213> 人工序列
[1287] <220>
[1288] <223> gRNA间隔序列
[1289] <400> 18
[1290] gaatccgcag gtgcactcac 20
[1291] <210> 19
[1292] <211> 20
[1293] <212> DNA
[1294] <213> 人工序列
[1295] <220>
[1296] <223> gRNA间隔序列
[1297] <400> 19
[1298] gaccagcctg cacagtgggc 20
[1299] <210> 20
[1300] <211> 20
[1301] <212> DNA

[1302] <213> 人工序列
[1303] <220>
[1304] <223> gRNA间隔序列
[1305] <400> 20
[1306] gcgacgcggt tggcagccga 20
[1307] <210> 21
[1308] <211> 20
[1309] <212> DNA
[1310] <213> 人工序列
[1311] <220>
[1312] <223> gRNA间隔序列
[1313] <400> 21
[1314] ggtcgccagc gctccagcgg 20
[1315] <210> 22
[1316] <211> 20
[1317] <212> DNA
[1318] <213> 人工序列
[1319] <220>
[1320] <223> gRNA间隔序列
[1321] <400> 22
[1322] gctttccaat tccgccagct 20
[1323] <210> 23
[1324] <211> 20
[1325] <212> DNA
[1326] <213> 人工序列
[1327] <220>
[1328] <223> gRNA间隔序列
[1329] <400> 23
[1330] caattccgcc agctcggctg 20
[1331] <210> 24
[1332] <211> 20
[1333] <212> DNA
[1334] <213> 人工序列
[1335] <220>
[1336] <223> gRNA间隔序列
[1337] <400> 24
[1338] cccagcctca gccgagctgg 20
[1339] <210> 25
[1340] <211> 20
[1341] <212> DNA
[1342] <213> 人工序列
[1343] <220>

[1344] <223> gRNA间隔序列
[1345] <400> 25
[1346] ccgccagctc ggctgaggct 20
[1347] <210> 26
[1348] <211> 20
[1349] <212> DNA
[1350] <213> 人工序列
[1351] <220>
[1352] <223> gRNA间隔序列
[1353] <400> 26
[1354] ggaaagccga cagccgccgc 20
[1355] <210> 27
[1356] <211> 20
[1357] <212> DNA
[1358] <213> 人工序列
[1359] <220>
[1360] <223> gRNA间隔序列
[1361] <400> 27
[1362] agcgctccag cggcggctgt 20
[1363] <210> 28
[1364] <211> 20
[1365] <212> DNA
[1366] <213> 人工序列
[1367] <220>
[1368] <223> gRNA间隔序列
[1369] <400> 28
[1370] ggcggtcgcc agcgctccag 20
[1371] <210> 29
[1372] <211> 20
[1373] <212> DNA
[1374] <213> 人工序列
[1375] <220>
[1376] <223> gRNA间隔序列
[1377] <400> 29
[1378] ctcagccgag ctggcggaat 20
[1379] <210> 30
[1380] <211> 20
[1381] <212> DNA
[1382] <213> 人工序列
[1383] <220>
[1384] <223> gRNA间隔序列
[1385] <400> 30

[1386] tagcccagcc tcagccgagc 20

[1387] <210> 31

[1388] <211> 20

[1389] <212> DNA

[1390] <213> 人工序列

[1391] <220>

[1392] <223> gRNA间隔序列

[1393] <400> 31

[1394] ggcggtcgcc agcgctccag 20

[1395] <210> 32

[1396] <211> 20

[1397] <212> DNA

[1398] <213> 人工序列

[1399] <220>

[1400] <223> gRNA间隔序列

[1401] <400> 32

[1402] gccacctgga aagaagagag 20

[1403] <210> 33

[1404] <211> 20

[1405] <212> DNA

[1406] <213> 人工序列

[1407] <220>

[1408] <223> gRNA间隔序列

[1409] <400> 33

[1410] ggtcgccagc gctccagcgg 20

[1411] <210> 34

[1412] <211> 20

[1413] <212> DNA

[1414] <213> 人工序列

[1415] <220>

[1416] <223> gRNA间隔序列

[1417] <400> 34

[1418] gccagcaatg ggaggaagaa 20

[1419] <210> 35

[1420] <211> 20

[1421] <212> DNA

[1422] <213> 人工序列

[1423] <220>

[1424] <223> gRNA间隔序列

[1425] <400> 35

[1426] gttccaggtg gcgtaataca 20

[1427] <210> 36

[1428] <211> 20
[1429] <212> DNA
[1430] <213> 人工序列
[1431] <220>
[1432] <223> gRNA间隔序列
[1433] <400> 36
[1434] ggcggggctg ctacctccac 20
[1435] <210> 37
[1436] <211> 20
[1437] <212> DNA
[1438] <213> 人工序列
[1439] <220>
[1440] <223> gRNA间隔序列
[1441] <400> 37
[1442] gggcgcagtc tgcttgcagg 20
[1443] <210> 38
[1444] <211> 20
[1445] <212> DNA
[1446] <213> 人工序列
[1447] <220>
[1448] <223> gRNA间隔序列
[1449] <400> 38
[1450] ggcgctccag cggcggctgt 20
[1451] <210> 39
[1452] <211> 20
[1453] <212> DNA
[1454] <213> 人工序列
[1455] <220>
[1456] <223> gRNA间隔序列
[1457] <400> 39
[1458] gaccgggtgg ttccagcaat 20
[1459] <210> 40
[1460] <211> 20
[1461] <212> DNA
[1462] <213> 人工序列
[1463] <220>
[1464] <223> gRNA间隔序列
[1465] <400> 40
[1466] ggggtggttc cagcaatggg 20
[1467] <210> 41
[1468] <211> 20
[1469] <212> DNA

[1470] <213> 人工序列
[1471] <220>
[1472] <223> gRNA间隔序列
[1473] <400> 41
[1474] gggcgcagtc tgcttgcagg 20
[1475] <210> 42
[1476] <211> 20
[1477] <212> DNA
[1478] <213> 人工序列
[1479] <220>
[1480] <223> gRNA间隔序列
[1481] <400> 42
[1482] tgggtgccag tggctgctag 20
[1483] <210> 43
[1484] <211> 20
[1485] <212> DNA
[1486] <213> 人工序列
[1487] <220>
[1488] <223> gRNA间隔序列
[1489] <400> 43
[1490] tctgggctcc tgttgctcag 20
[1491] <210> 44
[1492] <211> 20
[1493] <212> DNA
[1494] <213> 人工序列
[1495] <220>
[1496] <223> gRNA间隔序列
[1497] <400> 44
[1498] gcagccctga gagagcgccg 20
[1499] <210> 45
[1500] <211> 20
[1501] <212> DNA
[1502] <213> 人工序列
[1503] <220>
[1504] <223> gRNA间隔序列
[1505] <400> 45
[1506] gagcacgggc gaaagaccga 20
[1507] <210> 46
[1508] <211> 20
[1509] <212> DNA
[1510] <213> 人工序列
[1511] <220>

[1512] <223> gRNA间隔序列
[1513] <400> 46
[1514] atagacacag gtgggtgtgg 20
[1515] <210> 47
[1516] <211> 20
[1517] <212> DNA
[1518] <213> 人工序列
[1519] <220>
[1520] <223> gRNA间隔序列
[1521] <400> 47
[1522] atgtgaaaat agacacaggt 20
[1523] <210> 48
[1524] <211> 20
[1525] <212> DNA
[1526] <213> 人工序列
[1527] <220>
[1528] <223> gRNA间隔序列
[1529] <400> 48
[1530] gatgtgaaaa tagacacagg 20
[1531] <210> 49
[1532] <211> 20
[1533] <212> DNA
[1534] <213> 人工序列
[1535] <220>
[1536] <223> gRNA间隔序列
[1537] <400> 49
[1538] cgagatgtga aaatagacac 20
[1539] <210> 50
[1540] <211> 20
[1541] <212> DNA
[1542] <213> 人工序列
[1543] <220>
[1544] <223> gRNA间隔序列
[1545] <400> 50
[1546] gccacctgga aagaagagag 20
[1547] <210> 51
[1548] <211> 20
[1549] <212> DNA
[1550] <213> 人工序列
[1551] <220>
[1552] <223> gRNA间隔序列
[1553] <400> 51

[1554] aggggagaag cttgaccggg 20
[1555] <210> 52
[1556] <211> 20
[1557] <212> DNA
[1558] <213> 人工序列
[1559] <220>
[1560] <223> gRNA间隔序列
[1561] <400> 52
[1562] cgggtggttc cagcaatggg 20
[1563] <210> 53
[1564] <211> 20
[1565] <212> DNA
[1566] <213> 人工序列
[1567] <220>
[1568] <223> gRNA间隔序列
[1569] <400> 53
[1570] atagctgggc agctcctgtg 20
[1571] <210> 54
[1572] <211> 20
[1573] <212> DNA
[1574] <213> 人工序列
[1575] <220>
[1576] <223> gRNA间隔序列
[1577] <400> 54
[1578] ccacagagtc aaaaccgcac 20
[1579] <210> 55
[1580] <211> 20
[1581] <212> DNA
[1582] <213> 人工序列
[1583] <220>
[1584] <223> gRNA间隔序列
[1585] <400> 55
[1586] gctgccaggt tctgaaactg 20
[1587] <210> 56
[1588] <211> 20
[1589] <212> DNA
[1590] <213> 人工序列
[1591] <220>
[1592] <223> gRNA间隔序列
[1593] <400> 56
[1594] caggttctga aactgtggaa 20
[1595] <210> 57

[1596] <211> 20
[1597] <212> DNA
[1598] <213> 人工序列
[1599] <220>
[1600] <223> gRNA间隔序列
[1601] <400> 57
[1602] aaaggaaggg tagcaatgcc 20
[1603] <210> 58
[1604] <211> 20
[1605] <212> DNA
[1606] <213> 人工序列
[1607] <220>
[1608] <223> gRNA间隔序列
[1609] <400> 58
[1610] ggaagggtag caatgcctgg 20
[1611] <210> 59
[1612] <211> 20
[1613] <212> DNA
[1614] <213> 人工序列
[1615] <220>
[1616] <223> gRNA间隔序列
[1617] <400> 59
[1618] ataaaagaca gtaaaccacc 20
[1619] <210> 60
[1620] <211> 20
[1621] <212> DNA
[1622] <213> 人工序列
[1623] <220>
[1624] <223> gRNA间隔序列
[1625] <400> 60
[1626] tagatggact tcaattcaag 20
[1627] <210> 61
[1628] <211> 20
[1629] <212> DNA
[1630] <213> 人工序列
[1631] <220>
[1632] <223> gRNA间隔序列
[1633] <400> 61
[1634] gcttagcaga tacaacctgt 20
[1635] <210> 62
[1636] <211> 20
[1637] <212> DNA

[1638] <213> 人工序列
[1639] <220>
[1640] <223> gRNA间隔序列
[1641] <400> 62
[1642] cttagcagat acaacctgtg 20
[1643] <210> 63
[1644] <211> 20
[1645] <212> DNA
[1646] <213> 人工序列
[1647] <220>
[1648] <223> gRNA间隔序列
[1649] <400> 63
[1650] aatttacatg agaaacttag 20
[1651] <210> 64
[1652] <211> 20
[1653] <212> DNA
[1654] <213> 人工序列
[1655] <220>
[1656] <223> gRNA间隔序列
[1657] <400> 64
[1658] atttacatga gaaacttagg 20
[1659] <210> 65
[1660] <211> 20
[1661] <212> DNA
[1662] <213> 人工序列
[1663] <220>
[1664] <223> gRNA间隔序列
[1665] <400> 65
[1666] tttacatgag aaacttaggg 20
[1667] <210> 66
[1668] <211> 20
[1669] <212> DNA
[1670] <213> 人工序列
[1671] <220>
[1672] <223> gRNA间隔序列
[1673] <400> 66
[1674] tcatgaaaat ttgcgacaca 20
[1675] <210> 67
[1676] <211> 20
[1677] <212> DNA
[1678] <213> 人工序列
[1679] <220>

[1680] <223> gRNA间隔序列
[1681] <400> 67
[1682] tgattatatg caggccctag 20
[1683] <210> 68
[1684] <211> 20
[1685] <212> DNA
[1686] <213> 人工序列
[1687] <220>
[1688] <223> gRNA间隔序列
[1689] <400> 68
[1690] taatcatggg agcccttctg 20
[1691] <210> 69
[1692] <211> 20
[1693] <212> DNA
[1694] <213> 人工序列
[1695] <220>
[1696] <223> gRNA间隔序列
[1697] <400> 69
[1698] atagaagcat taccacagaa 20
[1699] <210> 70
[1700] <211> 20
[1701] <212> DNA
[1702] <213> 人工序列
[1703] <220>
[1704] <223> gRNA间隔序列
[1705] <400> 70
[1706] taatcaaccc actttctctg 20
[1707] <210> 71
[1708] <211> 20
[1709] <212> DNA
[1710] <213> 人工序列
[1711] <220>
[1712] <223> gRNA间隔序列
[1713] <400> 71
[1714] aacccacttt ctctgtggca 20
[1715] <210> 72
[1716] <211> 20
[1717] <212> DNA
[1718] <213> 人工序列
[1719] <220>
[1720] <223> gRNA间隔序列
[1721] <400> 72

[1722] gccgtgtaga tacagaaaag 20
[1723] <210> 73
[1724] <211> 20
[1725] <212> DNA
[1726] <213> 人工序列
[1727] <220>
[1728] <223> gRNA间隔序列
[1729] <400> 73
[1730] gtatagagaa tgaattgcag 20
[1731] <210> 74
[1732] <211> 20
[1733] <212> DNA
[1734] <213> 人工序列
[1735] <220>
[1736] <223> gRNA间隔序列
[1737] <400> 74
[1738] tgtatagaga atgaattgca 20
[1739] <210> 75
[1740] <211> 20
[1741] <212> DNA
[1742] <213> 人工序列
[1743] <220>
[1744] <223> gRNA间隔序列
[1745] <400> 75
[1746] atttaaaaaa aaaaaaaaag 20
[1747] <210> 76
[1748] <211> 20
[1749] <212> DNA
[1750] <213> 人工序列
[1751] <220>
[1752] <223> gRNA间隔序列
[1753] <400> 76
[1754] agagagtaaa ccatatgctg 20
[1755] <210> 77
[1756] <211> 20
[1757] <212> DNA
[1758] <213> 人工序列
[1759] <220>
[1760] <223> gRNA间隔序列
[1761] <400> 77
[1762] gaagagaata ggttctggtg 20
[1763] <210> 78

[1764] <211> 20
[1765] <212> DNA
[1766] <213> 人工序列
[1767] <220>
[1768] <223> gRNA间隔序列
[1769] <400> 78
[1770] atgtgtttta gccacgacct 20
[1771] <210> 79
[1772] <211> 20
[1773] <212> DNA
[1774] <213> 人工序列
[1775] <220>
[1776] <223> gRNA间隔序列
[1777] <400> 79
[1778] tccaacatca agaccaacac 20
[1779] <210> 80
[1780] <211> 20
[1781] <212> DNA
[1782] <213> 人工序列
[1783] <220>
[1784] <223> gRNA间隔序列
[1785] <400> 80
[1786] ttccaacatc aagaccaaca 20
[1787] <210> 81
[1788] <211> 20
[1789] <212> DNA
[1790] <213> 人工序列
[1791] <220>
[1792] <223> gRNA间隔序列
[1793] <400> 81
[1794] tttgcatacc aaatactcca 20
[1795] <210> 82
[1796] <211> 20
[1797] <212> DNA
[1798] <213> 人工序列
[1799] <220>
[1800] <223> gRNA间隔序列
[1801] <400> 82
[1802] ttgcatacca aatactccaa 20
[1803] <210> 83
[1804] <211> 20
[1805] <212> DNA

[1806] <213> 人工序列
[1807] <220>
[1808] <223> gRNA间隔序列
[1809] <400> 83
[1810] gcctggcatc aagtagtagg 20
[1811] <210> 84
[1812] <211> 20
[1813] <212> DNA
[1814] <213> 人工序列
[1815] <220>
[1816] <223> gRNA间隔序列
[1817] <400> 84
[1818] atcatggtat gatattgagg 20
[1819] <210> 85
[1820] <211> 20
[1821] <212> DNA
[1822] <213> 人工序列
[1823] <220>
[1824] <223> gRNA间隔序列
[1825] <400> 85
[1826] agaaatgtag tcagatgagg 20
[1827] <210> 86
[1828] <211> 20
[1829] <212> DNA
[1830] <213> 人工序列
[1831] <220>
[1832] <223> gRNA间隔序列
[1833] <400> 86
[1834] ccataagtta ggtttccaca 20
[1835] <210> 87
[1836] <211> 20
[1837] <212> DNA
[1838] <213> 人工序列
[1839] <220>
[1840] <223> gRNA间隔序列
[1841] <400> 87
[1842] aaacatcaat ttagaccgtg 20
[1843] <210> 88
[1844] <211> 20
[1845] <212> DNA
[1846] <213> 人工序列
[1847] <220>

[1848] <223> gRNA间隔序列
[1849] <400> 88
[1850] tctctaagga aggttcagag 20
[1851] <210> 89
[1852] <211> 20
[1853] <212> DNA
[1854] <213> 人工序列
[1855] <220>
[1856] <223> gRNA间隔序列
[1857] <400> 89
[1858] gaaggttcag agaggcaatg 20
[1859] <210> 90
[1860] <211> 20
[1861] <212> DNA
[1862] <213> 人工序列
[1863] <220>
[1864] <223> gRNA间隔序列
[1865] <400> 90
[1866] atagtctgca aaaataaagg 20
[1867] <210> 91
[1868] <211> 20
[1869] <212> DNA
[1870] <213> 人工序列
[1871] <220>
[1872] <223> gRNA间隔序列
[1873] <400> 91
[1874] aattatttac caaaaatctg 20
[1875] <210> 92
[1876] <211> 20
[1877] <212> DNA
[1878] <213> 人工序列
[1879] <220>
[1880] <223> gRNA间隔序列
[1881] <400> 92
[1882] attgtggatg ttgtattgga 20
[1883] <210> 93
[1884] <211> 20
[1885] <212> DNA
[1886] <213> 人工序列
[1887] <220>
[1888] <223> gRNA间隔序列
[1889] <400> 93

[1890] aggaatgaaa cccttctggg 20
[1891] <210> 94
[1892] <211> 20
[1893] <212> DNA
[1894] <213> 人工序列
[1895] <220>
[1896] <223> gRNA间隔序列
[1897] <400> 94
[1898] tgccaggcca tgataaagtg 20
[1899] <210> 95
[1900] <211> 20
[1901] <212> DNA
[1902] <213> 人工序列
[1903] <220>
[1904] <223> gRNA间隔序列
[1905] <400> 95
[1906] acaggagccc agagaaaaag 20
[1907] <210> 96
[1908] <211> 20
[1909] <212> DNA
[1910] <213> 人工序列
[1911] <220>
[1912] <223> gRNA间隔序列
[1913] <400> 96
[1914] ggagcccaga gaaaaagaag 20
[1915] <210> 97
[1916] <211> 20
[1917] <212> DNA
[1918] <213> 人工序列
[1919] <220>
[1920] <223> gRNA间隔序列
[1921] <400> 97
[1922] acagagtcaa aaccgcacag 20
[1923] <210> 98
[1924] <211> 20
[1925] <212> DNA
[1926] <213> 人工序列
[1927] <220>
[1928] <223> gRNA间隔序列
[1929] <400> 98
[1930] gcgtaaacag aaataaaaga 20
[1931] <210> 99

[1932] <211> 20
[1933] <212> DNA
[1934] <213> 人工序列
[1935] <220>
[1936] <223> gRNA间隔序列
[1937] <400> 99
[1938] tctgcgctga gaaatagggg 20
[1939] <210> 100
[1940] <211> 20
[1941] <212> DNA
[1942] <213> 人工序列
[1943] <220>
[1944] <223> gRNA间隔序列
[1945] <400> 100
[1946] tttgcttctg aaactcagca 20
[1947] <210> 101
[1948] <211> 20
[1949] <212> DNA
[1950] <213> 人工序列
[1951] <220>
[1952] <223> gRNA间隔序列
[1953] <400> 101
[1954] gttgctgtgc tgagtttcag 20
[1955] <210> 102
[1956] <211> 20
[1957] <212> DNA
[1958] <213> 人工序列
[1959] <220>
[1960] <223> gRNA间隔序列
[1961] <400> 102
[1962] ctacttttt ccttgccaca 20
[1963] <210> 103
[1964] <211> 20
[1965] <212> DNA
[1966] <213> 人工序列
[1967] <220>
[1968] <223> gRNA间隔序列
[1969] <400> 103
[1970] gctgaaatgg agtaataagg 20
[1971] <210> 104
[1972] <211> 20
[1973] <212> DNA

[1974] <213> 人工序列
[1975] <220>
[1976] <223> gRNA间隔序列
[1977] <400> 104
[1978] atagagaatg aattgcaggg 20
[1979] <210> 105
[1980] <211> 20
[1981] <212> DNA
[1982] <213> 人工序列
[1983] <220>
[1984] <223> gRNA间隔序列
[1985] <400> 105
[1986] gaatagtgcc tggcatcaag 20
[1987] <210> 106
[1988] <211> 20
[1989] <212> DNA
[1990] <213> 人工序列
[1991] <220>
[1992] <223> gRNA间隔序列
[1993] <400> 106
[1994] gtaatgcatt cttagaaagg 20
[1995] <210> 107
[1996] <211> 20
[1997] <212> DNA
[1998] <213> 人工序列
[1999] <220>
[2000] <223> gRNA间隔序列
[2001] <400> 107
[2002] gtagagttag attaccactt 20
[2003] <210> 108
[2004] <211> 28
[2005] <212> DNA
[2006] <213> 人工序列
[2007] <220>
[2008] <223> 鼠ZF靶序列
[2009] <400> 108
[2010] tgagtgacgg acgggtgagg tttccgtc 28
[2011] <210> 109
[2012] <211> 28
[2013] <212> DNA
[2014] <213> 人工序列
[2015] <220>

[2016] <223> 鼠ZF靶序列
[2017] <220>
[2018] <221> misc_feature
[2019] <222> (25)..(28)
[2020] <223> n是a, c, g,或t
[2021] <400> 109
[2022] ttcgtggagg agccccggac aagtnnnn 28
[2023] <210> 110
[2024] <211> 28
[2025] <212> DNA
[2026] <213> 人工序列
[2027] <220>
[2028] <223> 鼠ZF靶序列
[2029] <400> 110
[2030] atggtgctcc agaaagtaca ctctgaat 28
[2031] <210> 111
[2032] <211> 28
[2033] <212> DNA
[2034] <213> 人工序列
[2035] <220>
[2036] <223> 鼠ZF靶序列
[2037] <400> 111
[2038] tgagtgacgg acgggtgagg tttccgtc 28
[2039] <210> 112
[2040] <211> 18
[2041] <212> DNA
[2042] <213> 人工序列
[2043] <220>
[2044] <223> 人ZF靶序列
[2045] <400> 112
[2046] agtctgcttg caggcggt 18
[2047] <210> 113
[2048] <211> 18
[2049] <212> DNA
[2050] <213> 人工序列
[2051] <220>
[2052] <223> 人ZF靶序列
[2053] <400> 113
[2054] ccagcggcgg ctgtcggc 18
[2055] <210> 114
[2056] <211> 18
[2057] <212> DNA

[2058] <213> 人工序列
[2059] <220>
[2060] <223> 人ZF靶序列
[2061] <400> 114
[2062] gcctgggtgc cagtggct 18
[2063] <210> 115
[2064] <211> 18
[2065] <212> DNA
[2066] <213> 人工序列
[2067] <220>
[2068] <223> 人ZF靶序列
[2069] <400> 115
[2070] tggctgctag cggcaggc 18
[2071] <210> 116
[2072] <211> 18
[2073] <212> DNA
[2074] <213> 人工序列
[2075] <220>
[2076] <223> 人ZF靶序列
[2077] <400> 116
[2078] gcgtcccctg agcaacag 18
[2079] <210> 117
[2080] <211> 18
[2081] <212> DNA
[2082] <213> 人工序列
[2083] <220>
[2084] <223> 人ZF靶序列
[2085] <400> 117
[2086] aaggagaggc ccgcgccc 18
[2087] <210> 118
[2088] <211> 18
[2089] <212> DNA
[2090] <213> 人工序列
[2091] <220>
[2092] <223> 人ZF靶序列
[2093] <400> 118
[2094] gcaggtgcac tgggtggg 18
[2095] <210> 119
[2096] <211> 18
[2097] <212> DNA
[2098] <213> 人工序列
[2099] <220>

[2100] <223> 人ZF靶序列
[2101] <400> 119
[2102] gcgcccgtgg aggtagca 18
[2103] <210> 120
[2104] <211> 18
[2105] <212> DNA
[2106] <213> 人工序列
[2107] <220>
[2108] <223> 人ZF靶序列
[2109] <400> 120
[2110] tgccagggcg cgcccgtg 18
[2111] <210> 121
[2112] <211> 18
[2113] <212> DNA
[2114] <213> 人工序列
[2115] <220>
[2116] <223> 人ZF靶序列
[2117] <400> 121
[2118] acagccgccg ctggagcg 18
[2119] <210> 122
[2120] <211> 18
[2121] <212> DNA
[2122] <213> 人工的序列
[2123] <220>
[2124] <223> 人ZF靶序列
[2125] <400> 122
[2126] ccaggagagg gcgcgggc 18
[2127] <210> 123
[2128] <211> 295
[2129] <212> PRT
[2130] <213> 人工序列
[2131] <220>
[2132] <223> ZF-KRAB序列
[2133] <400> 123
[2134] Met Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp
[2135] 1 5 10 15
[2136] Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Met Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
[2137] 20 25 30
[2138] Gly Ile His Gly Val Pro Ala Ala Met Ala Glu Arg Pro Phe Gln Cys
[2139] 35 40 45
[2140] Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Ser Gln His
[2141] 50 55 60

[2142] Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly
[2143] 65 70 75 80
[2144] Arg Lys Phe Ala Arg Ser Ala Val Arg Lys Asn His Thr Lys Ile His
[2145] 85 90 95
[2146] Thr Gly Ser Gln Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe
[2147] 100 105 110
[2148] Ser Arg Ser Asp His Leu Ser Glu His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu
[2149] 115 120 125
[2150] Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Gln Ser His
[2151] 130 135 140
[2152] His Arg Lys Thr His Thr Lys Ile His Thr Gly Ser Gln Lys Pro Phe
[2153] 145 150 155 160
[2154] Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Asp Arg Ser Asn Leu Ser
[2155] 165 170 175
[2156] Arg His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile
[2157] 180 185 190
[2158] Cys Gly Arg Lys Phe Ala Leu Lys Gln His Leu Asn Glu His Thr Lys
[2159] 195 200 205
[2160] Ile His Leu Arg Gln Lys Asp Ala Ala Arg Gly Ser Arg Thr Leu Val
[2161] 210 215 220
[2162] Thr Phe Lys Asp Val Phe Val Asp Phe Thr Arg Glu Glu Trp Lys Leu
[2163] 225 230 235 240
[2164] Leu Asp Thr Ala Gln Gln Ile Val Tyr Arg Asn Val Met Leu Glu Asn
[2165] 245 250 255
[2166] Tyr Lys Asn Leu Val Ser Leu Gly Tyr Gln Leu Thr Lys Pro Asp Val
[2167] 260 265 270
[2168] Ile Leu Arg Leu Glu Lys Gly Glu Glu Pro Trp Leu Val Asp Tyr Lys
[2169] 275 280 285
[2170] Asp Asp Asp Asp Lys Arg Ser
[2171] 290 295
[2172] <210> 124
[2173] <211> 295
[2174] <212> PRT
[2175] <213> 人工序列
[2176] <220>
[2177] <223> ZF-KRAB序列
[2178] <400> 124
[2179] Met Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp
[2180] 1 5 10 15
[2181] Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Met Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
[2182] 20 25 30
[2183] Gly Ile His Gly Val Pro Ala Ala Met Ala Glu Arg Pro Phe Gln Cys

[2184] 35 40 45
[2185] Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Asp Arg Ser Asn Leu Ser Arg His
[2186] 50 55 60
[2187] Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly
[2188] 65 70 75 80
[2189] Arg Lys Phe Ala Arg Ser Asp Asp Arg Lys Thr His Thr Lys Ile His
[2190] 85 90 95
[2191] Thr Gly Ser Gln Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe
[2192] 100 105 110
[2193] Ser Glu Arg Gly Thr Leu Ala Arg His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu
[2194] 115 120 125
[2195] Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Gln Ser Gly
[2196] 130 135 140
[2197] His Leu Ser Arg His Thr Lys Ile His Thr Gly Ser Gln Lys Pro Phe
[2198] 145 150 155 160
[2199] Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Ser Gly His Leu Ala
[2200] 165 170 175
[2201] Arg His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile
[2202] 180 185 190
[2203] Cys Gly Arg Lys Phe Ala Val Ser His His Leu Arg Asp His Thr Lys
[2204] 195 200 205
[2205] Ile His Leu Arg Gln Lys Asp Ala Ala Arg Gly Ser Arg Thr Leu Val
[2206] 210 215 220
[2207] Thr Phe Lys Asp Val Phe Val Asp Phe Thr Arg Glu Glu Trp Lys Leu
[2208] 225 230 235 240
[2209] Leu Asp Thr Ala Gln Gln Ile Val Tyr Arg Asn Val Met Leu Glu Asn
[2210] 245 250 255
[2211] Tyr Lys Asn Leu Val Ser Leu Gly Tyr Gln Leu Thr Lys Pro Asp Val
[2212] 260 265 270
[2213] Ile Leu Arg Leu Glu Lys Gly Glu Glu Pro Trp Leu Val Asp Tyr Lys
[2214] 275 280 285
[2215] Asp Asp Asp Asp Lys Arg Ser
[2216] 290 295
[2217] <210> 125
[2218] <211> 295
[2219] <212> PRT
[2220] <213> 人工序列
[2221] <220>
[2222] <223> ZF-KRAB序列
[2223] <400> 125
[2224] Met Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp
[2225] 1 5 10 15

[2226] Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Met Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
[2227] 20 25 30
[2228] Gly Ile His Gly Val Pro Ala Ala Met Ala Glu Arg Pro Phe Gln Cys
[2229] 35 40 45
[2230] Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Ser Gly Asp Leu Thr Arg His
[2231] 50 55 60
[2232] Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly
[2233] 65 70 75 80
[2234] Arg Lys Phe Ala Leu Ala His His Leu Val Gln His Thr Lys Ile His
[2235] 85 90 95
[2236] Thr Gly Ser Gln Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe
[2237] 100 105 110
[2238] Ser Gln Ser Gly Asn Leu Ala Arg His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu
[2239] 115 120 125
[2240] Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Gln Arg Ile
[2241] 130 135 140
[2242] Asp Leu Thr Arg His Thr Lys Ile His Thr Gly Ser Gln Lys Pro Phe
[2243] 145 150 155 160
[2244] Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Ser Ser Asp Leu Ser
[2245] 165 170 175
[2246] Arg His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile
[2247] 180 185 190
[2248] Cys Gly Arg Lys Phe Ala Trp His Ser Ser Leu His Gln His Thr Lys
[2249] 195 200 205
[2250] Ile His Leu Arg Gln Lys Asp Ala Ala Arg Gly Ser Arg Thr Leu Val
[2251] 210 215 220
[2252] Thr Phe Lys Asp Val Phe Val Asp Phe Thr Arg Glu Glu Trp Lys Leu
[2253] 225 230 235 240
[2254] Leu Asp Thr Ala Gln Gln Ile Val Tyr Arg Asn Val Met Leu Glu Asn
[2255] 245 250 255
[2256] Tyr Lys Asn Leu Val Ser Leu Gly Tyr Gln Leu Thr Lys Pro Asp Val
[2257] 260 265 270
[2258] Ile Leu Arg Leu Glu Lys Gly Glu Glu Pro Trp Leu Val Asp Tyr Lys
[2259] 275 280 285
[2260] Asp Asp Asp Asp Lys Arg Ser
[2261] 290 295
[2262] <210> 126
[2263] <211> 295
[2264] <212> PRT
[2265] <213> 人工序列
[2266] <220>
[2267] <223> ZF-KRAB序列

[2268] <400> 126

[2269] Met Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp

[2270] 1 5 10 15

[2271] Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Met Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

[2272] 20 25 30

[2273] Gly Ile His Gly Val Pro Ala Ala Met Ala Glu Arg Pro Phe Gln Cys

[2274] 35 40 45

[2275] Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Ser Gly Asn His Ile Arg Thr

[2276] 50 55 60

[2277] His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe

[2278] 65 70 75 80

[2279] Ala Thr Arg Asn Gly Leu Lys Tyr His Thr Lys Ile His Thr Gly Ser

[2280] 85 90 95

[2281] Gln Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Ser

[2282] 100 105 110

[2283] Ser Asp Leu Ser Arg His Ile Arg Leu Ala Arg His Ile Arg Thr His

[2284] 115 120 125

[2285] Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala

[2286] 130 135 140

[2287] Arg Leu Asp Ile Leu Gln Gln His Thr Lys Ile His Thr Gly Ser Gln

[2288] 145 150 155 160

[2289] Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp

[2290] 165 170 175

[2291] Val Leu Ser Glu Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile

[2292] 180 185 190

[2293] Cys Gly Arg Lys Phe Ala Arg Lys Tyr Tyr Leu Ala Lys His Thr Lys

[2294] 195 200 205

[2295] Ile His Leu Arg Gln Lys Asp Ala Ala Arg Gly Ser Arg Thr Leu Val

[2296] 210 215 220

[2297] Thr Phe Lys Asp Val Phe Val Asp Phe Thr Arg Glu Glu Trp Lys Leu

[2298] 225 230 235 240

[2299] Leu Asp Thr Ala Gln Gln Ile Val Tyr Arg Asn Val Met Leu Glu Asn

[2300] 245 250 255

[2301] Tyr Lys Asn Leu Val Ser Leu Gly Tyr Gln Leu Thr Lys Pro Asp Val

[2302] 260 265 270

[2303] Ile Leu Arg Leu Glu Lys Gly Glu Glu Pro Trp Leu Val Asp Tyr Lys

[2304] 275 280 285

[2305] Asp Asp Asp Asp Lys Arg Ser

[2306] 290 295

[2307] <210> 127

[2308] <211> 16

[2309] <212> DNA

[2310] <213> 人工序列
[2311] <220>
[2312] <223> AAV-ITR-正向引物
[2313] <400> 127
[2314] cggcctcagt gagcga 16
[2315] <210> 128
[2316] <211> 21
[2317] <212> DNA
[2318] <213> 人工序列
[2319] <220>
[2320] <223> AAV-ITR-反向引物
[2321] <400> 128
[2322] ggaaccccta gtgatggagt t 21
[2323] <210> 129
[2324] <211> 19
[2325] <212> DNA
[2326] <213> 人工序列
[2327] <220>
[2328] <223> gRNA间隔序列
[2329] <400> 129
[2330] acagtgggca ggattgaaa 19
[2331] <210> 130
[2332] <211> 19
[2333] <212> DNA
[2334] <213> 人工序列
[2335] <220>
[2336] <223> gRNA间隔序列
[2337] <400> 130
[2338] gcaggtgcac tcaccgggt 19
[2339] <210> 131
[2340] <211> 20
[2341] <212> DNA
[2342] <213> 人工序列
[2343] <220>
[2344] <223> gRNA间隔序列
[2345] <400> 131
[2346] gagctcaggg agcatcgagg 20
[2347] <210> 132
[2348] <211> 19
[2349] <212> DNA
[2350] <213> 人工序列
[2351] <220>

[2352] <223> gRNA间隔序列
[2353] <400> 132
[2354] agagtcgcaa ttggagcgc 19
[2355] <210> 133
[2356] <211> 19
[2357] <212> DNA
[2358] <213> 人工序列
[2359] <220>
[2360] <223> gFNA间隔序列
[2361] <400> 133
[2362] ccagaccagc ctgcacagt 19
[2363] <210> 134
[2364] <211> 20
[2365] <212> DNA
[2366] <213> 人工序列
[2367] <220>
[2368] <223> gRNA间隔序列
[2369] <400> 134
[2370] gagcgcaggc taggcctgca 20
[2371] <210> 135
[2372] <211> 19
[2373] <212> DNA
[2374] <213> 人工序列
[2375] <220>
[2376] <223> gRNA间隔序列
[2377] <400> 135
[2378] ctaggagtcc gggataccc 19
[2379] <210> 136
[2380] <211> 20
[2381] <212> DNA
[2382] <213> 人工序列
[2383] <220>
[2384] <223> gRNA间隔序列
[2385] <400> 136
[2386] gaatccgcag gtgcactcac 20
[2387] <210> 137
[2388] <211> 20
[2389] <212> DNA
[2390] <213> 人工序列
[2391] <220>
[2392] <223> gRNA间隔序列
[2393] <400> 137

[2394] gaccagcctg cacagtgggc 20
[2395] <210> 138
[2396] <211> 20
[2397] <212> DNA
[2398] <213> 人工序列
[2399] <220>
[2400] <223> gRNA间隔序列
[2401] <400> 138
[2402] gcgacgcggt tggcagccga 20
[2403] <210> 139
[2404] <211> 18
[2405] <212> DNA
[2406] <213> 人工序列
[2407] <220>
[2408] <223> ZF靶序列
[2409] <400> 139
[2410] ggcgaggtga tggaaggg 18
[2411] <210> 140
[2412] <211> 18
[2413] <212> DNA
[2414] <213> 人工序列
[2415] <220>
[2416] <223> ZF靶序列
[2417] <400> 140
[2418] gagggagcta ggggtggg 18
[2419] <210> 141
[2420] <211> 18
[2421] <212> DNA
[2422] <213> 人工序列
[2423] <220>
[2424] <223> ZF靶序列
[2425] <400> 141
[2426] agtgctaatg tttccgag 18
[2427] <210> 142
[2428] <211> 18
[2429] <212> DNA
[2430] <213> 人工序列
[2431] <220>
[2432] <223> ZF靶序列
[2433] <400> 142
[2434] tagacggtgc agggcgga 18
[2435] <210> 143

[2436] <211> 25

[2437] <212> PRT

[2438] <213> 人工序列

[2439] <220>

[2440] <223> ZF结合结构域共有序列

[2441] <220>

[2442] <221> MISC_FEATURE

[2443] <222> (2)..(5)

[2444] <223> X是任何氨基酸,且其中位置2和3可以存在或不存在

[2445] <220>

[2446] <221> MISC_FEATURE

[2447] <222> (7)..(18)

[2448] <223> X是任何氨基酸

[2449] <220>

[2450] <221> MISC_FEATURE

[2451] <222> (20)..(24)

[2452] <223> X是任何氨基酸

[2453] <400> 143

[2454] Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

[2455] 1 5 10 15

[2456] Xaa Xaa His Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His

[2457] 20 25

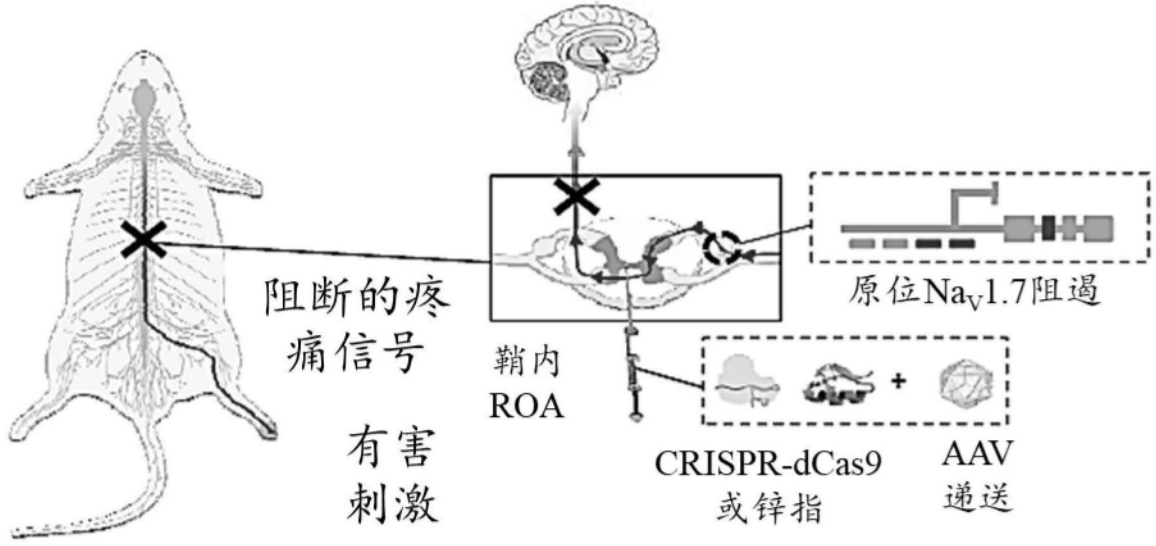

阻断的疼痛信号
有害刺激
鞘内ROA
原位$Na_V1.7$阻遏
CRISPR-dCas9或锌指
AAV递送

图1A

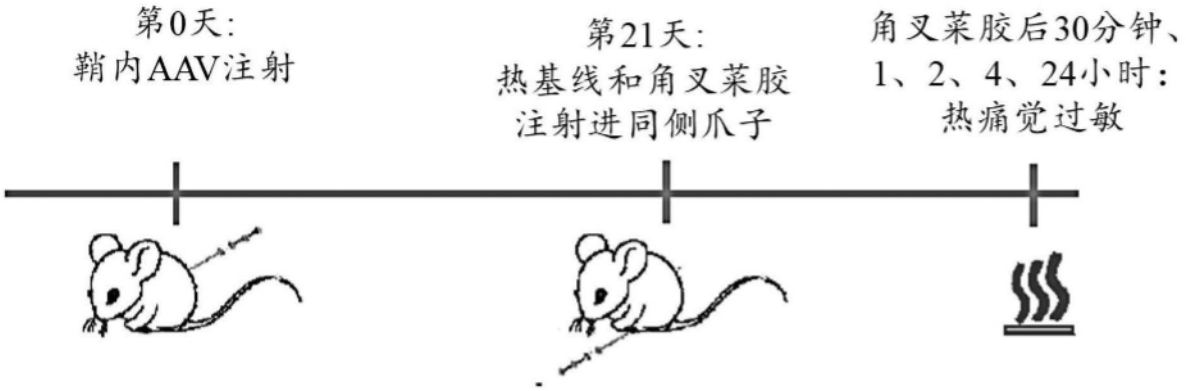

第0天:
鞘内AAV注射
第21天:
热基线和角叉菜胶注射进同侧爪子
角叉菜胶后30分钟、1、2、4、24小时:
热痛觉过敏

图1B

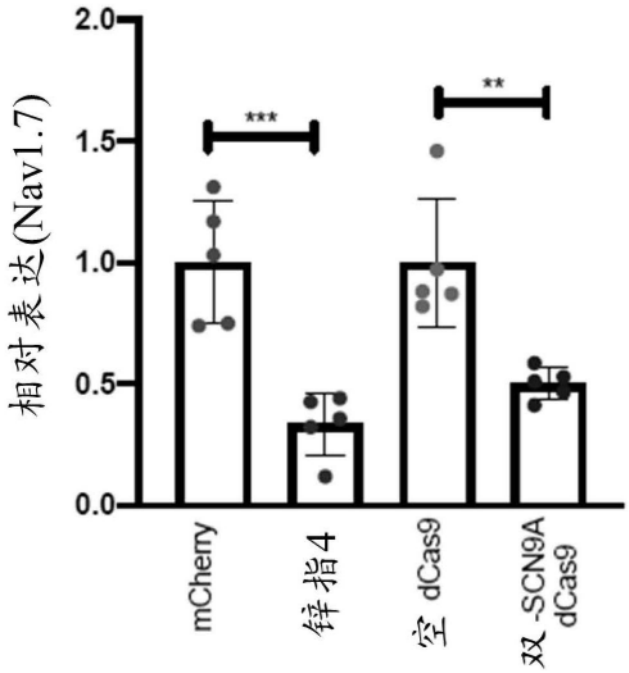

相对表达(Nav1.7)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
**
mCherry
锌指4
空 dCas9
双-SCN9A dCas9

图1C

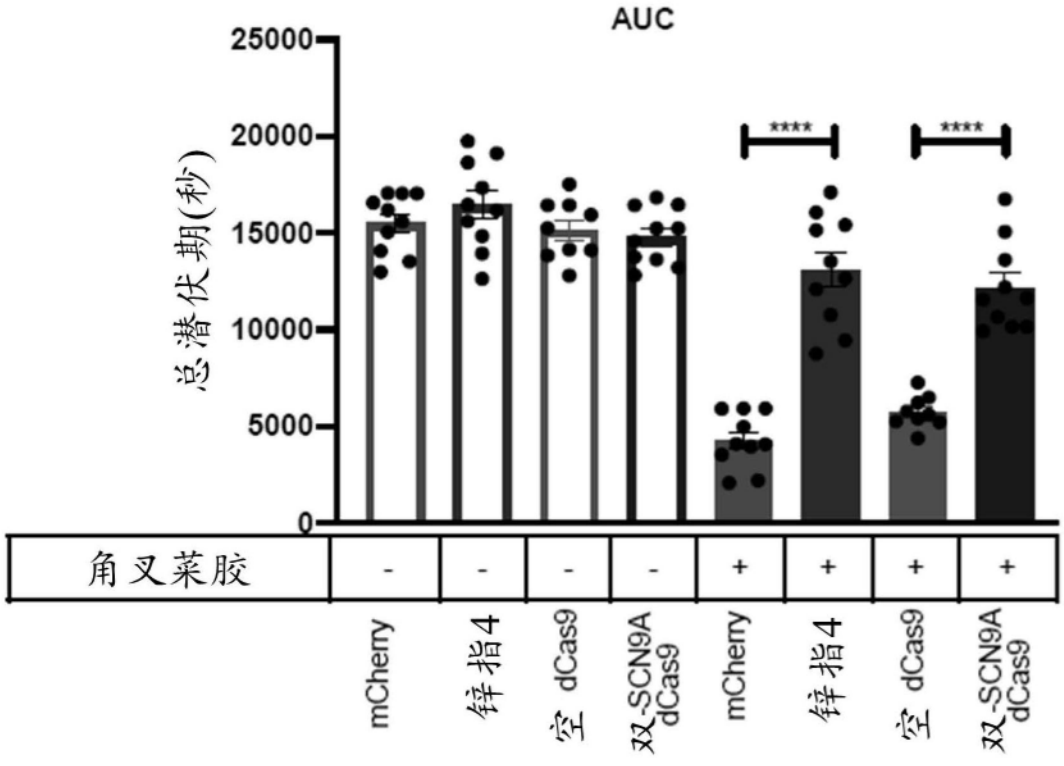

AUC
总潜伏期(秒)
25000
20000
15000
10000
5000
0
****
****
角叉菜胶
- - - - + + + +
mCherry
锌指4
空 dCas9
双-SCN9A dCas9
mCherry
锌指4
空 dCas9
双-SCN9A dCas9

图1D

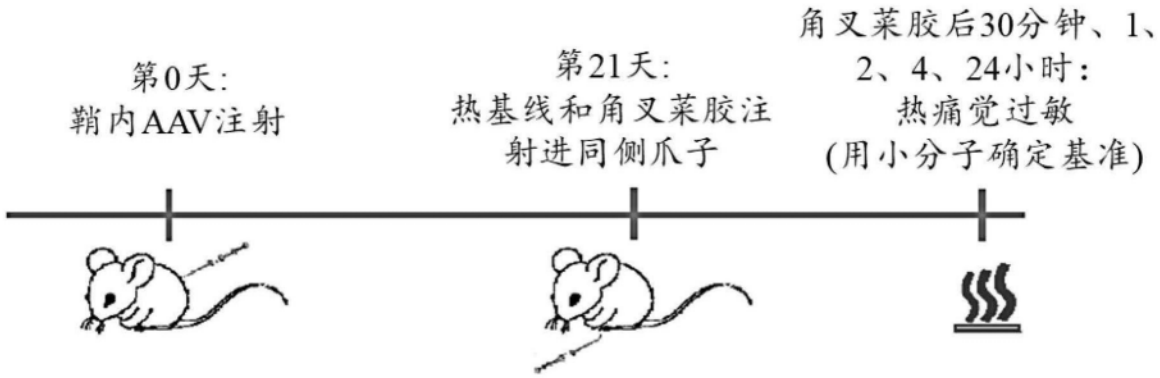

第0天:
鞘内AAV注射
第21天:
热基线和角叉菜胶注射进同侧爪子
角叉菜胶后30分钟、1、2、4、24小时:
热痛觉过敏
(用小分子确定基准)

图2A

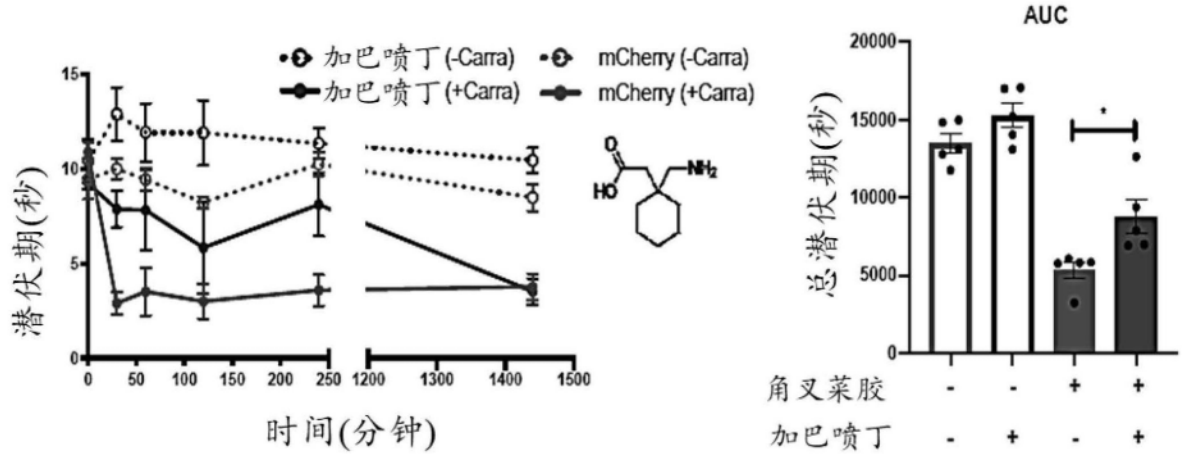

加巴喷丁(-Carra)
加巴喷丁(+Carra)
mCherry (-Carra)
mCherry (+Carra)
潜伏期(秒)
时间(分钟)
AUC
总潜伏期(秒)
角叉菜胶
加巴喷丁

图2B

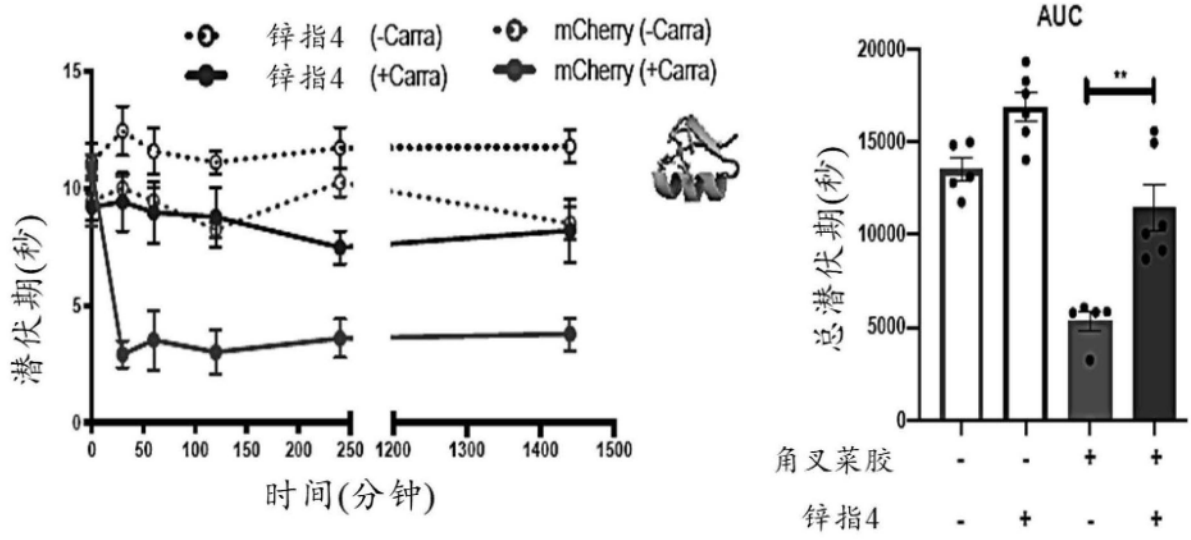

锌指4 (-Carra)
锌指4 (+Carra)
mCherry (-Carra)
mCherry (+Carra)
潜伏期(秒)
时间(分钟)
AUC
总潜伏期(秒)
角叉菜胶
锌指4

图2C

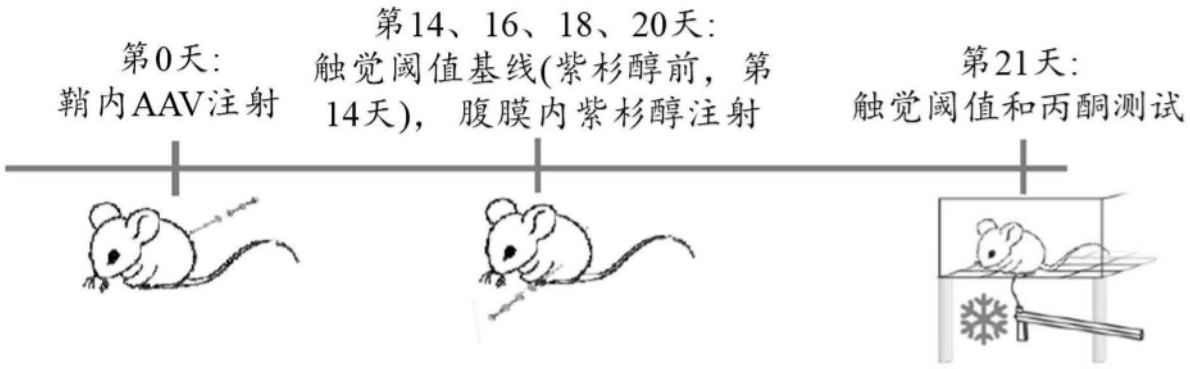

第0天:
鞘内AAV注射
第14、16、18、20天:
触觉阈值基线(紫杉醇前，第14天)，腹膜内紫杉醇注射
第21天:
触觉阈值和丙酮测试

图3A

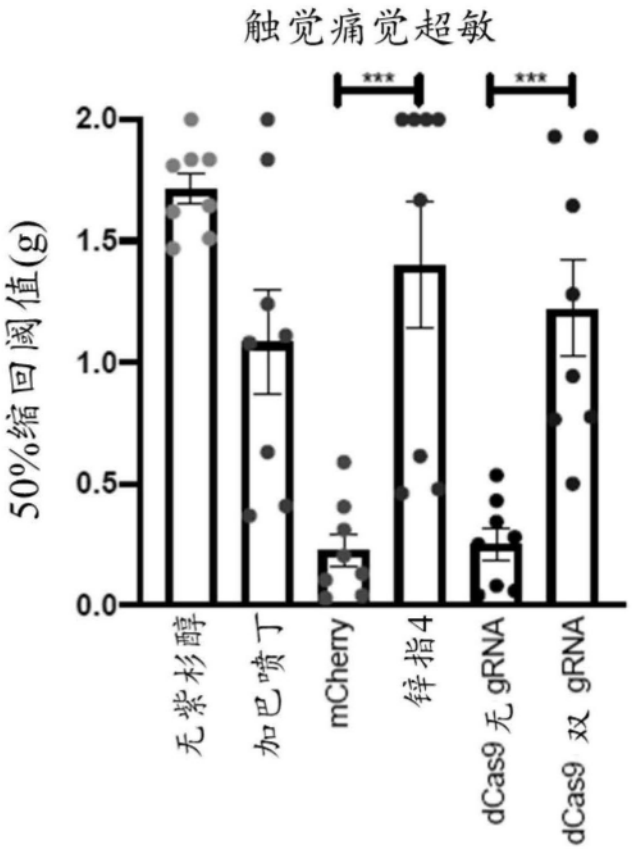

触觉痛觉超敏
50%缩回阈值(g)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
无紫杉醇
加巴喷丁
mCherry
锌指4
dCas9 无 gRNA
dCas9 双 gRNA

图3B

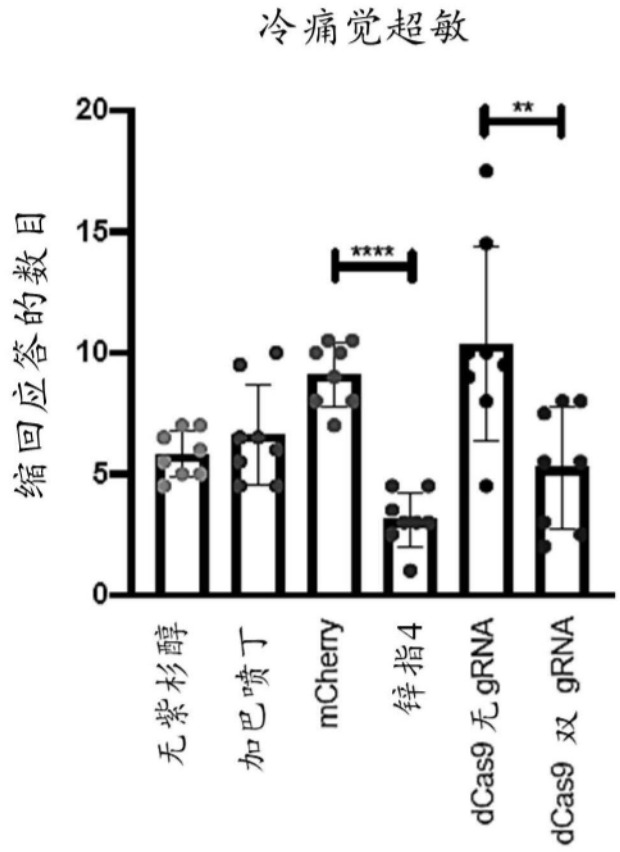

冷痛觉超敏
缩回应答的数目
20
15
10
5
0
****
**
无紫杉醇
加巴喷丁
mCherry
锌指4
dCas9 无 gRNA
dCas9 双 gRNA

图3C

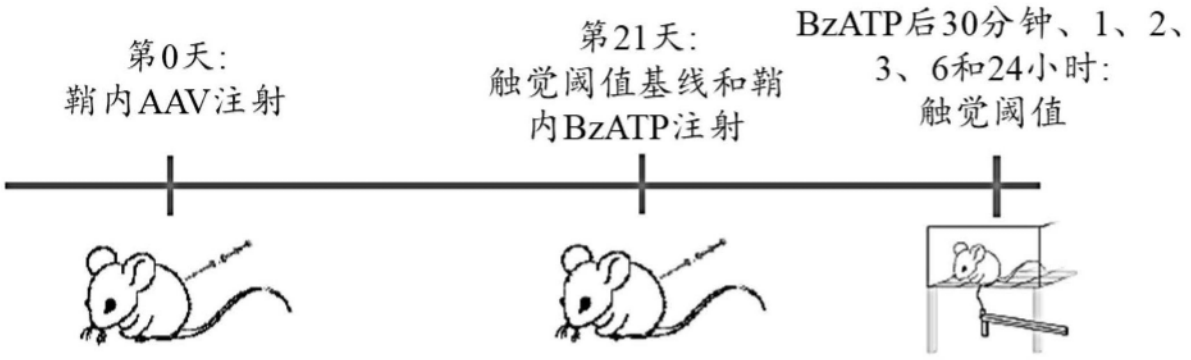

第0天:
鞘内AAV注射
第21天:
触觉阈值基线和鞘
内BzATP注射
BzATP后30分钟、1、2、
3、6和24小时:
触觉阈值

图3D

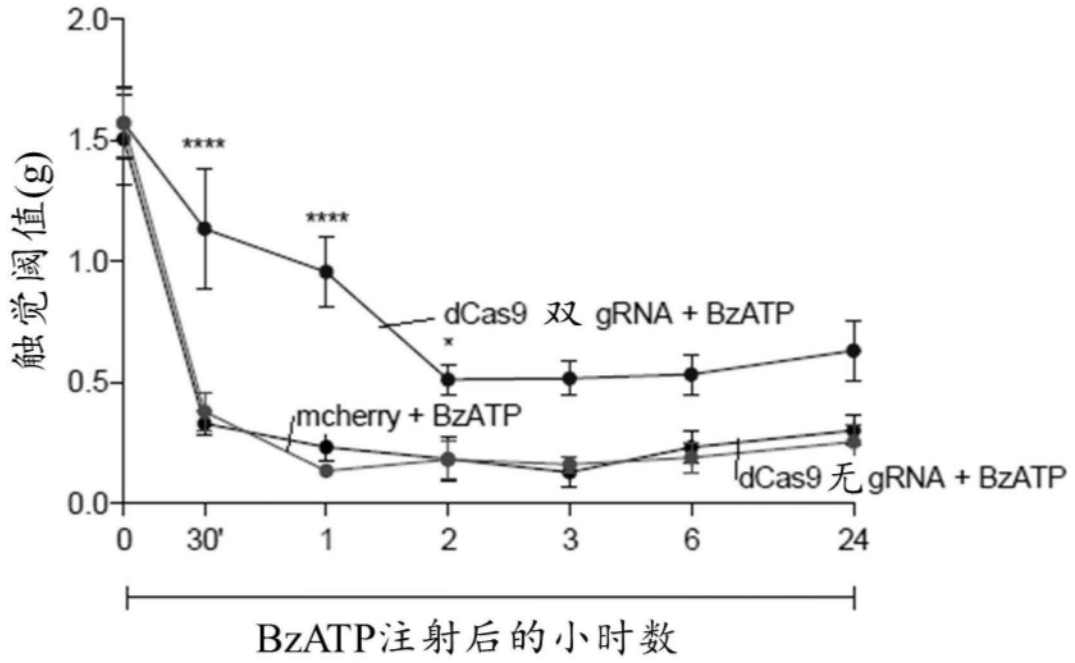

2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
触觉阈值(g)
****
****
*
dCas9 双 gRNA + BzATP
mcherry + BzATP
dCas9 无 gRNA + BzATP
0
30'
1
2
3
6
24
BzATP注射后的小时数

图3E

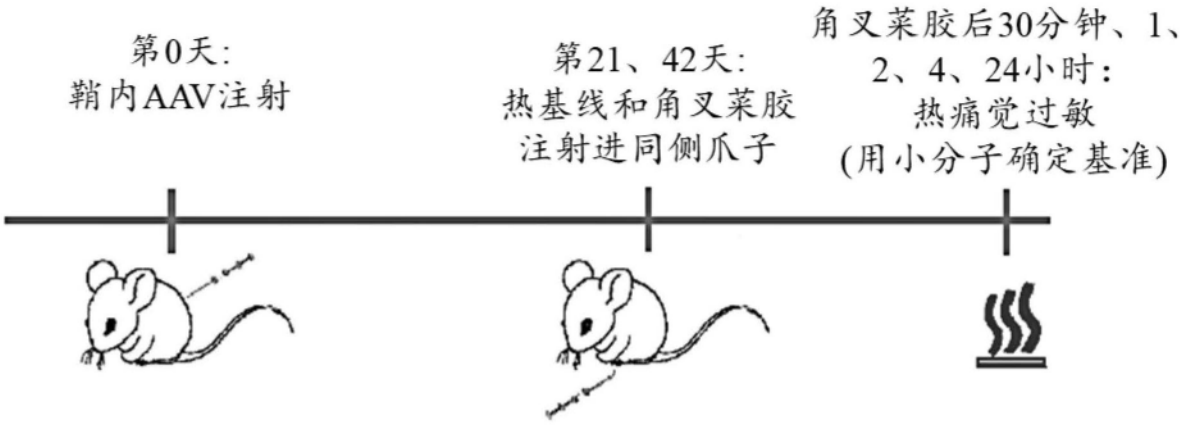

第0天:
鞘内AAV注射
第21、42天:
热基线和角叉菜胶
注射进同侧爪子
角叉菜胶后30分钟、1、
2、4、24小时:
热痛觉过敏
(用小分子确定基准)

图4A

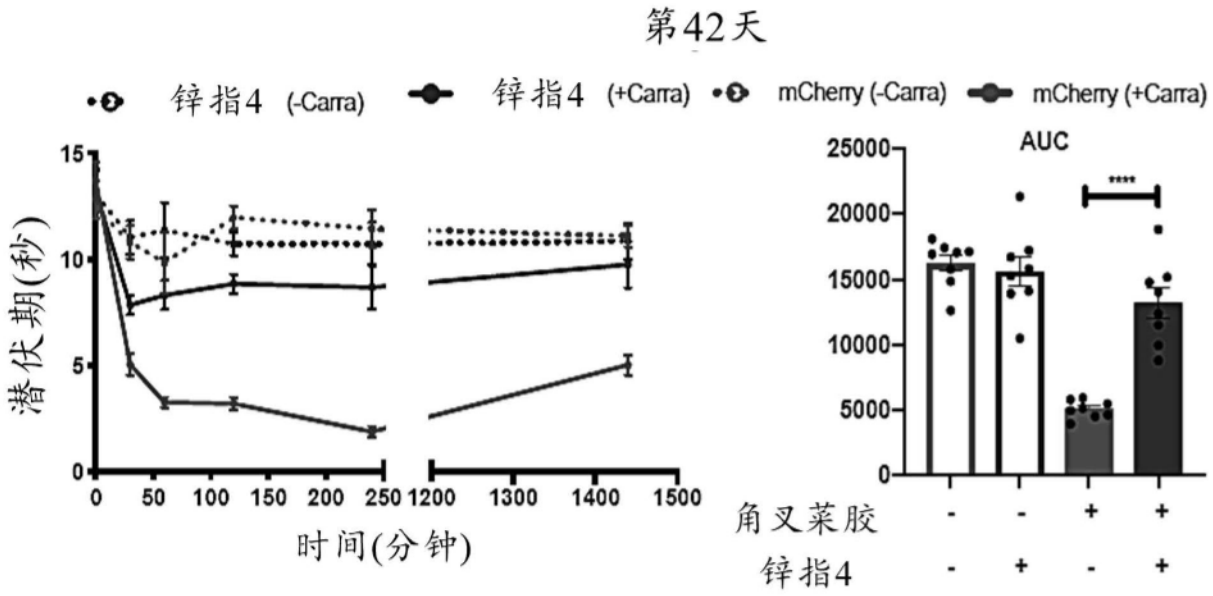

第42天
锌指4 (-Carra)
锌指4 (+Carra)
mCherry (-Carra)
mCherry (+Carra)
潜伏期(秒)
时间(分钟)
AUC
****
角叉菜胶
锌指4

图4B


第0天:
鞘内AAV注射
第14、16、18、20天:
触觉阈值基线(紫杉醇前，第14天)，腹膜内紫杉醇注射
第105天:
触觉阈值和丙酮测试

图4C

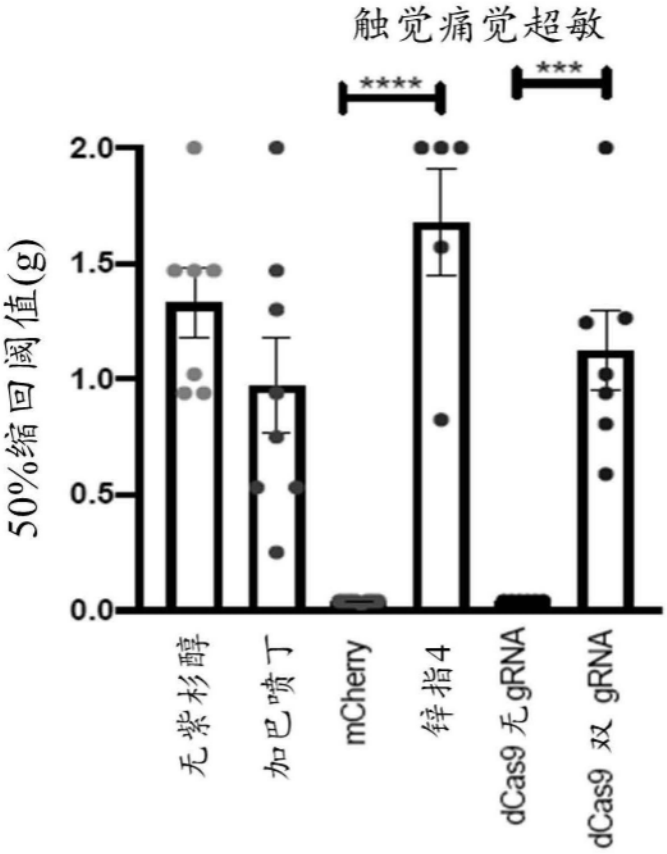

触觉痛觉超敏
****
***
50%缩回阈值(g)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
无紫杉醇
加巴喷丁
mCherry
锌指4
dCas9 无gRNA
dCas9 双 gRNA

图4D

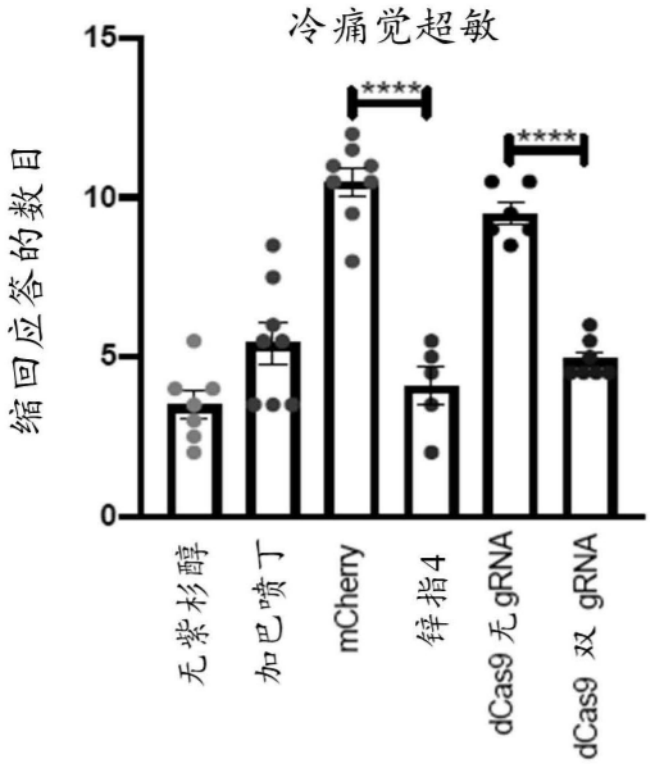

冷痛觉超敏
缩回应答的数目
15
10
5
0
****
****
无紫杉醇
加巴喷丁
mCherry
锌指4
dCas9 无gRNA
dCas9 双 gRNA

图4E

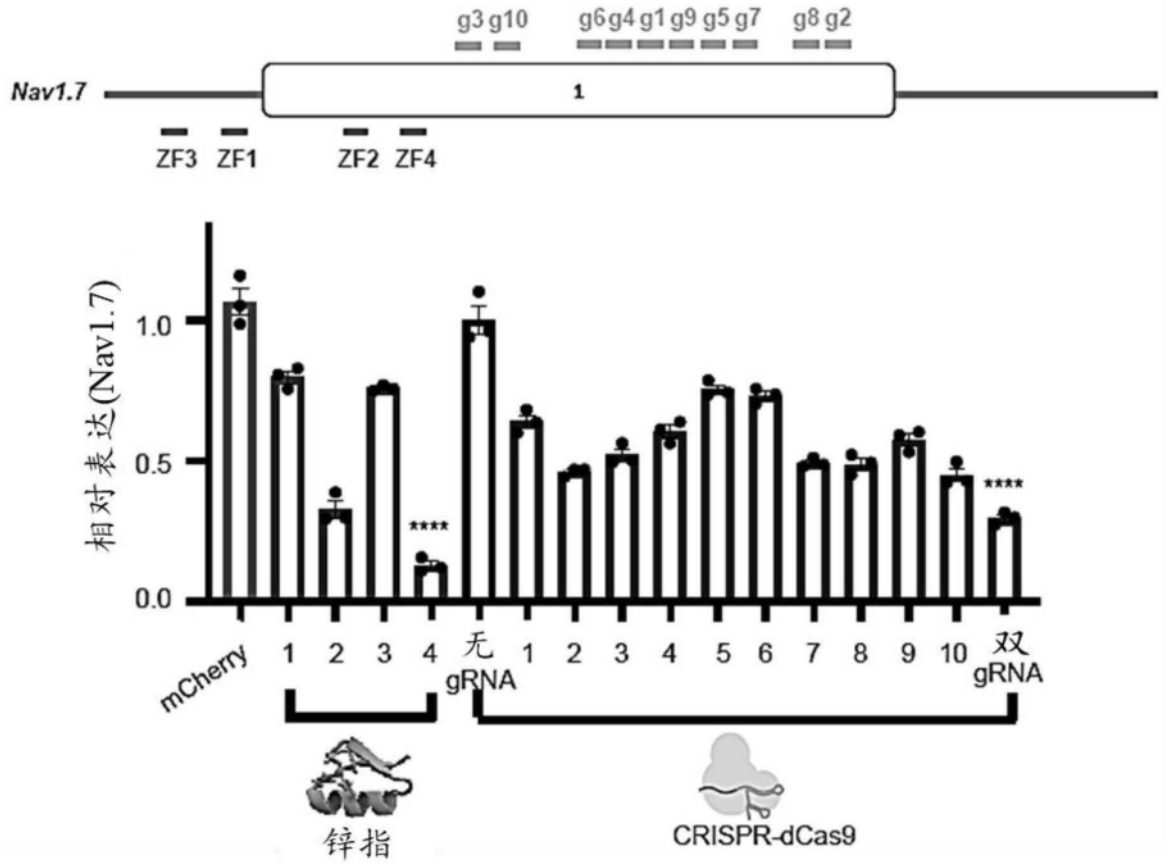

g3 g10
g6 g4 g1 g9 g5 g7
g8 g2
Nav1.7
1
ZF3 ZF1 ZF2 ZF4
相对表达(Nav1.7)
1.0
0.5
0.0
****
****
mCherry 1 2 3 4 无 gRNA 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 双 gRNA
锌指
CRISPR-dCas9

图5A

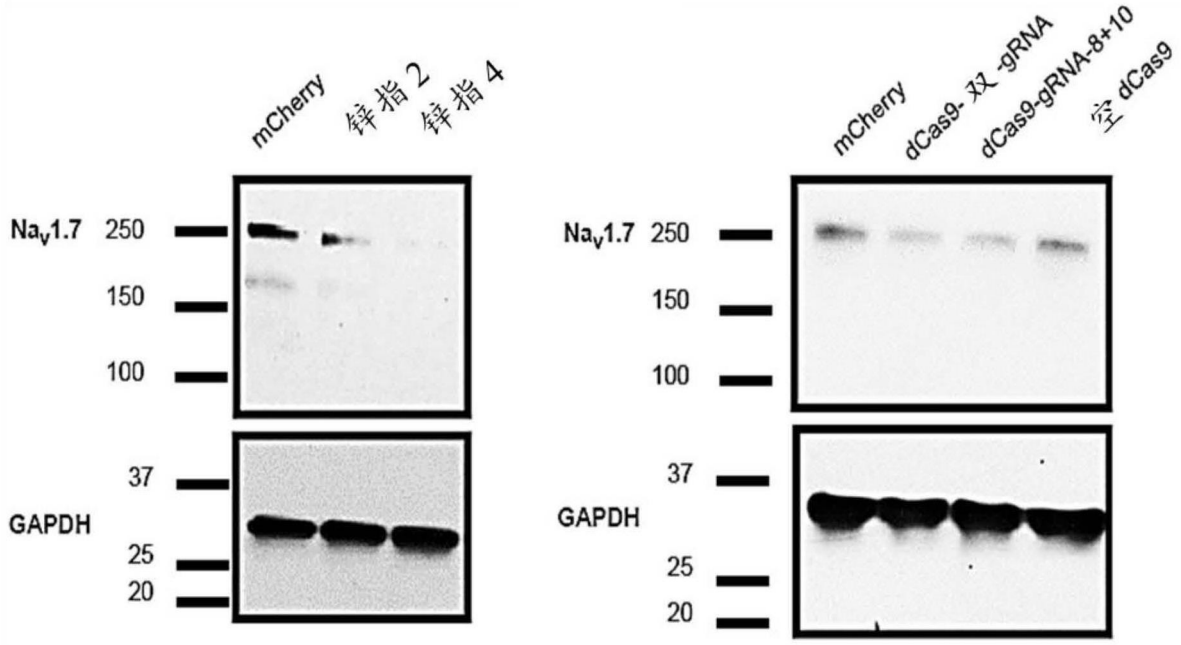

mCherry
锌指 2
锌指 4
Nav1.7 250
150
100
37
GAPDH
25
20
mCherry
dCas9- 双 -gRNA
dCas9-gRNA-8+10
空 dCas9
Nav1.7 250
150
100
37
GAPDH
25
20

图5B

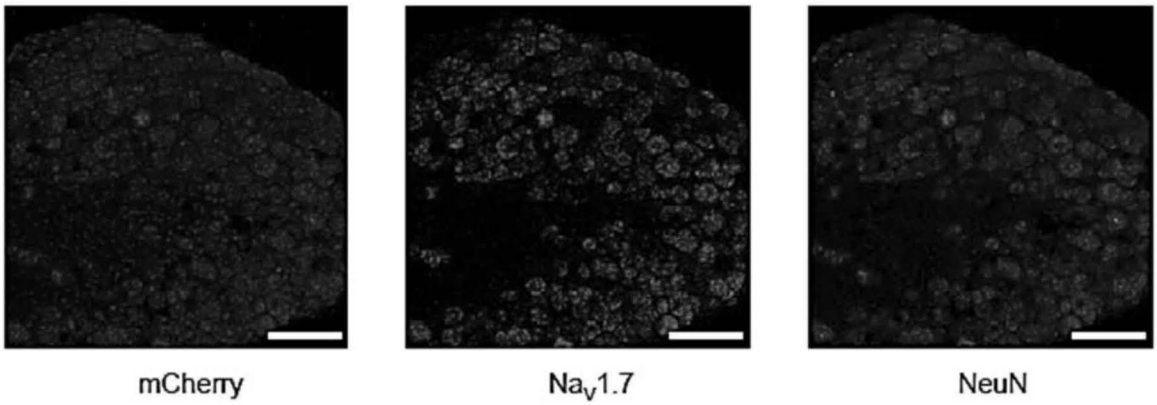

mCherry
$Na_V1.7$
NeuN

图6A

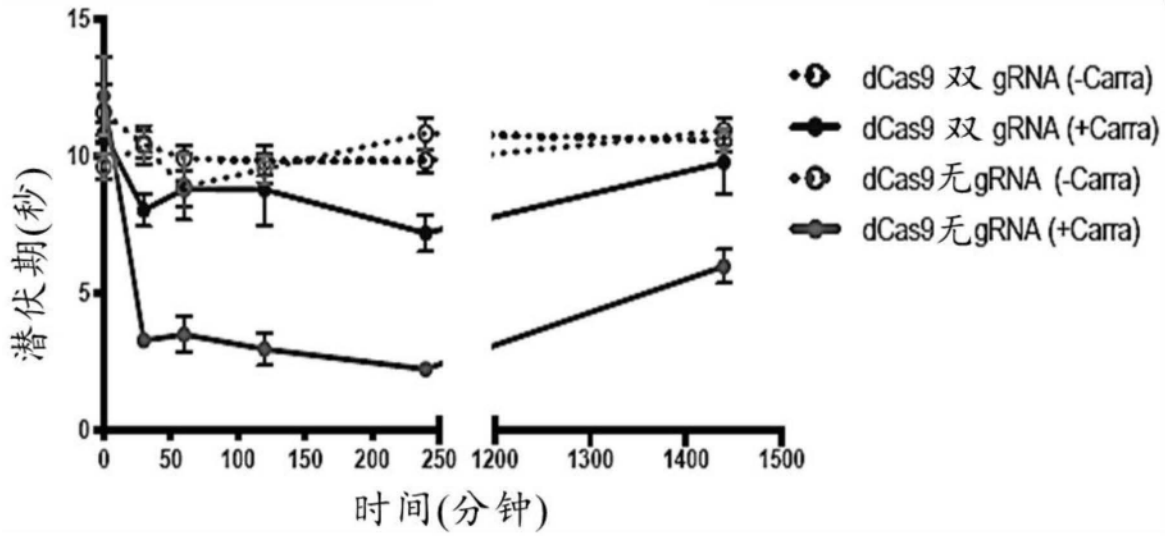

dCas9 双 gRNA (-Carra)
dCas9 双 gRNA (+Carra)
dCas9无gRNA (-Carra)
dCas9无gRNA (+Carra)
潜伏期(秒)
时间(分钟)
0
5
10
15
0
50
100
150
200
250
1200
1300
1400
1500

图6B

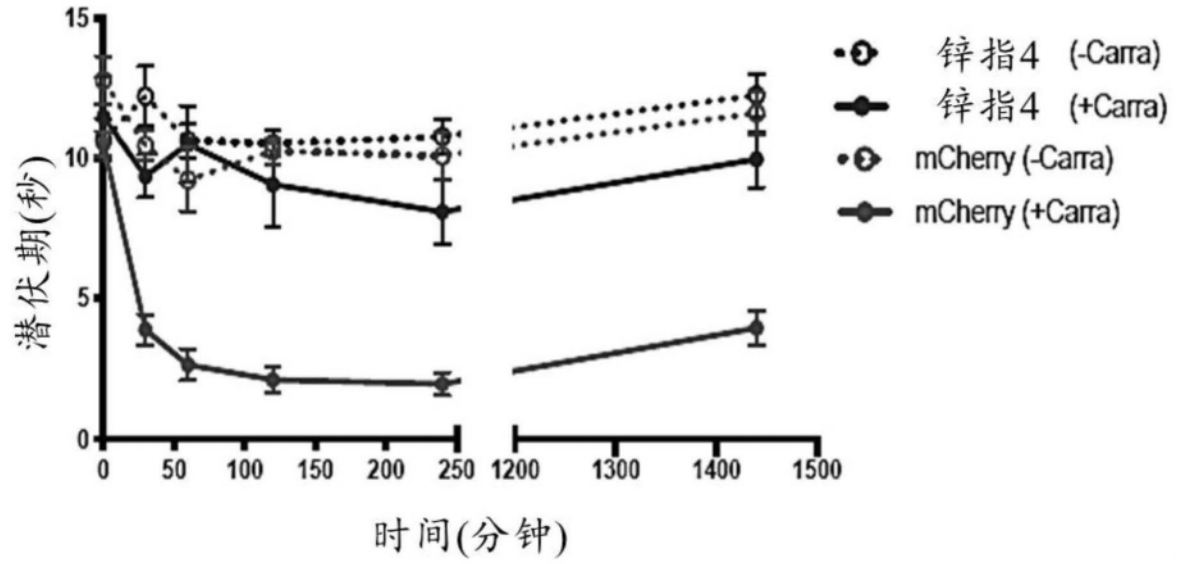

锌指4 (-Carra)
锌指4 (+Carra)
mCherry (-Carra)
mCherry (+Carra)
潜伏期(秒)
时间(分钟)
0
5
10
15
0
50
100
150
200
250
1200
1300
1400
1500

图6C

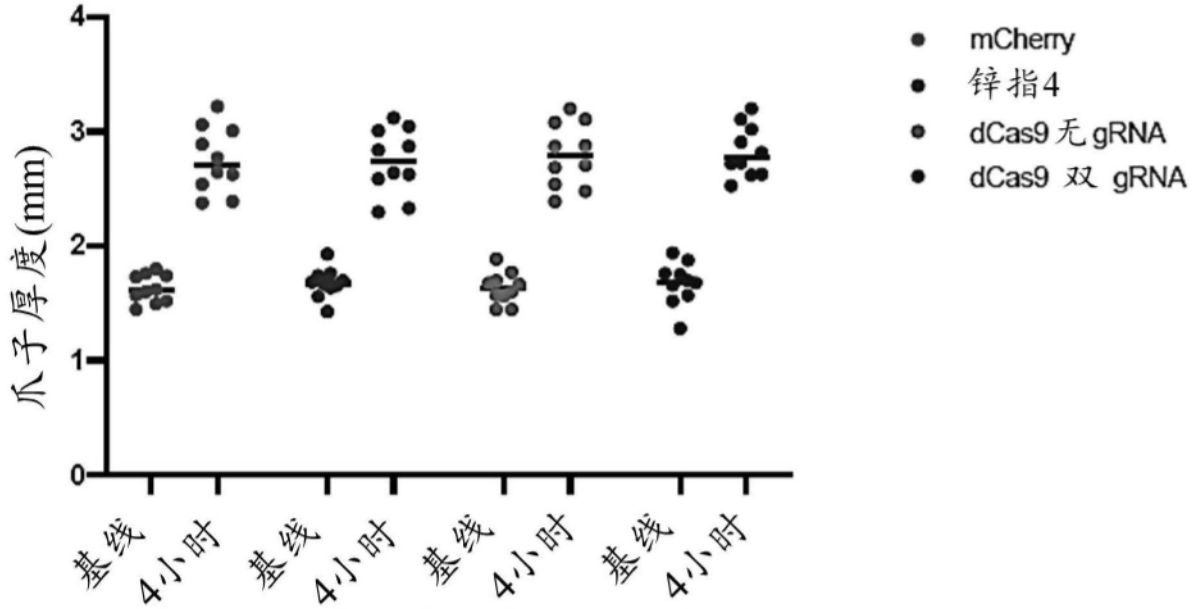

mCherry
锌指4
dCas9 无 gRNA
dCas9 双 gRNA
爪子厚度(mm)
0
1
2
3
4
基线
4小时
基线
4小时
基线
4小时
基线
4小时

图6D

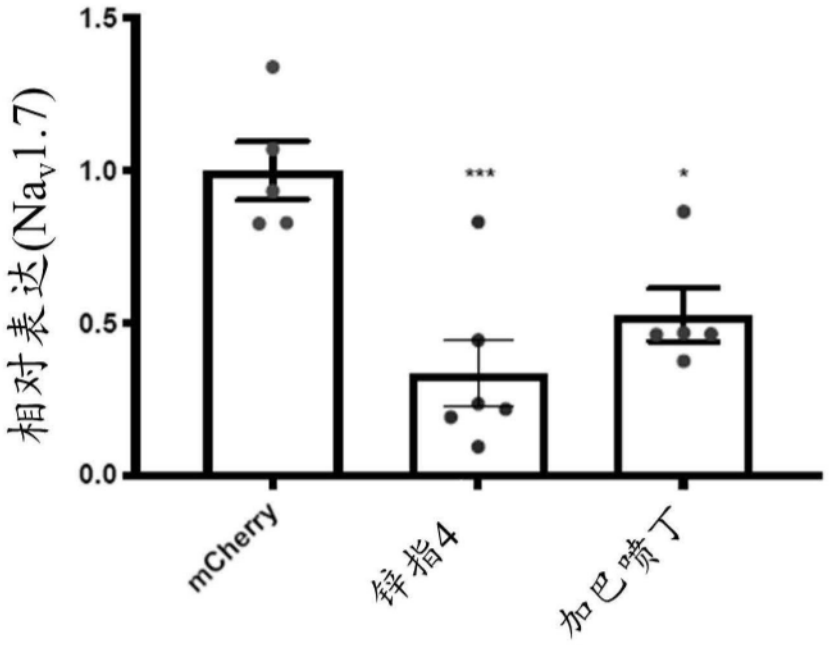

1.5
1.0
0.5
0.0
相对表达(Nav1.7)
***
*
mCherry
锌指4
加巴喷丁

图7A

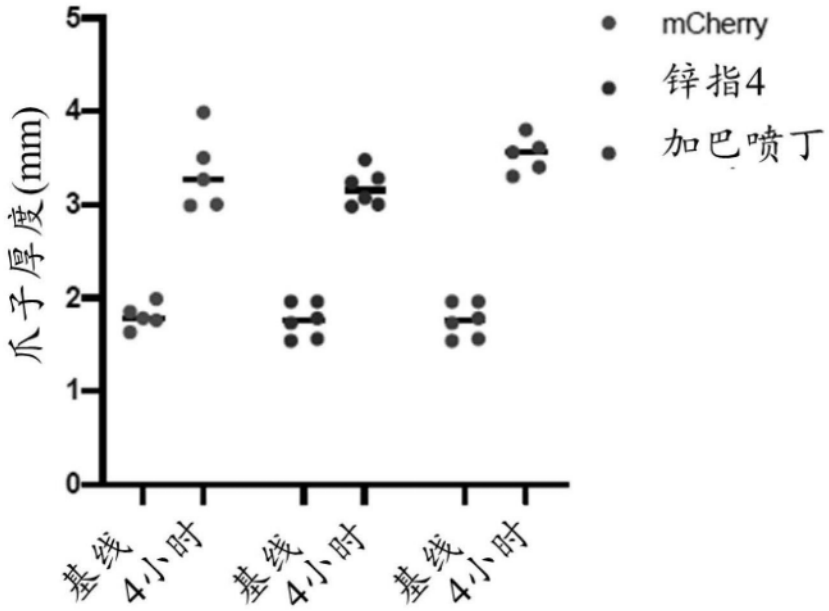

5
4
3
2
1
0
爪子厚度(mm)
mCherry
锌指4
加巴喷丁
基线
4小时
基线
4小时
基线
4小时

图7B

对比	组	角叉菜胶前	角叉菜胶后				
		0分钟	30分钟	1小时	2小时	4小时	24小时
mCherry (+Carra)	KRAB-ZF-4 (+Carra)	n.s.	****p<0.0001	***p=0.0002	****p< 0.0001	*p=0.0104	**p=0.0028
	加巴喷丁 (+Carra)	n.s.	**p=0.0081	*p=0.0276	n.s.	*p=0.0184	n.s.
mCherry (-Carra)	KRAB-ZF-4 (-Carra)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	加巴喷丁 (-Carra)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

图7C

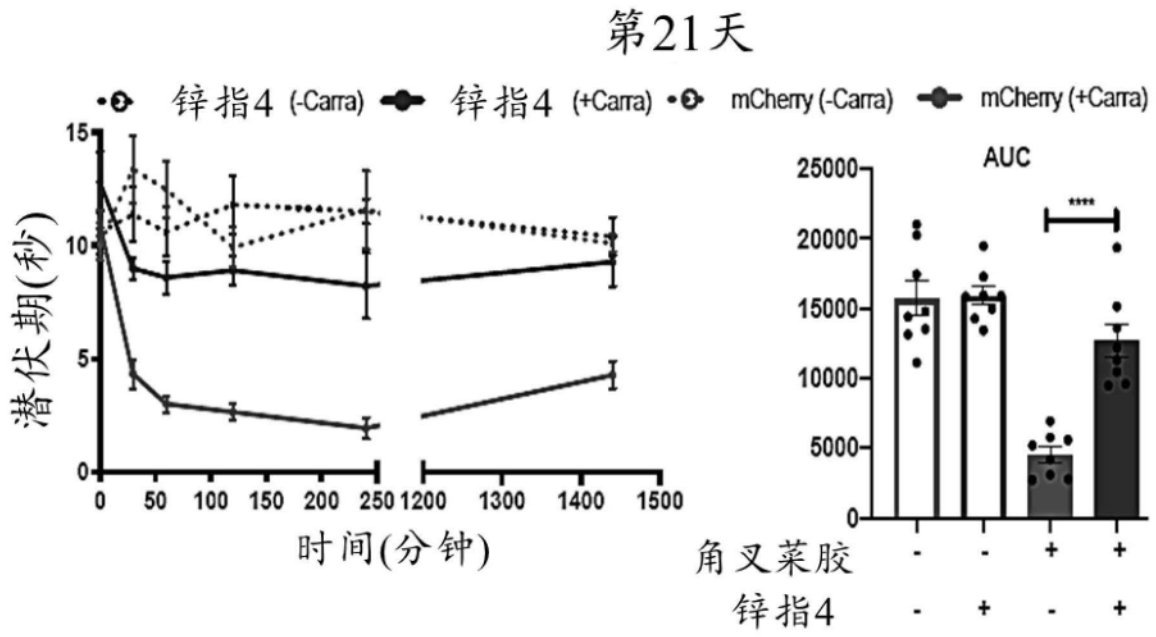


图7D

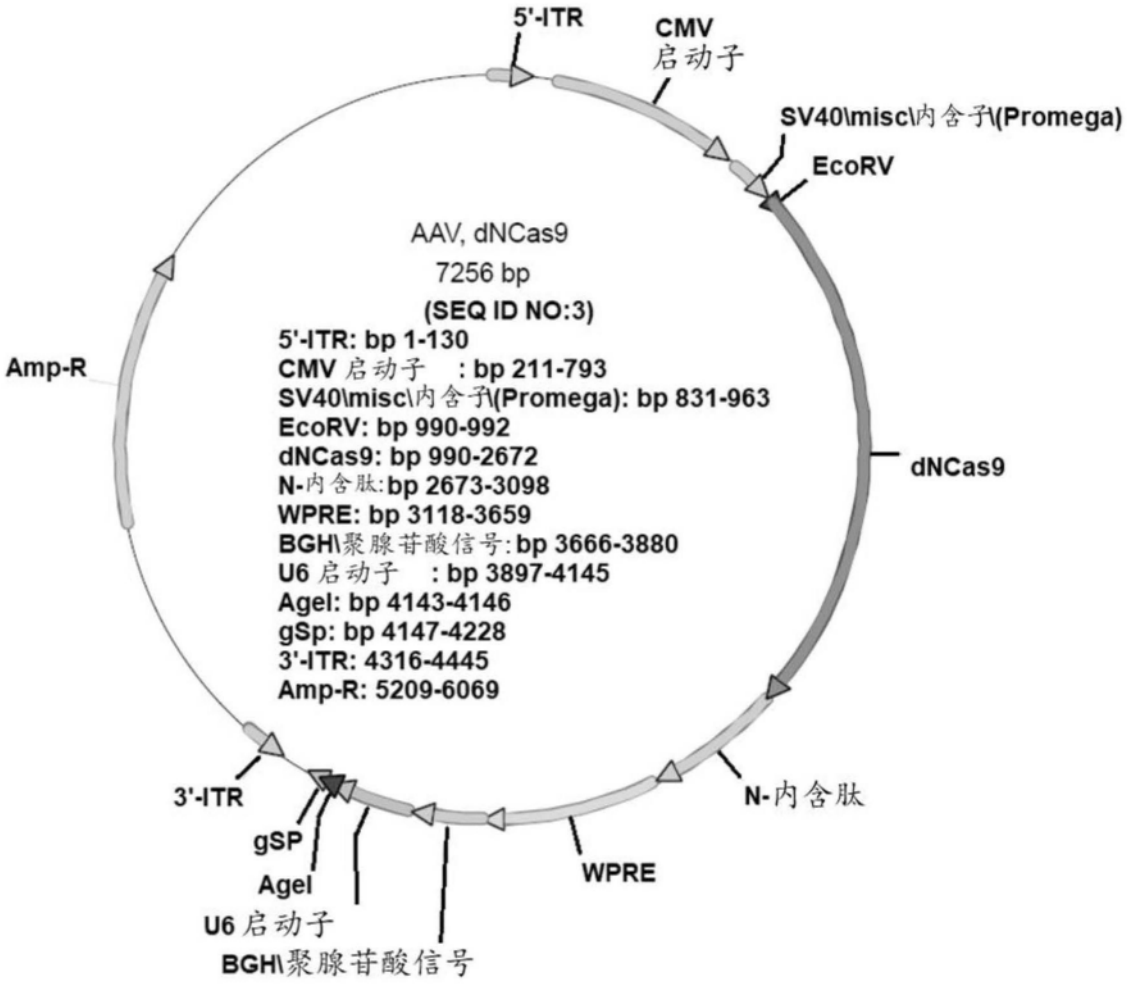

AAV, dNCas9
7256 bp
(SEQ ID NO:3)
5'-ITR: bp 1-130
CMV 启动子 : bp 211-793
SV40\misc\内含子\(Promega): bp 831-963
EcoRV: bp 990-992
dNCas9: bp 990-2672
N-内含肽:bp 2673-3098
WPRE: bp 3118-3659
BGH\聚腺苷酸信号:bp 3666-3880
U6 启动子 : bp 3897-4145
AgeI: bp 4143-4146
gSp: bp 4147-4228
3'-ITR: 4316-4445
Amp-R: 5209-6069
5'-ITR
CMV 启动子
SV40\misc\内含子\(Promega)
EcoRV
dNCas9
N-内含肽
WPRE
BGH\聚腺苷酸信号
U6 启动子
AgeI
gSP
3'-ITR
Amp-R

图8A

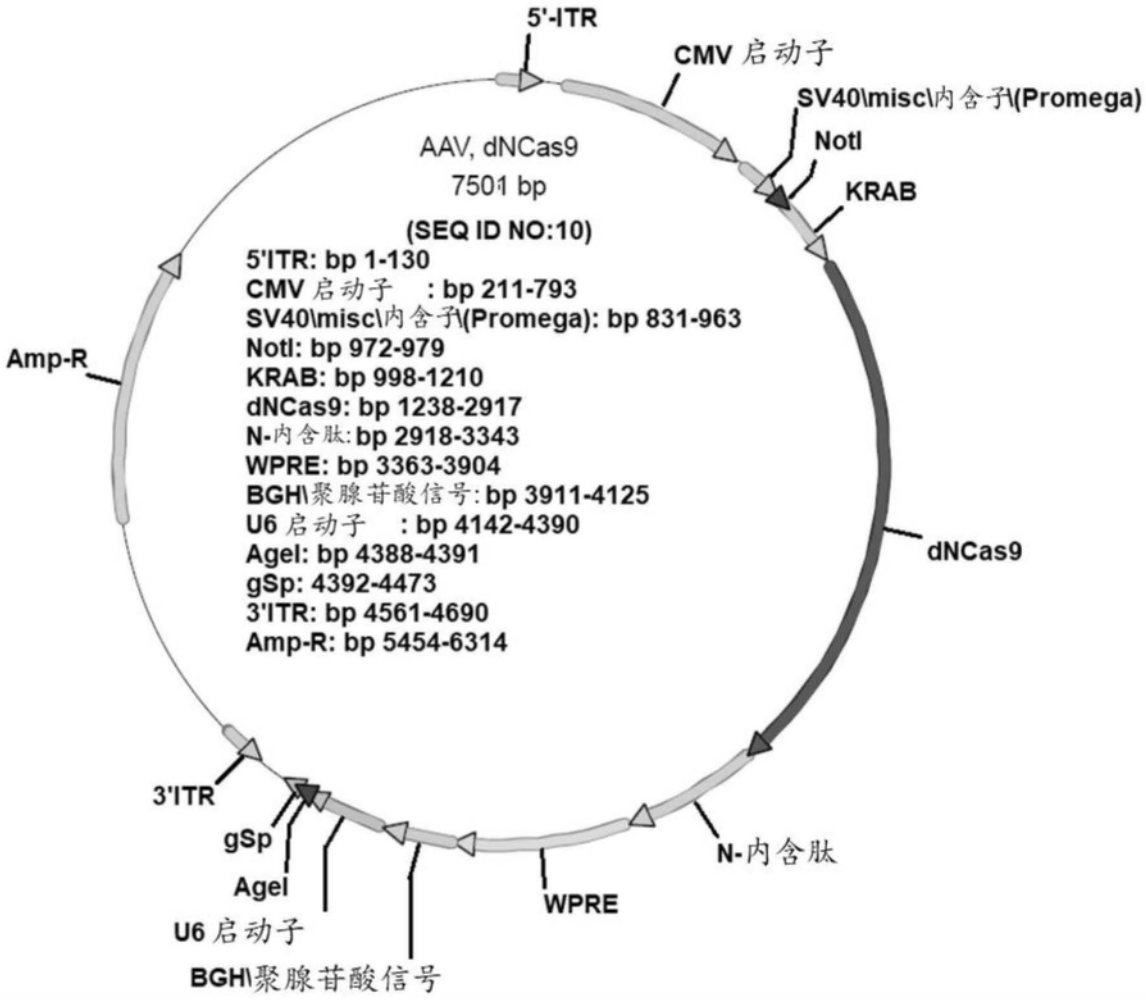

5'-ITR
CMV 启动子
SV40\misc\内含子\(Promega)
NotI
KRAB
dNCas9
N-内含肽
WPRE
BGH\聚腺苷酸信号
U6 启动子
AgeI
gSp
3'ITR
Amp-R
AAV, dNCas9
7501 bp
(SEQ ID NO:10)
5'ITR: bp 1-130
CMV 启动子 : bp 211-793
SV40\misc\内含子\(Promega): bp 831-963
NotI: bp 972-979
KRAB: bp 998-1210
dNCas9: bp 1238-2917
N-内含肽: bp 2918-3343
WPRE: bp 3363-3904
BGH\聚腺苷酸信号: bp 3911-4125
U6 启动子 : bp 4142-4390
AgeI: bp 4388-4391
gSp: 4392-4473
3'ITR: bp 4561-4690
Amp-R: bp 5454-6314

图8B

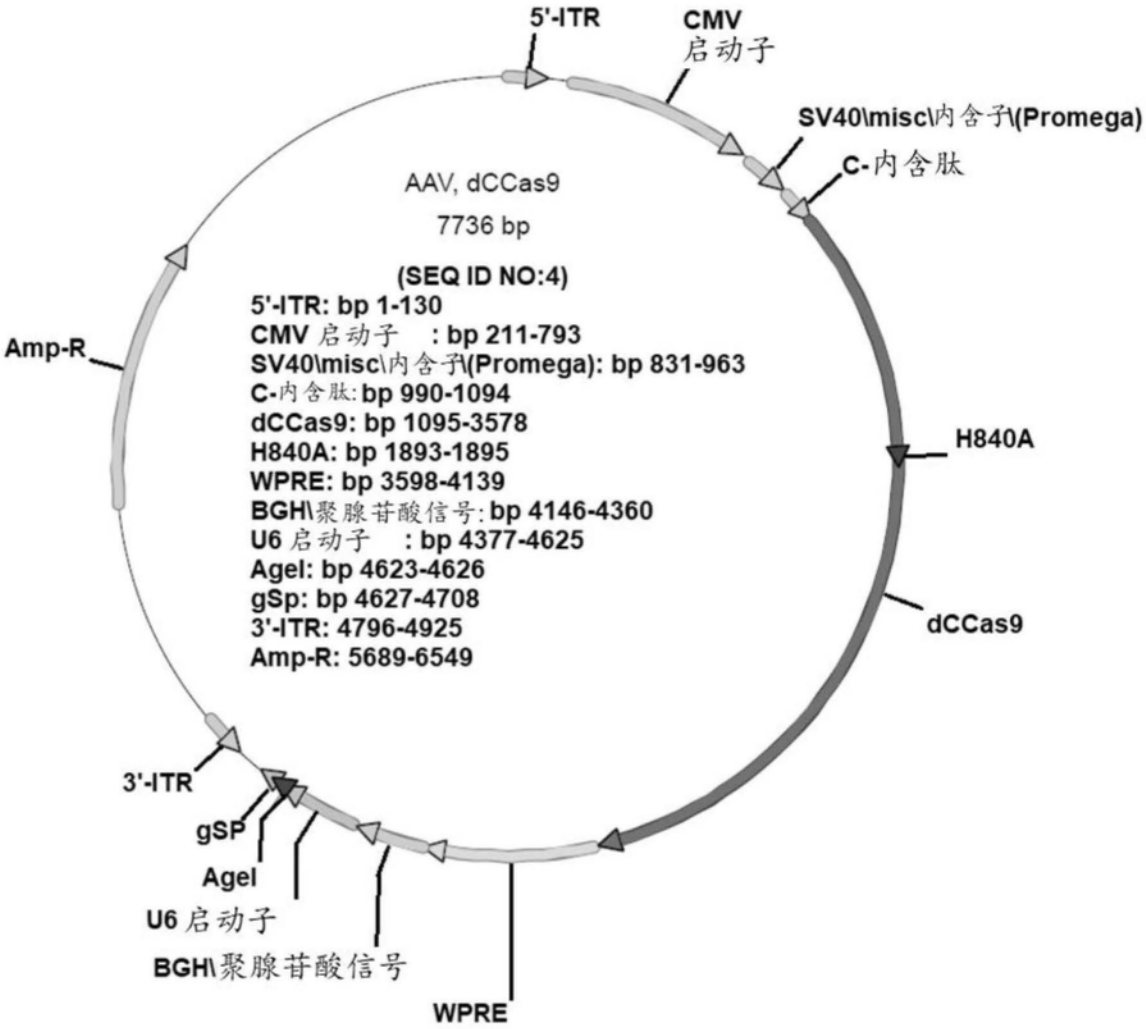

5'-ITR
CMV
启动子
SV40\misc\内含子\(Promega)
C-内含肽
AAV, dCCas9
7736 bp
(SEQ ID NO:4)
5'-ITR: bp 1-130
CMV 启动子 : bp 211-793
SV40\misc\内含子\(Promega): bp 831-963
C-内含肽: bp 990-1094
dCCas9: bp 1095-3578
H840A: bp 1893-1895
WPRE: bp 3598-4139
BGH\聚腺苷酸信号: bp 4146-4360
U6 启动子 : bp 4377-4625
AgeI: bp 4623-4626
gSp: bp 4627-4708
3'-ITR: 4796-4925
Amp-R: 5689-6549
Amp-R
H840A
dCCas9
3'-ITR
gSP
AgeI
U6 启动子
BGH\聚腺苷酸信号
WPRE

图8C

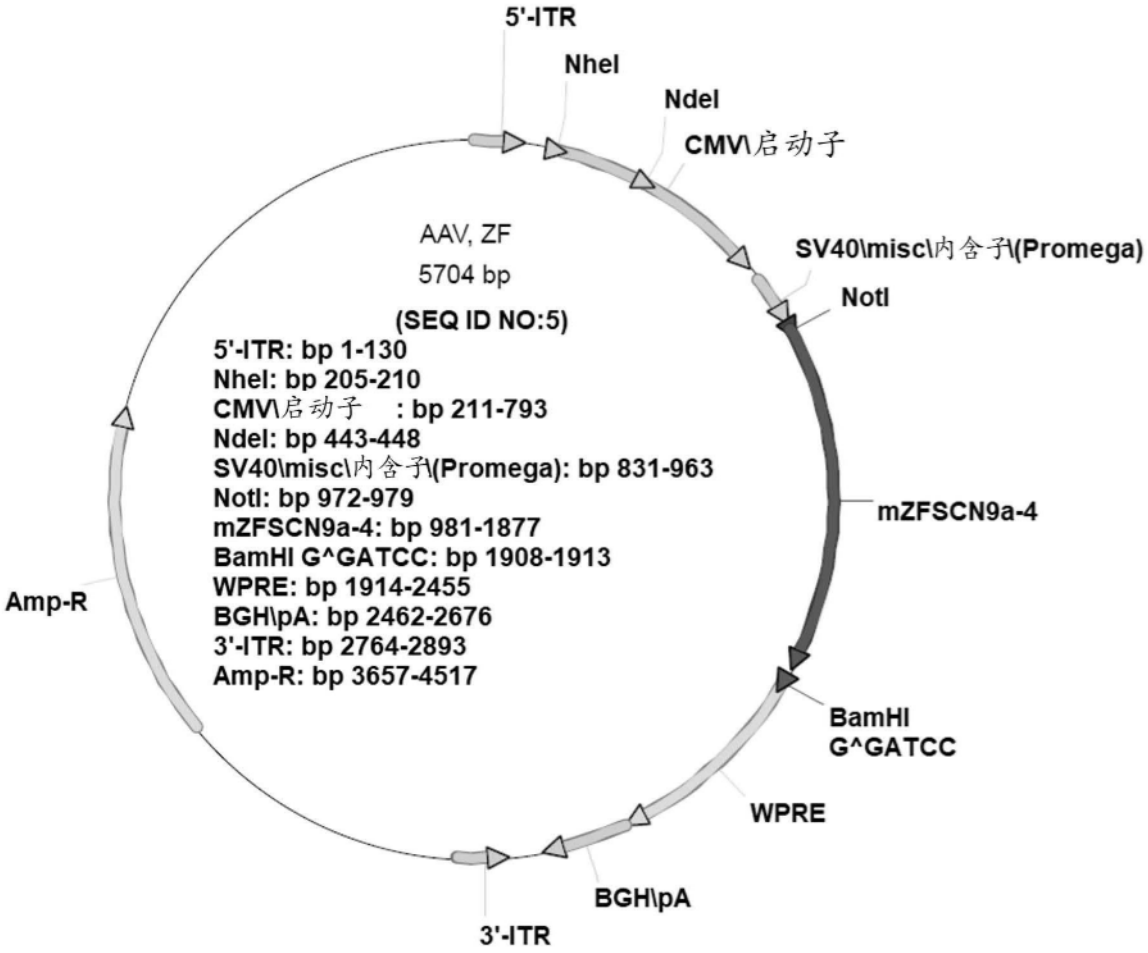

5'-ITR
NheI
NdeI
CMV\启动子
SV40\misc\内含子\(Promega)
NotI
mZFSCN9a-4
BamHI
G^GATCC
WPRE
BGH\pA
3'-ITR
Amp-R
AAV, ZF
5704 bp
(SEQ ID NO:5)
5'-ITR: bp 1-130
NheI: bp 205-210
CMV\启动子 : bp 211-793
NdeI: bp 443-448
SV40\misc\内含子\(Promega): bp 831-963
NotI: bp 972-979
mZFSCN9a-4: bp 981-1877
BamHI G^GATCC: bp 1908-1913
WPRE: bp 1914-2455
BGH\pA: bp 2462-2676
3'-ITR: bp 2764-2893
Amp-R: bp 3657-4517

图9

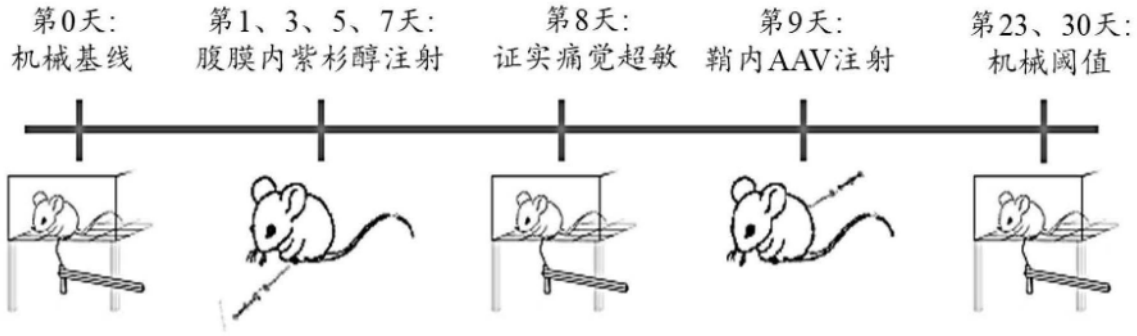

第0天:
机械基线
第1、3、5、7天:
腹膜内紫杉醇注射
第8天:
证实痛觉超敏
第9天:
鞘内AAV注射
第23、30天:
机械阈值

图10A

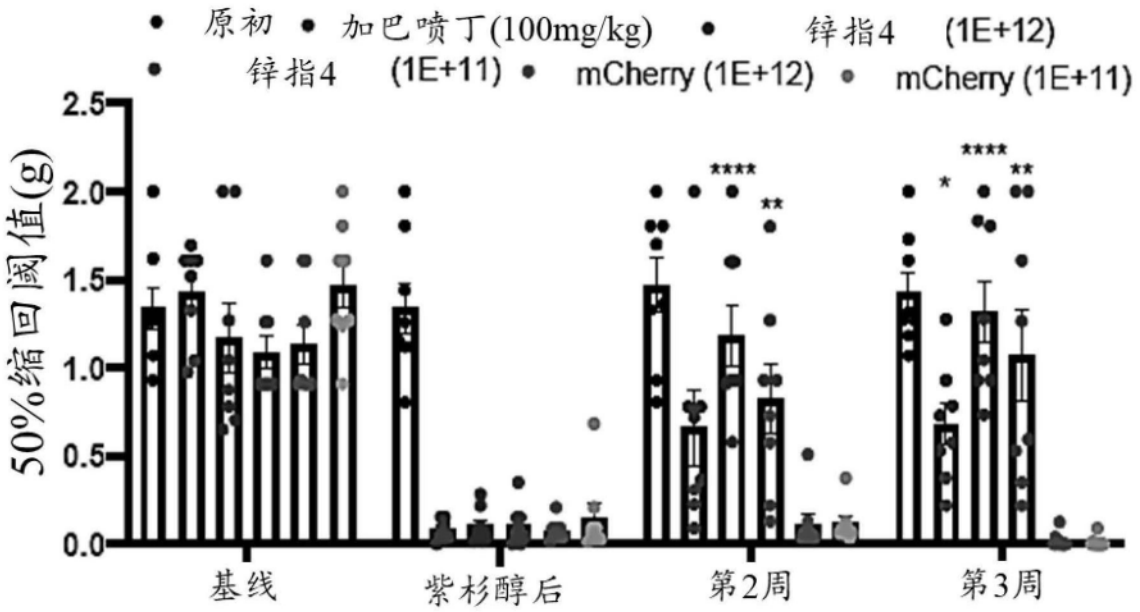

原初
加巴喷丁(100mg/kg)
锌指4 (1E+12)
锌指4 (1E+11)
mCherry (1E+12)
mCherry (1E+11)
50%缩回阈值(g)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
****
**
****
*
**
基线
紫杉醇后
第2周
第3周

图10B

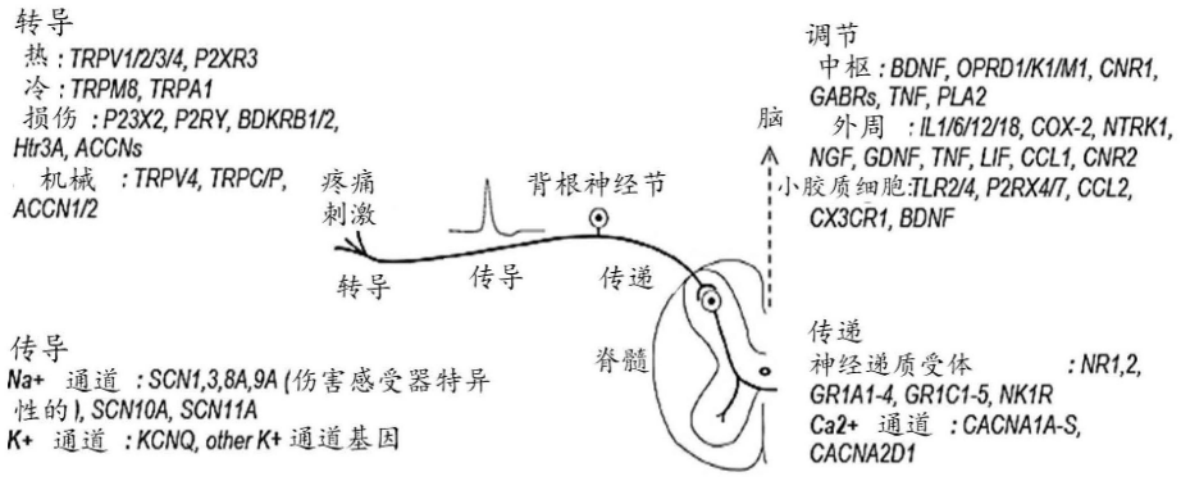

转导
热：TRPV1/2/3/4, P2XR3
冷：TRPM8, TRPA1
损伤：P23X2, P2RY, BDKRB1/2, Htr3A, ACCNs
机械：TRPV4, TRPC/P, ACCN1/2
疼痛刺激
背根神经节
转导
传导
传递
脊髓
脑
调节
中枢：BDNF, OPRD1/K1/M1, CNR1, GABRs, TNF, PLA2
外周：IL1/6/12/18, COX-2, NTRK1, NGF, GDNF, TNF, LIF, CCL1, CNR2
小胶质细胞:TLR2/4, P2RX4/7, CCL2, CX3CR1, BDNF
传导
Na+ 通道：SCN1,3,8A,9A (伤害感受器特异性的), SCN10A, SCN11A
K+ 通道：KCNQ, other K+ 通道基因
传递
神经递质受体：NR1,2, GR1A1-4, GR1C1-5, NK1R
Ca2+ 通道：CACNA1A-S, CACNA2D1

图11