



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112313246 B

(45) 授权公告日 2025. 05. 13

(21) 申请号 201980040791.1

专利权人 CHDI基金会股份有限公司

(22) 申请日 2019.04.17

(72) 发明人 S·弗洛里奇 I·姆诺兹-桑居安

(65) 同一申请的已公布的文献号

E·J·瑞巴 B·泽特勒

申请公布号 CN 112313246 A

H·S·张

(43) 申请公布日 2021.02.02

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

(30) 优先权数据

专利代理师 李政璋 陶家蓉

62/659,552 2018.04.18 US

62/780,605 2018.12.17 US

(51) Int.Cl.

G07K 14/47 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.12.17

(56) 对比文件

CA 2769262 A1, 2011.02.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/027891 2019.04.17

CN 105934524 A, 2016.09.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/204457 EN 2019.10.24

审查员 龙添珍

(73) 专利权人 桑格摩生物治疗股份有限公司

权利要求书1页 说明书63页

地址 美国加利福尼亚州

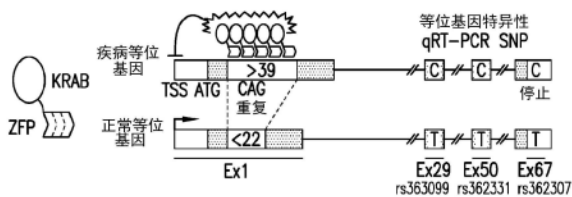
序列表25页 附图72页

(54) 发明名称

用于调节亨廷顿蛋白 (HTT) 的锌指蛋白组合物

(57) 摘要

本公开涉及调节Htt基因表达和HTT蛋白质水平的领域。



1. 一种锌指蛋白转录因子阻遏物 (ZFP-TF阻遏物), 其包含阻遏结构域以及结合亨廷顿蛋白 (HTT) 的锌指蛋白 (ZFP), 其中ZFP-TF阻遏物的氨基酸序列如下所示:

(a) MAPKKRKRKVG IHG VPAAMAERPFQCRICMRNFSQSSDL SRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQWSTRKR HTKIHTGSQKPFQCRICMRNFSQSSDL SRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQWSTRKRHTKIHTGEKPFQCRICMRK FAQSGDLTRHTKIHLRQKDAARGSGMDAKSLTAW SRTLVTFKDVFVDF TREEWKLLDTAQQIVYRNVML ENYKNLV SLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVERE IHQETHPDSETAFEIKSSV (SEQ ID NO:64);

(b) MAPKKRKRKVG IHG VPAAMAERPFQCRICMRNFSRSDNLSEHIRTHTGEKPFACDICGRKFAKRCNLRC HTKIHTHPRAPIPKPFQCRICMRNFSQSGDLTRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQSGDLTRHTKIHTPNPHRRTDP SHKPFQCRICMRNFSRSDNLSEHIRTHTGEKPFACDICGRKFAKRCNLRCHTKIHLRQKDAARGSGMDAKSLTAW SRTLVTFKDVFVDF TREEWKLLDTAQQIVYRNVML ENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVERE IHQETHPD SETAFEIKSSV (SEQ ID NO:65);

(c) MAPKKRKRKVG IHG VPAAMAERPFQCRICMRNFSRSDNLSEHIRTHTGEKPFACDICGRKFAKRCNLRC HTKIHTGSQKPFQCRICMRNFSRSDNLSEHIRTHTGEKPFACDICGRKFAKRCNLRCHTKIHTGSQKPFQCRICMR NFSRSDNLSEHIRTHTGEKPFACDICGRKFAKRCNLRCHTKIHLRQKDAARGSGMDAKSLTAW SRTLVTFKDVFVD FTREEWKLLDTAQQIVYRNVML ENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVERE IHQETHPDSETAFEIKSSV (SEQ ID NO:66); 或

(d) MAPKKRKRKVG IHG VPAAMAERPFQCRICMRNFSRSDNLSEHIRTHTGEKPFACDICGRKFAKRCNLRC HTKIHTHPRAPIPKPFQCRICMRNFSQSSDL SRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQWSTRKRHTKIHTGEKPFQCRI CMRKFQSGDLTRHTKIHLRQKDAARGSGMDAKSLTAW SRTLVTFKDVFVDF TREEWKLLDTAQQIVYRNVML ENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVERE IHQETHPDSETAFEIKSSV (SEQ ID NO:67)。

2. 一种多核苷酸, 其编码权利要求1所述的ZFP-TF阻遏物。

3. 一种mRNA, 其包含一种或多种权利要求2所述的多核苷酸。

4. 一种腺相关病毒血清2型 (AAV2) 载体, 其包含一种或多种权利要求2所述的多核苷酸。

5. 一种药物组合物, 其包含一种或多种权利要求1所述的ZFP-TF阻遏物, 一种或多种权利要求2所述的多核苷酸, 一种或多种权利要求3所述的mRNA和/或一种或多种权利要求4所述的AAV2载体。

6. 一种细胞, 其包含一种或多种权利要求1所述的ZFP-TF阻遏物, 一种或多种权利要求2所述的多核苷酸, 一种或多种权利要求3所述的mRNA, 和/或一种或多种权利要求4所述的AAV2载体和/或权利要求5所述的药物组合物。

7. 如权利要求6所述的细胞, 其中, 所述细胞是神经元或成纤维细胞。

8. 一种或多种权利要求1所述的ZFP-TF阻遏物, 一种或多种权利要求2所述的多核苷酸, 一种或多种权利要求3所述的mRNA, 一种或多种权利要求4所述的AAV2载体和/或权利要求5所述的药物组合物在制备在有需要的对象中治疗和/或预防亨廷顿氏病 (HD) 的药物中的用途。

9. 如权利要求8所述的用途, 其通过向所述对象的纹状体给予一种或多种所述ZFP-TF阻遏物, 一种或多种所述多核苷酸, 一种或多种所述mRNA, 一种或多种所述AAV2载体和/或所述药物组合物。

用于调节亨廷顿蛋白 (HTT) 的锌指蛋白组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年4月18日提交的美国临时申请号62/659,552和2018年12月17日提交的美国临时申请号62/780,605的权益,其公开通过引用全文纳入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含以ASCII格式电子提交的序列表并通过引用其全部内容纳入本文。所述ASCII拷贝创建于2019年4月15日,命名为8325-0173_SL.txt,并且大小为34,379字节。

技术领域

[0005] 本公开涉及诊断和治疗亨廷顿氏病的领域。

[0006] 背景

[0007] 亨廷顿氏病(HD),也称为亨廷顿氏舞蹈病(Huntington'sChorea),是一种运动、认知和精神障碍的进行性紊乱。该疾病发作的平均年龄是35-44岁,但在约10%的情况下,发作在21岁之前发生,并且疾病诊断后的平均寿命是15-18年。患病率是每100,000西欧血统人约3-7人。

[0008] 亨廷顿氏病是在九十年代早期首个表征的三核苷酸重复序列扩增病症的示例(参见Di Prospero和Fischbeck(2005)Nature Reviews Genetics6:756-765)。这些病症涉及3个核苷酸组不稳定重复序列的局部扩增并可能会导致其中保留扩增的重复序列的基因的功能丧失、获得毒性功能或两者。三核苷酸重复序列可位于基因的任何部分,包括非编码和编码基因区。位于编码区内的重复序列通常涉及重复的谷氨酰胺编码三联体(CAG)或丙氨酸编码三联体(CGA)。非编码序列内的扩增的重复序列区域可能会导致基因的异常表达,而编码区内的扩增的重复序列(也称作密码子重复病症(codon reiteration disorder))可能会导致错误折叠和蛋白质聚集。与异常蛋白质相关的病理生理的确切原因常常是未知的。通常,在经历三核苷酸扩增的野生型基因中,这些区域在正常群体中包含可变数量的重复序列,但在患病群体中,重复序列的数量可以从倍增增加到重复序列数量的对数级增加。在HD中,重复序列被插入大胞质蛋白亨廷顿蛋白(Htt)的N末端编码区。正常的Htt等位基因包含15-20个CAG重复序列(SEQ ID NO:71),而包含35个或更多个重复序列的等位基因有可能被认为是潜在的HD致病等位基因并且增加患此疾病的风险。包含36-39个重复序列(SEQ ID NO:89)的等位基因被认为是不完全外显(penetrant)的,并且具有这些等位基因的个体可能或可能不发展出疾病(或在以后的生活中可能发展出症状),而包含40个重复序列或更多个重复序列的等位基因被认为是完全外显的。事实上,已经报道了包含具有40或更多个重复序列的HD等位基因的无症状者。常常发现具有青少年HD发作(年龄<21岁)的那些个体具有60或更多个CAG重复序列。除了CAG重复序列的增加以外,还已经证明HD可涉及重复序列内的+1和+2个移码,因此该区域将编码多聚丝氨酸多肽(在+1移码的情况下,由AGC重复序列编码)踪迹,而不是多聚谷氨酰胺(Davies和Rubinsztein(2006)Journal of Medical Genetics 43:893-896)。

[0009] 在HD中,突变的Htt等位基因通常遗传自一个亲本,作为显性性状。如果另一亲本

不患该疾病,HD患者的任何子女都有50%的可能性发展出疾病。在一些情况中,父母可能有中间HD等位基因并且可能是无症状的,但是由于重复序列扩增,子女显示出该疾病。此外,HD等位基因还可以显示出一种预知现象,其中由于精子发生过程中重复序列区域的不稳定性质,在数代人中观察到严重性增加或发病年龄降低。

[0010] 此外,Htt中的三核苷酸扩增导致纹状体中棘 γ -氨基丁酸(GABA)投射神经元中的神经元丧失,并且新皮层中也发生神经元丧失。相比包含物质P并投射至内部苍白球的神经元,包含脑啡肽并投射至外部苍白球(globus pallidum)的中棘神经元的相关性更高。亨廷顿氏病患者中受大幅影响的其他脑区域包括:黑质,皮层3、5和6,海马体的CA1区,顶叶的角回,小脑的浦肯野细胞(Purkinje cell),下丘脑的外侧管状核和丘脑的中央束旁(centromedialparafascicular)复合体(Walker (2007) Lancet 369:218-228)。

[0011] 对正常Htt蛋白的作用了解甚少,但可能与神经发生、程序性细胞死亡和/或囊泡运输有关。此外,有证据表明野生型Htt刺激脑源性神经营养因子(BDNF)的产生,所述BDNF是纹状体神经元的促生存因子。已经证明在HD的小鼠模型中HD的进展与BDNF表达降低相关联(Zuccato等(2005) Pharmacological Research 52(2):133-139),并且在HD小鼠模型中通过腺相关病毒(AAV)载体介导的基因递送来递送BDNF或神经胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)可以保护纹状体神经元(Kells等(2004) Molecular Therapy 9(5):682-688)。

[0012] 已经研究了HD发病机理的多种机制,包括突变HTT(mHTT)蛋白的毒性和正常HTT蛋白的损失(Ross和Tabrizi(2011) The Lancet. Neurology 10:83-98; Zuccato等(2010) Physiological Reviews 90:905-981)。表达mHtt的多个HD小鼠模型的结果表明其主要通过功能获得性毒性发挥其致病活性(Brooks和Dunnett(2015) Curr Top Behav Neurosci 22:101-133)。使诱导型mHTT转基因失活导致疾病逆转的发现(Yamamoto等(2000) Cell 101:57-66)导致了HTT降低剂作为潜在治疗剂的发展。已经证明靶向HTT mRNA的RNA干扰(RNAi)和反义寡核苷酸(ASO)在多种HD临床前模型中有效(Boudreau等(2009) Mol Ther 17:1053-1063; Harper等(2005) Proc Natl Acad Sci 102:5820-5825; Kordasiewicz等(2012) Neuron 74:1031-1044; Stanek等(2014) Human Gene Ther. 25(5):461)。并且近期的1/2a期试验表明多次鞘内给予ASO降低了参与者脑脊液中正常的和突变HTT水平。

[0013] 当前,HD的诊断和治疗选择非常有限。在诊断方面,改变的(突变)Htt(mHTT)水平与疾病负荷评分显著相关,并且可溶性mHTT物质的浓度随疾病进展增加。然而,难以定量患者CNS中的低丰度mHTT,这既限制了体内HD神经病理学作用的研究,又排除对降低HTT的药物的靶接合的证明。参见例如,Wild等(2014) J Neurol Neurosurg Psychiatry 85:e4。

[0014] 对于治疗,一些设计成预防蛋白质聚集相关毒性的潜在方法已经在体外模型中显示出降低这些毒性,所述蛋白质聚集通过延伸的多聚谷氨酰胺束(tract)发生,诸如伴侣蛋白的过表达或化合物格尔德霉素诱导的热休克反应。其他治疗靶向细胞凋亡在疾病临床表现中的作用。例如,在其中一亲本包含HD等位基因而另一亲本具有胱天蛋白酶1的显性负等位基因的一对小鼠的后代中,已经在动物模型中证明了胱天蛋白酶活性的阻断减缓疾病症状。此外,通过胱天蛋白酶切割突变HD Htt可能在疾病的致病性中起作用。发现相较于携带非胱天蛋白酶抗性突变Htt等位基因的小鼠,携带胱天蛋白酶-6抗性突变Htt的转基因小鼠保持正常的神经元功能并且不发展纹状体神经退行性发生(参见Graham等(2006) Cell 125:1179-1191)。靶向细胞凋亡途径成员的分子也已显示出对症状的减缓作用。例如,已经

证明抑制胱天蛋白酶活性的化合物zVAD-fmk和米诺环素(minocycline)减缓小鼠中的疾病表现。瑞马西胺(remacemide)药物也已经用于小型HD人体试验,因为该化合物被认为将阻止突变Htt与NDMA受体结合,从而预防对神经细胞产生毒性作用。然而,在这些试验中,没有观察到神经元功能在统计学上的显著改善。此外,亨廷顿研究小组使用辅酶Q进行了随机双盲研究。虽然在用辅酶Q10治疗的患者中观察到疾病进展趋于缓慢的趋势,但是总功能能力的下降率没有显著变化。(Di Prospero和Fischbeck,同上)。

[0015] 包含来自锌指蛋白(“ZFP”)的DNA结合结构域的重组转录因子具有调节内源基因(包括Htt基因)基因表达的能力。参见例如,美国专利号9,943,565;9,499,597;9,234,016;和8,841,260以及美国专利公开号2015/0335708;2017/0096460;和20150255877。使用包含锌指蛋白的这些工程改造转录因子的临床试验表明这些新型转录因子能够治疗多种疾病。(参见例如,Yu等(2006)FASEB J.20:479-481)。

[0016] 此外,包含ZFP的人工核酸酶具有通过核酸酶介导的基因修饰来修饰内源基因的基因表达的能力,包括同源定向修复(HDR),在非同源末端连接(NHEJ)之后和/或在非同源末端连接(NHEJ)驱动的过程中通过末端捕获。参见例如,美国专利号9,873,894;9,394,545;9,150,847;9,206,404;9,222,105;9,045,763;9,005,973;8,956,828;8,936,936;8,945,868;8,871,905;8,586,526;8,563,314;8,329,986;8,399,218;6,534,261;6,599,692;6,503,717;6,689,558;7,067,317;7,262,054;7,888,121;7,972,854;7,914,796;7,951,925;8,110,379;8,409,861;8,771,985;8,895,264;美国专利公开号2003/0232410;2005/0208489;2005/0026157;2005/0064474;2006/0063231;2011/0265198;和2013/0177960,其公开通过引用其全部内容纳入本文用于所有目的。因此,这些方法通常涉及使用工程改造的切割系统诱导靶DNA序列中的双链断裂(DSB)或切口(nick),因此通过错误出现过程(error born process)如非同源末端连接(NHEJ)修复断裂或使用修复模板(同源定向修复或DHA)进行修复可导致敲除基因或插入感兴趣的序列(靶向整合)。在不存在外部提供的修复模板(例如“供体”或“转基因”)的情况下引入双链断裂通常用于经由细胞NHEJ途径所引入的突变(插入和/或缺失称之为“插入缺失”)来使靶基因失活。

[0017] 然而,仍选需要用于诊断、研究、治疗和/或预防亨廷顿氏病的方法,包括检测mHTT用于监测疾病进展,用于增加对于HD神经病理学的理解,以及评估改善疾病的HD疗法。

发明内容

[0018] 本文公开了用于诊断和/或治疗亨廷顿氏病的方法和组合物。具体地,本文提供了调节Htt表达的锌指蛋白组合物,包括选择性阻遏突变Htt基因(mHtt)表达毒性突变HTT(mHTT)蛋白。所述组合物和方法在80倍剂量范围内选择性地阻遏>99%的导致HD的等位基因,同时保留HD群体中存在的>86%的野生型等位基因的表达。其他包含CAG的基因的表达受到最小影响,并且本文所述的人工转录因子阻遏物在HD神经元超100天培养和小鼠大脑中至少9个月或更长的时间中具有活性且耐受良好。

[0019] 因此,在一个方面中,描述了Htt基因的ZFP遗传调节剂。在某些实施方式中,遗传调节剂包含人工ZFP转录因子或锌指核酸酶(ZFN)和调节HD等位基因(例如,Htt)表达的功能结构域(转录激活因子、转录阻遏物、核酸酶结构域等)。在某些实施方式中,锌指蛋白具有任何所附表格和附图所示的识别螺旋。在某些实施方式中,将ZFP-TF配制成药物组合物,

例如,用于给予对象。

[0020] 在一个方面中,本文所述的遗传调节剂是ZFP阻遏物(抑制Htt表达的人工转录因子或核酸酶)。这些ZFP阻遏物可以特异性地结合野生型和/或突变Htt等位基因。某些阻遏物结合野生型和突变Htt基因;其他仅结合野生型Htt基因,而其他仅结合突变Htt基因。在一些实施方式中,人工转录因子形成给定大小的多聚体稳定复合物,并因此能够与超过一定最小尺寸的CAG束优先相互反应,其中所述最小尺寸大于野生型CAG束的长度。

[0021] 在某些实施方式中,本文所述的ZFP遗传调节剂优先调节突变Htt等位基因的表达。在一些实施方式中,ZFP遗传调节剂(例如,阻遏物)特异性地结合突变Htt等位基因,其中扩增的束编码多聚谷氨酰胺,而在其他实施方式中,遗传调节剂特异性地结合突变Htt等位基因,其中扩增束编码多聚丝氨酸。因此,在一些实施方式中,ZFP遗传调节剂调节野生型和突变型Htt等位基因。在某些实施方式中,ZFP遗传调节剂仅调节野生型Htt等位基因。在某些实施方式中,ZFP遗传调节剂仅调节突变型Htt。

[0022] 在其他实施方式中,提供了包含本文所述ZFP的阻遏性调节剂,其优先结合与扩增的HD Htt等位基因相关的已知SNP。以此方式,遗传阻遏物对包含SNP的突变Htt等位基因具有特异性,从而允许特异性阻遏突变Htt等位基因。在另一方面中,提供了遗传调节剂,其通过与野生型等位基因相关的SNP相互作用来特异性地激活野生型Htt等位基因。以此方式,仅激活野生型Htt等位基因。

[0023] 在某些实施方式中,ZFP遗传调节剂包含至少一个调控结构域(或功能结构域)。例如,功能结构域可以是转录激活结构域、转录阻遏结构域和/或核酸酶(切割)结构域。通过选择激活结构域或阻遏结构域供于与ZFP DNA结合结构域融合,这些人工转录因子可以用于激活或阻遏基因表达。在一些实施方式中,提供了这样的融合分子,其包含本文所述靶向突变Htt的ZFP DNA结合结构域,所述ZFP DNA结合结构域与可用于下调突变Htt表达的转录阻遏结构域融合。在一些实施方式中,提供了这样的人工转录因子,其包含靶向野生型Htt等位基因的ZFP DNA结合结构域,所述ZFP DNA结合结构域与可上调野生型Htt等位基因的转录激活结构域融合。在某些实施方式中,调控结构域的活性通过外源性小分子或配体调节,因此在不存在外源性配体的情况下,与细胞转录机制结构的相互作用不会发生。这类外部配体控制人工转录因子与转录机制结构相互作用的程度。一个或多个调控(功能)结构域可以操作性地连接一个或多个ZFP DNA结合结构域的任何部分或以任何方式与之相关联,包括在一个或多个锌指结构域之间,一个或多个ZFP的外部和其任何组合。本文所述的任何融合蛋白均可以配制成药物组合物。

[0024] 在一些实施方式中,本文所述的遗传调节剂包含人工核酸酶,所述人工核酸酶包含本文所述的工程改造的ZFP蛋白和切割(核酸酶结构域)。这些人工锌指核酸酶(ZFN)可以用于靶向干细胞如诱导型多潜能干细胞(iPSC)、人胚胎干细胞(hESC细胞)、间充质干细胞(MSC)或神经元干细胞中的突变Htt等位基因,其中核酸酶融合物的活性将产生包含野生型数量的CAG重复序列的Htt等位基因。在某些实施方式中,提供了包含经修饰的干细胞的药物组合物,用于离体给予对象。

[0025] 在另一方面中,提供了编码本文所述任一ZFP DNA结合遗传调节剂(或其组分)的多核苷酸。这类多核苷酸可以给予希望治疗亨廷顿氏病的对象。

[0026] 在另一方面中,本发明提供了用于生成研究亨廷顿氏病的特定模型系统的方法和

组合物。在某些实施方式中,本文提供了模型,其中突变Htt等位基因使用胚胎干细胞产生,以生成细胞系或动物品系,其中使用本文所述的靶向Htt的人工核酸酶将特定三核苷酸扩增束(例如,50(SEQ ID NO:72)、80(SEQ ID NO:73)、109(SEQ ID NO:74)和180个CAG重复序列(SEQ ID NO:75))插入野生型Htt等位基因,以驱动靶向整合。在某些实施方式中,模型系统包含体外细胞系,而在其他实施方式中,模型系统包含转基因动物。在本文所述的任何动物模型中,例如,动物可以是啮齿动物(例如,大鼠,小鼠),灵长类动物(例如,非人灵长类动物)或兔子。

[0027] 而在另一个方面中,提供了包含编码本文所述ZFP调节剂的任何多核苷酸的基因递送载体。在某些实施方式中,载体是腺病毒载体(例如,Ad5/F35载体),慢病毒载体(LV),包括有整合能力的或整合缺陷型慢病毒载体,或腺病毒相关病毒载体(AAV)。因此,本文还提供了包含这样序列的腺病毒(AD)载体、LV或腺病毒相关病毒载体(AAV),所述序列编码本文所述的至少一种遗传调节剂,任选地,进一步编码在核酸酶介导的切割后靶向整合到靶基因中的一种或多种供体序列。在某些实施方式中,Ad载体是嵌合Ad载体,例如,Ad5/F35载体。在某些实施方式中,慢病毒载体是整合酶缺陷型慢病毒载体(IDLV)或有整合能力的慢病毒载体。在某些实施方式中,载体是带VSV-G包膜或用其他包膜的假型化载体。

[0028] 在一些实施方式中,提供了用于亨廷顿氏病的模型系统,其中靶等位基因(例如,突变Htt)用表达标志物标签标记。在某些实施方式中,突变等位基因(例如,突变Htt)经标签标记。在一些实施方式中,野生型等位基因(例如,野生型Htt)经标签标记,并且在其他实施方式中,用不同的表达标志物标签标记野生型和突变等位基因。在某些实施方式中,模型系统包含体外细胞系,而在其他实施方式中,模型系统包含转基因动物。

[0029] 此外,还提供了包含本文所述一种或多种遗传调节剂的药物组合物。例如,某些组合物包括含有编码本文所述ZFP-TF的序列的核酸与药学上可接受的运载体或稀释剂的组合,从而在给予对象后,所述ZFP-TF在对象中表达并调节Htt表达。在某些实施方式中,编码的遗传调节剂对HD Htt等位基因具有特异性。在这些药物组合物中,蛋白质ZFP-TF还与编码本文所述遗传调节剂的核酸联用或作为其的替代。

[0030] 而在另一方面中,还提供了分离细胞,其包含本文所述的任何ZFP遗传调节剂和/或组合物。

[0031] 在其他方面中,本文还提供了使用本文所述的方法和组合物治疗和/或预防亨廷顿氏疾病的方法。在一些实施方式中,该方法涉及这样的组合物,其中多核苷酸和/或蛋白质可以使用病毒载体、非病毒载体(例如,质粒)和/或其组合来递送。在一些实施方式中,该方法涉及包含干细胞群的组合物。

[0032] 基于本公开内容整体,这些和其它方面对于本领域技术人员而言将是显而易见的。

[0033] 附图简要说明

[0034] 图1A-1K显示了靶向mHtt的等位基因选择性ZFP的设计和测试。图1A是HTT等位基因特异性阻遏物的结构和期望行为。设计的经工程改造以适当亲和力和靶标间隔结合在多聚CAG束内的ZFP-KRAB蛋白应当展现出对扩增的疾病等位基因的高度选择性阻遏。就在携带下游SNP的患者细胞系中对野生型(<22)和疾病(>39)等位基因的差异性阻遏对ZFP-TF进行筛选,从而能够使用靶向rs363099、rs362331和rs362307的SNP特异性qRT-PCR对等位基

因水平进行独立定量。图1B显示了用于组装候选ZFP的1-和2-碱基跨越性接头 (spanning linker) 和1-和2-指单元。替代阴影表示具有不同DNA接触残基组和结合特性的替代设计。序列详情参见表1。图1C显示了就对于mHTT的选择性抑制筛选的ZFP-TF正义(左)和反义链(右)靶向设计。使用替代接头将靶向多聚CAG链中任一链的1-和2-指模块连接在一起以生成3、4、5或6指ZFP,从而能够跳过相邻指之间的0、1或2个碱基。靶序列由左、中和右的DNA序列指示。图1D显示了HTT的正常(顶部图)和疾病(底部图)等位基因的转录水平,其通过核转染将100ng ZFP-TF mRNA递送至携带不同长度的多聚CAG束的患者成纤维细胞(GM02151或GM04723)后24小时予以评估。选择等位基因选择性阻遏物(ZFP A、B和D)和非选择性阻遏物(ZFP-C)进行进一步研究。 $n=3$ 个生物学重复;平均值 \pm SD。图1D按出现顺序分别公开了SEQ ID No:81、82、79和80。图1E显示了如图1D所示进行进一步研究和分析的三个ZFP的等位基因特异性阻遏。在患者GM04723成纤维细胞中进行研究。还显示了总HTT水平。 $n=3$ 个生物学重复;平均值 \pm SD。图1E按出现顺序分别公开了SEQ ID No:81和82。图1F显示了用100ng或30ng ZFP或对照mRNA转染GM04723成纤维细胞72小时后通过Western印迹检测到的ZFP-A和ZFP-B对mHTT(印迹顶部的上条带)蛋白的选择性下调。野生型HTT(印迹顶部的下条带)没有减弱。钙联接蛋白加载对照(下方印迹)。图1G(图1G按出现顺序分别公开了SEQ ID No:81和82)、1I(图1I按出现顺序分别公开了SEQ ID No:79和80)和1J(图1J按出现顺序分别公开了SEQ ID No:83和84)显示了患者GM04723(图G)、GM02151(图I)或GM30259(图J)成纤维细胞中等位基因特异性阻遏的剂量反应。在RNA上进行针对总、WT和突变型HTT的qRT-PCR,所述RNA分离自经剂量范围为100,000倍(半对数剂量步骤,1,000-0.01ng)的ZFP mRNA转染的患者成纤维细胞。 $n=3$ 个生物学重复;平均值 \pm SD。图1H是显示HD群中多种CAG重复序列长度的频率的图。根据第三入组-HD周期性数据集来计算HD患者等位基因频率。将CAG高 >35 的所有条目($n=6602$)用于分析平均和中值mHTT等位基因长度。CAG17(SEQ ID NO:76)和CAG43(SEQ ID NO:77)框显示了中值等位基因。CAG编号下的圆圈表示在该研究中测试的等位基因长度。图1K显示了GM02151和GM30259成纤维细胞中ZFP 45249的活性,其中数据以双峰显示,并且各双峰右侧的条形表示扩增的等位基因上的Htt表达,而各双峰左边的条形表示野生型Htt等位基因上的Htt表达。图1K按出现顺序分别公开了SEQ ID No:79、80、83和84。

[0035] 图2A-2N显示了HD神经元中的等位基因选择性抑制、特异性和表型校正。图2A显示了使用源自GENEA020 hESC的NSC(CAG17/48,EQ ID NO 76/78)进行的研究的时间线概述。图2B显示了HD NSC中等位基因特异性阻遏的剂量反应。在RNA上进行针对WT(CAG17)和突变HTT(CAG48)的总HTT或SNP特异性(rs362307)qRT-PCR,所述RNA分离自经剂量范围为3,000倍(半对数剂量步骤,3,000-1ng)的ZFP mRNA转染的NSC。 $n=3$ 个生物学重复;平均值 \pm SD。图2B按出现顺序分别公开了SEQ ID No:76和78。图2C显示了用AAV6-ZFP或AAV6-GFP(1×10^5 vg/细胞)感染21天的分化的HD神经元。该图显示了针对WT和mHTT的qRT-PCR,如图2B; $n=2$ 个生物学重复;平均值 \pm SD。图2C按出现顺序分别公开了SEQ ID No:76和78。图2D显示了用编码ZFP-2A-GFP或GFP的慢病毒感染的HD NSC,其在感染后27天针对GFP表达进行细胞分选以富集转导的细胞。显示了在74天的qRT-PCR数据,如图2B; $n=3$ 个生物学重复;平均值 \pm SD。图2D按出现顺序分别公开了SEQ ID No:76和78。图2E显示了来自图D的GFP分选的NSC分化成神经元。显示了在神经元分化开始后25天(慢病毒感染后103天)的qRT-PCR数据,如图2B; $n=3$ 个生物学重复;平均值 \pm SD。图2E按出现顺序分别公开了SEQ ID No:76和78。图2F

显示了用1500ng的ZFP mRNA转染后24小时使用微阵列(Affymetrix GeneChip Primeview, n=4-6生物学重复/处理)的全基因组特异性评估HD神经元(CAG17/48(SEQ ID NOS 76/78))。各点代表相较于对照处理的细胞,用指定ZFP处理的细胞中单基因的转录水平(x轴)和p值(y轴)的倍数变化。显示了>2倍调节且p-值<0.01的基因。图2G显示了图2F中调节的基因的维恩(Wenn)图。图2H显示了用ZFP-B处理的神经元中胞内ATP水平的增加。在ZFP-2A-GFP或CMV-GFP慢病毒感染后21天测量HD和正常神经元中的胞内ATP水平。图2I显示了用ZFP-B处理的神经元中细胞凋亡减少。通过对神经元进行TUNEL染色来评估细胞凋亡,所述神经元用编码ZFP-2A-GFP或CMV-GFP的慢病毒感染5天,然后撤去生长因子48小时。图2J是HdhQ50小鼠实验的概述。图2K显示了在注射编码ZFP-B或GFP的AAV2/6后7周,通过等位基因特异性qRT-PCR测量杂合Q50小鼠中的纹状体WT(Q7)和KI(Q50)Htt mRNA水平。n=6-8个半球/组,平均值±SD。图2L是通过qRT-PCR评估的Q50或Q7和ZFP-B mRNA水平的回归分析。包括所有纹状体小分区(subsection)。显示了95%置信带。图2M显示了用1500ng的ZFP mRNA转染后24小时使用微阵列(Affymetrix GeneChip Primeview, n=4-6生物学重复/处理)在HD神经元(CAG17/48(SEQ ID NOS 76/78))和HD成纤维母细胞(CAG18/45(SEQ ID NOS 79/80))中的全基因组特异性评估。在图2M中,比较了两种ZFP-TF:ZFP-B和ZFP-45249。点表示相较于无ZFP-TF处理,>2倍调节的基因。图2N显示了使用ZFP-45249在GeneA020神经元中的mHtt等位基因和野生型等位基因阻遏。还显示了这些相同ZFP的CPEB1和MBD5阻遏(参见实施例5)。图2N按出现顺序分别公开了SEQ ID No:76和78。

[0036] 图3A-3G显示了R6/2小鼠中行为缺陷和神经保护的改善。图3A是野生型和AAV处理的R6/2小鼠中评估的行为和分子终点的时间线概述。图3B显示了在用编码ZFP-B(左柱)或GFP(右柱)的AAV2/6处理后每周评估表现出扣爪(clasping)行为的小鼠的百分比;n=14/组;治疗效果P=0.024,对数秩检验。图3C和3D显示了在4(基线)、6、8、10和12周龄时对野生型(左)、ZFP-B处理的R6/2(中)或GFP处理的(右)R6/2小鼠进行的饲养频率(3C)或总行进距离(3D)空场(open field)试验结果。重复测量ANOVA,(3C,3D)基因型主效应P<0.0001,(图3C)治疗效应P<0.009,(3D)治疗效应P<0.038。图3E显示了递送后7周通过qRT-PCR测量的WT和突变Htt(R6/2)mRNA。n=14-20个半球;平均值±SD。图3F是纹状体神经元标志物DARPP32、PDE10A、DRD1A和DRD2的mRNA水平的qRT-PCR评估,如(3E);各组n=6(野生型)、14(GFP)和20(ZFP-B)个半球;显示平均值±SD。图3G是mHtt,DARPP32,PDE10A,DRD1A或DRD2水平和ZFP-B mRNA水平之间的相关性。包括所有纹状体小分区。显示了95%置信带。

[0037] 图4A-4T显示了在敲入HD小鼠模型中ZFP驱动的mHTT阻遏。图4A和4B显示了用编码ZFP-B或ΔDBD.T2A.GFP的AAV2/1+2感染10天后zQ175神经元中的小鼠或突变HTT mRNA(图4A)或可溶性蛋白(图4B)水平。mRNA通过qRT-PCR评估。在Singulex(小鼠HTT)或MSD(mHTT)平台上评估蛋白质。图4C是显示zQ175杂合小鼠研究中终点的时间线概述。图4D显示了在2月龄时注射编码ZFP-B.T2A.GFP的AAV2/1+2并在4月龄时通过对mEM48、GFP、DARPP-32和DAPI进行染色分析的杂合zQ175纹状体中mEM48免疫染色的代表性图像(颜色未显示但如下所示:HTT包涵体(inclusion)(mEM48):黄色,GFP:绿色,DARPP-32:红色,DAPI:蓝色)。右侧显示了扩增的GFP+和GFP-区域。图4E和4F显示来自2-4个月治疗组的纹状体MSN中核周(图4E)和核(图4F)mHTT包涵体的定量;n=5;平均值±SD。4E-40中使用的统计分析:使用Welch校正的双尾t检验。图4G显示了GFP+细胞中mEM48强度的定量,如在(4E和4F)中;n=5;平均

值 \pm SD。图4H显示了如4D中所示的数据,不同之处在于使用在6月龄时注射编码ZFP-B.T2A.GFP的AAV2/1+2并在10月龄时进行分析的杂合小鼠。图4I和4J显示了如4E和4F所示的数据,不同之处在于6-10月龄组用AAV2/1+2ZFP-B.T2A.GFP、 Δ DBD.T2A.GFP或GFP处理;n=5;平均值 \pm SD。图4K如4G所示,不同之处在于6-10月龄组用AAV2/1+2ZFP-B.T2A.GFP、 Δ DBD.T2A.GFP或GFP处理;n=5;平均值 \pm SD。图4L显示了通过IHC测量的10月龄WT和杂合zQ175小鼠的纹状体中的DARPP32;n=5;平均值 \pm SD。图4M显示了在6月龄时注射AAV2/1+2ZFP-B.T2A.GFP、 Δ DBD.T2A.GFP或GFP并在10月龄时进行分析的小鼠纹状体中的DARPP32水平;n=5;平均值 \pm SD。图4N显示了在6月龄时注射编码ZFP-B.T2A.GFP的AAV2/1+2并在10月龄时对GFP、DAPI、GFAP和IBA1进行分析的杂合zQ175纹状体中GFAP和IBA1免疫染色的代表性图像(颜色未显示但如下所示:GFP:绿色,DAPI:蓝色,GFAP:红色,IBA1:黄色)。图4O和4P显示了在6月龄时用AAV2/1+2ZFP-B.T2A.GFP、 Δ DBD.T2A.GFP或GFP处理并在10月龄进行分析的小鼠纹状体中相较于其中所有细胞的GFAP+(o)和IBA+(p)细胞的定量;n=5;平均值 \pm SD。图4Q显示了在同一树突的近端和远端位置拍摄bAP诱发的Ca²⁺图像并用于计算树突指数的线扫描。图4R显示了在4个月时注射编码ZFP-D.T2A.tdTomato(zQ175,左)、 Δ DBD.T2A.tdTomato zQ175 het(zQ175,中)或ZFP-D.T2A.tdTomato(WT同窝仔,右)并在6个月时测试的小鼠的Ca²⁺瞬态。图4S和4T显示了相较于 Δ DBD.T2A.tdTomato zQ175(n=6-11)和ZFP-D.T2A.tdTomato WT小鼠(n=10-15),2-6月龄(s)或4-6月龄(t)组中,用ZFP-D.T2A.tdTomato(n=10-17)处理的zQ175 HET的树突指数的援救。曼-惠特尼U,单尾。

[0038] 图5A-5F显示了Q175 het小鼠的纹状体中通过ZFP表达的成像标志物的恢复。图5A-5F显示了单侧注射编码ZFP-D(右)或GFP(左)的AAV2/1+2的小鼠(n=10/组)的放射自显影分析。小鼠在2月龄时注射并在6月龄(图5A)或4月龄分析,且在10月龄(图5A)分析,使用用于D1(图5B)、D2(图5C)和PDE10(图5D)的标志物。在两项研究中,对D1、D2和PDE10的特异性结合在用AAV2/1+2ZFP-D处理的小鼠中显著增加(配对t检验)。图5E显示了在6.5/7M和10M龄时用编码ZFP-D或GFP的AAV2/1+2ZFP处理的zQ175小鼠的注射和未注射的纹状体中[18F]MNI-659的BPND的差异%(n=33-41只小鼠/组/时间点)。通过未配对t检验比较两个治疗组之间左右纹状体之间的差异百分比。(图5F)从15至63分钟平均的、用AAV2/1+2ZFP-D处理的10M龄的zQ175 het小鼠的平均[18F]MNI-659% SUV图像。模板MRI(上排)PET(中排)在底排共现(co-registered)显示。左(未处理)和右(已处理)纹状体均在矢状平面(sagittal plane)中显示(n=36)。星号标注ZFP-D处理的纹状体半球中获得的PDE10结合增加。

[0039] 图6A和6B显示了等位基因特异性qRT-PCR试验的验证。图6A显示了使用质粒模板所得结果,所述质粒模板对应HTT的rs63099T(099T)和rs363099C(099C) SNP制备。099T SNP与GM02151 CAG18/45(SEQ ID NOS 79/80)和GM04723 CAG15/67HD(SEQ ID NOS 81/82)成纤维细胞中的WT HTT同相,而099C与同一细胞中的突变HTT同相。然后将质粒用于制备相互连续的稀释液,如所示。为此,在固定量(1.25fg)的099T模板存在的情况下将099C模板从5fg连续稀释两倍至0.156fg(099C:099T从0.125:1至4:1);并且在固定量(1.25fg)的099C模板存在的情况下将099T模板从5fg连续稀释两倍至0.156fg(099T:099C从0.125:1至4:1)。在存在固定量的总cDNA的情况下组装连续稀释液,所述总cDNA由第三患者成纤维细胞系制备,其中已耗尽HTT和mHTT表达(参见实施例中的方法)。在该系中,HTT和mHTT也(分别)

与099T和099C同相。选择质粒水平,以使来自1:1质粒比率的qRT-PCR信号与来自未耗尽细胞的HTT和mHTT cDNA大致相同。对每个稀释样品进行099C特异性(右柱)和099T特异性(左柱)qRT-PCR分析。相对量绘制为099T和099C模板比例为1:1的样品获得的值的部分。图6B显示了来自rs362331T(331T,与WT HTT在ND30259 CAG21/38(SEQ ID NO 83/84)HD成纤维细胞中同相)和rs362331C(331C,与mHTT在ND30259 CAG21/38(SEQ ID NO 83/84)HD成纤维细胞中同相)的质粒模板的结果,其经连续稀释至由GM21756成纤维细胞(CAG15/70(SEQ ID NO 81/85))制成的cDNA,所述GM21756成纤维细胞已经阻遏WT和突变HTT>90%的双等位基因ZFP阻遏物转染。在固定量(0.5fg)的331T模板存在的情况下将331C模板从2fg连续稀释两倍至0.0625fg;在固定量(0.5fg)的331C模板存在的情况下将331T模板从2fg连续稀释两倍至0.0625fg。对每个稀释样品进行331C特异性(红色柱)和331T特异性(蓝色柱)qRT-PCR分析。相对量绘制为331T和331C模板比例为1:1的样品获得的值的部分。

[0040] 图7A和7B显示了越100倍转染的ZFP mRNA的剂量依赖性ZFP蛋白表达。图7A显示以每 2×10^5 个细胞1000、300、100、30和10ng的剂量用ZFP mRNA转染的HD成纤维细胞(GM04723,CAG15/67(SEQ ID NOS 81/82))。转染五小时后,使用抗FLAG抗体(Sigma F1804)收获细胞用于ZFP Western印迹。图7B显示了使用Odyssey CLx成像仪定量的ZFP和GAPDH蛋白水平,各样品的ZFP/GAPDH比例按1000ng ZFP-C样品的比例(设置为1)缩放。

[0041] 图8A和8B显示了Hdh Q7/Q111纹状体细胞中候选ZFP设计的测试。图8A和8B显示了在用于本研究的筛选系统中的候选ZFP-TF设计(患者成纤维细胞;CAG18/45(SEQ ID NOS 79/80)) (图8B)对比用于先前工作(来自STHdhQ111/HdhQ7小鼠模型的细胞;CAG 4/111(SEQ ID NOS 86/87)) (图8A)中的小鼠细胞所展示的等位基因选择性比较。仅有3个测试设计(ZFP-A、ZFP-B、ZFP-D)在患者成纤维细胞系统中表现出高度等位基因特异性阻遏(突变等位基因的阻遏>75%,野生型等位基因的阻遏<10%)。相反,25个设计在不那么严格的小鼠细胞中表现出这种行为。对于小鼠细胞研究,在用100ng的ZFP或GFP mRNA转染STHdhQ111/HdhQ7小鼠纹状体细胞后24小时,使用等位基因特异性qRT-PCR测量WT(CAG4(SEQ ID NO: 86))和KI(CAG111(SEQ ID NO:87))Htt等位基因。将Htt信号针对EIF4a2、ATP5b和GAPDH的平均值标准化,然后针对GFP(设置为1)进行缩放;n=3个生物学重复;平均值±SD。

[0042] 图9显示了在HD成纤维细胞中测试来自Garriga-Canut等(2012)Proc Natl Acad Sci USA 109(45):e3136-45的靶向CAG的ZFP,并且显示了在来自先前研究的患者成纤维细胞(CAG 18/45(SEQ ID NO 79/80))中等位基因选择性抑制的比较(ZF6和ZF11,参见Garriga-Canut等(2012)Proc Natl Acad Sci USA 109(45):e3136-45))。在用1000、300或100ng的ZFP mRNA转染GM02151成纤维细胞后24小时总、WT(CAG18(SEQ ID NO:86))和突变(CAG45(SEQ ID NO:87))HTT mRNA的等位基因特异性qRT-PCR。标准化HTT表达,如(图1D)。将公开的ZF6-Kox和ZF11-Kox序列克隆到当前研究中使用的同一表达盒中,并并行制备图1D中测试的所有ZFP的体外转录mRNA;n=3个技术重复;平均值±SD。

[0043] 图10A-10D显示了分化的CAG17/48(SEQ ID NO 76/78)hESC中NSC和神经元标志物的表达。图10A显示了通过IHC确认的、分化自CAG17/48(SEQ ID NO 76/78)ESC(GENEA020)的NSC中NSC特异性PAX6(浅色阴影)和巢蛋白(深色阴影)表达。图10B显示了通过qRT-PCR测量的、ESC或分化的NSC中一组多能性标志物(OCT4、NANOG和REX1)或NSC标志物(PAX6、SOX1和NES)的表达水平。基因表达针对GAPDH标准化,并针对ESC(上组图)或NSC(下组图)中的标

准化表达水平(设置为1)缩放;n=2个生物学重复;平均值±SD。图10C显示了通过IHC确认的、分化的CAG17/48 (SEQ ID NO 76/78) 神经元 (DAPI, 浅色阴影) 中神经元特异性βIII微管蛋白表达 (深色阴影)。图10D显示了通过qRT-PCR测量的、来自CAG17/48 (SEQ ID NO 76/78) NSC或分化的神经元的一组神经元标志物 (MAP2、GAD1和FOXP1) 或NSC标志物 (PAX6、SOX1和NES) 的表达水平。基因表达针对GAPDH标准化,并针对神经元(顶部)或NSC(底部)中的标准化表达水平(设置为1)缩放;n=2个生物学重复;平均值±SD。

[0044] 图11A-11D显示了HD成纤维细胞中的ZFP特异性评估。图11A显示了具有指定ZFP-TF的基因表达的倍数变化。各点代表相较于对照处理的细胞,用指定ZFP处理的细胞中单基因的转录水平(x轴)和p值(y轴)的倍数变化。显示了>2倍调节且p-值<0.01的基因。图11B显示了指定基因的倍数抑制。图11B按出现顺序分别公开了SEQ ID No:79和80。图11B显示了指定基因的标准化表达百分比。图11D显示了图11C中调节的基因的维恩图。参见实施例文本的进一步描述。

[0045] 图12A和12B是显示确认用于微阵列研究的样品中等位基因选择性HTT阻遏的图表。进行等位基因特异性qRT-PCR分析以确认RNA样品中的mHTT调节(各处理6个生物学重复),所述RNA样品经历针对GENEA020神经元(示于图12A(以出现顺序分别为SEQ ID No:76和78);对应图2F和2G)和GMO2151成纤维细胞(示于图12B(以出现顺序分别为SEQ ID NO 79和80);对应图11A)的微阵列分析。如图2B(GENEA020神经元)和图1I(GMO2151成纤维细胞)所示分析等位基因特异性qPCR。

[0046] 图13A-图13C显示了野生型(“R62_WT”)对象和经GFP转基因(“R62_Tg GFP”)或ZFP-TF 33074(“R62_Tg 33074”)处理的对象的R6/2小鼠研究体重和其他行为数据。图13A是描述指定星期的体重的图表。显示了针对性别组合的男性和女性对象的单独图表。图13B是描绘指定条件下下降时间(fall time)的图表。显示了针对性别组合的男性和女性对象的单独图表。图13C是描述指定星期前肢握力强度:体重的标准化比例的图表。还参见实施例文本的进一步描述。

[0047] 图14A-14C显示了注射AAV1/2-hSYN1-GFP和

[0048] AAV1/2-hSYN1-GFP的zQ175小鼠的IHC分析。注射对照构建体的杂合zQ175小鼠的纹状体中mEM48免疫染色的代表性图像。图14A显示了在2月龄时注射AAV2/1+1-hSYN1-GFP并在4月龄时分析的对象的结果;图14B显示了在6月龄时注射AAV2/1+1-hSYN1-GFP并在10月龄时分析的对象的结果;图14C显示了在6月龄时注射AAV2/1+1-hSYN1-ΔDBD.T2A.GFP并在10月龄时分析的对象的结果。颜色未示出如下:HTT包涵体(mEM48):黄色,GFP:绿色,DARPP-32:红色,DAPI:蓝色。

[0049] 图15A-15G显示了治疗的野生型和zQ175小鼠中的神经炎症评估。图15A显示了针对指定分子(GFP、DAP、GFAP、BA1)的免疫染色的结果。图15B是显示按指示处理的对象中2-6个月时ba1细胞与所有细胞的比例的图表。图15C是显示按指示处理的对象中2-6个月时GFAP细胞与所有细胞的比例的图表。图15D是显示按指示处理的对象中2-6个月时GFAP细胞中GFAP F强度的图表。图15E是显示按指示处理的对象中6-12个月时ba1细胞与所有细胞的比例的图表。图15F是显示按指示处理的对象中6-12个月时GFAP细胞与所有细胞的比例的图表。图15G是显示按指示处理的对象中6-12个月时GFAP细胞中GFAP F强度的图表。还参见实施例文本的进一步描述。

[0050] 图16A-16E显示了zQ175小鼠中ZFP-D的分子和组织病理学桥接数据 (bridging data)。图16A显示了用ZFP-D或空白处理的对象的神经元中野生型和突变Htt的标准化mRNA表达。图16B为指定条件下野生型和突变Htt的HTT蛋白表达。图16C显示了处理后2-6个月(左)或6-12个月(右)时如所示处理的对象中核周包涵体的密度。图16D显示了处理后2-6个月(左)或6-12个月(右)时按指示处理的对象的ZFP+和NueN+神经元中的核包涵体。图16E显示了处理后2-6个月(左)或6-12个月(右)时按指示处理的对象的ZFP+和NueN+神经元中的EM48核强度。还参见实施例文本的进一步描述。

[0051] 图17A-17F显示了具有大于或等于6个CAG重复序列 (“ \geq CAG \times 6”) 的基因的人或小鼠基因组中的CAG重复序列含量分析。图17A显示了筛选0个错配/6聚体的结果。图17B显示了在1kb转录位点位点 (TSS) 内筛选0个错配的结果。图17C显示了筛选 \leq 3个错配/6聚体的结果。图17D显示了在1kb的TSS内筛选 \leq 3个错配的结果。图17E显示了具有0个错配的前100个基因(左)和具有 \leq 3个错配的前100个基因(右)的小鼠和人的比较。图17F显示了具有0个错配的前100个基因(左)和具有 \leq 3个错配的前100个基因(右)的小鼠和niyse的比较。还参见实施例文本的进一步描述。

具体实施方式

[0052] 本文公开了使用突变Htt等位基因ZFP遗传调节剂降低对象中毒性mHTT蛋白水平的组合物和方法。本文所述的遗传阻遏物在80倍剂量范围内选择性地阻遏 $>99\%$ 导致HD的等位基因,同时保留HD群体中存在的 $>86\%$ 的野生型等位基因的表达。同时,其他包含CAG的基因的表达受到最小影响,并且通过病毒递送的阻遏物在HD神经元培养超过100天和小鼠大脑中至少4个月的时间中具有活性且耐受良好。此外,本文所述的遗传阻遏物在多种接受的动物模型中导致HD分子、组织病理学、电生理学和表型校正。

[0053] 本文所述的方法和组合物在天然HTT基因座处提供了等位基因选择性转录阻遏。在源自患者的细胞中进行大量测试的结果表明,具有 ≥ 38 个CAG重复序列的mHTT等位基因的表达可被阻遏79-93%,而具有 ≤ 21 个CAG重复序列(测试的最长正常重复序列长度)的正常等位基因的表达仅被抑制0-31%。因此,等位基因选择性ZFP-TF展现出区分HD群体中100%的完全外显突变等位基因和至少86%的正常HTT等位基因的显著能力。相较于基于SNP的等位基因选择性mHTT降低方法,其各自限于HD患者的亚群(Pfister等(2009) *Cur Biol* 19(9):774-778;Southwell等(2014) *Mol Ther*

[0054] 22(12):2093-106),本研究所靶向CAG的ZFP阻遏物具有选择性下调大多数HD患者中致病等位基因表达的潜力。

[0055] 虽然非人灵长类纹状体可以耐受正常HTT表达的部分降低(约45%) (Grondin等(2012) *Brain* 135(4):1197-1209;McBride等(2011) *Mol Ther* 19:2152-2162;Stiles等(2012) *Exp Neurol* 233:463-471),但进一步降低的长期影响尚不清楚。HTT在多种生物学功能中起作用(Zuccato, 引用同上),包括胞内运输、能量、转录调节和自噬。在小鼠中,Htt基因敲除具有胚胎致死性(Duyao等(1995) *Science* 269:407-410;Zeitlin等(1995) *Nat Genet* 11:155-163;Nasir等(1995) *Cell* 81:811-823),并且围产期丧失(perinatal loss)导致运动功能障碍和其他神经病理学(Dragatsis等(2000) *Nat Genet* 26:300-306;Arteaga-Bracho等(2016) *Neurobiol Dis* 96:144-155),这表明了在神经系统发育中的重

要作用。虽然成年小鼠脑中的条件型敲除似乎是可以耐受的(Wang等(2016)Proc Natl Acad Sci USA 113:3359-3364),但是杂合亚效等位基因(hypomorphic)HTT变体已与雷特综合症(Rett Syndrome)样紊乱联系在一起(Lopes,F.,等(2016)J Med Genet 53:190-199;Rodan等(2016)Eur J Hum Genet 24:1833),这表明在人类中的关键作用。因此,降低与mHTT并存的正常HTT,特别是低于50%基线水平将带来未知的风险。因此,开发适合临床使用的等位基因选择性mHTT降低方法一直是长期目标。

[0056] 已经研究了多种靶向RNA的模式,以通过降解或翻译抑制来选择性下调mHTT转录本。例如,已经证明针对与mHTT等位基因关联的单核苷酸多态性(SNP)的基于ASO和RNAi的策略(Pfister等(2009)Cur Biol19(9):774-778;Lombardi等(2009)Exp Neurol 217:312-319;Carroll等(2011)Mol Ther.19(12):2178-85)选择性降低HD小鼠模型中的mHTT。这些方法临床开发的重大障碍是各种SNP特异性疗法只能治疗携带该特定SNP的患者亚群(Kay等(2015)Mol Ther 23:1759-1771)。或者,直接靶向CAG重复序列将原则上构成对所有HD患者的单一疗法。但是,针对CAG重复序列的基于ASO和RNAi的试剂迄今为止仅产生了中等水平的等位基因识别(Evers等(2011)PLoS One 6(9):e24308;Gagnon等(2010)Biochemistry 49:10166-10178;Hu等(2009)Nat Biotech 27:478-484;Yu等(2012)Cell 150:895-908;Fischer等(2011)Nuc Acids Res 39:5578-5585),这可能是由于对大量作用效应的普遍依赖来实现选择性。

[0057] 如本文所述,通过直接结合靠近启动子的扩增的CAG束来阻遏转录有效地降低了mHtt水平。不受任何理论的束缚,该方法通过利用功能协同效应(Lutz等(2000)Biochem Soc Trans 28:386-389)和协作性(Reiter等(2017)Curr Opin Genet Dev 43:73-81)的有时在转录调节中提供了更大程度的等位基因区分,并可以利用多种局部调控元件来设定转录本合成的水平。我们的方法提供了减少突变RNA水平的额外好处,所述突变RNA本身是潜在的致病因素(Marti(2016)Brain Pathol 26:779-786)。转录抑制也可以提供更有效的方法来实现完全切除mHTT,因为与各细胞结合成千上万个突变RNA或蛋白质物质的其他方法相比,该方法只需要识别治疗靶标的单一拷贝——内源性mHTT基因。在先前的研究中,靶向多聚CAG的设计的转录因子被试图用于进行等位基因选择性调节,尽管通过更简单且功能更弱的大量作用机制(Garriga-Canut等(2012)Proc Nat Acad Sci USA 109(45):e3136-45)。差异性阻遏仅在携带非病原性重复阵列过小的细胞中观察到,所述非病原性重复阵列过小以至于不能包含所检测试剂的单个靶标(CAG4 (SEQ ID NO:86))。此外,等位基因偏斜(allele skew)被急剧夸大(4个(SEQ ID NO:86)相对111个CAG (SEQ ID NO:87);长度比为28),并且是典型患者中存在的十倍以上(17个(SEQ ID NO:76)相对43个CAG (SEQ ID NO:77);长度比为2.5)。

[0058] 此外,使用还在全基因组范围内具有高度特异性的本文所述的等位基因选择性阻遏物(ZFP-B),我们在3种不同的HD小鼠模型中在7周至4个月之间的时间点证明了mHtt表达的稳健体内阻遏,并由此校正了分子、组织学、电生理学和表型病理。我们还在HD神经元中建立了>100天的持续ZFP表达和功效,并且挽救了R6/2和zQ175小鼠中MSN标志物基因表达,这表明在目标脑区域和人细胞类型中长期表达高效mHTT选择性ZFP良好耐受。

[0059] 在此,我们提出了靶向转录的方法,其在规模,测试的设计复杂性以及直接查询所需行为的筛选的使用方面不同于先前方法:在广泛的剂量范围内对内源性人基因进行等位

基因选择性阻遏。我们鉴定了一类新型具有功能协同作用的ZFP,其阻遏高度依赖于多聚CAG束长度。这些ZFP阻遏物高度区分>86%的HD患者正常和疾病等位基因的组合(Landwehrmeyer等(2017) Movement Disorders Clinical Practice 4:212-224),并展现出相较于其他CAG重复基因而言对mHTT的高度特异性。使用3种HD小鼠模型,我们证明了在分子、组织病理学、电生理学和功能终点方面的改进。最后,我们证明了等位基因选择性ZFP在给予小鼠纹状体后良好耐受性至少9个月,并且在多种HD病理模型中均有效。

[0060] 概述

[0061] 除非另有说明,本方法的实施以及本文所述组合物的制备与应用采用本领域技术范围内的分子生物学、生物化学、染色质结构与分析、计算化学、细胞培养、重组DNA与相关领域的常规技术。这些技术在文献中已有充分描述。参见例如,Sambrook等,《分子克隆:实验室手册》(MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL)第2版,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),1989以及第3版,2001;Ausubel等,《新编分子生物学实验指南》(CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY),约翰韦利父子公司(John Wiley&Sons),纽约,1987及定期更新;《酶学方法》(METHODS IN ENZYMOLOGY)丛书,学术出版社(Academic Press),圣迭戈;Wolffe,《染色质结构与功能》(CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION),第3版,学术出版社,圣迭戈,1998;《酶学方法》(METHODS IN ENZYMOLOGY),第304卷,“染色质(Chromatin)”(P.M.Wassarman和A.P.Wolffe编),学术出版社,圣迭戈,1999;和《分子生物学方法》(METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY),第119卷,“染色质方案(Chromatin Protocols)”(P.B.Becker编),休玛纳出版社(Humana Press),托托瓦,1999。

[0062] 定义

[0063] 术语“核酸”,“多核苷酸”和“寡核苷酸”互换使用并指脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物,可以是直链或环状构型的,是单链或双链形式的。出于本公开目的,这些术语不意在限制聚合物的长度。所述术语可涵盖天然核苷酸的已知类似物,以及在碱基、糖和/或磷酸部分(例如,硫逐磷酸酯主链)经修饰的核苷酸。一般而言,具体核苷酸的类似物具有相同的碱基配对特异性;即,A的类似物将与T碱基配对。

[0064] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指氨基酸残基的聚合物。该术语还应用于其中一种或多种氨基酸是对应的天然产生的氨基酸的化学类似物或经修饰的衍生物的氨基酸聚合物。

[0065] “结合”指大分子之间(例如蛋白质与核酸之间)的序列特异性、非共价相互作用。只要相互作用作为整体为序列特异性的,则不要求结合相互作用的所有组分都是序列特异性的(例如,与DNA主链中的磷酸残基接触)。这样的相互作用通常表征为解离常数(K_d)是 $10^{-6}M^{-1}$ 或更低。“亲和力”指结合强度:增加的结合亲和力与较低的 K_d 关联。

[0066] 锌指“DNA结合蛋白”(或结合结构域)是能以序列特异性方式通过一个或多个锌指结合DNA的蛋白质或较大蛋白质内的结构域,锌指是通过锌离子配位稳定其结构的结合结构域内氨基酸序列的区域。术语锌指DNA结合蛋白常缩写为锌指蛋白或ZFP。人工核酸酶和转录因子可以包括ZFP DNA结合结构域和功能性结构域和功能性结构域(ZFN的核酸酶结构域或ZFP-TF的转录调控结构域)。术语“锌指核酸酶”包括一个ZFN以及一对ZFN(包括称为左和右ZFN的第一和第二ZFN),其二聚化以切割靶基因。

[0067] 锌指结合结构域可经“工程改造”,以结合预定的核苷酸序列,例如,通过对天然产

生的锌指的识别螺旋区的工程改造(改变一个或多个氨基酸)。因此,工程改造的DNA结合蛋白(锌指)是非天然产生的蛋白质。用于工程改造DNA结合蛋白的方法的非限制性示例是设计和选择。经设计的DNA结合蛋白是非天然产生的蛋白质,其设计/组成主要来自于合理标准。设计的合理标准包括应用替代法则和计算机算法来处理现有ZFP设计和结合数据的数据库存储信息中的信息。参见例如,美国专利号6,140,081;6,453,242;6,534,261;和8,585,526;还参见国际专利公开号WO 98/53058;WO 98/53059;WO 98/53060;WO 02/016536;和WO 03/016496。

[0068] “选择的”锌指蛋白是不存在于自然界中的蛋白质,其产生的结果主要来自经验过程,例如噬菌体展示、相互作用阱或杂交体选择。参见例如,美国专利号5,789,538;5,925,523;6,007,988;6,013,453;6,200,759;8,586,526;和国际专利公开号WO 95/19431;WO 96/06166;WO 98/53057;WO 98/54311;WO 00/27878;WO 01/60970;WO 01/88197;和WO 02/099084。

[0069] “TtAgo”是原核阿尔古(Argonaute)蛋白质,认为其参与基因沉默。TtAgo源自嗜热细菌(*Thermus thermophilus*)。参见例如,Swarts等(2014) *Nature* 507 (7491):258-261; G. Sheng等(2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111:652)。“TtAgo系统”是所需的全部组分,其包括例如用于被TtAgo酶切割的向导DNA。

[0070] “重组”表示两种多核苷酸之间交换遗传信息的过程,包括但不限于通过非同源末端连接(NHEJ)和同源性重组的供体捕获。就本公开的目的而言,“同源重组(HR)”指发生这种交换的特定形式,例如在修复细胞内双链断裂期间通过同源定向修复机制发生。该过程要求核苷酸序列同源性,利用“供体”分子模板修复“靶”分子(即,经历双链断裂的分子),该过程也称作“非交叉基因转化”或“短道基因转化”,因为其导致遗传信息从供体向靶转移。不希望受限于任何特定理论,这种转移可以涉及断裂的靶与供体间形成的异双链体DNA的错配修正,和/或采用供体再合成将成为部分靶的遗传信息的“合成依赖性链退火”,和/或相关过程。这种专门的HR通常导致靶分子序列的改变,从而供体多核苷酸的部分或全部序列被纳入靶多核苷酸中。

[0071] 在本公开的方法中,本文所述的一种或多种靶向的核酸酶在靶序列(例如,细胞染色质)中预定位点(例如,细胞染色质)处产生双链断裂(DSB)。DSB可以通过同源定向修复或通过非同源定向修复机制导致缺失和/或插入。缺失可以包括任何数量的碱基对。相似地,插入可以包括任何数量的碱基对,包括例如,整合“供体”多核苷酸,任选地,与断裂区域中的核苷酸序列具有同源性。供体序列可被物理整合(physically integrated),或者,供体多核苷酸被用作模板用于通过同源重组进行的断裂修复,导致将供体中的全部或部分核苷酸序列引入细胞染色质。因此,细胞染色质中的第一序列可改变,并且在某些实施方式中,可转化成供体多核苷酸中存在的序列。因此,使用术语“替换”或“置换”可理解为表示一种核苷酸序列被另一种核苷酸序列替换(即,信息意义上序列的替换),而不一定要求一种多核苷酸被另一种多核苷酸物理或化学替换。

[0072] 本文所述的任意方法可用于通过能破坏感兴趣基因表达的供体序列的靶向整合来插入任何大小的供体和/或使细胞中的一种或多种靶序列部分或完全失活。还提供具有部分或完全失活基因的细胞系。

[0073] 在本文所述的任何方法中,外源性核苷酸序列(“供体序列”或“转基因”)可包含与

感兴趣区域中的基因组序列同源但不相同的序列,由此刺激同源重组以在感兴趣区域插入非相同序列。因此,在某些实施方式中,供体序列中与感兴趣区域序列同源的部分呈现与待替换的基因组序列有约80-99% (或其间任意整数) 的序列相同性。在其它实施方式中,供体和基因组序列间的同源性超过99%,例如,超过100个连续碱基对的基因组序列与供体之间相差仅1个核苷酸。在某些情况中,供体序列的非同源部分可包含不存在于感兴趣区域的序列,从而将新序列引入感兴趣区域。在这些情况中,非同源序列一般侧接50-1,000个碱基对 (或其间的任何整数值) 或大于1,000的任何数量个碱基对的序列,其与感兴趣区域中的序列同源或相同。在其它实施方式中,供体序列与第一序列非同源,并且通过非同源重组机制插入基因组。

[0074] “切割”指DNA分子共价主链的断裂。切割可以由多种方法引发,包括但不限于,磷酸二酯键的酶促或化学水解。单链切割和双链切割均可采用,并且双链切割可由不同的单链切割事件所致。DNA切割可导致产生钝端或交错末端。在某些实施方式中,将融合多肽用于靶向双链DNA切割。

[0075] “切割半结构域”是能与第二多肽 (两者相同或不同) 形成具有切割活性 (优选双链切割活性) 的复合物的多肽序列。术语“第一和第二切割半结构域”、“+和-切割半结构域”和“右和左切割半结构域”可互换使用,指二聚化的切割半结构域的对。

[0076] “工程改造的切割半结构域”是经修饰以与另一切割半结构域 (例如,另一工程改造的切割半结构域) 形成专性异二聚体的切割半结构域。还参见美国专利号8,623,618;7,888,121;7,914,796;和8,034,598,通过引用其全部内容纳入本文。

[0077] 术语“序列”指任意长度的核苷酸序列,可以是DNA或RNA;可以是直链、环状或支链且可以是单链或双链。术语“供体序列”指插入基因组的核苷酸序列。供体序列可以是任意长度,例如长度为2-100,000,000个核苷酸 (或其间或其上的任意整数值),优选长度为约100-100,000个核苷酸 (或其间的任意整数),更优选长度为约2000-20,000个核苷酸 (或其间的任意值),甚至更优选长度为约5-15kb (或其间的任意值)。

[0078] “染色质”是包含细胞基因组的核蛋白结构。细胞染色质包含核酸和蛋白,核酸主要为DNA,蛋白包括组蛋白和非组蛋白染色体蛋白。真核细胞染色质主要以核小体形式存在,其中核小体核心包含约150碱基对的DNA与八聚体关联,所述八聚体包含组蛋白H2A、H2B、H3和H4各两份;以及在核小体核心之间延伸的接头DNA (长度根据生物体而各有不同)。组蛋白H1分子通常与接头DNA关联。就本公开的目的而言,术语“染色质”意在涵盖所有类型的细胞核蛋白,包括原核与真核的。细胞染色质包括染色体和附加体染色质。

[0079] “染色体”是包含细胞的全部或部分基因组的染色质复合物。细胞基因组通常由其核型表征,其为包含该细胞基因组的全部染色体的集合。细胞基因组可包含一条或多条染色体。

[0080] “附加体”是复制的核酸、核蛋白复合物或其它包含并非细胞染色体核型部分的核酸的结构。附加体的示例包括质粒和某些病毒基因组。

[0081] “可及区域”是细胞染色质中这样的位点,其中核酸中存在的靶位点可以通过识别靶位点的外源性分子结合。不希望受任何特定理论的束缚,据信可及区域是未被包装进入核小体结构中的区域。通常可以通过其对化学和酶促探针例如核酸酶的敏感性检测可及区域的不同结构。

[0082] “靶位点”或“靶序列”是限定结合分子将结合的核酸部分的核酸序列,前提是存在结合的充分条件。靶位点可以是任何长度,例如,9 -20或更多个核苷酸和长度,并且结合的核苷酸可以是连续的或非连续的。

[0083] “外源性”分子是通常不存在于细胞内的分子,但可通过一种或多种遗传、生化或其它方法导入细胞。“正常存在于细胞中”相对于细胞的具体发育阶段和环境条件确定。因此,例如,仅在肌肉的胚胎发育期间存在的分子对于成体肌肉细胞是外源性分子。类似地,相对于非热激的细胞,通过热激诱导的分子是外源性分子。例如,外源性分子可以包括功能失常的内源性分子的功能性形式或者正常功能的内源性分子的功能失常形式。

[0084] “融合”分子是其中两个或更多个亚基分子相连(优选共价相连)的分子。亚基分子可以是相同化学类型的分子,也可以是不同化学类型的分子。第一类型的融合分子的示例可包括但不限于,融合蛋白(例如,ZFP或TALE DNA结合结构域与一种或多种活化结构域之间的融合)和融合核酸(例如,编码上文所述的融合蛋白的核酸)。第二类融合分子的示例包括但不限于:形成三链体的核酸与多肽之间的融合体,以及小沟结合子与核酸之间的融合体。

[0085] 细胞内融合蛋白的表达可由融合蛋白递送入细胞造成或通过向细胞递送编码融合蛋白的多核苷酸而引起,其中所述多核苷酸被转录,转录本经翻译产生所述融合蛋白。细胞中蛋白质的表达也可涉及反式剪接、多肽切割和多肽连接。用于将多核苷酸和多肽递送至细胞的方法在本公开内容中的他处呈现。

[0086] 就本公开的目的而言,“基因”包括编码基因产物(见前文)的DNA区域,以及调节基因产物生成的DNA区域,不论这类调节序列是否毗邻编码和/或转录序列。因此,基因包括但不限于,启动子序列、终止子、翻译调节序列,例如核糖体结合位点和内部核糖体进入位点、增强子、沉默子、绝缘子、边界元件、复制起点、基质连接位点和基因座控制区域。

[0087] “基因表达”指将基因所含信息转化成基因产物。基因产物可以是基因的直接转录产物(例如,mRNA、tRNA、rRNA、反义RNA、核糖酶、结构RNA或任何其它类型的RNA)或通过mRNA翻译产生的蛋白质。基因产物还包括经修饰的RNA,通过如下加工修饰,例如加帽、聚腺苷酸化、甲基化,和编辑,以及通过如下加工修饰的蛋白质,例如,甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化、ADP-核糖基化、豆蔻酰化和糖基化。

[0088] 基因表达的“调控”指基因活性的改变。表达的调控可包括但不限于,基因活化和基因阻遏。基因组编辑(例如,切割,改变,失活,随机突变)可以用于调控表达。基因调节剂指相较于不包含本文所述ZFP基因调节剂的细胞,基因表达的任何改变。因此,基因失活可以是部分或完全的。

[0089] “感兴趣的区域”是需要结合外源性分子的细胞染色质的任意区域,例如,基因或者基因内或与之毗邻的非编码序列。结合可以是出于靶向DNA切割和/或靶向重组的目的。感兴趣区域可以存在于例如染色体,附加体,细胞器基因组(例如,线粒体、叶绿体),或感染性病毒基因组中。感兴趣的区域可处于基因的编码区中,转录的非编码区域例如前导序列、尾随序列或内含子中,或非转录区域中编码区的上游或下游。感兴趣的区域可如单一核苷酸对一样小,或长达2,000个核苷酸对,或任意整数值的核苷酸对。

[0090] “真核”细胞包括但不限于,真菌细胞(例如酵母)、植物细胞、动物细胞、哺乳动物细胞和人细胞(例如,B细胞),包括干细胞(多能和多潜能)。

[0091] 涉及两个或更多个组分(例如序列元件)的并置,所述组分设置成组分都可正常发挥作用并允许组分中至少一种能介导施加于至少一种其它组分上的作用时,术语“操作性相连”和“操作性连接的”(或“操作地连接”)互换使用。例如,若转录调节序列控制编码序列响应一种或多种转录调节因子存在与否时的转录水平,则所述转录调节序列如启动子与所述编码序列操作性连接。转录调节序列一般与编码序列以顺式操作性地连接,但无需紧邻该序列。例如,增强子是操作性地连接编码序列的转录调节序列,尽管它们是不连续的。

[0092] 对于融合多肽,术语“操作性连接”可指各组分在与其它组分的连接中所发挥的功能与其在未连接时的功能相同。例如,对于其中ZFP DNA结合结构域与转录阻遏结构域融合或以其他方式关联的融合分子,如果在所述融合分子中,所述ZFP DNA结合结构域部分能够结合其靶位点和/或其结合位点,同时激活结构域能够上调基因表达,那么所述DNA结合结构域和阻遏结构域是操作性连接的。在其中ZFP DNA结合结构域与切割结构域融合的融合多肽的情况中,如果在所述融合多肽中,所述ZFP DNA结合结构域部分能结合其靶位点和/或其结合位点,同时切割结构域能切割靶位点附近的DNA,那么所述ZFP DNA结合结构域和切割结构域是操作性连接的。

[0093] 蛋白质、多肽或核酸的“功能性片段(或功能片段)”是序列与全长蛋白质、多肽或核酸不相同但保留全长蛋白质、多肽或核酸的相同功能的蛋白质、多肽或核酸。功能性片段可具有比相应的天然分子更多、更少或相同数量的残基,和/或可含有1个或多个氨基酸或核苷酸取代。用于确定核酸功能(例如,编码功能、与另一核酸杂交的能力)的方法是本领域熟知的。类似地,用于确定蛋白质功能的方法也是为本领域熟知的。例如,可测定多肽的DNA结合功能,例如通过滤膜结合、电泳迁移率改变或免疫沉淀试验。DNA切割可通过凝胶电泳分析。参见Ausubel等,同上。可测定蛋白质与另一蛋白质相互作用的能力,例如,通过共免疫沉淀、双杂交试验或互补分析,既可以是遗传的也可以是生化的。参见例如,Fields,等(1989)Nature 340:245-246;美国专利号5,585,245和国际专利公开号WO 98/44350。

[0094] “载体”能将基因序列转移至靶细胞。“载体构建体”、“表达载体”和“基因转移载体”通常指能指导感兴趣基因表达并能将基因序列转移至靶细胞的核酸构建体。因此,该术语包括克隆和表达载体,以及整合载体。

[0095] 术语“对象”和“患者”可以互换使用,并且表示哺乳动物例如人类患者和非人类灵长类,以及实验室动物例如兔、狗、猫、大鼠、小鼠和其他动物。因此,本文所用术语“对象”或“患者”表示可给予本发明核酸酶、供体和/或遗传修饰的细胞的任何哺乳动物患者或对象。本没法的对象包括患有疾病的那些。

[0096] 锌指DNA结合结构域

[0097] 本文描述了包含结合Htt基因的锌指蛋白的DNA结合结构域。参见例如,美国专利号8,841,260。

[0098] 与天然产生的锌指蛋白相比,经工程改造的锌指结合结构域可具有新结合特异性。工程改造方法包括但不限于合理设计和不同选择类型。例如,合理设计包括利用包含三体(或四体)核苷酸序列和单独锌指氨基酸序列的数据库,其中各三体或四体核苷酸序列与一种或多种结合该特定三体或四体序列的锌指氨基酸序列相关联。参见例如,共同拥有的美国专利号6,453,242和6,534,261,通过引用其全文的方式纳入本文。

[0099] 示例性选择方法包括噬菌体展示和双杂交系统,公开于美国专利号5,789,538、5,

925,523,6,007,988,6,013,453,6,410,248,6,140,466,6,200,759和6,242,568,以及国际专利公开号WO 98/37186、WO 98/53057、WO 00/27878和WO 01/88197,以及GB 2,338,237。此外,已经在例如共同拥有的国际专利公开号WO 02/077227中描述了对锌指结合结构域的结合特异性的增强。

[0100] 此外,如这些及其它参考文献中所公开的,锌指结构域和/或多指的锌指蛋白可利用任何合适的接头序列连接在一起,包括例如长度为5个或更多个氨基酸的接头。长度为6或更多个氨基酸的示例性接头序列还参见例如美国专利号6,479,626、6,903,185和7,153,949。本文所述的蛋白质可包括蛋白质的个体锌指之间的合适接头的任何组合。此外,已经在例如共同拥有的国际专利公开号WO 02/077227中描述了对锌指结合结构域的结合特异性的增强。

[0101] 靶位点选择;用于设计和构建融合蛋白(及其编码多核苷酸)的ZFP和方法是本领域技术人员已知的,并且详细描述于美国专利号6,140,0815;789,538;6,453,242;6,534,261;5,925,523;6,007,988;6,013,453;6,200,759;国际专利公开号WO 95/19431;WO 96/06166;WO 98/53057;WO 98/54311;WO 00/27878;WO 01/60970;WO 01/88197;WO 02/099084;WO 98/53058;WO 98/53059;WO 98/53060;WO 02/016536;和WO 03/016496。

[0102] 此外,如这些及其它参考文献中所公开的,锌指结构域和/或多指的锌指蛋白可利用任何合适的接头序列连接在一起,包括例如长度为5个或更多个氨基酸的接头。长度为6或更多个氨基酸的示例性接头序列还参见例如美国专利号6,479,626、6,903,185和7,153,949。本文所述的蛋白质可包括蛋白质的个体锌指之间的合适接头的任何组合。

[0103] 在某些实施方式中,DNA结合结构域是经工程改造的锌指蛋白,其(以序列特异性方式)结合Htt基因中的靶位点并调节Htt的表达。ZFP可以选择性地结合突变Htt等位基因或野生型Htt序列。Htt靶位点通常包括至少一个锌指,但是可以包括多个锌指(例如,2、3、4、5、6或更多个指)。ZFP通常包括至少三个指。某些ZFP包括4、5或6个指,而一些ZFP包括8、9、10、11或12个指。包括三个指的ZFP通常识别包括9或10个核苷酸的靶位点;包括四个指的ZFP通常识别包括12-14个核苷酸的靶位点;而具有六个指的ZFP能识别包括18-21个核苷酸的靶位点。ZFP也可以是包括一个或多个调控结构域的融合蛋白,所述结构域可以是转录活化或阻遏结构域。在一些实施方式中,融合蛋白包含连接在一起的ZFP DN结合结构域。因此,这些锌指可以包含8、9、10、11、12或更多个指。在一些实施方式中,两个DNA结合结构域通过可延伸的柔性接头连接,因而一个DNA结合结构域包含4、5或6个锌指,而第二个DNA结合结构域包含4、5或5个锌指。在一些实施方式中,接头是标准指间(inter-finger)接头,因此该指阵列包括一个DNA结合结构域,其含有8、9、10、11或12或更多个指。在其他实施方式中,接头是非典型接头,如柔性接头。DNA结合结构域与至少一个调控结构域融合,并且可以被认为是“ZFP-ZFP-TF”架构。这些实施方式的特定示例可以称为“ZFP-ZFP-KOX”和“ZFP-KOX-ZFP-KOX”,所述“ZFP-ZFP-KOX”包含与柔性接头连接并与KOX抑制剂融合的两个DNA结合结构域,和所述“ZFP-KOX-ZFP-KOX”中两个ZFP-KOX融合蛋白通过接头融合在一起。

[0104] 或者,DNA结合结构域可衍生自核酸酶。例如,寻靶内切核酸酶和兆核酸酶的识别序列例如I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII和I-TevIII是已知的。还参见美国专利第5,420,032号;美国专利第6,833,252号;Belfort等(1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388;Dujon等

(1989) *Gene* 82:115-118; Perler等(1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 1125-1127; Jasin (1996) *Trends Genet.* 12:224-228; Gimble等(1996) *J. Mol. Biol.* 263:163-180; Argast等(1998) *J. Mol. Biol.* 280:345-353和新英格兰生物实验室公司(New England Biolabs)产品目录。此外,归巢内切核酸酶和兆核酸酶的DNA结合特异性可被工程改造以结合非天然靶位点。参见例如Chevalier等(2002) *Molec. Cell* 10:895-905; Epinat等(2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2952-2962; Ashworth等(2006) *Nature* 441:656-659; Paques等(2007) *Current Gene Therapy* 7:49-66; 美国专利公开号2007/0117128。

[0105] “双手(Two handed)”锌指蛋白是这样的蛋白质,其中两簇锌指DNA结合结构域通过介于中间的氨基酸分隔,从而使两个锌指结构域与两个不连续的靶位点结合。双手类型的锌指结合蛋白的示例是SIP1,其中四个锌指的簇位于蛋白质的氨基末端,而三个锌指的簇位于羧基末端(参见,Remacle等(1999) *EMBO Journal* 18(18):5073-5084)。这些蛋白质中锌指的各个簇能够结合独特的靶序列,并且两个靶序列之间的间隔可以囊括许多核苷酸。双手ZFP可以包括功能结构域,例如,与一个或两个ZFP融合。因此,将显而易见的是,功能结构域可以连接至一个或两个ZFP的外部,或者可以位于ZFP之间(连接两个ZFP)。

[0106] 融合蛋白

[0107] 还提供这样的融合蛋白,其包含本文所述的DNA结合蛋白(例如,ZFP)和异源性调控(功能)结构域(或其功能性片段)。常见结构域包括,例如,转录因子结构域(活化剂,阻遏物,共活化剂,共阻遏物),沉默子,癌基因(例如,myc、jun、fos、myb、max、mad、rel、ets、bcl、myb、mos家族成员等);DNA修复酶及其相关因子和修饰物;DNA重排酶及其相关因子和修饰物;染色质相关蛋白质及其修饰物(例如,激酶、乙酰酶和脱乙酰酶);和DNA修饰酶(例如,甲基转移酶、拓扑异构酶、解旋酶、连接酶、激酶、磷酸酶、聚合酶、核酸内切酶)及其相关因子和修饰物。有关DNA结合结构域和核酸酶切割结构域的融合的信息,参见美国专利申请公开号2005/0064474;2006/0188987和2007/0218528,通过引用其全部内容纳入本文。

[0108] 用于实现活化的合适结构域包括HSV VP16活化结构域(参见例如,Hagmann等(1997) *J. Virol.* 71:5952-5962),核激素受体(参见例如,Torchia等(1998) *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:373-383);核因子 κ B的p65亚基(Bitko和Barik(1998) *J. Virol.* 72:5610-5618和Doyle和Hunt(1997) *Neuroreport* 8:2937-2942);Liu等(1998) *Cancer Gene Ther.* 5:3-28),或人工嵌合功能结构域,如VP64(Beerli等(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14623-33),和降解决定子(degron)(Molinari等(1999) *EMBO J.* 18:6439-6447)。其它示例性活化结构域包括,Oct 1、Oct-2A、Sp1、AP-2和CTF1(Seipel等(1992) *EMBO J.* 11:4961-4968以及p300、CBP、PCAF、SRC1、PvALF、AtHD2A和ERF-2)。参见例如Robyr等(2000) *Mol. Endocrinol.* 14:329-347;Collingwood等(1999) *J. Mol. Endocrinol.* 23:255-275;Leo等(2000) *Gene* 245:1-11;Manteuffel-Cymborowska(1999) *Acta Biochim. Pol.* 46:77-89;McKenna等(1999) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69:3-12;Malik等(2000) *Trends Biochem. Sci.* 25:277-283;和Lemon等(1999) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9:499-504。其它示例性活化结构域包括但不限于,0sGAI,HALF-1,C1,AP1,ARF-5,-6,-7和-8,CPRF1,CPRF4,MYC-RP/GP,和TRAB1。参见例如,Ogawa等.(2000) *Gene* 245:21-29;Okanami等.(1996) *Genes Cells* 1:87-99;Goff等.(1991) *Genes Dev.* 5:298-309;Cho等.(1999) *Plant Mol. Biol.* 40:419-429;Ulmason等.(1999)

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96:5844-5849;Sprenger-Haussels等.(2000)Plant J.22:1-8;Gong等.(1999)Plant Mol.Biol.41:33-44;和Hobo等.(1999)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96:15,348-15,353。

[0109] 本领域技术人员应明了,在DNA结合结构域与功能结构域之间的融合蛋白(或编码相同内容的核酸)的形成中,活化结构域或与活化结构域相互作用的分子适于作为功能结构域。基本上,能够招募活化复合物和/或活化活性(例如,组蛋白乙酰化)至靶基因的任何分子均可用作融合蛋白的活化结构域。适用作融合分子中的功能结构域的绝缘子结构域、定位结构域和染色质重构蛋白(如含ISWI的结构域和/或甲基结合结构域的蛋白质)描述于,例如,共有的美国专利公开号2002/0115215和2003/0082552中,以及共有的国际专利公开号W0 02/44376中。

[0110] 示例性的阻遏结构域包括但不限于,KRAB A/B,KOX,TGF- β -诱导型早期基因(TIEG),v-erbA,SID,MBD2,MBD3,DNMT家族成员(例如,DNMT1,DNMT3A,DNMT3B),Rb和MeCP2。参见例如,Bird等.(1999)Cell 99:451-454;Tyler等.(1999)Cell 99:443-446;Knoepfler等.(1999)Cell99:447-450;和Robertson等.(2000)Nature Genet.25:338-342。其它示例性阻遏结构域包括但不限于ROM2和AtHD2A。参见例如,Chem等.(1996)Plant Cell18:305-321;和Wu等.(2000)Plant J.22:19-27。

[0111] 通过本领域技术人员熟知的克隆和生物化学偶联方法构建融合分子。融合分子包括DNA结合结构域和功能结构域(例如,转录激活或阻遏结构域)。融合分子还任选地包含核定位信号(例如,来自SV40介质T-抗原)和表位标签(例如,FLAG和血细胞凝集素)。设计融合蛋白(及其编码核酸),从而翻译阅读框保留于融合体的组分间。

[0112] 一方面,功能结构域(或其功能性片段)多肽组分与另一方面非蛋白质DNA结合结构域(例如,抗生素、嵌入剂、小沟结合剂、核酸)之间的融合通过本领域技术人员已知的生物化学偶联法构建。参见例如,皮尔斯化学公司(Pierce Chemical Compan)(伊利诺伊州罗克福德)产品目录。已描述用于生成小沟结合剂与多肽之间的融合的方法和组合物。Mapp等.(2000)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:3930-3935。

[0113] 在某些实施方式中,通过DNA结合结构域结合的靶位点存在于细胞染色质的可及区域中。可及区域可按例如共有的国际专利公开号W0 01/83732中所述确定。如果靶位点不存在于细胞染色质的可及区域中,则可按共有的国际专利公开号W0 01/83793所述产生一个或多个可及区域。在其它实施方式中,融合分子的DNA结合结构域能够结合至细胞染色质,无论其靶位点是否位于可及区域中。例如,所述DNA结合结构域能够结合至接头DNA和/或核小体DNA。这类“先锋(pioneer)”DNA结合结构域的示例存在于某些类固醇受体中和肝细胞核因子3(HNF3)中。Cordingley等(1987)Cell148:261-270;Pina等(1990)Cell 60:719-731;和Cirillo等(1998)EMBO J.17:244-254。

[0114] 融合分子可用药理学上可接受的载体/载剂配制,如本领域技术人员已知。参见例如,《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences),第17版,1985;和共有的国际专利公开号W0 00/42219。

[0115] 融合分子的功能性组分/结构域可选自任何多种不同的组分,一旦该融合分子通过其DNA结合结构域结合至靶序列,所述组分即能影响基因转录。因此,功能性组分可包括但不限于,各种转录因子结构域,例如活化物、阻遏物、共活化物、共阻遏物,和沉默子。

[0116] 例如,共有的美国专利号,534,261和美国专利公开号2002/0160940中公开了其它示例性功能结构域。

[0117] 还可选择通过外源性小分子或配体调节的功能结构域。例如,可使用 **RheoSwitch®** 技术,其中功能结构域仅在外部RheoChem™配体存在时才呈现其活性构象(例如,参见美国专利公开号2009/0136465)。因此,可将ZFP操作性地连接至可调节的功能结构域,其中所得ZFP-TF的活性由外部配体控制。

[0118] 递送

[0119] 核酸酶,编码这些核酸酶的多核苷酸,供体多核苷酸和包含本文所述的蛋白质和/或多核苷酸的组合物可以通过任何合适的方式递送。某些实施方式中,体内递送核酸酶和/或供体。在其他实施方式中,将核酸酶和/或供体递送至分离的细胞(例如,自体同源或异源性干细胞),用于提供能够用于离体递送至患者的修饰细胞。

[0120] 递送含本文所述核酸酶的方法述于,例如,美国专利号6,453,242;6,503,717;6,534,261;6,599,692;6,607,882;6,689,558;6,824,978;6,933,113;6,979,539;7,013,219和7,163,824,其全部公开内容通过引用其全文的方式纳入本文。

[0121] 还可以使用任何核酸递送机制递送本文所述核酸酶和/或供体构建体,包括裸DNA和/或RNA(例如,mRNA)和载体,其包含编码一种或多种所述组件的序列。可采用任何载体系统,包括但不限于,质粒载体、DNA小环、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及其组合。还参见例如,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;和美国专利公开号2014/0335063,其通过引用其全文的方式纳入本文。此外,显而易见的是,这些系统中的任一种系统可以包含治疗所需的一种或多种序列。因此,在将一种或多种核酸酶和供体构建体导入细胞时,核酸酶和/或供体多核苷酸可以被相同的递送系统或不同的递送机制携带。当使用多个系统时,各递送机制可以包含编码一种或多宗核酸酶和/或供体构建体的序列(例如,编码一种或多种核酸酶的mRNA和/或携带一种或多种供体构建体的AAV或mRNA)。

[0122] 可采用常规的基于病毒和非病毒的转基因方法来将编码核酸酶或供体构建体的核酸导入细胞(例如,哺乳动物细胞)和靶组织中。非病毒载体递送系统包括DNA质粒、DNA小环,裸核酸以及与递送载剂(诸如脂质体或泊洛沙姆(poloxamer))复合的核酸。病毒载体递送系统包括DNA和RNA病毒,其在递送至细胞后具有附加型或整合的基因组。基因治疗操作的综述见于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(1995) *Current Topics in Microbiology and Immunology* Doerfler和Böhm(编);和Yu等(1994) *Gene Therapy* 1:13-26。

[0123] 核酸的非病毒递送方法包括电穿孔、脂质转染、显微注射、基因枪、病毒颗粒、脂质体、免疫脂质体、聚阳离子或脂质:核酸偶联物、脂质纳米颗粒(LNP)、裸DNA、裸RNA、加帽RNA、人工病毒粒和试剂增强型DNA摄取。利用例如Sonitron 2000系统(Rich-Mar)的声孔效应也可用于递送核酸。

[0124] 其它示例性的核酸递送系统包括Amaya生物系统公司(德国科隆)、迈克赛特公司(Maxcyte, Inc.) (马里兰州罗克韦尔)、BTX分子递送系统公司(马萨诸塞州霍利斯顿)和哥白尼治疗公司(Copernicus Therapeutics Inc.) (参见例如美国专利号6,008,336)提供的那些。脂质转染描述于例如,美国专利号5,049,386、4,946,787和4,897,355,并且脂质转染试剂市售可得(例如,TransfectamTM和LipofectinTM)。适于多核苷酸的高效受体-识别脂质转染的阳离子和中性脂质包括Felgner、国际专利公开号W0 91/17424,W0 91/16024的那些。在一些方面中,核酸酶以mRNA递送,而转基因通过其他方式递送,诸如病毒载体,小环DNA,质粒DNA,单链DNA,线性DNA,脂质体,纳米颗粒等。

[0125] 脂质:核酸复合物(包括靶向的脂质体,例如免疫脂质复合物)的制备是本领域技术人员熟知的(参见例如,Crystal (1995) Science 270:404-410; Blaese等 (1995) Cancer Gene Ther. 2:291-297; Behr等 (1994) Bioconjugate Chem. 5:382-389; Remy等 (1994) Bioconjugate Chem. 5:647-654; Gao等 (1995) Gene Therapy 2:710-722; Ahmad等 (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)。

[0126] 递送的其它方法包括将待被递送的核酸包装到EnGeneIC递送载体(EDV)中。采用双特异性抗体将这些EDV被特异性递送至靶组织,其中,所述抗体的一个臂对靶组织具有特异性,而另一个臂对EDV具有特异性。抗体将EDV带至靶细胞表面,然后EDV通过内吞作用进入细胞。一旦进入细胞,内容物即被释放(参见MacDiarmid等(2009) Nature Biotechnology 27(7):643)。

[0127] 使用基于RNA或DNA病毒的系统递送编码经工程改造的CRISPR/Cas系统的核酸利用高度演化的过程来将病毒靶向身体中特定的细胞并且将该病毒负载物(payload)运输至核。病毒载体可直接给予对象(体内),或其可用于体外处理细胞,并将经修饰的细胞给予对象(离体)。用于CRISPR/Cas系统的常规的基于病毒的系统包括但不限于,用于基因传递的逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关、牛痘和单纯性疱疹病毒载体。宿主基因组中的整合可采用逆转录病毒、慢病毒和腺相关病毒基因传递方法进行,通常导致插入的转基因的长期表达。此外,已在许多不同的细胞类型和靶组织中观察到了高转导功效。

[0128] 逆转录病毒的趋性可通过引入外来包膜蛋白、扩大靶细胞的潜在靶群体来改变。慢病毒载体是能够转导或感染非分裂细胞的逆转录病毒载体,并且通常产生高病毒效价。逆转录病毒转基因系统的选择取决于靶组织。逆转录病毒载体包含顺式作用的长末端重复,其具有包装长达6-10kb的外来序列的能力。最小的顺式作用LTR足以用于载体的复制和包装,其随后用于将治疗基因整合进入靶细胞,以提供永久的转基因表达。广泛应用的逆转录病毒载体包括基于鼠白血病病毒(MuLV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、类人猿免疫缺陷型病毒(SIV)、人类免疫缺陷型病毒(HIV),及其组合的那些(参见例如,Buchscher等(1992) J. Virol. 66:2731-2739; Johann等(1992) J. Virol. 66:1635-1640; Sommerfelt等(1990) Virol. 176:58-59; Wilson等(1989) J. Virol. 63:2374-2378; Miller等(1991) J. Virol. 65:2220-2224; 国际专利公开号W0 1994/026877)。

[0129] 在其中优选瞬时表达的应用中,可采用基于腺病毒的系统。基于腺病毒的载体能够在许多细胞类型中获得极高的转导效率,并且不需要细胞分裂。采用这种载体,已获得了高效价和高水平的表达。该载体可在相对简单的系统中大量产生。腺相关病毒("AAV")载体

也用于用靶核酸转导细胞,例如,用于核酸和肽的体外生成,以及用于体内和离体基因治疗法(参见例如,West等,Virology 160:38-47;美国专利号4,797,368;国际专利公开号W0 93/24641;Kotin(1994) Human Gene Therapy 5:793-801;Muzyczka(1994) J.Clin.Invest.94:1351。重组AAV载体的构建描述于多个公开文本中,包括美国专利号5,173,414;Tratschin等(1985) Mol.Cell.Biol.5:3251-3260;Tratschin等(1984) Mol.Cell.Biol.4:2072-2081;Hermonat和Muzyczka(1984) PNAS 81:6466-6470;和Samulski等(1989) J.Virol.63:03822-3828。可以使用任何AAV血清型,包括AAV1,AAV3,AAV4,AAV5,AAV6和AAV8,AAV 8.2,AAV9和AAV rh10和假型AAV,诸如AAV9.45,AAV2/8,AAV2/5和AAV2/6。

[0130] 目前有至少六种病毒载体法可用于临床试验中的基因传递,其采用通过将基因插入辅助细胞系来产生转导剂进行涉及缺陷型载体的互补的方法。

[0131] pLASN和MFG-S是已用于临床试验的逆转录病毒载体的示例(Dunbar等(1995) Blood 85:3048-305;Kohn等(1995) Nat.Med.1:1017-102;Malech等(1997) PNAS 94(22):12133-12138)。PA317/pLASN是用于基因治疗试验的第一治疗载体。(Blaese等(1995) Science 270:475-480)。已在MFG-S包装的载体中观察到50%或更高的转导效率。(Ellem等(1997) Immunol Immunother.44(1):10-20;Dranoff等(1997) Hum.Gene Ther.1:111-2。

[0132] 重组腺相关病毒载体(rAAV)是一种具有前景的替代性基因递送系统,其基于缺陷型和非病原性细小病毒腺相关2型病毒。全部载体源自这样的质粒,所述质粒仅保留了侧接转基因表达盒的AAV 145碱基对(bp)反向末端重复序列。高效的基因转移和稳定的转基因递送是该载体系统的关键特征,这归因于向转导的细胞的基因组的整合。(Wagner等(1998) Lancet351(9117):1702-3;Kearns等(1996) Gene Ther.9:748-55)。根据本发明也可使用其它AAV血清型,包括AAAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9、AAV9.45和AAVrh10,以及其所有变体。

[0133] 复制缺陷型重组腺病毒载体(Ad)可以高效价生成,并且容易地感染多种不同的细胞类型。大多数腺病毒载体是经工程改造的,从而转基因替代了Ad E1a、E1b和/或E3基因;随后该复制缺陷型载体在提供缺失反式基因功能的人293细胞中传播。Ad载体可体内转导多种类型的组织,包括不分裂的、分化的细胞,例如发现于肝、肾和肌肉中的那些。传统的Ad载体具有较大携载能力。临床试验中Ad载体应用的一个示例涉及用于采用肌内注射进行抗肿瘤免疫的多核苷酸治疗(Sterman等(1998) Hum.Gene Ther.7:1083-1089)。临床试验中用于转基因的腺病毒载体的应用的其它示例包括Rosenecker等(1996) Infection 24(1):5-10;Sterman等(1998) Hum.Gene Ther.9(7):1083-1089;Welsh等(1995) Hum.Gene Ther.2:205-18;Alvarez等(1997) Hum.Gene Ther.5:597-613;和Topf等(1998) Gene Ther.5:507-513。

[0134] 采用包装细胞来形成能够感染宿主细胞的病毒颗粒。所述细胞包括293细胞,其包装腺病毒,和 ψ 2细胞或PA317细胞,其包装逆病毒。用于基因治疗的病毒载体通常由将核酸载体包装成病毒颗粒的生产细胞系产生。所述载体通常包含包装和后续整合进入宿主(若可行)所需的最小病毒序列,其它病毒序列被编码待表达的蛋白质的表达盒所替代。失去的病毒功能通过包装细胞系以反式提供。例如,用于基因治疗的AAV载体通常仅加工来自AAV基因组的反向末端重复(ITR)序列,其为包装和整合进入宿主基因组所需。病毒DNA被包装

进入细胞系,其包含编码其它AAV基因,即rep和cap,但缺乏ITR序列的辅助质粒。所述细胞系也用腺病毒(作为辅助物)感染。辅助病毒促进AAV载体的复制和AAV基因从辅助质粒的表达。因为缺乏ITR序列,辅助质粒不以显著的量包装。腺病毒的污染可通过,例如,热处理(相比AAV,腺病毒对热处理更为敏感)来减少。

[0135] 在许多基因治疗应用中,希望将基因治疗载体以高度特异性递送至特定组织类型。因此,病毒载体可经修饰以通过将配体表达成与病毒包衣蛋白融合的位于病毒外表面上的蛋白来具有针对给定细胞类型的特异性。选择对于已知存在于感兴趣的细胞类型上的受体具有亲和性的配体。例如,Han等(1995),*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9747-9751 (1995),报道了莫洛尼鼠白血病毒可经修饰以表达融合至gp70的人调蛋白,并且该重组病毒感染表达人表皮生长因子受体的某些人乳腺癌细胞。该原理可延伸至其它病毒-靶细胞对,其中靶细胞表达受体,并且病毒表达包含针对该细胞表面受体的配体的融合蛋白。例如,丝状噬菌体可经工程改造以显示对于几乎任何所选细胞受体具有特异性结合亲和力的抗体片段(例如,FAB或Fv)。尽管上文描述主要应用至病毒载体,相同的原理可应用至非病毒载体。所述载体可经工程改造以包含特定的摄取序列,其有利于被特定靶细胞摄取。

[0136] 基因治疗载体可通过给予个体对象来体内递送,通常通过全身性给予(例如,静脉内、腹膜内、肌内、皮下、舌下或颅内输注)局部施用,如下所述,或通过肺吸入。或者,载体可离体递送至细胞,例如来自个体患者的外植的细胞(例如,淋巴细胞、骨髓抽出物、组织活检物)或通用供体造血干细胞,然后将所述细胞再植入患者,通常在选择已引入载体的细胞之后进行。

[0137] 也可将包含核酸酶和/或供体构建体的载体(例如,逆转录病毒、腺病毒、脂质体等)直接给予生物体用于体内细胞转导。或者,可给予裸DNA。给予通过常用于引入分子并最终与血液或组织细胞接触的任何常规途径进行,包括但不限于,注射、输注、局部施用、吸入和电穿孔。合适的给予所述核酸的方法可得且为本领域技术人员熟知,并且,尽管可利用超过一种途径给予特定组合物,某特定途径通常能提供比另一途径更直接和更有效的反应。

[0138] 适合用于导入本文所述多核苷酸的载体包括非整合型慢病毒载体(IDLV)。参见例如,Ory,等(1996)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

[0139] 93:11382-11388;Dull,等(1998)*J. Virol.* 72:8463-8471;Zuffery,等(1998)*J. Virol.* 72:9873-9880;Follenzi,等(2000)*Nature Genetics* 25:217-222;美国专利号8,936,936。

[0140] 药学上可接受的运载体部分地由所给予的特定组合物以及用于给予组合物的特定方法确定。因此,有多种合适的药物组合物制剂可用,如下所述(参见例如,《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences);第17版,1989)。

[0141] 显而易见的是,可以使用相同或不同的系统递送编码核酸酶的序列和供体构建体。例如,供体多核苷酸可以通过AAV携带,而一种或多种核酸酶可以通过mRNA携带。此外,不同系统可以相同或不同的途径给予(肌内注射、尾静脉注射、其他静脉注射、腹腔给予及/或肌内注射。可以同时或以任何先后顺序递送多种载体。

[0142] 离体和体内给药的制剂包括液体或乳化液体中的悬浮物。活性成分通常与赋形剂混合,后者是药学上可接受的,并与活性成分相容。合适的赋形剂包括,例如,水,盐水,右旋糖,甘油,乙醇等及其组合。另外,组合物可含有少量辅助物质,如湿润或乳化剂,pH缓冲剂,

稳定剂或增强药物组合物效力的其他试剂。

[0143] 实施例

[0144] 实施例1:材料和方法

[0145] 用于瞬时转染的mRNA产生

[0146] 使用PCR(正向引物GCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAG (SEQ ID NO:1);反向引物(T(180)):CTGGCAACTAGAAGGCACAG (SEQ ID NO:2))由pVAX-ZFP或pVAX-GFP质粒产生体外转录的模板。使用mMESSAGE mMACHINE® T7ULTRA转录试剂盒(赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Scientific))按照生产商的说明合成mRNA,并使用RNeasy96柱(凯杰公司(Qiagen))纯化。

[0147] 慢病毒载体的产生

[0148] 将ZFP-2A-GFP的编码序列克隆到CMV启动子下游的慢病毒转移载体pRRL中。使用Lipofectamine 2000(赛默飞世尔科技公司),用下述质粒转染在15-cm组织培养皿中培养的HEK293T细胞:pRRL-CMV-ZFP-2A-GFP(37.5 μ g),VSVG包膜质粒(18.75 μ g)和包装质粒(pMDL和pREV,各自为18.75 μ g(Dull,T.,等(1998)J Virol 72(11):8463-8471)。转染后48和72小时收获病毒上清液(30ml)并通过0.45- μ m的过滤器过滤,然后通过以50,000 \times g在4 $^{\circ}$ C(Optima L-80K制备型超速离心机,贝克曼库尔特公司(Beckman Coulter))下进行超速离心90分钟以浓缩300倍。然后将沉淀物悬浮于适当体积的汉氏(Hank's)缓冲盐溶液(隆萨公司(Lonza))。为了确定感染效价,用100 μ l连续稀释的载体制备物转导 2×10^4 个HEK293T细胞过夜(设三重),然后在37 $^{\circ}$ C以5% CO₂另孵育48小时。使用对GFP表达表现出线性剂量应答的稀释度确定感染效价。

[0149] AAV载体的产生

[0150] 根据本领域的标准方法,通过基于杆状病毒的AAV产生法来生成AAV6-CMV-GFP和AAV6-CMV-ZFP(A、B和C)。所有AAV6载体通过双重CsCl超速离心纯化,缓冲液交换为具有0.001%普朗尼克(Pluronic)F-68的PBS。使用qPCR确定AAV效价。

[0151] 通过Evotec AG(德国汉堡)生成嵌合AAV血清型1/2(Hauck,B.,等(2003)Mol Ther 7:419-425)载体,以在人突触蛋白1(hSYN1)启动子的控制下表达ZFP-2A-GFP和GFP对照。AAV1/2载体通过HEK293转染产生并通过碘克沙醇梯度纯化,如(Heikkinen等(2012)PLoS ONE 7:e50717,doi:10.1371/journal.pone.0050717)所述。

[0152] 细胞培养和mRNA转染

[0153] 永生化小鼠纹状体细胞系STHdhQ111/HdhQ7(Q111/Q7,Trettel等(2000)Human Molecular Genetics 9:2799-2809,doi:10.1093/hmg/9.19.2799)来自CHDI基金会(CHDI)的馈赠。Q111/Q7细胞在含有10%FBS、青霉素/链霉素和G418(0.4mg/ml)的DMEM中以33 $^{\circ}$ C维持生长。使用96孔Shuttle Nucleofector(隆萨公司)进行mRNA转染,每 1×10^5 个细胞使用P3溶液和程序EN-132转染100ng ZFP mRNA。转染后24小时,收获细胞用于通过qRT-PCR的基因表达分析。

[0154] HD成纤维细胞系GM04723(CAG15/67(SEQ ID NO:81/82))、GM02151(CAG18/45(SEQ ID NO:79/80))和ND30259(CAG21/38(SEQ ID NO:83/84))获自柯瑞尔细胞库(Coriell Cell Repository)并保持在含20% FBS的完整MEM中。通过测序确认CAG重复序列长度。使用96孔Shuttle Nucleofector(隆萨公司)进行mRNA转染。每 1.5×10^5 个细胞使用P2溶液和

程序CA-137转染0.01-1000ng ZFP mRNA;对于小于100ng ZFP mRNA的剂量,添加GFP mRNA以使转染的mRNA的总量至100ng。转染后24小时,收获细胞用于通过qRT-PCR的基因表达分析。

[0155] HD ESC系GENEA018 (CAG17/48 (SEQ ID NO:76/78), Bradley等(2011) Stem Cells Dev 20:495-502, doi:10.1089/scd.2010.0120) 来自CHDI的馈赠。通过测序确认CAG重复序列长度。HD-ESC用accutase酶传代并在E8培养基中于基质胶涂覆的平板(赛默飞世尔科技公司)上培养。使用StemPro神经诱导培养基(赛默飞世尔科技公司)衍生神经干细胞。简而言之,将ESC以 2×10^5 个细胞/孔接种到geltrex涂覆的6孔培养皿中,并在10-20%融合时,将培养基更换为StemPro神经诱导培养基(赛默飞世尔科技公司)。每两天更换一次培养基,并在第7天收获NSC并扩增。使用StemPro NSC SFM培养基(生命技术公司(Life Technologies))培养HD-NSC和非HD NSC (HIPTM神经干细胞, Globalstem。用accutase酶在geltrex涂覆的平板上传代NSC。使用96孔Shuttle Nucleofector (隆萨公司)进行mRNA转染。根据NSC继代培养方案(StemPro NSC, 生命技术公司)制备NSC,使用20 μ L SF溶液和程序CM转染 2×10^5 个细胞。之后立即将80 μ L培养基添加到孔中,然后转移到包含50 μ L温培养基的96孔板中。

[0156] 通过更换为神经分化培养基 (NDIFF) 来诱导来自NSC的神经元分化,所述神经分化培养基由具有B-27无血清补充剂的神经基础培养基和GlutaMAXTM(赛默飞世尔科技公司)组成。培养基每3-4天更换一次。在NDIFF中7天后,细胞呈神经元形态。

[0157] 为了证实NSC和神经元分化,在室玻片(Lab-Tek, 赛默飞世尔)上培养HD NSC或神经元培养,用于神经元标志物基因的免疫组织化学分析。简言之,使用BD Cytifix/CytopermTM试剂盒(BD生物科学公司(BD Biosciences))固定并透化细胞。玻片用4%NGS封闭,并在4C下用一抗抗PAX6 (AB2237, 密理博公司(Millipore)), 抗巢蛋白-488 (MAB5326A4, 密理博公司) 或抗 β -III微管蛋白 (MAB119, R&D系统公司(R&D Systems)) 染色过夜。将合适的Alexa 488或555偶联二抗(分子探针公司(Molecular Probes)) 1:500稀释用于进行二级染色。

[0158] HD蛋白敲减的western印迹分析

[0159] 使用P2溶液中的Lonza程序CA-137,用ZM0 (300ng)以150,000个细胞/转染(设四重复)转染GM04723 (CAG15/67 (SEQ ID NO:81/82)) 人成纤维细胞。转染后将细胞在完全培养基中合并,然后分离到24孔板的4孔中,并在37 $^{\circ}$ 、5% CO₂下孵育72小时。细胞经胰蛋白酶化、洗涤、沉淀并在热的95 $^{\circ}$ Laemmli样品缓冲液中溶解,并在95 $^{\circ}$ 下孵育5分钟。将样品以5 μ L/泳道上样到伯乐公司(Bio-Rad) 4-15% TGX凝胶上,并在三/甘氨酸/SDS运行缓冲液中于室温在150V下运行3.5小时。在含有MeOH (10%) 的转移缓冲液中,在90 $^{\circ}$ V下于4 $^{\circ}$ 湿转移到PVDF膜上2.5小时。膜在Odyssey封闭缓冲液中于4 $^{\circ}$ 封闭,然后在0.2%吐温-20Odyssey封闭缓冲液中与一抗于室温下孵育3小时,所述一抗为:小鼠抗Htt (1:500;密理博公司MAB2166) 和兔抗钙连接蛋白 (1:5000;西格玛公司(Sigma) C4731)。在PBS-T (PBS+0.1%吐温-20) 中洗涤印迹3次 \times 10分钟。然后在包含0.2%吐温-20, 0.01% SDS的Odyssey封闭缓冲液中将印迹与二抗于室温下避光孵育1小时,所述二抗为:山羊抗小鼠IgG1 (1:5000;Li-Cor IRDye 800CW 926-32350) 和山羊抗兔 (1:10,000;LiCor IRDye 680RD#926-68071)。光保护下,将印迹在PBS-T中洗涤3次 \times 10分钟,在Whatman纸之间干燥,并在Li-Cor Odyssey近红外荧光

成像系统上进行扫描。

[0160] 生成表达ZFP的稳定NSC系

[0161] 使用具有CMV启动子的慢病毒载体建立表达ZFP的HD-NSC,所述CMV启动子驱动用2A肽连接GFP的ZFP的表达。在6孔板中用 1×10^6 个细胞接种浓缩的载体。数次传代后,将所得细胞进行细胞分选以富集GFP阳性细胞。如上所述,将分选的细胞进一步扩增并分化为神经元。

[0162] 使用qRT-PCR进行基因表达分析

[0163] 分别使用HighPure RNA分离试剂盒(罗氏公司(Roche))和Purelink RNA迷你试剂盒(安碧公司(Ambion))由培养的细胞和小鼠纹状体提取总RNA。使用大容量cDNA逆转录试剂盒(赛默飞世尔科技公司)生成cDNA,使用SsoAdvanced通用探针超混合物(伯乐公司)和CFX实时PCR仪(伯乐公司)进行定量PCR。用于基因表达分析的qRT-PCR引物/探针组订购自IDT:小鼠总Htt(Mm.PT.58.6953479),DRD1A(Mm.PT.56a.43576955.g),DRD2(Mm.PT.56a.7811767),PDE10A(Mm.PT.56a.16919824),DARPP-32(Mm.PT.53a.9253526.gs),ATP5B(Mm.PT.53a.17279462),EIF4A2(Mm.PT.53a.9498195.g),RPL38(Mm.PT.58.42993403.g)AIF1

[0164] (Mm.PT.58.7014816);人总HTT(Hs.PT.49a.14676852.g),STC1

[0165] (Hs.PT.51.14992722),NAP1L3(Hs.PT.56a.24655549.g),ATXN2(Hs.PT.58.40126607),ORC4(Hs.PT.56a.24527823.g),THAP11

[0166] (Hs.PT.49a.15404553.g),GLS(Hs.PT.53a.20624732),FBXO11

[0167] (Hs.PT.58.2665601),DNM1(Hs.PT.58.25262501),TBP(Hs.PT.56a.20792004),FOXP2(Hs.PT.58.15357735),ENO2(Hs.PT.53a.25227282),B2M(Hs.PT.20234084),TOP1(Hs.PT.53a.19541381),NES(Hs.PT.53a.20758620),SOX1(Hs.PT.53a.28041414.g),PAX6(Hs.PT.53a.814314),OCT4(Hs.PT.58.14494169.g),REX1(Hs.PT.53a.23001209),NANOG(Hs.PT.53a.21480849),GAD1(Hs.PT.56a.21283000),MAP2

[0168] (Hs.PT.53a.40791337.g)和FOXP1(Hs.PT.56a.26906112.g)。

[0169] 通过针对5'UTR的通用引物/探针检测AAV6载体表达的ZFP和GFP mRNA:

[0170] 正向引物:GGAACGGTGCATTGGAACG(SEQ ID NO:3)

[0171] 反向引物:GTTCGAATCCCAATTCTTTGCC(SEQ ID NO:4)

[0172] 探针:AGCACGTTGCCAGGAGGTCAC(SEQ ID NO:5)。

[0173] 使用下述引物/探针组检测R6/2小鼠中的突变Htt mRNA:

[0174] 正向引物:CGCAGGCTGCAGGGTTAC(SEQ ID NO:6)

[0175] 反向引物:GCTGCACCGACCGTGAGT(SEQ ID NO:7)

[0176] 探针:CAGCTCCCTGTCCCGCGG(SEQ ID NO:8)。

[0177] 用基于SNP rs363099C/T(外显子29)定制的引物在HD成纤维细胞GM04723(CAG15/67(SEQ ID NOS:81/82))和GM02151(CAG18/45(SEQ ID NOS:79/80))中进行人HTT表达的等位基因特异性检测:

[0178] 363099C-F(099-C正向引物):AGTTTGGAGGGTTTCTC(SEQ ID NO:9)

[0179] 363099T-F(099-T正向引物):AGTTTGGAGGGTTTCTT(SEQ ID NO:10)

[0180] 363099T-BL(099-T封闭物(Blocker)):

[0181] AGGGTTTCTCCGCTCAGC/phos/(SEQ ID NO:11)

[0182] 363099-R(反向引物,与099-C和099T正向引物一起使用):TCGACTAAAGCAGGATTTTCAGG(SEQ ID NO:12)。

[0183] 将099-T封闭物寡核苷酸设计成与“C/G”等位基因退火,并在3'端碱基处经磷酸化,以抑制突变等位基因的扩增(Morlan等(2009)PLOS ONE 4:e4584),将其以相对于099T正向引物2:1摩尔比例添加。对于各样品,将针对099T和099C的10 μ L qPCR反应设置如下:5 μ L SsoFast Evagreen超混合物(伯乐公司),0.5 μ L的20x 099C或099T主混合物(在099T试验中最终浓度对于各引物为0.5 μ M和1 μ M的封闭物寡核苷酸),2.5 μ L H₂O和2 μ L的cDNA样品。热循环条件如下:1)98 $^{\circ}$ C进行2分钟,2)98 $^{\circ}$ C进行5秒,3)对于099C试验为58.3 $^{\circ}$ C进行9秒,获自对于099T试验为55.6 $^{\circ}$ C进行9秒,4)读板,5)重复步骤2-4,45次,6)结束。

[0184] 用基于SNP rs362331C/T(外显子50)定制的引物在HD成纤维细胞ND30259(CAG21/38(SEQ ID NOS:83/84))中进行人HTT表达的等位基因特异性检测:362331-F(331正向引物):TCTCCTCCACAGAGTTTGTGA(SEQ ID NO:13),362331-R(331反向引物):

[0185] CCTTCTTTCTGGACTAAGAAGCTG(SEQ ID NO:14),362331C探针:TCC CTC ATC+C+AC TGT GT(SEQ ID NO:15),和362331T探针:CTC+A+T+C+T+A+C TGT GT(SEQ ID NO:16)。

[0186] 对于各试验,添加等位基因特异性Taqman探针以检测331C或331T,其包含了锁核酸(LNA)碱基(用“+N”指示)。相较于未修饰的DNA探针,利用LNA探针改善等位基因识别(Latorra等(2003)Hum Mutat 22:79-85,doi:10.1002/humu.10228和You等(2006)Nucleic Acids Research 34:e60,doi:10.1093/nar/gkl175)。对于各样品,将针对331T和331C的10 μ L qPCR反应设置如下:5 μ L SsoFast探针超混合物(伯乐公司),1 μ L的10x 331-C主混合物(试验中的最终浓度为:F和R引物各自为0.5 μ M和0.25 μ M的331C探针)或331T主混合物(试验中的最终浓度为:F和R引物各自为0.5 μ M和0.25 μ M的331-T探针),2 μ L H₂O和2 μ L的cDNA样品。热循环条件如下:1)95 $^{\circ}$ 进行45秒,2)95 $^{\circ}$ 进行5秒,3)对于331C试验,62 $^{\circ}$ 进行1分钟,或对于331T试验,62.7 $^{\circ}$ 进行1分钟,4)读板,5)重复步骤2-4,45次,6)结束。

[0187] 微阵列

[0188] 将编码ZFP-TF的体外转录的mRNA(100ng)转染至150,000个HD成纤维细胞(GM02151)中,设生物学六重复(Amaxa穿梭,设置CA-137,溶液P2,隆萨公司(Lonza))。24小时后,用PBS洗涤细胞1次,然后处理以提取总RNA(High Pure,罗氏公司)。各重复样品(50ng总RNA)根据生产商样品制备的方案处理,杂交,流控和扫描(Human Primeview GeneChip阵列,艾菲美特公司(Affymetrix))。将稳健多阵列平均值(RMA)用于对来自各探针组的原始信号进行标准化。使用具有“基因水平差异表达分析(Gene Level Differential Expression Analysis)”选项的转录组分析控制台(Transcriptome Analysis Console)3.0(艾菲美特公司)进行倍数变化分析。将用ZFP-A、ZFP-B和ZFP-C转染的样品与用不靶向CAG的ZFP-TF处理的样品进行比较,所述不靶向CAG的ZFP-TF在成纤维细胞中具有两个已知靶标(PAPPA和LMCD1,均以<2FC阻遏)。报告了转录本(探针组)的变化,其平均信号相对于对照的差异大于2倍且P值<0.05(对于各探针组,未配对T检验,单尾ANOVA分析)。对于具有多于一个探针组的任何基因,选择具有最高倍数变化的探针组进行下游分析。

[0189] 生物信息学分析

[0190] 使用来自MOODS软件包(1.9.2版本)的‘moods_dna.py’Python脚本并使用设置为

检测基序中零至最多3个错配的阈值扫描人染色体1-22、X和Y (GRCh38版本)的六聚体CAG基序 (ZFP-A和ZFP-C) 或CAGCAGnnGCAGCAnCAGCAG基序 (SEQ ID NO:17) (ZFP-B)。使用定制python脚本将使用该方法发现的区域转换为BED格式。对BED区域进行分选,并使用不依赖于链型 (strandedness) 的BEDtools (v2.26.0) “merge” 命令将相邻或重叠的基序区域融合到单个区域中。

[0191] ENSEMBL人转录本及其转录起始位点坐标 (Ensembl版本87) 获自ENSEMBL Biomart,并仅对那些具有GENCODE (v25)BASIC注释和“protein_coding”生物型的样品进行过滤。通过bedtools命令“bedtools closest-D”确定CAG基序与给定转录起始位点的距离 (反之亦然)。使用Biomart hg38数据进行Affymetrix Primeview探针组ID至ENSEMBL转录本的映射。将根据ENSEMBL biomart注释 (GRCh38.7,版本87)映射至多个基因或与ENSEMBL转录本不重叠的Affymetrix Primeview探针组从后续研究中去除。如果有多个转录本映射至Primeview探针组,那么选择在CAG基序和TSS之间距离最小的转录本。

[0192] 用于人组织表达的表达式RPKM值获自可以通过UCSC基因组浏览器获取的GTEx项目数据 (Mele等. (2015)Science 348:660-665,doi:10.1126/science.aaa0355),用于下述类别:脑_尾状核 (brain_caudate)、脑_皮质 (brain_cortex)、脑_核壳 (brain_putamen) 和转换的_成纤维细胞 (transformed_fibroblasts)。

[0193] 测量培养的神经元中的ATP水平

[0194] 用Lenti-CMV-ZFP-2A-GFP或Lenti-CMV-GFP以500的MOI设三重感染体外分化的CAG17/48 (SEQ ID NO:76/78) 神经元和正常神经元 (约 1.5×10^5 个细胞)。感染后21天,使用CellTiter-Glo® 发光试验 (普洛麦格公司 (Promega) 测量胞内ATP水平,使用ApoLive-Glo® 试验 (普洛麦格公司) 确定各样品中的细胞数量。然后将来自不同细胞/处理的各细胞的ATP水平针对模拟感染的HD神经元水平标准化。

[0195] 测量培养的神经元中生长因子撤去所诱导的细胞凋亡

[0196] 用Lenti-CMV-ZFP-2A-GFP或Lenti-CMV-GFP以500的MOI设三重感染体外分化的CAG17/48 (SEQ ID NO:76/78) 神经元和正常神经元 (约 1.5×10^5 个细胞)。感染后五天,将培养基更换为不含生长因子的新鲜神经基础培养基。生长因子撤去48小时后,使用末端脱氧核苷酸转移酶dUTP缺口末端标记 (TUNEL) 试验试剂盒 (ApoBrdU Red DNA裂解试剂盒,百信公司 (BioVision)) 测量细胞死亡的水平。使用流式细胞仪测量慢病毒转导的 (GFP阳性) 细胞中凋亡细胞的百分比 (抗BrdU染色阳性)。

[0197] 小鼠研究

[0198] HdhQ50/Hdh+ (Q50) 和R6/2小鼠研究在PsychoGenics有限公司 (纽约州塔里敦) 根据美国公共卫生服务有关人文关怀和实验动物使用的政策进行,并且程序已获PsychoGenics公司的机构动物与使用委员会批准。zQ175小鼠研究在Evotec AG公司 (德国汉堡) 根据德国动物福利法和欧盟法规 (欧盟指令2010/63/EU) 进行。根据年龄、性别、CAG数量和体重将动物分组为不同的治疗组。

[0199] Q50小鼠研究

[0200] HdhQ50/Hdh+ (Q50) C57BL/6J小鼠由CHDI提供。在11周龄时,使用立体定位注射将AAV6-CMV-ZFP或AAV6-CMV-GFP (1×10^{13} vg/ml) 双侧递送至Q50小鼠的纹状体 (n=4/组,雄性2和雌性2,组大小通过初步确定)。为了增加纹状体的载体覆盖,在各纹状体中使用两个注

射部位:以0.5 μ L/分钟的速率使用阶梯式 (stepped) 套管设计将5 μ L递送到前位点 (坐标:A/P+1.4mm、M/L+/-1.7mm、D/V-3.5mm) 中并将4 μ L递送到后位点 (坐标:A/P+0.2mm、M/L+/-2.3mm、D/V-3.2mm)。在整个研究过程中,每周两次监测体重。注射后7周,将小鼠断头,并将大脑从颅骨中快速取出,并在冰冷盐水中冲洗以除去任何表面血液。将纹状体在冰冷的表面上解剖并细分为代表纹状体喙部、中部和尾部的3个相等大小的碎片;纹状体组织在RNALater (凯杰公司) 中4 $^{\circ}$ C过夜处理,然后在-80 $^{\circ}$ C下保存直至提取RNA。因为AAV注射并不导致纹状体的完全且均匀的覆盖 (数据未显示),所以将各纹状体分为3个部分以降低转导不良区域中基线Htt水平干扰转导良好区域中检测Htt调节的可能性。对于各纹状体切片,通过qRT-PCR对Htt以及ZFP表达进行定量。

[0201] zQ175小鼠研究

[0202] zQ175 C57B/L6J敲入小鼠源自杰克逊实验室公司 (Jackson Laboratory) (美国缅因州巴港)。在2或6月龄时,杂合zQ175小鼠 ($n=5$ /组,混合性别) 的右半球接受AAV1/2-hSYN1-ZFP-2A-GFP (1×10^{13} vg/mL) 的纹状体内注射,而左半球接受AAV1/2-hSYN1-GFP (1×10^{13} vg/ml) 的纹状体内注射。使用汉密尔顿 (Hamilton) 气密注射器 (,型号1801RN) 和定制的26号针头以200 0.5 μ L/分钟的恒定流速向各纹状体递送总计2 μ L的AAV载体,注射坐标为A/P+0.8mm、M/L+/-1.8mm、D/V-3.8mm。

[0203] zQ175小鼠在使用蠕动泵经颅输注30mL冰冷PBS随后50mL 4%多聚甲醛后2或4个月进行安乐死。从颅骨中取出脑样品并进行切片;如先前所述进行免疫组织化学、图像采集和自动图像分析 (Carty等 (2015) PLoS One 10:e0123527, doi:10.1371/journal.pone.0123527)。

[0204] R6/2小鼠研究

[0205] 通过将CBAxC57BL/6背景的卵巢移植的雌性 (杰克逊实验室公司) 与C57BL/6野生型雄性杂交,在PsychoGenics公司群体繁殖R6/2转基因小鼠。确认转基因小鼠中CAG序列重复长度为 123 ± 0.6 。所有实验对各组处理不知情。在5周龄时,使用立体定位注射将AAV6-CMV-ZFP或AAV6-CMV-GFP (1×10^{13} vg/mL) 双侧递送至R6/2小鼠的纹状体 ($n=14$ /组,雄性7和雌性7,组大小通过相同模型中测试其他试剂的研究选择);相同注射体积和坐标用在Q50小鼠研究中。每天两次监测小鼠的存活。体重 (BW) 每周测量一次,直到12周龄小鼠安乐死时。两组之间的BW没有存在统计学上显著的差异性。

[0206] 在各体重测试期间记录扣爪 (clasp) 行为。简言之,将各只小鼠从其家笼中取出,将笼盖倒置,然后将小鼠置于该表面上。然后,观察者以平稳的动作将动物轻轻地向后和向上拉动,直到将动物悬挂在表面上方约12英寸处。观察动物30秒。记录完全扣爪并用于分析,所述完全扣爪定义为后肢和前肢爪同时扣紧到核心。

[0207] 还对在4 (基线)、6、8、10和12周龄对小鼠进行了空场 (OF) 测试。将动物置于红外光源包围的有机玻璃方室 (27.3x 27.3x 20.3cm; Med联合有限公司 (Med Associates Inc.), 佛蒙特州圣阿巴斯 (St Albans, VT)) 中30分钟。由连续光束中断 (beam break) 测量总水平活动度 (行进的距离) 和垂直活动度 (饲养)。

[0208] 在研究过程中,AAV-CMV-ZFP组的三只小鼠和AAV-CMV-GFP组的五只小鼠死亡。在12周龄时对小鼠安乐死后,将纹状体切开 (对于GFP和ZFP组,分别为 $n=7$ 和10只小鼠),以进行如Q50小鼠研究所述的基因表达分析。

[0209] ZFP处理的zQ175小鼠中HTT聚集物的分析(动物研究)

[0210] 雄性和雌性zQ175 C57B/L6J敲入小鼠源自杰克逊实验室公司(美国缅因州巴港)。zQ175系源自CAG 140敲入小鼠中CAG拷贝数的自发扩增,并在Psychogenics公司(美国纽约州塔里敦)生成。将转基因小鼠回交至C57BL/6J,以生成杂合zQ175小鼠和野生型同窝仔。将动物圈养在欧洲标准II型长笼子中,并允许随意进食和饮水。保持如下环境条件:21±1℃环境温度,55±10%湿度和12:12光照:黑暗周期,其中上午7点至下午7点光照。每日检查动物的健康状况。所有动物处理根据德国动物福利法和欧盟法规(欧盟指令2010/63/EU)进行。研究方案已获汉堡市和州健康与消费者保护局地区道德委员会(汉堡的“消费者保护协会(BehördefürGesundheitund Verbraucherschutz)”BGV)文件编号#V11307/591 00.33的批准。

[0211] AAV载体构建和产生

[0212] 为了表达ZFP,由腺相关病毒(AAV)载体pAAV-6P-SWB修饰质粒(Minderer等.(2012) *J Physiol* 590(1):99-107)。在人突触蛋白1启动子(phSyn1)后克隆ZFP-C(FLAG标签标记的),以生成pAAV-SWB-ZFP-C。此外,通过由ZFP-B删除ZFP DNA结合结构域(ZFP-ΔDBD)来生成无活性ZFP对照构建体。如之前所述产生并纯化假型rAAV2/1+2颗粒(Zolotukhin,S.,等(1999) *Gene Ther.* 6(6):973-85.PMID:10455399);Carty,N.,等(2015) *PLOS ONE* 10:e0123527)。

[0213] 简言之,通过聚乙烯亚胺介导的质粒转染,用携带感兴趣转录单位的AAV载体和含有rep和cap基因的质粒(pDP1rs和pDP2rs,质粒工厂公司(Plasmid Factory))以等摩尔比共转染HEK293细胞。转染后48小时,通过3个冻融循环将细胞裂解,并通过离心去除细胞碎片。含有病毒颗粒的上清液用核酸酶处理,并以60,000rpm进行碘克沙醇密度离心(S6,S7)。去除碘克沙醇,并通过过滤器离心将病毒颗粒浓缩在PBS 300MK(300mM NaCl、1mM MgCl₂、2.5mM KCl)中。剩余rAAV溶液通过Millex GV 0.22μm孔径过滤。无菌rAAV颗粒4℃储存,并与无菌PBS缓冲液1:1稀释,以获得PBS MK(150mM NaCl、0.5mM MgCl₂、1.25mM KCl),用于体内应用。使用qPCR确定AAV效价。体内应用之前,体外测试表达ZFP的rAAV颗粒对zQ175 het小鼠原代纹状体神经元中WT或突变型Htt的下调。简言之,在24孔板中以2E5个细胞/孔的细胞密度制备纹状体培养物。在3DIV添加rAAV颗粒(包含拷贝的3E8基因组,GS),并在14DIV收获细胞。Wt和突变Htt敲减通过qPCR分别使用下述引物评估:对于WT为正向CAG GTC CGG CAG AGG AAC C(SEQ ID NO:18)和反向TTC ACA CGG TCT TTC TTG GTG G(SEQ ID NO:19),和对于Htt突变为正向GCC CGG CTG TGG CTG A(SEQ ID NO:20)和反向TTC ACA CGG TCT TTC TTG GTG G(SEQ ID NO:21)。

[0214] AAV-ZFP体内应用

[0215] 两组16只zQ175 het小鼠(8只雄性和8只雌性)在2月龄时接受双侧纹状体内注射rAAV构建体,所述rAAV构建体编码HTT等位基因特异性ZFP30640或ZFP-ΔDBD对照。用3%异氟烷以1L/分钟的流速麻醉各个小鼠,并置于立体定位仪(Kopf,型号940)中。在整个外科手术过程中以0.5L/分钟的流速通过2%异氟烷的气鼻锥递送来维持麻醉状态。在用70%乙醇和碘溶液灭菌并施用利多卡因后,在头皮上做一个长度为1cm的纵向中央矢状纵切口。切开皮肤后,使用电钻(Foredom;型号H.30)在颅骨上开一个对应纹状体注射部位的小孔。根据小鼠前囟测量的坐标为前0.8mm,右侧1.8mm,距前囟3.8mm深,并且扁平颅骨鼻设置。使用与

自动微量注射泵连接的汉密尔顿气密注射器(型号1801RN,定制量26号针)以200nL/分钟的恒定流速给予总体积为4 μ L(4E10 GC)的ZFP病毒载体。注射后,将手术伤口密封,并将动物放在加热垫中直至完全康复。

[0216] 组织学和免疫组织化学

[0217] 小鼠在6和10周龄时通过经心(transcardial)输注对小鼠安乐死。对于输注,使用小直径27G针通过腹膜内注射氯胺酮(ketamine)/甲苯噻嗪混合物(120mg/15mg/kg(15 μ l/g体重))深度麻醉小鼠。开始输注前,评估动物的脚趾捏反射和角膜反射的损失,以确保实现正确的麻醉水平。使用蠕动泵,小鼠被经心输注30mL冰冷PBS以及50mL 4%多聚甲醛。从颅骨中取出脑样品,并于4 $^{\circ}$ C在相同的固定剂中固定过夜,然后通过30的蔗糖溶液中孵育直至饱和并进行冷冻保护。将整个大脑包埋在TissueTek中并储存在-80 $^{\circ}$ C下。使用低温恒温器切割25 μ m的冠状切片,以自由漂浮形式在24孔板中收集,并直接用于染色或在-20 $^{\circ}$ C冷冻保护溶液中(25mM磷酸钠缓冲液pH 7.4、30%乙二醇,20%甘油)保存直至使用。将下述一抗用于免疫染色:单克隆小鼠抗突变亨廷顿蛋白(1:100;EM48,密理博公司,MAB5374,批号2135055),单克隆兔抗DARPP-32(1:250;克隆19A3,细胞信号转导公司(Cell Signaling)#2306,批号2),多克隆兔抗NeuN(1:1000;密理博公司,ABN78,批号2140086),单克隆小鼠抗GFAP(1:1500,密理博公司,MAB3402,批号1990686),多克隆兔抗Iba1(1:1000,Wako公司,#019-19741,批号SAE6921)。用漂浮切片法进行所有染色。将切片在0.3%曲通X-100/PBS中透化,在10%正常山羊血清/PBS中封闭,并用在1%正常山羊血清,0.1%曲通X-100PBS中稀释的一抗于4 $^{\circ}$ C孵育过夜。将切片在PBS中洗涤3次,持续15分钟,并在室温下在二抗中孵育2小时。如上所述在PBS中洗涤切片,并使用包含DAPI的水性封固剂(Fluoroshield,西格玛公司(Sigma),F6057)固定在24孔玻璃底平板(Sensoplate,葛莱娜公司(Greiner),#662892),其适合使用Opera高含量筛选系统(High Content Screening system)(帕金埃尔默有限公司(PerkinElmer Inc.))进行成像。

[0218] 图像获取和自动图像分析

[0219] 如先前所述(Carty, N., 等同上)进行图像采集和分析。简言之,使用Opera[®]高含量筛选系统和Opera软件2.0.1(帕金埃尔默有限公司)进行自动图像采集,使用40倍水浸物镜(奥林巴斯公司(Olympus),NA 1.15,像素大小:0.32 μ m)用于对进行mHTT包涵体进行成像,或20倍水浸物镜(奥林巴斯公司,NA 0.7,像素大小:0.64 μ m)用于分析组织中的神经胶质细胞。使用Acapella[®]Studio 3.1(帕金埃尔默有限公司)和集成的Acapella[®]批处理分析(作为Columbus[®]系统的部分)开发用于表征和定量mHTT包涵体的图像分析脚本。为了鉴定星形胶质细胞和小胶质细胞,该算法在GFAP和Iba1通道中搜索了神经突样细胞延伸。将在核周围4像素宽的边缘中与先前确定的细胞核边界相连接的延伸认为是有效的。只有可以检测到延伸时,才将细胞认为是GFAP或Iba1阳性。随后,在距先前确定的核边界相隔3px宽和2px距离的核外边缘区域内确定“本地”背景信号强度。最后,仅将核GFAP或Iba1强度高于平均“局部”背景强度的细胞分别认为是星形胶质细胞或小胶质细胞。将各动物的6个切片的图像数据平均,并将各处理组的5只动物用于统计学评估。

[0220] 组织均质化用于中尺度发现(Meso Scale Discovery,MSD)分析

[0221] 使用FastPrep24均质仪(MP Biomedicals公司),将解剖自脑半球的整个纹状体在

80 μ L组织裂解缓冲液(20mM Tris(pH 7.5),150mM NaCl,1mM EDTA,1mM EGTA,1%曲通X-100,10mM NaF,1mM PMSF,磷酸酶抑制剂混合物II(西格玛公司),磷酸酶抑制剂混合物III(西格玛公司),蛋白酶抑制剂(罗氏诊断公司(Roche Diagnostics)))中裂解。将粗制裂解物在16,000rcf和4 $^{\circ}$ C下连续3次离心10分钟,并在各离心步骤后收集上清液。使用双辛可宁酸(bicinchoninic acid)试验(BCA;赛默飞世尔科技公司)确定总蛋白浓度,并使用裂解缓冲液将总蛋白浓度调节至1mg/mL。将均质物等分,速冻,并在-80 $^{\circ}$ C下储存直至分析。

[0222] 中尺度发现分析

[0223] MSD板(384孔)在4 $^{\circ}$ C下用各孔10 μ L包被抗体碳酸盐-碳酸氢盐涂覆缓冲液(15mM Na₂CO₃/35mM NaHCO₃,pH 9.6)涂覆过夜。然后,各孔用35 μ L洗涤缓冲液(0.2%吐温-20的PBS)洗涤平板3次,并且各孔在RT下用35 μ L封闭缓冲液(2%probumin/0.2%吐温-20的PBS)封闭1小时并进行摇床振荡。将纹状体提取物在50%组织裂解缓冲液和50%封闭缓冲液的混合物中稀释至0.5mg/mL。在额外的洗涤步骤后,将各样品10 μ L转移至抗体涂覆的MSD板的各孔中,并在RT下振荡孵育1小时。在处理样品并使用35 μ L洗涤缓冲液分别进行4个洗涤循环后,将10 μ L检测抗体添加到各孔中,并在RT下振荡孵育1小时。在用洗涤缓冲液洗涤3次后,将35 μ L读取缓冲液T和表面活性剂(中尺度发现)添加到各孔中,并根据生产商的说明在Sector Imager 6000(中尺度发现)上对板进行成像。使用下述抗体组合:4 μ g/mL 2B7/0.1 μ g/mL 4C9-ST;4 μ g/mL MW8/1mg/mL 4C9-ST;4 μ g/mL MW8/5 μ g/mL MW8-ST(ST:SULFO-标签)。根据人HTT-Q73,aa 1-573(用于试验2B7/4C9-ST)或聚集的外显子1-Q46(用于MW8/4C9-ST和MW8/MW8-ST测定)标准曲线对样品进行定量。

[0224] 数据分析与统计

[0225] 使用GraphPad Prism[®]6.0软件进行统计分析。对于所有分析,认为p值小于0.05是具有统计学显著性的。定量分析(n=5只动物,各处理组每只动物6个切片)使用具有Welch校正的t检验进行;p<0.05*;p<0.01**;p<0.001***。

[0226] 用于受体放射自显影(ARG)和微型PET研究的动物

[0227] 于德国汉堡的Evotec公司分别在2月龄或4月龄时用AAV1/2-hSYN1-ZFP-D或AAV2/1-hSYN1- Δ DBD-ZFP单侧注射杂合zQ175小鼠(混合性别)。

[0228] 使用三个纹状体标志物[3H]雷氯必利(raclopride)(D2配体)、[3H]MNI-659(PDE10配体)和[3H]NNC112(D1配体),用ARG检测两组zQ175 het小鼠的大脑。在6个月时处死一组在2月龄时注射的动物(n=10只小鼠/组),将其运送到卡罗琳斯卡医学院(Karolinska Institutet),并使用放射性配体以体外ARG检测大脑。

[0229] 在4月龄时注射第二组(n=33-41只小鼠/组)。将动物运送到卡罗琳斯卡医学院(瑞典斯德哥尔摩),并用多巴胺D2/D3受体放射性配体[11C]雷氯必利和[18F]MNI-659(PDE10A酶的放射性配体)在6.5-7和10月龄时进行微型PET成像。在10个月的影像学研究表明时,将该组的一个子集(n=10只动物/组)处死,并用于进行ARG,使用[3H]雷氯必利(D2配体)、[3H]MNI-659(PDE10配体)和[3H]NNC112(D1配体)。

[0230] 在卡罗琳斯卡医学院时,动物在卡罗琳斯卡大学医院的动物部门中温度(\pm 21 $^{\circ}$ C)和湿度(\pm 40%)控制的环境下饲养,光照时间为12小时光照/黑暗周期(光照始于上午7:00),并允许随意进食和饮水。在开始成像过程之前,允许动物至少一周适应动物部门。所有实验在循环的光照阶段进行。所有实验在瑞典北斯德哥尔摩动物伦理审查委员会批准的协

议(N558/11)下根据瑞典国家实验动物委员会的指导进行。

[0231] 脑部切除和切片

[0232] 从颅骨快速取出大脑,置于异戊烷(2-甲基丁烷99%溶液)中于约-40℃冷冻15-20秒。将冷冻大脑包裹在锡箔纸中,并保存在-80℃下直至使用。在低温恒温切片机(Leica CM 1860)上以14μm的厚度(冠状)切开中央部分或纹状体(大约1mm)。各载玻片3个切片(75切片=1mm组织=25个载玻片)。将切片在显微镜载玻片上解冻安装(SuperFrost®Plus,德国Menzel-Gläser),风干并直接在低温恒温器中重新冷冻。将载玻片保持在-20℃直至使用。切片依次进行,这意味着同一载玻片上有三个水平的切片。

[0233] HTT聚集物的荧光免疫组化(IHC)

[0234] 将切片置于磷酸盐缓冲盐溶液(PBS)中,然后与在0.3%TX-100,0.1%NaN₃的PBS溶液中1/300稀释的小鼠抗HTT一抗(来自开米康公司(Chemicon)的MAB5374,抗亨廷顿蛋白抗体,克隆mEM48,小鼠源)一起温育72小时。将切片在含有0.5%吐温的Tris-HCl缓冲盐溶液(pH 7.4)中洗涤,封闭(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer)),并在含有488偶联的抗小鼠二抗(1/200,杰克逊(Jackson)公司)的封闭缓冲液中孵育,然后在含有0.5%吐温的Tris-HCl缓冲盐溶液中洗涤数次。所有切片用核标志物Hoechst(1/5,000)染色,并使用1% Sudan Black(在70%乙醇中)封闭组织自发荧光,并用含有2.5%DABCO的聚乙烯醇/甘油(西格玛公司)固定。使用MetaSystems公司的MetaViewer图像软件对所有IHC载玻片进行分析。

[0235] 放射性配体

[0236] [3H]NNC112(77Ci/mmol)是由卡罗琳斯卡医学院临床神经科学系合成的。[3H]雷氯必利(81Ci/mmol)购自Novandi Chemistry AB(瑞典南泰利耶)。MNI659(57Ci/mmol)由CHDI基金会提供。在ARG实验之前测量所有放射性配体的放射化学纯度(>95%)。

[0237] 体外放射自显影(ARG)

[0238] 将载玻片在室温下解冻,并在结合缓冲液(Tris HCl 50mM, pH7.4, 包括120mM NaCl、5mM KCl、2mM CaCl₂、1mM MgCl₂)中预孵育约20分钟。然后将载玻片在室温下与1nM放射性配体在结合缓冲液中孵育60分钟。

[0239] 在重复的一组容器中,添加10μM布他拉莫(butaclamol) ([3H]NNC112和[3H]雷氯必利)或MP-10([3H]MNI659)以建立不可移置的结合。孵育后,将载玻片在Tris HCl 50mM, pH 7.4中洗涤3次,每次10分钟,然后在蒸馏水中短暂洗涤。将载玻片在室温下干燥过夜,或在加热(37℃)板上干燥约30分钟。将载玻片与放射自显影微型标准物(美国放射性标记化学有限公司(American Radiolabeled Chemicals Inc.))一起放置,并在氚敏感磷光体成像板(富士板BAS-TR2025,日本东京富士公司(Fujifilm))上暴露90小时。

[0240] 在暴露于磷光体成像板之前,用于[3H]MNI659的组织切片在4%多聚甲醛(PFA)中进行固定。这会导致信号强度降低,这对于分析信号至关重要,因为放射性配体非常强力。这种具有组织后固定(post fixation)的技术之前用于使低能同位素如氚(3H)的磷光体成像板的多次使用成为可能。在这种情况下,我们使用后固定来降低组织中[3H]MNI659的信号强度,以利用较高浓度(例如,1nM)的结合,这对于使结合和游离级分之间达到平衡至关重要。没有后固定步骤,我们只能以低于0.15nM的浓度进行结合,并且这不足以达到平衡,因此不足以显示野生型与Q175[3H]MNI659体外结合之间的差异。

[0241] 用[3H]MNI659进行后固定后缺点是除去的信号以较低的特异性结合定量值

(fmol/mg组织)影响图像分析。尽管如此,经分析的大脑区域之间的比率仍然相同,这意味着各组之间特异性结合的差异是相等的。

[0242] 图像分析

[0243] 扫描磷光体成像板,并在富士BAS-5000磷光体成像仪(富士公司,日本东京)中处理所得图像。感兴趣区域(ROI)分析通过手动划定注射位点位来应用,所述手动划定注射位点基于通过荧光IHC显示的EM48免疫反应性。然后,使用微型标准物将6个切片的ROI的平均像素值转换为放射性值和结合密度(fmol/mg组织,组织湿重)。使用Multi Gauge 3.2磷光体成像仪软件(富士公司,日本东京)进行定量分析。通过由各切片的全部结合中减去非特异性结合水平来计算特异性结合。

[0244] 放射性合成

[0245] [11C]雷氯必利的放射性合成:在卡罗琳斯卡医学院如先前所述(Langer等(1999) Nucl Med Biol 26(5):509-18)使用[11C]三氟甲磺酸甲酯通过去甲基前体类似物的甲基化合成[11C]雷氯必利。纳入率>50%,而放射化学纯度>99%。

[0246] [18F]MNI659的放射性合成:如PMID 27856625中所述进行放射性合成。

[0247] 使用[11C]雷氯必利和[18F]MNI-659进行体内成像

[0248] 使用MedisonanoScan®PET-MRI和nanoScan®PET-CT临床前小动物成像系统进行PET测量。这两个系统具有相同的PET性能(Nagy等(2013) J.Nucl Med 54(10):1825-32),并经过校准以提供一致的结果。当动物为6.5-7月龄时,进行首次PET测量。在实验当天,通过吸入异氟烷(在100%氧气中的4-5%异氟烷)麻醉动物。诱导麻醉后,将异氟烷浓度降低至1.5-2%(50/50空气/氧气),并将动物置于扫描仪中指定的小鼠床上。将套管插入尾静脉,通过该套管给予放射性配体。静脉内注射放射性配体后立即开始63分钟的动态PET扫描。完成成像过程后,将动物放回其笼中。将这些动物饲养在卡罗琳斯卡医学院的动物部门饲养,直到10月龄,在那里使用相同的放射性配体重复进行成像。

[0249] 图像分析和统计学分析

[0250] 将所获取的列表模式数据重构为25个时间帧(63分钟扫描=4x10s、4x20 s、4x60 s、7x180 s、6x360 s)。图像重建使用具有20次迭代的完全三维的最大似然期望最大化算法(maximum-likelihood expectation maximization algorithm,MLEM)进行,没有散射和衰减校正。将重建的动态PET图像与PMOD中的内置小鼠MRI模板共对齐(co-register),所述PMOD还包括了感兴趣体积(VOI)设定(PMOD技术股份有限公司(PMOD Technologies Ltd.),瑞士苏黎世)。在这些VOI组的帮助下,生成衰减校正的时间活动曲线(TAC)。使用小脑作为参照区域,束缚势(binding potentia,BPND)在PMOD中用简化参照组织模型(simplified reference tissue model,SRTM)计算。根据下述公式计算左右纹状体之间的差异%:

[0251] 差异% = ((右纹状体-左纹状体)/(左纹状体) x100

[0252] 使用Windows的GraphPad Prism版本5.00(格拉夫派得软件有限公司(GraphPad Software Inc),美国圣地亚哥加利福尼亚),使用对象内配对t检验分析纹状体两侧之间的差异。此外,使用对象之间未配对的t检验分析对照治疗组和阻遏物治疗组之间左右纹状体之间的差异%。

[0253] 电生理学记录

[0254] 对于电生理学记录,将切片转移到配备有红外差分干涉对比的Olympus BX51立式

显微镜(60X/0.9NA物镜)上固定的浸没式记录室中。用Multiclamp 700B放大器进行全细胞膜片钳电生理学记录。以1KHz过滤信号,并用Digidata 1400转换为数字格式。用定制编写的WinFluor软件(John Dempster,英国格拉斯哥斯特拉思克莱德大学)获得电生理学记录的刺激和显示,所述软件同步双光子成像和电生理学。由iSPN或dSPN获得靶向的电生理学记录。膜片钳微电极(patch-pipette)(4-6M Ω)用Sutter Instruments水平拉出器使用具有细丝的硼硅酸盐玻璃制造,并用下述内容填充(mM):135KMeSO₄、5KCl、5HEPES、0.05EGTA、2ATP-Mg₂、0.5GTP-Na、10磷酸肌酸二(tris);用KOH将pH调节至7.25,并将渗透压调节至270-280mosM。为了记录树突棘和杆中的Ca²⁺瞬变,将细胞充满100 μ M氟-4五钾盐和25 μ MAlexa Fluor 568酰肼钠盐(英杰公司(Invitrogen))。在建立整个细胞配置后30分钟进行所有记录。神经元的电生理表征是在当前钳位配置下进行的。调节放大器桥接电路以补偿电极电阻。连续监测接入电阻(access resistance),并且如果观察到变化>20%,那么放弃实验。仅将稳定记录的神经元用于分析。因为接入电阻的变化,我们舍弃了30%的记录。膜电位保持在-80mV。导入数字化数据,用于使用商业软件(IGOR Pro 6.0, WaveMetrics, 俄勒冈州)进行分析。

[0255] 二光子Ca²⁺成像

[0256] Ca²⁺瞬变通过反向传播动作电位(bAP)激发(各自为5个bAP三联体;50Hz内部训练;5Hz训练之间;在ZFP实验中,bAP用单一50Hz三联体产生)。使用与具有820nm激发波长(脉冲频率为80MHz;脉冲持续时间为250fs)的可调激光器(Chameleon,相干激光集团公司(Coherent Laser Group),加利福尼亚州圣克拉拉)连接的Ultima激光扫描显微镜系统(布鲁克技术公司(Bruker Technologies),之前的Prairie公司)在与同一树突同平面部分的近端(50~60 μ m)和远端树突棘(>100 μ m)处记录Ca²⁺瞬变。来自Alexa Fluor 568的红色信号(580-630nm)用于显示树突,而来自氟-4的绿色信号(490-560nm)用于记录Ca²⁺瞬变。红色通道用于将获自近端和远端部分的信号标准化。因此,Ca²⁺瞬变表示为绿色和红色荧光之间的比率(G/R)。为了避免染料扩散伪影,仅考虑在同一焦平面中其红色荧光差异<10%的近侧和远侧树突状裂解物用于进行进一步分析。以每行512像素的分辨率和10 μ s/像素的停留时间获取线扫描信号。对于使用三联体bAP的ZFP实验,将IGOR Pro(WaveMetrics公司,俄勒冈州奥斯威戈湖)用于数据平滑和统计。平均荧光与时间的函数(F(t))是5个相邻像素的空间平均值,而基本荧光F₀是线扫描中前30个时间点的平均值。Ca²⁺信号中因电流注入引起的经标准化的差异($\Delta F/F_0$)定义为通过基础荧光标准化的最大荧光变化。

[0257] 二光子激光解笼(uncage)

[0258] 使用与显微镜(Ultima,布鲁克集团公司)连接的两个不同的飞秒脉冲同时进行二光子Ca²⁺成像和二光子激光解笼。将MNI-谷氨酸(5mM)融合到记录的区域中,并通过光刺激激光(Chameleon,相干激光集团公司,加利福尼亚州圣克拉拉)在720nm处激发。样品上的两个激光束分别由两组独立的检流扫描镜控制。将1ms的脉冲(约10mW)传递到位于同一对焦平面(5-10 μ m)的单棘突。校准单刺刺激,以使各经刺激的棘突产生1-2mV的躯体兴奋性突触后电位。使用定制书写软件(WinFluor)来同步Ca²⁺瞬变,电生理学记录和二光子激光刺激。

[0259] ZFP构建体

[0260] 通过Virovek(加利福尼亚州海沃德)将含有ZFP-D cDNA和未结合ZFP cDNA的质粒亚克隆并包装到AAV9中。N端NLS和C端FLAG标签标记的人突变Htt-阻遏物ZFP和tdTomato的

表达通过病毒2A切割肽桥接。将来自包含杂合亨廷顿蛋白 (HTT) 基因座的敲入转基因小鼠的纹状体衍生细胞系ST HDH Q7/111 (Coriell, CHDI-90000072) 用于测试ZFP介导的mHTT表达的阻遏,所述基因座具有人源化外显子1,其带有111个多聚谷氨酰胺重复序列,而其余具有野生型小鼠HTT,其带有7个聚谷氨酰胺重复序列。孵育过夜后,将细胞在12孔板中铺板,然后用携带ZFP-30645的AAV感染,并在感染72小时后收获,用于RNA分离。

[0261] A2a-Q175 HET中的ZFP介导阻遏

[0262] 在异氟烷麻醉的4月龄A2a-EGFP和A2a-EGFP/Q175 het小鼠的纹状体中进行携带ZFP和tdTomato基因的AAV的立体定向注射鼠 (ML = -1.7、AP = -0.98、DV = -3.6)。允许注射后小鼠恢复至少2个月。

[0263] Htt mRNA表达的实时定量PCR分析

[0264] 使用RNAeasy试剂盒 (凯杰公司) 由注射有ZFP AAV的小鼠的ST HDH Q7/111细胞和纹状体组织中分离RNA。用Superscript III RT酶 (生命技术公司) 对RNA进行反转录。使用ABI StepOnePlus rtPCR系统以SYBR-Green PCR主混合物 (引用生物系统公司 (Applied Biosystems), 加利福尼亚州福斯特城) 进行实时定量PCR。通过SYBR定量PCR使用2- $[\Delta]$ $[\Delta]$ Ct方法 (ABS, 用户公告2) 来评估不同转录本的相对丰度。下述引物 (IDT) 用于PCR扩增: 野生型小鼠Htt_fw: CAG GTC CGG CAG AGG AAC C (SEQ ID NO:22), 涂白呢小鼠Htt_Q175_fw: GCC CGG CTG TGG CTG A (SEQ ID NO:23), 突变和野生型Htt_rv*: TTC ACA CGG TCT TTC TTG GTG G (SEQ ID NO:24), ZFP_fw: CTG GCT GGT GGA GAG AGA AAT T (SEQ ID NO:25) 和ZFP_rv: TCG TCG TCC TTG TAG TCA ACT GA (SEQ ID NO:26), (*野生型和突变HTT共有相同的反向引物序列)。简言之,使用下述公式将实验Ct针对GAPDH值标准化: $\Delta Ct = Ct (Htt) - Ct (GAPDH)$ 。使用下述公式计算相对于对照的表达水平: $\Delta \Delta Ct = Ct (处理的) - \Delta Ct (对照)$ 。使用公式 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 获得最终表达水平。

[0265] 实施例2: 鉴定选择性阻遏携带扩增的多聚-CAG束的HTT等位基因的ZFP-TF

[0266] 在进行这些研究时,可能无法预测靶向多聚CAG的ZFP-TF的结合特性,所述靶向多聚CAG的ZFP-TF表现出高度的协同作用并在其阻遏Htt的能力上表现出对多聚CAG束长度的强烈依赖性 (图1A)。此外,为解决这样的事实难题,即能够使等位基因特异性应答的环境因素在模型系统中难以模拟,我们所追求的策略强调在患者细胞中内源性HTT启动子的情况下筛选直接针对原位等位基因特异性阻遏的ZFP-TF的不同的组。

[0267] 因此,在患者细胞中内源性Htt启动子的背景下,筛选直接针对原位等位基因特异性阻遏的不同ZFP-TF组。如图1B和1C以及下述表1和表2所示,组装了41个不同ZFP的组 (基本上如美国专利号8,841,260中所述),其在多聚CAG束内具有多种结构,目标长度和结合周期性 (periodicity)。各ZFP与来自KOX1蛋白的KRAB转录阻遏结构域连接,如之前所述。按照惯例,ZFP由一指模块或两指模块组装,并且蛋白质在ZFP模块之间使用不同的指接头 (在下表1中称之为“Mod链接”)。使用的接头如下所示:“0a”是TGEKPFQ (SEQ ID NO:27);“0c”是TGSQKPFQ (SEQ ID NO:28);“1c”是

[0268] THPRAPIPKPFQ (SEQ ID NO:88);“2f”是TPNPHRRTPSHKPFQ (SEQ ID NO:29)。0a和0c接头不跳过模块之间的任何核苷酸碱基,而1c和2f分别跳过1bp和2bp。

[0269] 表1: 锌指设计

[0270]

ZFP ID	ZFP 别名	模型 1			模型 2			模型 3	
		F1	F2	Mod 链接	F3	F4	Mod 链接	F5	F6
ZFP -1	30639	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	QWSTRKR (SEQ ID NO:31)	0c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	QWSTRKR (SEQ ID NO:31)	0c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	QWSTRKR (SEQ ID NO:31)
ZFP -2	30640 - "ZFP-A"	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	QWSTRKR (SEQ ID NO:31)	0c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	QWSTRKR (SEQ ID NO:31)	0a	QSGDLTR (SEQ ID NO:32)	N/A
ZFP -3	30641	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	QWSTRKR (SEQ ID NO:31)	0c	QSGDLTR (SEQ ID NO:32)	N/A	0a	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	QWSTRKR (SEQ ID NO:31)
ZFP -4	30642	QSGDLTR (SEQ ID NO:32)	N/A	0a	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	QWSTRKR (SEQ ID NO:31)	0c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	QWSTRKR (SEQ ID NO:31)
ZFP -5	30643	RSDNLSE (SEQ ID NO:33)	KRCNLRC (SEQ ID NO:34)	1c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	QWSTRKR (SEQ ID NO:31)	0c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	QWSTRKR (SEQ ID NO:31)
ZFP -6	30644	RSDNLSE (SEQ ID NO:33)	KRCNLRC (SEQ ID NO:34)	0c	RSDNLSE (SEQ ID NO:33)	KRCNLRC (SEQ ID NO:34)	1c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	QWSTRKR (SEQ ID NO:31)
ZFP -7	30645 - "ZFP-D"	RSDNLSE (SEQ ID NO:33)	KRCNLRC (SEQ ID NO:34)	1c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	QWSTRKR (SEQ ID NO:31)	0a	QSGDLTR (SEQ ID NO:32)	N/A
ZFP -8	30646	RSDNLSE (SEQ ID NO:33)	KRCNLRC (SEQ ID NO:34)	1c	QSGDLTR (SEQ ID NO:32)	n/a	0a	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	QWSTRKR (SEQ ID NO:31)
ZFP -9	30647	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	QWSTRKR (SEQ ID NO:31)	2f	RSDNLSE (SEQ ID NO:33)	KRCNLRC (SEQ ID NO:34)	1c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	QWSTRKR (SEQ ID NO:31)
ZFP -10	33078	RSDNLSE (SEQ ID NO:33)	KRCNLRC (SEQ ID NO:34)	2f	MACCRYA (SEQ ID NO:35)	n/a	2f	QSGDLTR (SEQ ID NO:32)	QSGDLTR (SEQ ID NO:32)
ZFP -11	33079	MACCRYA (SEQ ID NO:35)	n/a	0a	MACCRYA (SEQ ID NO:35)	n/a	2f	QSGDLTR (SEQ ID NO:32)	QSGDLTR (SEQ ID NO:32)
ZFP -12	33080	QSGDLTR (SEQ ID NO:32)	QSGDLTR (SEQ ID NO:32)	2f	RSDNLSE (SEQ ID NO:33)	KRCNLRC (SEQ ID NO:34)	1c	QSGDLTR (SEQ ID NO:32)	QSGDLTR (SEQ ID NO:32)
ZFP -13	33060	RSDNLSE (SEQ ID NO:33)	RLWNRKQ (SEQ ID NO:36)	1c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	QWSTRKR (SEQ ID NO:31)		N/A	N/A
ZFP -14	33061	RSDNLSE (SEQ ID NO:33)	KRCNLRC (SEQ ID NO:34)	1c	QSGDLTR (SEQ ID NO:32)	QSGDLTR (SEQ ID NO:32)		N/A	N/A
ZFP -15	30648 - "ZFP-C"	RSDNLSE (SEQ ID NO:33)	KRCNLRC (SEQ ID NO:34)	0c	RSDNLSE (SEQ ID NO:33)	KRCNLRC (SEQ ID NO:34)	0c	RSDNLSE (SEQ ID NO:33)	KRCNLRC (SEQ ID NO:34)

ZFP -16	30649	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	QWSTRKR (SEQ ID NO:31)	0c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	QWSTRKR (SEQ ID NO:31)	2f	RSDNLSE (SEQ ID NO:33)	KRCNLRC (SEQ ID NO:34)
ZFP -17	30650	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	QWSTRKR (SEQ ID NO:31)	2f	RSDNLSE (SEQ ID NO:33)	KRCNLRC (SEQ ID NO:34)	0c	RSDNLSE (SEQ ID NO:33)	KRCNLRC (SEQ ID NO:34)
ZFP -18	30651	RSDNLSE (SEQ ID NO:33)	KRCNLRC (SEQ ID NO:34)	1c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	QWSTRKR (SEQ ID NO:31)	2f	RSDNLSE (SEQ ID NO:33)	KRCNLRC (SEQ ID NO:34)
ZFP -19	33074 - "ZFP- B"	RSDNLSE (SEQ ID NO:33)	KRCNLRC (SEQ ID NO:34)	1c	QSGDLTR (SEQ ID NO:32)	QSGDLTR (SEQ ID NO:32)	2f	RSDNLSE (SEQ ID NO:33)	KRCNLRC (SEQ ID NO:34)
ZFP -20	33076	QSGDLTR (SEQ ID NO:32)	QSGDLTR (SEQ ID NO:32)	1c	MACCRYA (SEQ ID NO:35)	n/a	1c	RSDNLSE (SEQ ID NO:33)	KRCNLRC (SEQ ID NO:34)
ZFP -21	33077	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	QWSTRKR (SEQ ID NO:31)	2f	RSDNLSE (SEQ ID NO:33)	KRCNLRC (SEQ ID NO:34)		N/A	N/A
ZFP -22	30656	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	HRSTRNR (SEQ ID NO:37)	0c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	HRSTRNR (SEQ ID NO:37)	0c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	HRSTRNR (SEQ ID NO:37)
ZFP -23	30657	RSDTLSE (SEQ ID NO:38)	RRWTLVG (SEQ ID NO:39)	1c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	HRSTRNR (SEQ ID NO:37)	0c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	HRSTRNR (SEQ ID NO:37)
ZFP -24	30658	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	HRSTRNR (SEQ ID NO:37)	0c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	HRSTRNR (SEQ ID NO:37)	0a	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	N/A
ZFP -25	30659	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	HRSTRNR (SEQ ID NO:37)	0c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	n/a	0a	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	HRSTRNR (SEQ ID NO:37)
ZFP -26	30660	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	n/a	0a	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	HRSTRNR (SEQ ID NO:37)	0c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	HRSTRNR (SEQ ID NO:37)
ZFP -27	30661	RSDTLSE (SEQ ID NO:38)	RRWTLVG (SEQ ID NO:39)	0c	RSDTLSE (SEQ ID NO:38)	RRWTLVG (SEQ ID NO:39)	1c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	HRSTRNR (SEQ ID NO:37)
ZFP -28	30662	RSDTLSE (SEQ ID NO:38)	RRWTLVG (SEQ ID NO:39)	1c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	HRSTRNR (SEQ ID NO:37)	0a	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	N/A
ZFP -29	30663	RSDTLSE (SEQ ID NO:38)	RRWTLVG (SEQ ID NO:39)	1c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	n/a	0a	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	HRSTRNR (SEQ ID NO:37)
ZFP -30	30665	RSDTLSE (SEQ ID NO:38)	RRWTLVG (SEQ ID NO:39)	0c	RSDTLSE (SEQ ID NO:38)	RRWTLVG (SEQ ID NO:39)	0c	RSDTLSE (SEQ ID NO:38)	RRWTLVG (SEQ ID NO:39)
ZFP -31	30666	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	HRSTRNR (SEQ ID NO:37)	0c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	HRSTRNR (SEQ ID NO:37)	2f	RSDTLSE (SEQ ID NO:38)	RRWTLVG (SEQ ID NO:39)

[0271]

[0272]

ZFP -32	30667	RSDTLSE (SEQ ID NO:38)	RRWTLVG (SEQ ID NO:39)	1c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	HRSTRNR (SEQ ID NO:37)	2f	RSDTLSE (SEQ ID NO:38)	RRWTLVG (SEQ ID NO:39)
ZFP -33	33062	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	HRSTRNR (SEQ ID NO:37)	0a	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	N/A	N/A	N/A	N/A
ZFP -34	33063	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	QSSDLRR (SEQ ID NO:40)	0a	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	N/A	N/A	N/A	N/A
ZFP -35	33064	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	n/a	0a	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	QSSDLRR (SEQ ID NO:40)	N/A	N/A	N/A
ZFP -36	33084	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	HRSTRNR (SEQ ID NO:37)	2f	RSDTLSE (SEQ ID NO:38)	RRWTLVG (SEQ ID NO:39)	N/A	N/A	N/A
ZFP -37	33086	RSDTLSE (SEQ ID NO:38)	RRWTLVG (SEQ ID NO:39)	1c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	n/a	2f	RSDTLSE (SEQ ID NO:38)	RRWTLVG (SEQ ID NO:39)
ZFP -38	33087	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	HRSTRNR (SEQ ID NO:37)	2f	RSDTLSE (SEQ ID NO:38)	RRWTLVG (SEQ ID NO:39)	1c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	N/A
ZFP -39	33088	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	HRSTRNR (SEQ ID NO:37)	2f	RSVLSE (SEQ ID NO:41)	n/a	1c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	HRSTRNR (SEQ ID NO:37)
ZFP -40	33089	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	HRSTRNR (SEQ ID NO:37)	2f	RSDVLSE (SEQ ID NO:42)	n/a	1c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	n/a
ZFP -41	33090	RSDVLSE (SEQ ID NO:42)	n/a	1c	QSSDLSR (SEQ ID NO:30)	HRSTRNR (SEQ ID NO:37)	2f	RSDVLSE (SEQ ID NO:42)	n/a
	45249	DTGLLNR (SEQ ID NO:69)	QSGDLTR (SEQ ID NO:32)	0c	DTGLLNR (SEQ ID NO:69)	QSGDLTR (SEQ ID NO:32)	2f	KRCNLRC (SEQ ID NO:34)	SSYNLKT (SEQ ID NO:70)

[0273] 表2: 锌指靶位点

[0274]

ID	别名	链	大小	结合位点(大写字母显示接触的核苷酸)	SEQ ID NO.
ZFP-1		上链 (Top)	6F	GCAGCAGCAGCAGCAGCA	43
ZFP-2	ZFP-A	上链	5F	GCAGCAGCAGCAGCA	44
ZFP-3		上链	5F	GCAGCAGCAGCAGCA	44
ZFP-4		上链	5F	GCAGCAGCAGCAGCA	44
ZFP-5		上链	6F	GCAGCAGCAGCAgCAGCAG	45
ZFP-6		上链	6F	GCAGCAgCAGCAGCAGCAG	45
ZFP-7	ZFP-D	上链	5F	GCAGCAGCAgCAGCAG	46
ZFP-8		上链	5F	GCAGCAGCAgCAGCAG	46
ZFP-9		上链	6F	GCAGCAgCAGCAGcaGCAGCA	47
ZFP-10		上链	5F	GCAGCAgcAGCagCAGCAG	45
ZFP-11		上链	4F	GCAGCAgcAGCAGC	90
ZFP-12		上链	6F	GCAGCAgCAGCAGcaGCAGCA	47
ZFP-13		上链	4F	GCAGCAgCAGCAG	48
ZFP-14		上链	4F	GCAGCAgCAGCAG	48
ZFP-15	ZFP-C	上链	6F	CAGCAGCAGCAGCAGCAG	49
ZFP-16		上链	6F	CAGCAGcaGCAGCAGCAGCA	50
ZFP-17		上链	6F	CAGCAGCAGCAGcaGCAGCA	50
ZFP-18		上链	6F	CAGCAGcaGCAGCAgCAGCAG	51
ZFP-19	ZFP-B	上链	6F	CAGCAGcaGCAGCAgCAGCAG	51
ZFP-20		上链	5F	CAGCAGcAGCaGCAGCA	52
ZFP-21		上链	4F	CAGCAGcaGCAGCA	53
ZFP-22		下链 (Bottom)	6F	GCTGCTGCTGCTGCTGCT	54
ZFP-23		下链	6F	GCTGCTGCTGCTgCTGCTG	55
ZFP-24		下链	5F	GCTGCTGCTGCTGCT	56
ZFP-25		下链	5F	GCTGCTGCTGCTGCT	56
ZFP-26		下链	5F	GCTGCTGCTGCTGCT	56
ZFP-27		下链	6F	GCTGCTgCTGCTGCTGCTG	55
ZFP-28		下链	5F	GCTGCTGCTgCTGCTG	57
ZFP-29		下链	5F	GCTGCTGCTgCTGCTG	57
ZFP-30		下链	6F	CTGCTGCTGCTGCTGCTG	58
ZFP-31		下链	6F	CTGCTGctGCTGCTGCTGCT	59
ZFP-32		下链	6F	CTGCTGctGCTGCTgCTGCTG	60
ZFP-33		下链	3F	GCTGCTGCT	61
ZFP-34		下链	3F	GCTGCTGCT	61
ZFP-35		下链	3F	GCTGCTGCT	61
ZFP-36		下链	4F	CTGCTGctGCTGCT	62

[0275]	ZFP-37		下链	5F	CTGCTGctGCTgCTGCTG	58
	ZFP-38		下链	5F	GCTgCTGCTGctGCTGCT	54
	ZFP-39		下链	5F	GCTGCTgCTGctGCTGCT	54
	ZFP-40		下链	4F	GCTgCTGctGCTGCT	56
	ZFP-41		下链	4F	CTGctGCTGCTgCTG	63
	45249		上链	6F	CAGCAGcaGCAGCAGCAGCA	68

[0276] *大写字母显示的核苷酸与DNA结合结构域接触;小写字母显示未接触的核苷酸

[0277] 然后筛选这些蛋白质在经由RNA核转染递送到来自两名不同的HD患者的成纤维细胞时的等位基因选择性阻遏,两名患者各自携带突变和野生型聚CAG束长度的不同组合(图1D)。经由基于SNP的等位基因特异性qRT-PCR实现对野生型和突变转录本水平的独立监测(图1A和图6)。

[0278] 该筛选得到不同范围的Htt的阻遏行为,包括等位基因特异性对一些设计的明确证据(参见例如,图1D)。

[0279] 实施例3:宽ZFP剂量范围的mHTT的等位基因选择性阻遏

[0280] 我们接下来扩展评估了与等位基因特异性阻遏相容的剂量范围,以及Htt蛋白产物的定量,使用选择性地阻遏初始筛选中突变等位基因的两种ZFP-TFS(ZFP-A和ZFP-B,图1C)。下表3提供了ZFP-A到ZFP-D的完整序列。

[0281] 表3:ZFP-A、ZFP-B、ZFP-C和ZFP-D的氨基酸序列

ZFP ID	别名	AA 序列 (<u>螺旋</u> , <u>模块内接头</u> , <u>模块间接头</u>)
ZFP-A	ZFP-02	MAPKKKRKVGIHGVPAAAMAERPFQCRICMRNFS QSSDL SRHIRTHTG EKPFACDICGRKFA QWSTRKR HTKIHTGSQKPFQCRICMRNFS QSSDL SR HIRTHTGKPFACDICGRKFA QWSTRKR HTKIHTGKPFQCRICMRK FA QSGDLTR HTKIHLRQKDAARGSGMDAKSLTAWSRTLVTFKDVFDV FTREEWKLLDTAQQIVYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEE PWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSV (SEQ ID NO:64)
ZFP-B	ZFP-19	MAPKKKRKVGIHGVPAAAMAERPFQCRICMRNFS RS DNLSEHIRTHTG EKPFACDICGRKFA KRCNL RCHTKIHTHPRAPIKPFQCRICMRNFS QS GD LTRHIRTHTGKPFACDICGRKFA QSGDLTR HTKIHTPNPHRRDPS HK PFQCRICMRNFS RS DNLSEHIRTHTGKPFACDICGRKFA KRCNL R HTKIHLRQKDAARGSGMDAKSLTAWSRTLVTFKDVFDVFTREEWKLLD TAQQIVYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQ ETHPDSETAFEIKSSV (SEQ ID NO:65)
ZFP-C	ZFP-15	MAPKKKRKVGIHGVPAAAMAERPFQCRICMRNFS RS DNLSEHIRTHTG EKPFACDICGRKFA KRCNL RCHTKIHTGSQKPFQCRICMRNFS RS DNLS E HIRTHTGKPFACDICGRKFA KRCNL RCHTKIHTGSQKPFQCRICMRN FS RS DNLSEHIRTHTGKPFACDICGRKFA KRCNL RCHTKIHLRQKDA ARGSGMDAKSLTAWSRTLVTFKDVFDVFTREEWKLLDTAQQIVYRNV MLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIK SSV (SEQ ID NO:66)
ZFP-D	ZFP-07	MAPKKKRKVGIHGVPAAAMAERPFQCRICMRNFS RS DNLSEHIRTHTG EKPFACDICGRKFA KRCNL RCHTKIHTHPRAPIKPFQCRICMRNFS QS D LSRHIRTHTGKPFACDICGRKFA QWSTRKR HTKIHTGKPFQCRICM RKFA QSGDLTR HTKIHLRQKDAARGSGMDAKSLTAWSRTLVTFKDV VDFTRREEWKLLDTAQQIVYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEK GEEPWLVEREIHQETHPDSETAFEIKSSV (SEQ ID NO:67)

[0282] 如图1E所示,在CAG15/67 (SEQ ID NOS:81/82) 成纤维细胞的研究中,ZFP-A和ZFP-B ZFP-TF表现出对扩增等位基因的排他性阻遏。此外,如图1F所示,两个阻遏物显示出仅选择性降低mHtt蛋白,通过Western印迹(图1F,比较上条带(mHtt)和下条带(wtHtt))测量。

[0284] 接下来,我们在如上所述的滴定研究中评估了这些ZFP-TF。

[0285] 如图1G所示,观察宽剂量范围的等位基因特异性阻遏。特别地,ZFP-B在100倍递送的RNA剂量范围(10ng-1000ng递送的RNA)表现出对疾病等位基因>92%的阻遏并且其 EC_{50} 为2.58ng (R^2 0.96),并且对野生型HTT没有阻遏。值得注意的是,ZFP表达在该剂量范围内反映了递送的RNA水平。总之,这些研究确定了设计的ZFP-TF可以在100倍ZFP表达范围内排他性下调mHTT转录本,从而导致选择性减少mHTT蛋白产物。

[0286] 实施例4:多种HD基因型之间的等位基因选择性阻遏

[0287] 我们接下来在携带代表HD群体的多聚CAG束的成纤维细胞中进行了滴定研究(图1H)。为实现此目的,首先在GM02151成纤维细胞中评估了阻遏物ZFP-A和ZFP-B,它们表现出具有18个(SEQ ID NO:79)和45个重复序列(SEQ ID NO:80)的多聚CAG束。

[0288] 如图1G所示,ZFP-A和ZFP-B在约100倍剂量范围内选择性阻遏mHTT,并且在任何剂量下所观察到CAG18(SEQ ID NO:79)等位基因的阻遏<15%。

[0289] 此外,还在患者成纤维细胞中检测阻遏物的作用,所述患者成纤维细胞在野生型和突变多聚CAG束长度之间具有非典型窄分离,21(SEQ ID NO:83)和38个重复(SEQ ID NO:

84)。

[0290] 如图1H所示,ZFP-A和ZFP-B在100倍的剂量(ZFP-AEC50=9.8ng,R2=0.94;ZFP-B EC50=3.9ng,R2=0.94)上驱动CAG38等位基因(SEQ ID NO:84)的选择性和有力阻遏(最高93%减少),不过在较高剂量下观察到CAG21等位基因(SEQ ID NO:83)的一些阻遏(通常<25%) (图IJ)。

[0291] 这些结果证实,本文所述的设计的遗传阻遏物在100倍ZFP水平范围可以驱动内源等位基因选择性阻遏,这基本上大于之前证明靶向多聚CAG的其他方式(例如,ASO或RNAi,参见,Gagnon等,同上;Hu等,同上;和Yu等,同上)。此外,通过分组(bracket)对阻遏易感(CAG≥38)或对阻遏具有抗性(CAG≤21)的等位基因长度,这些研究强调了ZFP-A和ZFP-B下调100%完全外显的突变等位基因(CAG>39)的能力,同时区分了HD患者中存在的至少87%的正常等位基因(图1H)。

[0292] 由ZFP-A和ZFP-B所展现出的高程度的等位基因选择性与之前研究(Garriga-Canut等,同上)中报道的HTT阻遏物形成对比,所述之前研究表现出对多聚CAG束长度低得多的敏感性。我们怀疑这样的区别是由于我们已经在更加严格和疾病相关的设置(患者成纤维细胞)中筛选了等位基因选择性,这使我们能够区分表现出真正功能性协同的稀有阻遏物,有别于通过简单的质量作用(mass action)以较低有效性区分等位基因的较常见设计。与此一致,在Garriga-Canut的小鼠细胞系统(HdhQ7/Q111,分别包括4(SEQ ID NO:86)和111(SEQ ID NO:87)个连续CAG重复等位基因)中对于我们的候选设计的评估产生了更高频率的明显等位基因选择性命中(hit),其中25个ZFP-TFS表现出mHTT减少>75%和野生型HTT减少<10%(图8)。在之相反,只有3个ZFP-TFS在我们更严格的患者成纤维细胞筛选模型(CAG 18/45(SEQ ID NO:79/80))产生定量可比较行为。与此观察一致,仅在CAG 4/111细胞中具有等位基因选择性的对照ZFP(ZFP-C)(SEQ ID NOS 86/87)在用于表征ZFP-A和ZFP-B的同一后续研究中不具有等位基因选择性(参见图1E-1J)。最后,对于来自Garriga-Canut等,同上的两个先导(lead)ZFP的直接评价显示在具有疾病相关多聚CAG束(CAG 18/45(SEQ ID NOS:79/80))的成纤维细胞(GM02151)中测试时(图9)都不展现等位基因选择性。

[0293] 实施例5:人神经元和小鼠纹状体中mHTT的长期等位基因选择性阻遏和HD相关表型的改善

[0294] 因为HD病理学的特征在于神经元功能障碍,我们进行了一个系列研究,以评估神经元干细胞(NSC)和分化自良好表征的CAG17/48(SEQ ID NOS:76/78)胚胎干细胞(ESC;Genea020)系的神经元中的ZFP性能(图2A;图10)。初始研究询问等位基因特异性阻遏,如上所述。

[0295] 如图2B所示,经由瞬态mRNA转染递送ZFP揭示了宽剂量范围的等位基因选择性阻遏,类似于实施例1中所述的结果。特别地,ZFP-B在100倍递送的RNA剂量范围(30ng-3,000ng)表现出对疾病等位基因>90%的阻遏,并且对野生型HTT没有阻遏。在分化的神经元中,经由AAV转导递送ZFP也产生了高度等位基因特异性阻遏(图2C;参见下表4关于该研究中使用的所有AAV载体的总结),虽然在CAG17(SEQ ID NO:76)中适度减少(对于ZFP-A和ZFP-B分别为大约17%和8%),这可能反映在该系统中较高的ZFP表达水平。与其在HD成纤维细胞中的行为相似,ZFP-C在NSC和神经元中强烈阻遏正常和疾病等位基因。

[0296] 表4:用于该研究的AAV血清型和转基因

[0297]

图	血清型	转基因（启动子、阻遏物、标签等）
2c	AAV2/6	CMV.ZFP-A.KRAB、CMV.ZFP-B.KRAB、CMV.ZFP-C.KRAB、CMV.eGFP
2k、l	AAV2/6	CMV.ZFP-B.KRAB、CMV.eGFP
3b-g	AAV2/6	CMV.ZFP-B.KRAB、CMV.eGFP
4a、b	AAV2/1+2	SYN1.ZFP-B.KRAB、SYN1.ΔDBD.KRAB
4d、h、n	AAV2/1+2	SYN1.ZFP-B.KRAB.T2A.eGFP
4e-g	AAV2/1+2	SYN1.ZFP-B.KRAB.T2A.eGFP、SYN1.eGFP
4i-k、m、o、p	AAV2/1+2	SYN1.ZFP-B.KRAB.T2A.eGFP、SYN1.ΔDBD.KRAB.T2A.eGFP、SYN1.eGFP
4q	AAV2/9	SYN1.ZFP-D.KRAB.T2A.tdTomato
4r-t	AAV2/9	SYN1.ZFP-D.KRAB.T2A.tdTomato、SYN1.ΔDBD.KRAB.T2A.tdTomato
5b-e	AAV2/1+2	SYN1.ZFP-D.KRAB.FLAG、SYN1.eGFP
5f	AAV2/1+2	SYN1.ZFP-D.KRAB.FLAG
13	AAV2/6	CMV.ZFP-B.KRAB、CMV.eGFP
14A、B	AAV2/1+2	SYN1.eGFP
14C	AAV2/1+2	SYN1.ΔDBD.KRAB.T2A.eGFP
15A	AAV2/1+2	SYN1.eGFP
15B-G	AAV2/1+2	SYN1.ZFP-B.KRAB.FLAG、SYN1.ΔDBD.KRAB.FLAG
16A、B	AAV2/1+2	SYN1.ZFP-D.KRAB.FLAG
16C-E	AAV2/1+2	SYN1.ZFP-D.KRAB.FLAG、SYN1.ΔDBD.KRAB.FLAG
17G-I	AAV2/1+2	SYN1.ZFP-A.KRAB.T2A.eGFP、SYN1.ZFP-B.KRAB.T2A.eGFP、SYN1.ΔDBD.KRAB.T2A.eGFP

[0298] 我们接下来检验了ZFP以证明细胞耐受性和持久功效。为此,将慢病毒递送用于驱动NSC和神经元中持续103天的研究的长期ZFP表达。在27天后,感染的NSC经扩增并针对ZFP表达进行FACS富集,扩增51天,并最终分化成神经元并进一步培养25天;在第74和103天评估等位基因表达(图2A)。

[0299] 如图2D和2E所示,调控是高度选择性的(CAG48(SEQ ID NO:78)减少>88%,CAG17(SEQ ID NO:76)阻遏<12%)并且在第二个取样日不减少,这表明ZFP表达在所有研究阶段期间被良好耐受。与该结果一致的是,通过微阵列进行的转录组范围特异性分析(n=18,149个查询的基因)揭示了稳健中靶等位基因特异性调控条件下CAG17/48(SEQ ID NO:76/78)神经元((n=5,ZFP-A;n=16,ZFP-B),图2F;下表5)以及CAG18/45(SEQ IDNO:79/80)成纤维细胞((n=10,ZFP-A;N=5,ZFP-B),图11A;下表6)中有限水平的脱靶基因阻遏(图11)。明显更多数量的基因在神经元(n=53)和成纤维细胞(n=45)中被非等位基因选择性ZFP-C阻遏,其中大部分在1kb的TSS内包含CAG阵列(图2G,图11D)。微阵列性能被对照转录本组的定量RT-PCR广泛地确认(图11B和11C)。重要的是,微阵列数据的资格(membership)分析揭示,通过ZFP-A和ZFP-B调控的基因之间没有重叠(图2G,图11D),并且对应启动子的检测显示基因是否被调节和CAG重复序列的存在、长度或位置之间没有严格的对应(参见,表5和

6)。总之,这些结果排除了靶向CAG的方法的等位基因特异性mHTT阻遏可能不可避免地阻遏具有更长和/或更容易结合的重复阵列的某些其他基因的可能性,而是表明进一步优化我们的设计会产生独特阻遏mHtt的ZFP-TF。

[0300] 表5:神经元中ZFP A、B和C的微阵列分析结果

ZFC ZFP	基因符号	Chr	链	ZFP 相对对照, 倍数变化			ZFP 相对对照, P 值			TSS 距离 (bp)	总 CAG	连续 CAG	位点长度 (bp)
				ZFP-A	ZFP-B	ZFP-C	ZFP-A	ZFP-B	ZFP-C				
ZFP-A	NAP1L3	chrX	-	-3.13	-1.07	-6.81	2.41E-16	1.57E-01	3.54E-21	393	19	6	87
ZFP-A	ABHD15	chr17	-	-2.53	-1.00	-1.02	1.79E-13	8.20E-01	8.43E-01	-1278	3	2	18
ZFP-A	GLS	chr2	+	-2.36	-1.60	-3.42	5.49E-11	1.45E-06	1.12E-14	36	15	15	57
ZFP-A	CRYAB	chr11	-	-2.22	1.07	-1.01	1.55E-12	2.96E-01	8.62E-01	18692	5	4	24
ZFP-A	ESYT1	chr12	+	-2.13	-1.07	1.05	1.64E-15	6.12E-02	5.67E-01	37306	4	4	21
ZFP-A	NRP2	chr2	+	2.04	-1.19	-1.37	1.23E-07	2.07E-01	2.64E-03	138	7	4	36
ZFP-A	EZR	chr6	-	2.19	-1.01	-2.03	8.67E-06	9.66E-01	2.96E-05	-4829	3	1	21
ZFP-B	IL17RA	chr22	+	-1.06	-8.44	1.05	4.72E-01	3.32E-16	9.39E-01	174	6	2	27
ZFP-B	MBD5	chr2	+	-1.35	-4.50	-3.26	4.13E-05	2.48E-17	8.34E-15	0	19	5	75
ZFP-B	COL13A1	chr10	+	1.03	-3.87	1.22	6.55E-01	5.81E-15	1.27E-02	-1415	4	2	18
ZFP-B	FLG	chr1	-	-1.04	-3.73	-1.26	5.46E-01	3.67E-16	7.66E-04	-7428	4	1	18
ZFP-B	KCNN3	chr1	-	-1.84	-3.64	-2.12	2.00E-07	9.82E-14	1.16E-08	396	11	7	45
ZFP-B	CPEB1	chr15	-	-1.00	-3.28	1.06	8.36E-01	4.83E-14	2.63E-01	-9805	4	2	18
ZFP-B	ADSSL1	chr14	+	-1.09	-3.04	1.04	2.59E-01	4.94E-13	5.71E-01	-4474	4	2	18
ZFP-B	DACH1	chr13	-	-1.16	-2.89	-5.01	7.13E-04	5.79E-18	5.90E-22	408	22	7	87
ZFP-B	RNF215	chr22	-	-1.09	-2.87	-1.35	1.29E-01	8.58E-13	4.73E-04	139	9	5	39
ZFP-B	GALNT5	chr2	+	1.05	-2.64	-1.24	3.79E-01	5.12E-11	2.89E-03	385	9	8	36
ZFP-B	CIZ1	chr9	-	1.02	-2.62	-1.22	7.71E-01	5.92E-17	1.26E-04	7	24	6	96
ZFP-B	CCDC90B	chr11	-	1.08	-2.58	1.13	5.99E-02	5.93E-13	4.65E-02	-2E+0	5	3	18
ZFP-B	MBP	chr18	-	1.02	-2.23	1.04	7.49E-01	5.53E-11	6.87E-01	-6231	4	3	18
ZFP-B	MAB21L1; MIR548F5	chr13	-	-1.53	-2.08	-10.69	2.02E-05	1.01E-09	2.12E-20	851	19	19	66
ZFP-B	GJB2	chr13	-	-1.07	-2.03	1.07	3.45E-01	1.15E-08	5.60E-01	-4700	3	1	18
ZFP-B	ADAM21	chr14	+	1.21	2.46	1.43	8.56E-02	3.59E-09	1.77E-03	49998	5	3	18
ZFP-C	MAB21L1; MIR548F5	chr13	-	-1.53	-2.08	-10.69	2.02E-05	1.01E-09	2.12E-20	851	19	19	66
ZFP-C	ASCL1	chr12	+	-1.51	-1.91	-9.29	8.37E-08	1.11E-10	2.81E-23	202	3	2	21
ZFP-C	SERPINB8	chr18	+	-1.29	-1.06	-6.86	7.07E-03	2.92E-01	2.58E-18	0	6	6	33
ZFP-C	NAP1L3	chrX	-	-3.13	-1.07	-6.81	2.41E-16	1.57E-01	3.54E-21	393	19	6	87

[0301]

[0302]

ZFP-C	SLC7A1 1	chr4	-	-1.39	-1.59	-6.16	8.06E-08	4.01E-10	1.10E-23	15	7	7	30
ZFP-C	SRPX	chrX	-	-1.43	-1.19	-5.95	3.36E-05	2.41E-03	4.67E-20	132	12	7	48
ZFP-C	DACH1	chr13	-	-1.16	-2.89	-5.01	7.13E-04	5.79E-18	5.90E-22	408	22	7	87
ZFP-C	IRS1	chr2	-	-1.21	1.03	-4.67	1.89E-03	2.48E-01	2.24E-19	363	11	8	48
ZFP-C	RAET1G ; RAET1L ; ULBP2	chr6	+	-1.07	-1.08	-4.44	5.01E-01	3.07E-01	3.85E-15	111	3	2	18
ZFP-C	GLS	chr2	+	-2.14	-1.51	-3.56	1.39E-12	1.51E-07	2.23E-17	36	15	15	57
ZFP-C	PAPD5	chr16	+	-1.17	-1.09	-3.48	3.87E-03	1.62E-01	8.13E-18	-4	6	6	30
ZFP-C	ULBP2	chr6	+	-1.04	1.04	-3.32	3.77E-01	7.84E-01	1.33E-13	111	3	2	18
ZFP-C	THAP11	chr16	+	-1.65	-1.51	-3.32	4.01E-09	9.16E-08	1.40E-17	778	25	10	93
ZFP-C	MBD5	chr2	+	-1.35	-4.50	-3.26	4.13E-05	2.48E-17	8.34E-15	0	19	5	75
ZFP-C	CRIP1	chr2	+	-1.04	-1.02	-3.11	3.61E-01	8.71E-01	4.58E-12	6	6	30	80
ZFP-C	IRF2BPL	chr14	-	-1.09	-1.00	-3.10	1.24E-02	8.84E-01	2.48E-20	1214	19	10	75
ZFP-C	ATRN	chr20	+	-1.03	-1.01	-3.09	5.28E-01	6.73E-01	1.10E-19	173	5	5	30
ZFP-C	FAM15 5A	chr13	-	-1.61	-1.41	-3.05	4.68E-06	3.68E-04	1.11E-12	347	22	9	93
ZFP-C	THSD7A	chr7	-	-1.17	-1.46	-2.98	5.21E-02	2.53E-04	1.17E-11	319	12	4	57
ZFP-C	PPP2R2 B	chr5	-	-1.21	-1.16	-2.92	1.10E-03	2.16E-03	2.79E-17	2	12	10	42
ZFP-C	RAET1L ; ULBP2	chr6	+	-1.13	1.04	-2.87	7.26E-02	6.42E-01	2.27E-13	111	3	2	18
ZFP-C	HTT; MSANT D1	chr4	+	-1.48	-1.77	-2.81	2.45E-06	3.19E-09	2.16E-14	192	20	19	69
ZFP-C	AHNAK 2	chr14	-	1.07	-1.00	-2.72	3.22E-01	8.10E-01	1.61E-11	16252	4	4	21
ZFP-C	HDAC2	chr6	-	1.13	-1.12	-2.69	6.02E-03	8.70E-03	2.09E-18	180	8	8	42
ZFP-C	RIMS1	chr6	+	-1.28	1.22	-2.55	2.18E-02	2.29E-02	6.62E-10	-131	6	6	30
ZFP-C	ARID1B	chr6	+	-1.10	-1.10	-2.44	3.59E-01	2.62E-01	9.49E-11	332	16	7	63
ZFP-C	ZFR	chr5	-	1.69	1.12	-2.43	5.05E-05	4.37E-01	5.56E-06	83	4	4	18
ZFP-C	CNKSR2	chrX	+	-1.09	-1.10	-2.37	2.22E-01	1.43E-01	9.38E-13	147	12	12	51
ZFP-C	JAK1	chr1	-	1.10	1.09	-2.36	4.62E-02	1.12E-01	5.35E-09	-54818	4	1	18
ZFP-C	C1RL	chr12	-	-1.06	-1.25	-2.32	8.86E-01	1.63E-01	9.08E-07	248	7	7	27
ZFP-C	PCDH7	chr4	+	-1.15	-1.48	-2.31	1.22E-01	1.57E-05	1.04E-10	539	5	4	30
ZFP-C	SETD2	chr3	-	1.73	-1.08	-2.30	9.76E-05	9.20E-01	1.67E-06	47	4	1	21
ZFP-C	SLC4A7	chr3	-	-1.11	-1.16	-2.27	3.31E-01	4.36E-01	3.09E-06	-3E+05	3	3	21
ZFP-C	NCALD	chr8	-	-1.13	-1.19	-2.24	1.47E-02	2.15E-03	2.13E-14	26	3	2	18
ZFP-C	FREM2	chr13	+	-1.04	-1.01	-2.20	8.89E-01	6.87E-01	2.06E-09	296	7	6	33
ZFP-C	POU3F2	chr6	+	-1.06	-1.27	-2.19	2.25E-02	1.04E-06	2.27E-16	92	7	4	45
ZFP-C	RIF1	chr2	+	1.09	1.07	-2.15	6.41E-01	4.34E-01	4.86E-07	611	4	4	24
ZFP-C	CADM3	chr1	+	-1.14	1.06	-2.13	1.25E-01	5.28E-01	6.14E-01	177	4	2	21

[0303]

							01	01	10				
ZFP-C	TMEM5 5A	chr8	-	-1.68	-1.90	-2.13	1.18E- 07	4.92E- 09	1.80E- 10	-63	13	4	57
ZFP-C	KIF21A	chr12	-	1.31	1.05	-2.13	4.01E- 03	5.06E- 01	3.00E- 08	32022 0	4	2	18
ZFP-C	KCNN3	chr1	-	-1.84	-3.64	-2.12	2.00E- 07	9.82E- 14	1.16E- 08	396	11	7	45
ZFP-C	ST6GAL NAC5	chr1	+	-1.15	-1.03	-2.12	9.46E- 02	8.93E- 01	1.05E- 11	1145	11	7	45
ZFP-C	KMT2C	chr7	-	-1.13	1.17	-2.10	4.70E- 01	2.01E- 01	2.28E- 05	-4354 0	5	2	18
ZFP-C	PRRC2C	chr1	+	1.31	-1.04	-2.05	2.68E- 02	9.64E- 01	6.95E- 05	24008	7	3	30
ZFP-C	EZR	chr6	-	2.19	-1.01	-2.03	8.67E- 06	9.66E- 01	2.96E- 05	-4829	3	1	21
ZFP-C	SMC5	chr9	+	1.15	-1.02	-2.02	1.64E- 02	5.70E- 01	1.81E- 07				
ZFP-C	DYNC1 H1	chr14	+	1.30	1.36	-2.02	1.73E- 01	8.18E- 02	2.73E- 05	271	4	3	18
ZFP-C	MLLT4	chr6	+	-1.10	-1.04	-2.01	3.97E- 01	7.16E- 01	1.41E- 06	-8080 7	4	2	18
ZFP-C	NUDT4 ; NUDT4 P1; NUDT4 P2	chr12	+	-1.12	1.12	-2.00	2.40E- 01	1.01E- 01	2.03E- 09	-235	6	6	33

表 6: 成纤维细胞中 ZFP A、B 和 C 的微阵列分析结果

ZFP	基因符号	Chr	链	ZFP 相对对照, 倍数变化			ZFP 相对对照, P 值			TSS 距离 (bp)	总 CAG	连续 CAG	位点长度 (bp)
				ZFP -A	ZFP -B	ZFP -C	ZFP -A	ZFP -B	ZFP -C				
ZFP-A	STC1	chr8	-	-19.2	-1.29	-34.0	1.51	4.14	2.70	30	18	6	78
ZFP-A	NAP1L3	chrX	-	-5.80	-1.04	-21.3	1.14	6.72	2.10	393	19	6	87
ZFP-A	ESYT1	chr1	+	-4.71	-1.03	-1.06	1.25	1.20	3.79	37306	4	4	21
ZFP-A	ABHD15	chr1	-	-4.34	-1.04	-1.12	3.20	5.28	3.36	-12788	3	2	18
ZFP-A	ISG20	chr1	+	-3.92	1.07	1.89	7.72	9.65	5.61	13993	5	3	18
ZFP-A	TP53II3	chr1	+	-3.06	-1.02	1.01	4.08	8.80	5.82	11281	3	2	18
ZFP-A	HNRNPDL	chr4	-	-2.44	-1.06	-1.00	3.89	4.00	5.87	12639	6	5	30
ZFP-A	GLS	chr2	+	-2.19	-1.19	-9.11	1.00	6.03	7.95	36	15	15	57
ZFP-A	RSAD2	chr2	+	-2.10	1.05	2.35	4.83	9.89	2.17	64817	5	4	21
ZFP-A	FRMD5	chr1	-	-2.04	-1.12	-1.08	8.11	3.27	7.24	174	3	3	18
ZFP-B	CPEB1	chr1	-	1.02	-8.72	-1.06	8.18	1.91	2.29	-9805	4	2	18
ZFP-B	IL17RA	chr2	+	-1.05	-5.52	-1.09	7.92	5.91	3.01	174	6	2	27
ZFP-B	MBD5	chr2	+	-1.08	-2.91	-3.36	2.39	5.29	3.49	90	6	5	24
ZFP-B	CCDC90B	chr1	-	1.02	-2.61	1.08	3.33	1.54	9.24	-231403	5	3	18
ZFP-B	SLC7A11	chr4	-	-1.03	-2.06	-33.3	6.26	2.23	3.15	15	7	7	30
ZFP-C	SERP1NB8	chr1	+	1.02	-1.00	-50.3	8.18	6.00	3.37	0	6	6	33
ZFP-C	STC1	chr8	-	-17.9	-1.30	-40.3	9.36	1.48	3.27	30	18	6	78
ZFP-C	SLC7A11	chr4	-	-1.03	-2.06	-33.3	6.26	2.23	3.15	15	7	7	30
ZFP-C	CRIP1	chr2	+	1.06	1.01	-30.2	4.99	8.53	1.53				
ZFP-C	GLS	chr2	+	-1.84	1.04	-26.7	2.34	8.93	1.17	36	15	15	57
ZFP-C	NAP1L3	chrX	-	-5.80	-1.04	-21.3	1.14	6.72	2.10	393	19	6	87
ZFP-C	RUNX2	chr6	+	1.04	-1.07	-11.2	6.73	3.70	1.23	101	19	6	75
ZFP-C	TTC13	chr1	-	-1.15	-1.11	-10.5	6.04	1.52	5.38	20	7	6	30
ZFP-C	HDAC2	chr6	-	1.02	-1.05	-8.50	6.49	4.06	6.17	180	8	8	42
ZFP-C	TMEM55A	chr8	-	-1.64	-1.36	-7.63	8.20	2.90	4.42	-63	13	4	57
ZFP-C	MAB2L1; MIR548F5	chr1	-	-1.48	-1.49	-7.29	1.09	9.28	1.35	851	19	19	66

[0304]

[0305]

ZFP-C	PAPSS 2	chr1 0	+	1.06	1.02	-6.90	7.25 E-01	8.60 E-01	3.47 E-21	154	9	8	42
ZFP-C	C1RL	chr1 2	-	-1.01	1.07	-6.67	6.93 E-01	1.97 E-01	8.03 E-19	248	7	7	27
ZFP-C	ATXN 2	chr1 2	-	-1.06	-1.10	-6.55	1.82 E-01	3.75 E-02	1.51 E-22	-122	22	13	81
ZFP-C	PAPD5	chr1 6	+	-1.03	1.02	-6.50	6.91 E-01	7.40 E-01	1.06 E-24	-4	6	6	30
ZFP-C	IRF2B PL	chr1 4	-	1.03	1.03	-6.26	7.32 E-01	3.86 E-01	6.68 E-28	1214	19	10	75
ZFP-C	IRS1	chr2	-	1.00	-1.05	-5.06	9.53 E-01	2.65 E-01	1.08 E-20	363	11	8	48
ZFP-C	GALN T5	chr2	+	-1.05	-1.43	-5.01	2.91 E-01	4.56 E-05	5.74 E-15				
ZFP-C	BRIBB P; THRIL	chr1 2	+	1.16	1.16	-4.70	3.85 E-02	1.46 E-02	1.49 E-18	129	11	9	45
ZFP-C	NUDT 4; NUDT 4P1; NUDT 4P2	chr1 2	+	-1.04	-1.02	-4.60	5.35 E-01	7.73 E-01	3.83 E-22	-235	6	6	33
ZFP-C	ATRN	chr2 0	+	-1.05	-1.02	-4.59	5.36 E-01	7.35 E-01	1.28 E-21	173	5	5	30
ZFP-C	MLLT 3	chr9	-	-1.04	-1.01	-4.22	4.92 E-01	9.95 E-01	2.97 E-14	36	7	6	33
ZFP-C	THAP1 1	chr1 6	+	-1.30	-1.15	-4.15	5.75 E-07	4.63 E-03	7.51 E-23	778	25	10	93
ZFP-C	LRP8	chr1	-	-1.14	-1.28	-3.91	1.32 E-01	6.36 E-03	2.69 E-14	31	14	11	51
ZFP-C	BPGM	chr7	+	1.02	-1.03	-3.72	7.75 E-02	5.60 E-01	2.56 E-20	61	8	8	33
ZFP-C	CUL4B	chrX	-	-1.08	-1.07	-3.68	3.01 E-02	1.45 E-02	7.18 E-24	94	6	4	24
ZFP-C	GABBR2	chr9	-	-1.07	1.02	-3.40	6.47 E-02	7.31 E-01	2.70 E-18	527	9	3	39
ZFP-C	MBD5	chr2	+	-1.08	-2.91	-3.36	2.39 E-01	5.29 E-11	3.49 E-12	90	6	5	24
ZFP-C	SRPX	chrX	-	-1.02	-1.06	-3.34	4.32 E-01	1.17 E-01	1.42 E-20	132	12	7	48
ZFP-C	ARID1 B	chr6	+	1.02	1.02	-3.26	4.23 E-01	6.33 E-01	2.17 E-19	332	16	7	63
ZFP-C	SLC27 A3	chr1	+	1.07	-1.40	-2.96	6.74 E-01	1.24 E-05	2.46 E-14	214	10	4	51
ZFP-C	ARV1	chr1	+	1.04	1.02	-2.85	7.33 E-01	8.00 E-01	3.81 E-17	-231	7	6	30
ZFP-C	NAAA	chr4	-	-1.01	1.03	-2.84	9.35 E-01	7.83 E-01	3.31 E-19	64	6	6	24
ZFP-C	SEMA 6D	chr1 5	+	1.00	-1.03	-2.73	4.50 E-01	9.70 E-01	2.16 E-17	47	6	6	27
ZFP-C	MAP2	chr2	+	-1.34	-1.16	-2.56	5.95 E-04	1.83 E-01	1.24 E-11	22	7	7	30
ZFP-C	FAM15 5A	chr1 3	-	-1.16	-1.30	-2.55	1.69 E-02	1.30 E-06	2.55 E-15	347	22	9	93
ZFP-C	SEC16 B	chr1	-	-1.03	-1.06	-2.45	5.64 E-01	7.70 E-01	2.05 E-16	-14015	4	3	21
ZFP-C	ORC4	chr2	-	-1.08	-1.56	-2.42	4.43 E-01	9.42 E-06	2.12 E-11	80	19	5	75
ZFP-C	ILIRL 1	chr2	+	-1.18	-1.04	-2.42	9.26 E-03	5.54 E-01	2.36 E-15	2642	5	5	21
ZFP-C	TMOD 2	chr1 5	+	-1.11	-1.03	-2.41	1.11 E-01	2.94 E-01	7.86 E-15	18839	4	2	21
ZFP-C	EGR1	chr5	+	-1.32	1.01	-2.40	9.85 E-03	3.61 E-01	3.40 E-10	441	8	6	36
ZFP-C	HTT; MSAN TD1	chr4	+	-1.43	-1.42	-2.39	6.38 E-08	4.67 E-07	2.02 E-15	192	20	19	69
ZFP-C	SPP1	chr4	+	-1.06	1.01	-2.37	2.90 E-01	7.76 E-01	2.44 E-09	0	4	4	18
ZFP-C	WNT2 B	chr1	+	-1.12	-1.07	-2.34	1.83 E-01	4.59 E-01	1.18 E-11	613	6	4	30

ZFP-C	PDE7B	chr6	+	-1.95	-1.44	-2.30	3.43 E-11	3.58 E-07	3.51 E-13	-36	17	6	75
ZFP-C	HRC1	chr9	+	-1.09	-1.11	-2.26	3.36 E-01	2.11 E-01	2.69 E-14	155	7	7	27
ZFP-C	BR13B P	chr1 2	+	-1.00	1.00	-2.19	9.28 E-01	9.76 E-01	2.48 E-10	129	11	9	45
ZFP-C	PCDH7	chr4	+	-1.24	-1.49	-2.14	5.76 E-03	1.60 E-06	7.03 E-12	539	5	4	30
ZFP-C	ULBP2	chr6	+	-1.01	1.03	-2.13	9.38 E-01	9.46 E-01	8.46 E-17	111	3	2	18
ZFP-C	TRMT 10B	chr9	+	-1.06	1.01	-2.10	8.48 E-01	3.01 E-01	1.19 E-11	56593	3	3	18
ZFP-C	SMND C1	chr1 0	-	1.03	-1.02	-2.08	9.75 E-01	5.33 E-01	1.80 E-09	111	6	4	30
ZFP-C	RAET1 L; ULBP2	chr6	+	1.02	1.01	-2.06	8.23 E-01	8.32 E-01	4.49 E-17	111	3	2	18
ZFP-C	SORCS 2	chr4	+	-1.01	-1.04	-2.05	4.09 E-01	1.59 E-01	2.58 E-11	207	7	7	33
ZFP-C	FAM17 1B	chr2	+	1.04	-1.03	-2.01	7.88 E-01	5.52 E-01	1.50 E-13	219	6	6	30
ZFP-C	CXCL1 1	chr4	-	-1.24	-1.22	2.01	7.51 E-02	4.09 E-01	1.96 E-03				
[0306] ZFP-C	TLR3	chr4	+	-1.51	1.09	2.05	1.07 E-02	9.86 E-01	1.50 E-03	76907	5	3	18
ZFP-C	CXCL1 0	chr4	-	-1.64	-1.04	2.09	4.19 E-02	7.26 E-01	1.24 E-03	-12499	7	3	36
ZFP-C	BATF2	chr1 1	-	-1.28	-1.02	2.10	6.53 E-02	8.65 E-01	1.32 E-05	14728	5	4	21
ZFP-C	BST2	chr1 9	-	-1.44	1.21	2.12	4.26 E-02	4.64 E-01	3.17 E-04	1913	4	2	18
ZFP-C	GIMA P2	chr7	+	-1.43	1.08	2.13	6.14 E-02	5.65 E-01	5.72 E-04	56994	4	3	18
ZFP-C	ADAM 21	chr1 4	+	1.19	1.15	2.14	5.20 E-02	8.18 E-02	1.52 E-11	49998	5	3	18
ZFP-C	ALDH 1A3	chr1 5	+	1.41	1.25	2.14	2.04 E-02	1.06 E-01	4.12 E-06	-8958	3	1	18
ZFP-C	ANGP TL1	chr1	-	-1.23	1.27	2.19	1.26 E-01	2.09 E-01	2.84 E-04	223973	3	2	18
ZFP-C	TNFSF 10	chr3	-	-1.32	1.25	2.27	1.73 E-01	1.74 E-01	8.02 E-05	78550	3	2	18
ZFP-C	IFIT2	chr1 0	+	-1.49	1.45	2.50	6.39 E-02	1.89 E-01	2.47 E-04	-76760	4	3	21
ZFP-C	RSAD2	chr2	+	-1.73	1.18	2.50	2.97 E-02	7.18 E-01	2.98 E-04	64817	5	4	21
ZFP-C	TRMT 10A	chr4	-	1.43	1.24	2.61	2.82 E-04	5.23 E-02	1.95 E-12	70682	5	3	18
ZFP-C	HERC5	chr4	+	-1.56	1.31	2.79	2.94 E-02	2.85 E-01	8.07 E-05	-160020	5	2	21

[0307] 我们接下来评估了ZFP-B处理的CAG17/48 (SEQ ID NO:76/78) 神经元的HD相关表型的改善(图2A)。

[0308] 如图2H所示,相较于非HD神经元(图2H和2I),CAG17/48 (SEQ ID NO:76/78) 神经元中胞内ATP水平显著减少并且细胞凋亡易感性增加。ZFP-B表达21天后,ATP水平相较于对照处理的神经元增加约70%,这表明该ZFP介导的mHTT阻遏可以改善HD相关的代谢缺陷。培养的HD神经元还展现出细胞凋亡易感性增强。生长因子撤去后7天,经历细胞凋亡的CAG17/48 (SEQ ID NO:76/78) 神经元的百分比比非HD神经元高3.3倍,并且ZFP表达使细胞凋亡恢复至基线水平。如图2I所示,ZFP-B的表达使细胞凋亡水平降低至正常神经元的水平。

[0309] 因此,通过ZFP-TF选择性阻遏mHTT等位基因导致与HD关键病理学特征相关的细胞表型的逆转。

[0310] 鉴于需要人工长CAG束诱导啮齿动物中的HD样疾病,在进行表型研究之前,我们评估了杂合Q50 (HdhQ50/HDH+) 小鼠中的ZFP-B性能,所述小鼠在内源性小鼠Htt基因处具有编码48个CAG (SEQ ID NO:78) 的人外显子1的等位基因敲入。虽然表型正常,但是Q50模型能够评估典型HD患者CAG阵列背景下的mHtt阻遏并且和我们人神经元研究中使用的长度相同。

将编码ZFP-B或GFP的AAV通过双侧纹状体内注射以2个剂量 (3×10^{10} 或 9×10^{10} VG/半球;图2J) 给予11周龄Q50杂合动物。递送后七周,通过qRT-PCR评估转基因表达和Htt调控。

[0311] 如图2K所示,低剂量和高剂量分别阻遏Q50等位基因达55% ($P < 0.001$) 或67% ($P < 0.0001$)。内源性小鼠Q7等位基因 (CAG4 (SEQ ID NO:86)) 不被任意剂量的ZFP-B阻遏,并且总Htt水平与观察到的等位基因选择性Q50阻遏一致。此外,如图2L所示,回归分析所有纹状体切片揭示了ZFP-B和Q50表达水平之间的逆相关性 ($P < 0.001$, $R^2 = 0.36$),而非Q7。纹状体切片中ZFP表达和Q50阻遏水平中的变异性与我们在整个立体递送研究中观察到的不完全AAV纹状体覆盖(通常覆盖30%-70%纹状体)一致。此外,ZFP-TF 45794也在GENEA020神经元中进行了测试(参见图2N)。

[0312] 总之,这些结果证明,ZFP可以实现人HD神经元和小鼠纹状体中疾病相关CAG等位基因的持久和选择性阻遏。

[0313] 任何治疗策略的关键考虑因素是评估特异性和脱靶作用。该方法特别令人感兴趣的是人基因组中其他1,053个内源性CAG阵列(长度 ≥ 6 ,以解释6指ZFP的大致DNA足迹)的患病率(prevalence)的总和与176个基因的启动子邻近(参见方法)。部分不连续阵列(各六聚体最多3个错配)的丰度甚至更高,总计接近1,872个人基因的21,456个位点(全部CAG阵列)。尽管没有其他人类基因具有与最小完全外显mHTT等位基因大小相同的TSS邻近CAG束(CAG40 (SEQ ID NO:91);参见图1H),但是对某些CAG邻近脱靶基因的潜在调控可能对该策略的临床应用造成风险。

[0314] 为了对此进行研究,我们在患者神经元和成纤维细胞中采用了全局转录概况分析。与之前靶向CAG的策略相反,由于启动子背景、表观遗传修饰以及ZFP-TF与其他因素协同作用的不确定影响,我们选择了无偏倚的方法来询问特异性,其中任何因素都可能不可预测地影响脱靶行为。在我们的首次设计尝试中(当前报告的重点),我们鉴定了这样的ZFP,其表现出高程度全基因组特异性,并且无需进行针对该特性的任何优化。特别有用的信息是结构对等位基因选择性ZFP特异性的影响。尽管ZFP-A和ZFP-B对于所有查询的mHTT等位基因具有相似的中靶行为,但是它们在两个细胞环境中具有互相排斥的脱靶概况(图2G,图11)。例如,MBD5是具有不连续CAG束的CAG邻近基因(CAG19 (SEQ ID NO:92),距TSS 0bp),其被ZFP-B阻遏,但未被ZFP-A阻遏(图11B和11C)。ZFP-A和ZFP-B靶向CAG束的不同框架,由不同的ZF模块组成,并使用不同的接头结构,这表明它们的脱靶特性可能与设计有关,并因此可以进行优化。我们还注意到,工程改造ZF模块的最新进展(例如,对CAG/CTG阵列中可靶向框架的偏好增加),以及ZF和DNA骨架之间非特异性相互作用的消除,为优化ZFP特异性和开发适合临床用途的ZFP提供了潜在的互补途径。

[0315] 虽然我们的初始设计工作在人成纤维细胞和神经元中产生了具有高度全基因组特异性的等位基因选择性ZFP,但是我们预计,我们的蛋白质也可在小鼠中表现出一些脱靶活性,尽管考虑到直系同源物之间基本上缺乏CAG重复保守性而位于不同的基因座处。令人惊讶的是,具有最大TSS相邻CAG阵列的前100个小鼠基因中有85个在人基因组中没有相应的重复。然而,在野生型和zQ175 het小鼠体内进行纹状体ZFP处理后,我们使用最大TSS相邻CAG阵列(± 1 kb的TSS)在小鼠基因组中进行了偏向的脱靶分析。通过ZFP-B和/或ZFP-D体内显著调控鼠基因,在小鼠直系同源物中都具有比人显著更多的CAG重复序列。例如,DNAJC12,一种在小鼠启动子中存在,但是在人直系同源物中不存在的具有19个CAG重复序

列 (SEQ ID NO:92) 的基因,其在小鼠纹状体中被调节,但是在人成纤维细胞或神经元中不被调节,这强调了评估人类细胞特异性的必要性。在直系同源物中,只有NAP1L3在人神经元和成纤维细胞中被调节,并且仅通过ZFP-A (3.1-5.8倍阻遏) 调节,而非ZFP-B (未检测到改变),这进一步证实了我们的观察结果,即CAG脱靶调节受ZFP设计的大幅影响。

[0316] 至关重要,我们进行了大量长期耐受性和安全性研究,以理解ZFP是否在分子、细胞或行为水平上导致可检测到的毒性 (图4、16和17)。我们注意到,在使用多种启动子和AAV血清型于人神经元和小鼠纹状体中长期表达的条件下,我们在至少15月龄和ZFP暴露9月龄没有观察到神经退行性、神经炎症或毒性,这表明在这些递送和表达条件下,ZFP的耐受性良好。鉴于ZFP-A和ZFP-B的中靶料理和等位基因选择性窗口,以及我们以高于中靶EC50剂量1-2.5个数量级的ZFP剂量进行了脱靶分析,在我们的实验系统之外使用这些试剂研究HTT生物学方面时,使用较弱细胞特异性启动子可能是有用的 (例如,其他血清型或给药途径)。

[0317] 实施例6:R6/2模型中ZFP驱动的神保护和行为缺陷改善

[0318] 在多个体外环境和脑中建立了稳健的mHTT阻遏后,我们继续评估等位基因选择性ZFP能否改善HD小鼠中的神经病理学标志和行为表现型。我们首先研究了R6/2小鼠模型中的ZFP性能,其中过表达具有扩增的CAG阵列 (约120个CAG) 的人HTT外显子1片段。R6/2小鼠在神经生理学、体重 (BW) 损失、运动和认知改变 (包括扣爪和运动减低 (hypolocomotor) 状态中显示出早期和进行性变化,和显著减少介质棘状神经元 (MSN) 标志物,包括DARPP32,磷酸二酯酶10a (PDE10a),多巴胺受体D1 (DRD1) 和D2 (DRD2) (参见实施例1)。

[0319] 在这些研究中,5周龄的R6/2小鼠经双侧纹状体内注射编码ZFP-B或GFP的AAV,并且就所有终点与非转基因年龄匹配的对照进行比较 (图3A)。

[0320] 如图3B所示,ZFP-B在持续7周的研究中导致扣爪的显著减少 ($P=0.024$,对数秩检验),并且较少ZFP处理的小鼠相较于每周GFP处理组扣爪。在7周的研究中,ZFP处理的组比GFP组扣爪的可能性低2.4倍 (图3B)。

[0321] 还使用空场测试每两周检测运动减低。如图3C所示,在针对自发运动的双周空场评估中,ZFP处理相较于GFP处理在饲养频率 ($P=0.009$) 和总进行距离 (图3D, $P=0.038$) 赋予显著的纵向改进。此外,ZFP处理的小鼠在ZFP给予后在多个时间点明显表现得更好,并在最终时间点观察到相对于对照处理的小鼠的最大益处 (12周)。值得注意的是,ZFP处理的小鼠相较于对照不存在显著的BW差异,并且我们也没有检测到ZFP处理对握力或旋转杆 (rotarod) 表现的作用 (图13)。

[0322] 我们在某些行为终点观察到的改善提高了在AAV转导的纹状体区域中表达ZFP的神经元受到保护的前景。为了研究这种可能性,在12周的行为评估后处死小鼠,并对纹状体组织进行针对ZFP、HTT和MSN标志物表达的qRT-PCR分析 (参见上述方法)。

[0323] 如图3E所示,与我们在Q50小鼠体内进行大块组织分析的结果相似 (图2K和2L),ZFP处理导致mHtt降低62% ($P<0.0001$),而天然小鼠Htt的表达未改变。我们检查了对照组动物的亚组中的GFP荧光,并且发现AAV覆盖范围为约50-70%的纹状体,这表明递送区域中mHTT接近最大的阻遏 (数据未显示)。ZFP处理的小鼠中DARPP32、PDE10A、DRD1A和DRD2的转录水平比GFP处理的小鼠高1.6-2.0倍 (所有 $P<0.0001$;图3F),尽管比年龄匹配非转基因对照低1.5-2.3倍 (所有 $P<0.0001$),这与经分析的纹状体区域的载体覆盖不完全以及干预年

龄之前存在的神经退行性相一致。重要的是,对各纹状体样品的回归分析揭示了ZFP和mHTT转录水平之间显著的负相关关系($R^2=0.48, P<0.0001$;图3G),以及ZFP表达与所有MSN标志物水平之间对应的正相关关系($R^2=0.38-0.62$,所有 $P<0.0001$)。总之,我们在R6/2小鼠中的发现提供了ZFP驱动行为和分子神经病理学终点方面改善的证据,并且促进了进一步研究攻击性较低的疾病模型情况下对等位基因选择性ZFP在细胞水平上潜在的神经保护作用。

[0324] 实施例7:zQ175杂合小鼠中mHtt的阻遏和组织病理学与电生理学缺陷校正

[0325] 由于小鼠中实质内AAV递送和快速R6/2疾病进展所导致的限制,我们关注的是,ZFP-TF在进展缓慢的zQ175模型中是否会影响关键神经病理学缺陷。这些小鼠携带具有约188个CAG重复序列的敲入mHtt类外显子1等位基因,并显示出HD相关分子、组织学、电生理学和行为表型。参见实施例1。杂合zQ175小鼠在3-4月龄时出现包含标志性的mHTT的包涵体,所述包涵体到12月龄时继续积累,在4-6月龄时出现分子和电生理学疾病特征,并在10-12月龄时出现相对轻度的延迟发作(Menalled等(2012) PLoS ONE 7:e49838;Heikkinen等(2012) PLoS ONE 7:e50717;Carty等(2015) PLoS One10:e0123527;Beaumont等(2016) Neuron 92:1220-1237),因此允许在疾病进展的不同阶段评估ZFP功效。我们首先确认了,ZFP-B的AAV递送在培养的原代杂合zQ175纹状体神经元中导致选择性阻遏突变HTT mRNA(99%, $P<0.0001$)和蛋白质(99%; $P<0.0001$) (图4A和4B)。如所预期,没有观察到野生型小鼠HTT降低,并且缺乏ZFP DNA结合结构域(Δ DBD)的对照病毒不能显著降低突变HTT。

[0326] 为了评估ZFP对mHTT包涵体的影响,我们在纹状体内处理之后监测了杂合zQ175小鼠中的EM48免疫反应性(图4c),所述纹状体内处理在神经病理学发作之前(早期处理)或之后(晚期处理)。对于早期处理组,将编码ZFP-B或GFP的AAV注射到2月龄小鼠的背侧纹状体中,并在4月龄时评估HTT聚集。将自切割T2A-GFP标签用于标记表达ZFP的细胞。在转导的MSN(DARPP32+GFP+)中,ZFP-B几乎完全阻止了核mHTT聚集(99.6%减少, $P<0.0001$) (图4D和4E;图14)。还观察到核周HTT包涵体的密度(88%减少; $P<0.0001$)和总EM48免疫荧光(48%减少; $P<0.01$)显著减少(图4F和4G)。对于晚期处理组,ZFP-B.T2A.GFP、 Δ DBD.T2A.GFP或GFP载体给予6周龄杂合zQ175小鼠的纹状体,它们具有大量预先负荷的HTT聚集体(Mangiarini等(1996) Cell 87:493-506)。注射后四个月,相对于GFP对照,ZFP-B处理减少19%的核EM48+包涵体的数量($P<0.01$,图4H和4I)和87%的核周包涵体的数量($P<0.0001$;图4H和4J)。具有核包涵体的细胞中的EM48强度降低了24% ($P<0.05$,图4k)。在这些研究中,经 Δ DBD和GFP处理的小鼠之间就任何终点无显著差异。

[0327] 总之,这些结果表明等位基因选择性ZFP可以在疾病发作之前和之后减少并潜在地阻断mHTT聚集。

[0328] 我们还通过监测DARRP32水平评估了ZFP表达在晚期治疗组中对转导的MSN健康的影响。相较于年龄匹配的WT小鼠,10月龄zQ175杂合子展现出DARPP-32免疫反应性的17% ($P<0.01$)纹状体减少(图4L)。与我们在R6/2小鼠中的发现一致,向6月龄zQ175小鼠的ZFP-B给药导致在10月龄时DARPP32免疫反应性增加20% ($P<0.01$) (图4M)。重要的是,该作用为表达ZFP的MSN所独有的,这表明ZFP表达所赋予的保护作用。为了评估长期ZFP表达是否在体内诱导了神经炎症反应,我们监测了星形胶质细胞增生(GFAP)和小胶质细胞增生(Iba1)的标志物。除了注射本身的瞬时作用(位于针迹处)外,对于这些研究整个时间过程中的任何处

理,我们没有观察到标志物强度或GFAP+ (图4N和4O) 或Iba+ (图4N和4P) 细胞的数量增加。重要的是,GFP表达对这些标志物没有影响 (图15)。

[0329] mHTT聚集病理学和DARPP32水平的改善促使我们研究ZFP是否还可以缓解影响zQ175间接途径投射神经元(indirect pathway projection neuron,iSPN)的重要电生理学缺陷,该缺陷在4月龄时显现 (PMID:24991961,在PMID:25700146中综述)。在这些研究中,2月龄或4月龄小鼠接受纹状体内注射编码ZFP-D.T2A.tdTomato或 Δ DBD.T2A.tdTomato的AAV,并在6月龄时评估了iSPN树突状兴奋性 (图4C和4N;图15)。

[0330] 我们首先确认了通过ZFP-D的mHTT特异性阻遏的程度与我们之前的立体定向递送研究一致,并且在非靶向皮质区域未发生改变 (数据未显示)。然后,我们使用包括50Hz的3个AP的简化型反向传播动作电位 (bAP) 突激 (burst) 方案测试了tdTomato+iSPN中的树突兴奋性 (图4O)。相对于表现出平均35%树突兴奋性阻遏 ($P < 0.01$) 的对照处理的zQ175 iSPN,ZFP-D处理的zQ175 iSPN的树突指数在2月龄组 (图4S, $P < 0.05$) 和4月龄组 (图4T, $P < 0.05$) 中恢复到接近野生型水平。因此,zQ175小鼠中的iSPN电生理学缺陷可以通过靶向mHTT的ZFP预防和逆转。此外,因为mHTT阻遏限于纹状体,所有我们的发现与出现树突低兴奋性的区域自主模型一致,而不是功能失调的神经支配性神经元的次要后果 (Cummings等 (2009) *J.Neurosci*29(33):10371-86)。

[0331] 实施例8:ZFP处理的zQ175小鼠中翻译生物标志物的恢复

[0332] 我们在R6/2小鼠中的结果证明,早期ZFP处理可以部分恢复在HD中被下调的基因的表达,包括PDE10A和D1和D2受体。监测这些基因很重要,因为PET成像研究已经证明HD患者中PDE10A酶和D2样受体水平的早期、进行性和显著下降,其开始于临床诊断前许多年 (CHDI/卡罗林斯卡医学院未出版的结果,参见Niccolini等 (2018) *J Neurol Neurosurg Psychiatry* PMID:28889093的综述)。在杂合zQ175小鼠的类似研究中 (PMID:27856625),临床成像配体鉴定直系同源小鼠蛋白质中的早期和进行性变化。因此,我们研究了使用两种方法进行ZFP给药后这些标志物是否对mHTT减少敏感:纹状体脑切片的体外放射自显影 (ARG),和活体动物中纵向微型PET成像。

[0333] 在第一个研究中,2月龄或4月龄杂合zQ175小鼠接受单侧纹状体内注射编码ZFP-d或GFP的AAV (图5A)。使用针对D1样受体 ($[^3\text{H}]$ NNC112)、D2样受体 ($[^3\text{H}]$ 雷氯必利) 或PDE10A ($[^3\text{H}]$ MNI-659) 的氚标记配体评估表达。结合通过在纹状体感兴趣区域 (ROI) 的ARG测量,所述ROI通过显示mHTT积累减少的区域划定 (通过相邻部分的EM48染色评价)。在用ZFP-D处理的小鼠中,注射的纹状体ROI中 $[^3\text{H}]$ NNC112的结合在早期2-6个月 (34%, $P < 0.0001$) 和晚期4-10个月 (24%, $P < 0.0001$) 中都显著高于对侧纹状体ROI中的结合 (图5B)。对于早期 (26%, $P < 0.0001$) 和晚期 (7%, $P < 0.001$) ZFP处理组,注射的纹状体ROI中 $[^3\text{H}]$ 雷氯必利的结合也显著高于未注射的纹状体ROI中的结合 (图5C)。相似地,注射ZFP的纹状体ROI中的 $[^3\text{H}]$ MNI-659结合在早期 (31%, $P < 0.0001$) 和晚期 (11%, $P < 0.001$) 组中显著较高 (图5D)。

[0334] 总之,这些数据表明,AAV递送的ZFP阻遏物可以防止和恢复患有建立的疾病的小鼠中PDE10A酶,D1样受体和D2样受体的特异性结合,并且观察到在症状发作和生物标志物表达降低之前对表达ZFP的动物的最大益处。

[0335] 然后,为了调查是否可以在活体动物中监测D2样和PDE10 ARG表达的体外改变,我们通过微型PET评估了ZFP处理对 $[^{11}\text{C}]$ 雷氯必利和 $[^{18}\text{F}]$ MNI-659结合的影响。我们先前证明

了,在6月龄至9月龄期间,雷氯必利和MNI-659结合在zQ175纹状体中逐渐减小,在6月龄至9月龄期间分别为从60%至56%和52%至41% (PMID 27856625)。因此,我们用AAV ZFP-D或ΔDBD单侧注射4月龄小鼠,并且从6.5-10月龄时纵向监测结合。与在这些小鼠中使用ARG获得的更大程度的作用相一致,注射ZFP的纹状体相对未处理的纹状体的^[18F]MNI-659BPND在6.5(12.8%, $P<0.0001$)和10(16.5%, $P<0.001$)月龄时显著增加,而在各时间点,ΔDBD组不存在统计学上显著的增加(在7个月时为1.9%,在10个月时为-1.5%;图5E和5F和表7)。此外,当比较各处理之间半球之间BPND的差异百分比时,ZFP-D组相较于GFP小鼠在6.5-7(11.0%, $P<0.001$)和10(18.1%, $P<0.0001$)月龄时显示出BPND显著升高(图5E)。有趣的是,尽管在4-10个月的ARG组中看到雷氯必利结合增加7%,但我们在微型PET研究中检测不到ZFP-D的^[11C]雷氯必利BPND的显著增加(表7和8)。

[0336] 表7:用^[11C]雷氯必利和^[18F]MNI-659成像的zQ175小鼠的平均注射放射性水平(注射的RA)、注射的质量和重量

图	时间点	n	处理	注射的 RA (MBq)	注射的质量(μg)	重量 (g)
[11C]雷氯必利	6.5-7M	41	ZFP-D	12.3±0.8	0.014±0.019	29.3±1.9
[11C]雷氯必利	7M	33	eGFP	13.1±0.6	0.015±0.014	29.3±2.3
[11C]雷氯必利	10M	35	ZFP-D	12.9±0.8	0.009±0.004	28.2±2.0
[11C]雷氯必利	10M	35	eGFP	12.6±0.7	0.008±0.004	28.1±2.6
[18F]MNI-659	6.5-7M	38	ZFP-D	11.7±1.2	0.055±0.035	28.7±1.7
[18F]MNI-659	7M	33	eGFP	12.8±1.0	0.087±0.038	29.3±2.3
[18F]MNI-659	10M	36	ZFP-D	12.7±1.5	0.13±0.20	28.9±2.0
[18F]MNI-659	10M	33	eGFP	12.2±0.6	0.061±0.043	28.3±2.5

[0338] 表8:相对对照病毒用ZFP-D处理的Q175动物的纹状体中^[11C]雷氯必利或^[18F]MNI-659的平均%SUV和BPND值

配体	处理(左纹状体相对右纹状体)	时间 (mo)	n	%SUV, BP_{ND}	平均值±SD		差异%	对象内	
					左纹状体	右纹状体		左纹状体相对右纹状体	配对的 t 检验
[^{18F}]MNI-659	未注射的相对ZFP-D	4-6.5	38	%SUV	23.8±6.6	25.1±6.5	0.06	****	p < 0.0001
				BP_{ND}	0.68±0.21	0.75±0.21	0.13	****	p < 0.0001
[^{18F}]MNI-659	未注射的相对对照eGFP	4-7	35	%SUV	25.2±16.8	24.9±17.0	n.s.		p > 0.05
				BP_{ND}	0.66±0.29	0.66±0.28	n.s.		p > 0.05
[^{18F}]MNI-659	未注射的相对ZFP-D	4-10	36	%SUV	21.4±6.9	23.0±7.3	0.08	***	p < 0.001
				BP_{ND}	0.62±0.25	0.71±0.28	0.17	***	p < 0.001

[0340]

[¹⁸ F]MNI-659	未注射的 相对对照 eGFP	4-10	33	%SUV	19.0±4.8	18.4±4.9	-3.10	****	p < 0.0001
				BP _{ND}	0.58±0.24	0.57±0.25	n.s.		p > 0.05
[¹¹ C]雷氯必利	未注射的 相对 ZFP-D	4-6.5	41	%SUV	98.1±14.4	98.0±14.0	n.s.		p > 0.05
				BP _{ND}	1.48±0.24	1.47±0.24	n.s.		p > 0.05
[¹¹ C]雷氯必利	未注射的 相对对照 eGFP	4-7	33	%SUV	90.2±14.2	88.5±14.5	-0.02	*	p < 0.05
				BP _{ND}	1.29±0.13	1.24±0.15	-0.04	**	p < 0.01
[¹¹ C]雷氯必利	未注射的 相对 ZFP-D	4-10	38	%SUV	81.5±14.8	81.7±16.1	n.s.		p > 0.05
				BP _{ND}	1.16±0.16	1.15±0.18	n.s.		p > 0.05
[¹¹ C]雷氯必利	未注射的 相对对照 eGFP	4-10	35	%SUV	76.2±14.5	74.3±14.4	-2.30	****	p < 0.0001
				BP _{ND}	1.17±0.10	1.13±0.12	-3.90	***	p < 0.001

[0341] 使用对象内配对的t检验计算左右纹状体之间的差异。各值表示为平均值±SD。n = 33-41只小鼠/组。

[0342] 总计,我们在R6/2和Q175小鼠中的分子发现结果证明,等位基因选择性ZFP-TF可以预防和逆转疾病进展关键标志物的丧失,并且这些改变可以使用临床转化标志物在活体对象中监测。

[0343] 实施例9:体内长期ZFP-TF表达后评估耐受性和特异性

[0344] 虽然我们在我们的体外和体内研究中没有观察到等位基因选择性ZFP毒性的证据,但是我们试图在短期和长期体内ZFP处理后更仔细地检测耐受性和特异性的标志物。为了评估长期ZFP表达是否导致神经炎性反应或神经退行性,我们在早期(2-6月龄)和后期(6-12月龄)范例中监测了用ZFP处理的zQ175和野生型小鼠中星形胶质细胞增生(GFAP)、小神经胶质细胞(Iba1)和一般神经元活力(NeuN)的标志物。除了注射本身的瞬态作用(位于针迹处)(图16A),对于任何处理,我们没有观察到标志物强度(图15B和15G),或GFAP+的数量(图4r,s和图15C、15D、15F、15G)或Iba+(图4r,t和图15B和15E)细胞增加。重要的是,GFP表达对这些标志物没有影响(图15A)。与不存在神经炎性标志物升高相一致,我们在经ZFP-B或ZFP-D处理的WT或zG175 het纹状体中并没有检测NeuN+细胞或强度或神经元数量的任何减少(图16C、16D、17)。这些结果表明,在WT和疾病发作前和疾病发作后zQ175小鼠中,长期纹状体表达普遍耐受良好并且不诱导明显的神经炎性反应。单侧纹状体AAV注射后,我们进一步评估了WT和zG175 het小鼠的早期(2-6月龄)和晚期(6-12月龄)处理组中的ZFP-B和ZFP-D。我们的观察结果是,研究进行期间没有BW减轻,且一般活动、自发性行为、刷洗、筑巢、食品和液体摄取或体温没有变化。组织学分析显示,相较于对侧半球,不存在脑体积变化的证据,没有NeuN表达的损失且没有星形胶质细胞标志物的升高(图16C-16E)。

[0345] 为了评估我们体内研究中脱靶调控的潜力,我们首先将最接近的CAG阵列位置(长度≥6CAG重复序列,以最低限度地考虑一个ZFP结合位点;参见方法)映射到小鼠和人基因组中各注释的转录起始位点(TSS)。我们考虑了完美CAG阵列,以及各CAG六聚体具有3个以上错配的那些,以允许更长且不连续的重复序列束。这些搜索显示小鼠基因组具有比人基因组显著更多的CAG含量(完美CAG重复序列为3,472相对1,053;次完美重复序列为32,328

相对21,456)。然而,强加与TSS距离1kb的要求,显示两个基因组就具有TSS邻近CAG阵列的基因的总数而言是相似的(完美CAG重复序列为150相对176;次完美重复序列为1720相对1872)。我们然后进行双向直系同源分析,由此将每个注释的编码蛋白的小鼠基因映射到对应人直系同源物,反之亦然(参见方法)。重要的是,我们发现了直系同源物之间较差的CAG保持性(conservation),其中前100个CAG小鼠基因中只有15个在人直系同源物中具有与任何长度的TSS邻近CAG阵列的直系同源物,并且进行反向比较,前100个人基因中只有12个。

[0346] 这些信息学结果被用来以引导针对用于我们功能性小鼠研究中的ZFP的体内脱靶分析。我们用编码ZFP-B、ZFP-D或 Δ DBD的AAV纹状体内注射6月龄野生型(WT)和zQ175小鼠的右半球,并用PBS注射左半球。1个月后收集纹状体组织进行qRT-PCR分析。

[0347] 与这些ZFP的等位基因选择性相一致,我们观察到突变HTT mRNA水平减少 $>70\%$,但是在任意基因型中并不显著阻遏小鼠HTT。我们然后检测了在我们的脱靶搜索中鉴定的12个基因,重点研究了小鼠基因组中具有最大TSS邻近CAG重复的那些基因。该组包括在人直系同源物中具有和不具有TSS邻近CAG阵列的基因。

[0348] 总之,我们观察到对于具有CAG阵列 ≤ 19 CAG的基因(MTUS2、RSLD241、AKT3、KCNA6、ITGA7)没有阻遏;例外是DNAJC12,其受ZFP-B调控70%并受ZFP-D调控62%,并且在人直系同源物中缺乏CAG重复。检测小鼠Dnajc12启动子显示,12个CAA重复与CAG阵列直接相邻,这可以解释为什么它受到调控,而其他相似长度的CAG候选物不受调控。对于具有含有 ≥ 24 个CAG的阵列的受检小鼠基因,我们观察到阻遏,范围为ZFP-D对RUNX2(CAG28(SEQ ID NO: 93), TSS100bp)为38%,而ZFP-B减少79%的NAP1L3(CAG28(SEQ ID NO:93), TSS 511bp)。在大多数情况中,且不论统计学上等同的zQ175阻遏,ZFP-D导致比ZFP-B显著更少的脱靶阻遏,除了RUNX2和NAP1L3的情况。基因型似乎没有实质性改变调节模式或程度。我们还检测了ZFP-B或ZFP-D处理是否导致神经元生物标志物转录本DRD1a、DRD2、DARPP32、PDE10a和RBFOX3/NEUN的丧失。与我们之前的长期分析一致,我们发现在处理过程的1个月后,这些神经元标志物的水平没有显著降低。最后,为了研究对长期ZFP表达所赋予的任何行为缺陷的一般耐受性和潜力,我们用延长的处理时间对小鼠的大组进行了另外两项研究。在第一个研究中,我们评估了在不同年龄单侧纹状体内注射后ZFP-B和ZFP-D的安全性。我们用ZFP-B和ZFP-D注射WT或zG175 het小鼠的早期(2-6月龄)和晚期(6-12月龄)组。包括未注射的年龄匹配的同窝仔。我们的观察结果是,研究进行期间没有体重减轻(早期组,4个月;晚期组,6个月),并且一般活动、自发性行为、刷洗、筑巢、食品和液体摄取或体温没有变化。与我们之前的研究一致,组织学分析显示,相较于对侧(数据未显示),没有大脑体积变化的证据,NeuN表达没有损失,并且Iba1和GFAP没有升高,这进一步支持了健康和患病纹状体中的长期ZFP耐受性。

[0349] 在第二个研究中,用编码ZFP-D或eGFP的AAV或载剂双侧注射总计164只6月龄雌性和雄性zQ175杂合小鼠,并监测其9个月内的空场、旋转杆、扣爪、神经学指标测量、大脑MRI和体重(对于所有组, $n=22$ 只动物/组,除了zQ175 het未注射组, $n=15$ 只动物)。该研究还包括未注射的年龄匹配的WT对照同窝仔($n=44$)。总之,在疾病表现后,我们在zQ175杂合小鼠中没有观察到任何程度ZFP-D的有害影响。zQ175 het小鼠在空场或神经系统指标缺陷中没有显示明显的扣爪表型或自发运动改变。纹状体ZFP处理没有显著改变在15个月观察到

的次要zQ175 het旋转杆表现缺陷,疾病进展过程中体重变化或影响神经学指标评分。此外,通过MRI评估,纹状体内ZFP-D给予对zQ175全脑、纹状体和皮质体积没有影响。

[0350] 综上,这些广泛的体内研究的结果支持这样的结论,即野生型和患病小鼠纹状体中,等位基因选择性ZFP在细胞和行为水平上良好耐受。

[0351] 总之,数据证明靶向突变体Htt序列的ZFP基因调节剂可用于治疗体捏HD。

[0352] 结论

[0353] 我们的研究首次直接证明小鼠中天然HTT基因座处的等位基因的选择性转录阻遏。在源自患者的细胞中进行大量测试的结果表明,具有 ≥ 38 个CAG重复序列的mHTT等位基因的表达可被阻遏79-93%,而具有 ≤ 21 个CAG重复序列(测试的最长正常重复长度)的正常等位基因的表达仅被阻遏0-31%。因此,等位基因选择性ZFP-TF展现出区分HD群体中100%的完全外显突变等位基因和至少86%的正常HTT等位基因的显著能力(图1H)。相较于基于SNP的等位基因选择性mHTT降低方法,各自仅限于HD患者的亚群,本研究所靶向CAG的ZFP阻遏物具有选择性下调大多数HD对象中致病等位基因表达的潜力。

[0354] 此外,在3个不同的HD小鼠模型中,我们证明了等位基因选择性ZFP在持续暴露6月至9个月或更长时间过程中稳健体内阻遏mHtt表达,并且改善分子、组织学、电生理学和某些行为缺陷。我们还在人HD神经元中建立了 >100 天的持续ZFP表达和功效,并且挽救了体内纹状体投射神经元的电生理学缺陷和MSN标志物基因表达,这表明在目标脑区域和相关人细胞类型中长期表达mHTT选择性ZFP是良好耐受的,并且有效缓解核心疾病表型。

[0355] 我们开发的ZFP表现出等位基因选择性、全基因组特异性和长期持续阻遏的高度组合,并且据我们所知,这对于合成转录因子而言是前所未有的。这些研究为这些因素的性能及其潜在应用建立了新的基准。该结果还引起了关于我们的研发策略可以对成功鉴定具有所需特性的ZFP做出贡献的有趣问题,特别是相较于先前对不同等位基因阻遏的尝试(Agustin-Pavon等(2016) *Mol Neurodegener* 11:64)。在这方面,看起来我们工作的一个关键方面是认识到,通过在足够多样化的候选设计组中寻找这种行为,有可能鉴定这样的多聚CAG靶向的ZFP阻遏物,其对重复束长度的功能依赖性非常强,比通过简单的质量作用更强。早已认可的是(Pavletich和Pabo(1991) *Science* 252:809-817),大分子系统可以提供进行高度协同行为的能力,其中初始结合事件促进后续结合事件,导致一致的全有或全无反应。这类行为最重要的要求是在底物结合的配体之间进行通讯的方法。考虑到KRAB阻遏结构域与大型共阻遏物复合物(其组分形成多聚体和较高水平的寡聚体)的相互作用,与染色体重复阵列结合的ZFP为这类通讯提供了无数的可能性,包括相邻DNA结合指之间的非共价接触(Nekludova和Pabo(1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6948-6952),结合依赖性DNA畸变(Mirny(2010) *Proc Natl Acad Sci USA* 107:22534-22539),核小体弹出(nucleosome ejection)(Iyengar和Farnham(2011) *J Biol Chem* 286:26267-26276),和亲和力(avidity)效应的潜能(Lupo等(2013) *Curr Genomics* 14:268-278;Peng等(2000) *J Biol Chem* 275:18000-18010;Hinde等(2015) *Sci Rep* 5:12001;Brasher等(2000) *EMBO J* 19:1587-1597;Sathasivam等(2013) *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:2366-2370)。

[0356] 这些考量促使我们选择ZFP结构(5F和6F蛋白,包含多种指、接头和靶向多聚CAG框架),设计规模(大到足以鉴定最佳区分等位基因的相对罕见的ZFP设计)等位基因)和方法(独立监测患者细胞中内源性正常和突变等位基因表达)。这些特征就位之时,相对较少的

筛选工作(41个设计)便产生了具有所需特性的蛋白质。与之相比,之前的研究仅采用单一重复指,并使用不真实的环境如嵌合游离报告物和小鼠细胞(Agustin-Pavon,同上)筛选出了较少的等位基因识别候选物(4个)。该研究证明了等位基因选择性mHTT阻遏,但是仅在携带非致病性等位基因(CAG 4(SEQ ID NO:86))的小鼠细胞的非疾病相关环境中,其甚至缺少单一全长靶标。此外,最初鉴定的ZFP并不良好耐受,并且需要进一步修饰ZFP骨架,KRAB阻遏结构域和启动子,以实现超过2周的体内阻遏(Gersbach和Perez-Pinera (2014) *Expert Opin Ther Targets* 18:835-839)。我们注意到,在我们自己在HD患者细胞中的测试这些试剂时,我们观察到无法在疾病相关人HTT等位基因(18(SEQ ID NO:79)相对45(SEQ ID NO:80)CAG)之间做区分。我们开发的策略相较于之前研究的差异似乎可能导致ZFP性能存在显著区别。

[0357] 我们的发现还提供了对等位基因选择性阻遏可能的机制的一些见解。具体地,我们观察到该现象与设计有关(图1D),似乎不利于结合的ZFP-TF之间通过例如传播DNA结构畸变或核小体弹出进行间接通讯的可能性(Mirny,同上,Iyengar和Farnham,同上)。此外,在使用纯化的组分的凝胶移位研究中观察到的结合协同的缺失与相邻结合的ZFP之间直接接触的发生不一致(数据未显示)。最后,我们注意到,观察到的特性需要KRAB功能结构域。这带来了这样的可能性,即等位基因选择性行为源自亲合力效应,所述亲合力效应可能是由KRAB阻遏结构域和大型共阻遏物复合物配合物的相互作用所介导的。

[0358] 任何治疗策略的关键考虑因素是评估特异性和脱靶作用。该方法特别令人感兴趣的是人基因组中其他1,053个内源性CAG阵列(长度 ≥ 6 ,以解释6指ZFP的大致DNA足迹)的患病率的总和与176个基因的启动子邻近。部分不连续阵列(各六聚体最多3个错配)丰度甚至更高,具有接近1,872个人基因的总计21,456个位点(全部CAG阵列)。尽管没有其他人类基因具有与最小完全外显性mHTT等位基因大小相同的TSS邻近CAG束(CAG40(SEQ ID NO:91);参见图1H),但是对某些CAG邻近脱靶基因的潜在调控可能对该策略的临床应用造成风险。

[0359] 为了对此进行研究,我们在患者神经元和成纤维细胞中采用了全局转录概括。与之前靶向CAG的策略相反(Gagnon,同上;Hu,同上;Yu,同上;Fischer,同上;Lutz,同上),由于启动子背景、表观遗传修饰以及我们的ZFP-TF与其他因素协同作用的不确定影响,我们选择了无偏向的方法来询问特异性,其中任何因素都可能不可预测地影响脱靶行为。我们鉴定例如表现出高度全基因组特异性的ZFP,无需针对该特性进行任何优化。特别有用的信息是结构对等位基因选择性ZFP特异性的影响。尽管ZFP-A和ZFP-B对于所有查询的mHTT等位基因具有相似的中靶行为,但是它们在两个细胞环境中具有互相排斥的脱靶概况(图2G,图11,图17)。例如,MBD5,一种具有不连续CAG束的CAG邻近基因(CAG19(SEQ ID NO:92),距TSS 0bp),被ZFP-B阻遏,但未被ZFP-A阻遏(图11B和11C)。ZFP-A和ZFP-B靶向CAG束的不同框架,由不同的ZF模块组成,并使用不同的接头结构,这表明它们的脱靶特性可能与设计有关,并因此可以进行优化。特异性同样重要的是有效靶向一种或多种致病剂。虽然早已认识到HTT基因中的CAG扩增是HD的原因,但是仍需继续阐明可能导致神经退行性的分子种类。例如,多个HD啮齿动物模型以及死后HD脑中存在包含外显子1和内含子1的异常剪接的Htt亚型,并且可能有助于形成包含致病多聚Q的N末端蛋白物质(Banez-Coronel等(2015) *Neuron* 88:667-677)。此外,已经证明越来越多的涉及疾病的微卫星扩增(包括mHTT的CAG重复)经历反义转录以及重复相关非ATG(RAN)翻译,产生了在患者脑中积累的神经毒性二

肽 (Arber (2017) *EMBO Mol Med* 9:281-284)。预计这些HTT亚型对于靶向外显子1下游序列的基于ASO和RNAi的策略具有抗性。与之相反,预计等位基因选择性ZFP-TF将减少包含扩增的CAG的所有正义和反义mHtt亚型的产生,这可能提供重要的治疗优势。我们注意到,虽然已经开发出靶向外显子1中CAG扩增的其他方式,但是据报道等位基因选择性行为仅适用于较窄的剂量范围(2-5倍) (Pfister等 (2009) *Current Biology* 19:774-778; Gagnon, 等; Hu. 等; Yu, 等, Fiszer, 等; Lutz, 等)。重要的是,我们证明了ZFP-TF可以在宽得多的剂量窗口(至少100倍)实现等位基因选择性阻遏,考虑到当前向靶组织内所有细胞递送统一剂量方面存在的技术难题,这是临床可转换性的关键因素。

[0360] 虽然经ZFP处理的R6/2小鼠在某些行为终点上表现出显著改善(扣抓和空场测试),但是我们没有在R6/2或zQ175 het小鼠中观察到其他标准HD模型终点的显著治疗效果(例如,加快旋转杆或握力强度)。在这方面中一个重要的考虑因素是对小鼠大脑进行立体定向给药可获得的有限AAV覆盖范围。在我们的研究中,实质内注射实现覆盖30-70%小鼠纹状体,从而限制了评估ZFP对一些疾病进展测量(最重要的是在行为水平)的影响的能力。此外,R6/2是侵袭性模型,并且在5周龄(可以可靠地进行立体定位注射的最早时间点)引入ZFP可能为时已晚,无法影响某些行为终点。虽然纳入纹状体对于运动控制而言至关重要,但是鉴于更广泛的皮质-纹状体-丘脑皮质环路在运动模式学习和执行中的作用,纹状体选择性遏制mHTT是否足以缓解这些症状尚不清楚。此外,尚不清楚HD小鼠中运动行为的改变是否仅由纹状体mHTT表达驱动。显然,其他大脑区域有助于小鼠自发性运动控制,包括运动相关皮质区域、小脑和脑干核,它们在这些模型中也可以受到影响 (Capelli等 (2017) *Nature* 551:373-377; Datson等 (2017) *PLoS One* 12:e0171127)。因此,可能有必要广泛抑制mHTT才能挽救HD小鼠模型中的这些疾病表型。为了支持这一观点,已经报道了替代方法(例如,ASO或siRNA)在自发性运动和旋转杆表现中的改善,所述替代方法已经证明在鼠脑中更广泛分布,尽管其作用通常是轻度或部分恢复的 (Stanek等 (2014) *Human Gene Therapy* 25(5):461-474; Russell等 (2014) *JAMA Neurol* 71:1520-1528)。考虑到这些局限性以及对mHTT是HD潜在病因的理解,我们主要将分析重点放在靶标参与的读出,组织病理学和电生理学缺陷的校正和生物标志物改善,这可能表示更可翻译且与延缓和/或逆转HD患者中神经退行性直接相关目的功效读出。

[0361] 使用针对多巴胺D1样和D2样受体的标志物和PDE10A酶的放射自显影结果表明,在早期和晚期治疗研究中(症状发作和表达下降后),降低Q175杂合小鼠中的mHTT与[3H] NNC112、[3H] 雷氯必利和[3H] MNI-659的特异性结合增加有关。观察到D1样受体的最大差异,其次是PDE10A和D2样受体,这表明在小鼠中的症状发作后降低mHTT的作用在直接途径的纹状体神经元中更为明显,因为SPN的两个群体中均PDE10。减少mHTT的作用在早期治疗研究中也更为明显,这表明如果尽早开始干预,降低mHTT可能产生更大的作用。然而,在Q175杂合小鼠中这些靶标下调后,在4个月时开始治疗(预期体内病毒转导1-2周内ZFP表达;数据未显示) (Monod等 (1965) *JMol Biol* 12:88-118),这表明ZFP给予可以部分恢复这些蛋白质的既有损失。使用具有[18F] MNI-659的微型PET确认了PDE10A ARG结果,其中我们证明了束缚势(binding potential)显著升高,即使在具有临床相关转化终点的症状起始后也是如此。与之相反,雷氯必利结合在微型PET研究中没有改变,这可能反映了D2样体外ARG和体内微型PET之间的方法学差异,以及用于检测对该标志物小幅影响的病毒载体的有

限组织分布。总之,我们的发现为在人试验中使用成像配体作为纹状体mHTT降低的早期读数提供了令人鼓舞的支持(Wilson等(2016) *Journal of the Neurological Sciences* 368:243-248;Marks等(2016) *Hum Gene Ther* 27:522-527)。还需要开展其他工作来研究标志物,针对涉及HD的其他大脑区域(如皮质),其中在临床上需求mHTT降低。

[0362] 本文中提及的所有专利、专利申请和出版物均以参考的方式用全文纳入本文。

[0363] 尽管出于理解清楚的目的,本发明通过说明和示例的方式提供了一些细节,但本领域技术人员可理解在不偏离本发明的精神或范围的情况下可实施各种改变和改进。因此,上述说明和实施例不应理解为是限制性的。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 桑格摩生物治疗股份有限公司(SANGAMO THERAPEUTICS, INC.)
- [0003] CHDI基金会股份有限公司(CHDI FOUNDATION, INC.)
- [0004] <120> 用于调节亨廷顿蛋白(HTT)的锌指蛋白组合物
- [0005] <130> 8327-0173.40
- [0006] <140>
- [0007] <141>
- [0008] <150> 62/659,552
- [0009] <151> 2018-04-18
- [0010] <150> 62/780,605
- [0011] <151> 2018-12-17
- [0012] <160> 93
- [0013] <170> PatentIn version 3.5
- [0014] <210> 1
- [0015] <211> 24
- [0016] <212> DNA
- [0017] <213> 人工序列
- [0018] <220>
- [0019] <223> 人工序列的描述:合成的引物
- [0020] <400> 1
- [0021] gcagagctct ctggctaact agag 24
- [0022] <210> 2
- [0023] <211> 20
- [0024] <212> DNA
- [0025] <213> 人工序列
- [0026] <220>
- [0027] <223> 人工序列的描述:合成的引物
- [0028] <400> 2
- [0029] ctggcaacta gaaggcacag 20
- [0030] <210> 3
- [0031] <211> 19
- [0032] <212> DNA
- [0033] <213> 人工序列
- [0034] <220>
- [0035] <223> 人工序列的描述:合成的引物
- [0036] <400> 3
- [0037] ggaacggtgc attggaacg 19
- [0038] <210> 4

- [0039] <211> 22
[0040] <212> DNA
[0041] <213> 人工序列
[0042] <220>
[0043] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0044] <400> 4
[0045] gttcgaatcc caattctttg cc 22
[0046] <210> 5
[0047] <211> 22
[0048] <212> DNA
[0049] <213> 人工序列
[0050] <220>
[0051] <223> 人工序列的描述:合成的探针
[0052] <400> 5
[0053] agcacgttgc ccaggaggtc ac 22
[0054] <210> 6
[0055] <211> 18
[0056] <212> DNA
[0057] <213> 人工序列
[0058] <220>
[0059] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0060] <400> 6
[0061] cgcaggctgc agggttac 18
[0062] <210> 7
[0063] <211> 18
[0064] <212> DNA
[0065] <213> 人工序列
[0066] <220>
[0067] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0068] <400> 7
[0069] gctgcaccga ccgtgagt 18
[0070] <210> 8
[0071] <211> 19
[0072] <212> DNA
[0073] <213> 人工序列
[0074] <220>
[0075] <223> 人工序列的描述:合成的探针
[0076] <400> 8
[0077] cagctccctg tcccggcgg 19

- [0078] <210> 9
[0079] <211> 17
[0080] <212> DNA
[0081] <213> 人工序列
[0082] <220>
[0083] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0084] <400> 9
[0085] agtttggagg gtttctc 17
[0086] <210> 10
[0087] <211> 17
[0088] <212> DNA
[0089] <213> 人工序列
[0090] <220>
[0091] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0092] <400> 10
[0093] agtttggagg gtttctt 17
[0094] <210> 11
[0095] <211> 18
[0096] <212> DNA
[0097] <213> 人工序列
[0098] <220>
[0099] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0100] <400> 11
[0101] agggtttctc cgctcagc 18
[0102] <210> 12
[0103] <211> 22
[0104] <212> DNA
[0105] <213> 人工序列
[0106] <220>
[0107] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0108] <400> 12
[0109] tcgactaaag caggatttca gg 22
[0110] <210> 13
[0111] <211> 21
[0112] <212> DNA
[0113] <213> 人工序列
[0114] <220>
[0115] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0116] <400> 13

- [0117] tctcctccac agagtttgtg a 21
[0118] <210> 14
[0119] <211> 24
[0120] <212> DNA
[0121] <213> 人工序列
[0122] <220>
[0123] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0124] <400> 14
[0125] ccttctttct ggactaagaa gctg 24
[0126] <210> 15
[0127] <211> 17
[0128] <212> DNA
[0129] <213> 人工序列
[0130] <220>
[0131] <223> 人工序列的描述:合成的探针
[0132] <400> 15
[0133] tccctcatcc actgtgt 17
[0134] <210> 16
[0135] <211> 14
[0136] <212> DNA
[0137] <213> 人工序列
[0138] <220>
[0139] <223> 人工序列的描述:合成的探针
[0140] <400> 16
[0141] ctcatctact gtgt 14
[0142] <210> 17
[0143] <211> 21
[0144] <212> DNA
[0145] <213> 人工序列
[0146] <220>
[0147] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0148] <220>
[0149] <221> 修饰的_碱基
[0150] <222> (7) .. (8)
[0151] <223> a、c、t、g未知或其他
[0152] <220>
[0153] <221> 修饰的_碱基
[0154] <222> (15) .. (15)
[0155] <223> a、c、t、g未知或其他

- [0156] <400> 17
[0157] cagcagnngc agcancagca g 21
[0158] <210> 18
[0159] <211> 19
[0160] <212> DNA
[0161] <213> 人工序列
[0162] <220>
[0163] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0164] <400> 18
[0165] caggtccggc agaggaacc 19
[0166] <210> 19
[0167] <211> 22
[0168] <212> DNA
[0169] <213> 人工序列
[0170] <220>
[0171] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0172] <400> 19
[0173] ttcacacggt ctttcttggt gg 22
[0174] <210> 20
[0175] <211> 16
[0176] <212> DNA
[0177] <213> 人工序列
[0178] <220>
[0179] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0180] <400> 20
[0181] gcccggctgt ggctga 16
[0182] <210> 21
[0183] <211> 22
[0184] <212> DNA
[0185] <213> 人工序列
[0186] <220>
[0187] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0188] <400> 21
[0189] ttcacacggt ctttcttggt gg 22
[0190] <210> 22
[0191] <211> 19
[0192] <212> DNA
[0193] <213> 人工序列
[0194] <220>

- [0195] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0196] <400> 22
[0197] caggtccggc agaggaacc 19
[0198] <210> 23
[0199] <211> 16
[0200] <212> DNA
[0201] <213> 人工序列
[0202] <220>
[0203] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0204] <400> 23
[0205] gcccggtgt ggctga 16
[0206] <210> 24
[0207] <211> 22
[0208] <212> DNA
[0209] <213> 人工序列
[0210] <220>
[0211] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0212] <400> 24
[0213] ttcacacggt ctttcttggt gg 22
[0214] <210> 25
[0215] <211> 22
[0216] <212> DNA
[0217] <213> 人工序列
[0218] <220>
[0219] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0220] <400> 25
[0221] ctggctggtg gagagagaaa tt 22
[0222] <210> 26
[0223] <211> 23
[0224] <212> DNA
[0225] <213> 人工序列
[0226] <220>
[0227] <223> 人工序列的描述:合成的引物
[0228] <400> 26
[0229] tcgtcgtcct tgtagtcaac tga 23
[0230] <210> 27
[0231] <211> 7
[0232] <212> PRT
[0233] <213> 人工序列

- [0234] <220>
- [0235] <223> 人工序列的描述:合成的肽
- [0236] <400> 27
- [0237] Thr Gly Glu Lys Pro Phe Gln
- [0238] 1 5
- [0239] <210> 28
- [0240] <211> 8
- [0241] <212> PRT
- [0242] <213> 人工序列
- [0243] <220>
- [0244] <223> 人工序列的描述:合成的肽
- [0245] <400> 28
- [0246] Thr Gly Ser Gln Lys Pro Phe Gln
- [0247] 1 5
- [0248] <210> 29
- [0249] <211> 16
- [0250] <212> PRT
- [0251] <213> 人工序列
- [0252] <220>
- [0253] <223> 人工序列的描述:合成的肽
- [0254] <400> 29
- [0255] Thr Pro Asn Pro His Arg Arg Thr Asp Pro Ser His Lys Pro Phe Gln
- [0256] 1 5 10 15
- [0257] <210> 30
- [0258] <211> 7
- [0259] <212> PRT
- [0260] <213> 人工序列
- [0261] <220>
- [0262] <223> 人工序列的描述:合成的肽
- [0263] <400> 30
- [0264] Gln Ser Ser Asp Leu Ser Arg
- [0265] 1 5
- [0266] <210> 31
- [0267] <211> 7
- [0268] <212> PRT
- [0269] <213> 人工序列
- [0270] <220>
- [0271] <223> 人工序列的描述:合成的肽
- [0272] <400> 31

[0273] Gln Trp Ser Thr Arg Lys Arg
[0274] 1 5
[0275] <210> 32
[0276] <211> 7
[0277] <212> PRT
[0278] <213> 人工序列
[0279] <220>
[0280] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0281] <400> 32
[0282] Gln Ser Gly Asp Leu Thr Arg
[0283] 1 5
[0284] <210> 33
[0285] <211> 7
[0286] <212> PRT
[0287] <213> 人工序列
[0288] <220>
[0289] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0290] <400> 33
[0291] Arg Ser Asp Asn Leu Ser Glu
[0292] 1 5
[0293] <210> 34
[0294] <211> 7
[0295] <212> PRT
[0296] <213> 人工序列
[0297] <220>
[0298] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0299] <400> 34
[0300] Lys Arg Cys Asn Leu Arg Cys
[0301] 1 5
[0302] <210> 35
[0303] <211> 7
[0304] <212> PRT
[0305] <213> 人工序列
[0306] <220>
[0307] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0308] <400> 35
[0309] Met Ala Cys Cys Arg Tyr Ala
[0310] 1 5
[0311] <210> 36

- [0312] <211> 7
[0313] <212> PRT
[0314] <213> 人工序列
[0315] <220>
[0316] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0317] <400> 36
[0318] Arg Leu Trp Asn Arg Lys Gln
[0319] 1 5
[0320] <210> 37
[0321] <211> 7
[0322] <212> PRT
[0323] <213> 人工序列
[0324] <220>
[0325] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0326] <400> 37
[0327] His Arg Ser Thr Arg Asn Arg
[0328] 1 5
[0329] <210> 38
[0330] <211> 7
[0331] <212> PRT
[0332] <213> 人工序列
[0333] <220>
[0334] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0335] <400> 38
[0336] Arg Ser Asp Thr Leu Ser Glu
[0337] 1 5
[0338] <210> 39
[0339] <211> 7
[0340] <212> PRT
[0341] <213> 人工序列
[0342] <220>
[0343] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0344] <400> 39
[0345] Arg Arg Trp Thr Leu Val Gly
[0346] 1 5
[0347] <210> 40
[0348] <211> 7
[0349] <212> PRT
[0350] <213> 人工序列

- [0351] <220>
[0352] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0353] <400> 40
[0354] Gln Ser Ser Asp Leu Arg Arg
[0355] 1 5
[0356] <210> 41
[0357] <211> 7
[0358] <212> PRT
[0359] <213> 人工序列
[0360] <220>
[0361] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0362] <400> 41
[0363] Arg Ser Ala Val Leu Ser Glu
[0364] 1 5
[0365] <210> 42
[0366] <211> 7
[0367] <212> PRT
[0368] <213> 人工序列
[0369] <220>
[0370] <223> 人工序列的描述:合成的肽
[0371] <400> 42
[0372] Arg Ser Asp Val Leu Ser Glu
[0373] 1 5
[0374] <210> 43
[0375] <211> 18
[0376] <212> DNA
[0377] <213> 人工序列
[0378] <220>
[0379] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0380] <400> 43
[0381] gcagcagcag cagcagca 18
[0382] <210> 44
[0383] <211> 15
[0384] <212> DNA
[0385] <213> 人工序列
[0386] <220>
[0387] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0388] <400> 44
[0389] gcagcagcag cagca 15

- [0390] <210> 45
[0391] <211> 19
[0392] <212> DNA
[0393] <213> 人工序列
[0394] <220>
[0395] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0396] <400> 45
[0397] gcagcagcag cagcagcag 19
[0398] <210> 46
[0399] <211> 16
[0400] <212> DNA
[0401] <213> 人工序列
[0402] <220>
[0403] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0404] <400> 46
[0405] gcagcagcag cagcag 16
[0406] <210> 47
[0407] <211> 21
[0408] <212> DNA
[0409] <213> 人工序列
[0410] <220>
[0411] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0412] <400> 47
[0413] gcagcagcag cagcagcagc a 21
[0414] <210> 48
[0415] <211> 13
[0416] <212> DNA
[0417] <213> 人工序列
[0418] <220>
[0419] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0420] <400> 48
[0421] gcagcagcag cag 13
[0422] <210> 49
[0423] <211> 18
[0424] <212> DNA
[0425] <213> 人工序列
[0426] <220>
[0427] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0428] <400> 49

- [0429] cagcagcagc agcagcag 18
[0430] <210> 50
[0431] <211> 20
[0432] <212> DNA
[0433] <213> 人工序列
[0434] <220>
[0435] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0436] <400> 50
[0437] cagcagcagc agcagcagca 20
[0438] <210> 51
[0439] <211> 21
[0440] <212> DNA
[0441] <213> 人工序列
[0442] <220>
[0443] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0444] <400> 51
[0445] cagcagcagc agcagcagca g 21
[0446] <210> 52
[0447] <211> 17
[0448] <212> DNA
[0449] <213> 人工序列
[0450] <220>
[0451] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0452] <400> 52
[0453] cagcagcagc agcagca 17
[0454] <210> 53
[0455] <211> 14
[0456] <212> DNA
[0457] <213> 人工序列
[0458] <220>
[0459] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0460] <400> 53
[0461] cagcagcagc agca 14
[0462] <210> 54
[0463] <211> 18
[0464] <212> DNA
[0465] <213> 人工序列
[0466] <220>
[0467] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

- [0468] <400> 54
[0469] gctgctgctg ctgctgct 18
[0470] <210> 55
[0471] <211> 19
[0472] <212> DNA
[0473] <213> 人工序列
[0474] <220>
[0475] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0476] <400> 55
[0477] gctgctgctg ctgctgctg 19
[0478] <210> 56
[0479] <211> 15
[0480] <212> DNA
[0481] <213> 人工序列
[0482] <220>
[0483] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0484] <400> 56
[0485] gctgctgctg ctgct 15
[0486] <210> 57
[0487] <211> 16
[0488] <212> DNA
[0489] <213> 人工序列
[0490] <220>
[0491] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0492] <400> 57
[0493] gctgctgctg ctgctg 16
[0494] <210> 58
[0495] <211> 18
[0496] <212> DNA
[0497] <213> 人工序列
[0498] <220>
[0499] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0500] <400> 58
[0501] ctgctgctgc tgctgctg 18
[0502] <210> 59
[0503] <211> 20
[0504] <212> DNA
[0505] <213> 人工序列
[0506] <220>

- [0507] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0508] <400> 59
[0509] ctgctgctgc tgctgctgct 20
[0510] <210> 60
[0511] <211> 21
[0512] <212> DNA
[0513] <213> 人工序列
[0514] <220>
[0515] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0516] <400> 60
[0517] ctgctgctgc tgctgctgct g 21
[0518] <210> 61
[0519] <211> 9
[0520] <212> DNA
[0521] <213> 人工序列
[0522] <220>
[0523] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0524] <400> 61
[0525] gctgctgct 9
[0526] <210> 62
[0527] <211> 14
[0528] <212> DNA
[0529] <213> 人工序列
[0530] <220>
[0531] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0532] <400> 62
[0533] ctgctgctgc tgct 14
[0534] <210> 63
[0535] <211> 15
[0536] <212> DNA
[0537] <213> 人工序列
[0538] <220>
[0539] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0540] <400> 63
[0541] ctgctgctgc tgctg 15
[0542] <210> 64
[0543] <211> 266
[0544] <212> PRT
[0545] <213> 人工序列

[0585] <212> PRT
 [0586] <213> 人工序列
 [0587] <220>
 [0588] <223> 人工序列的描述:合成的多肽
 [0589] <400> 65
 [0590] Met Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly Ile His Gly Val Pro Ala
 [0591] 1 5 10 15
 [0592] Ala Met Ala Glu Arg Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe
 [0593] 20 25 30
 [0594] Ser Arg Ser Asp Asn Leu Ser Glu His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu
 [0595] 35 40 45
 [0596] Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Lys Arg Cys
 [0597] 50 55 60
 [0598] Asn Leu Arg Cys His Thr Lys Ile His Thr His Pro Arg Ala Pro Ile
 [0599] 65 70 75 80
 [0600] Pro Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Ser
 [0601] 85 90 95
 [0602] Gly Asp Leu Thr Arg His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe
 [0603] 100 105 110
 [0604] Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Gln Ser Gly Asp Leu Thr
 [0605] 115 120 125
 [0606] Arg His Thr Lys Ile His Thr Pro Asn Pro His Arg Arg Thr Asp Pro
 [0607] 130 135 140
 [0608] Ser His Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Arg
 [0609] 145 150 155 160
 [0610] Ser Asp Asn Leu Ser Glu His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro
 [0611] 165 170 175
 [0612] Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Lys Arg Cys Asn Leu
 [0613] 180 185 190
 [0614] Arg Cys His Thr Lys Ile His Leu Arg Gln Lys Asp Ala Ala Arg Gly
 [0615] 195 200 205
 [0616] Ser Gly Met Asp Ala Lys Ser Leu Thr Ala Trp Ser Arg Thr Leu Val
 [0617] 210 215 220
 [0618] Thr Phe Lys Asp Val Phe Val Asp Phe Thr Arg Glu Glu Trp Lys Leu
 [0619] 225 230 235 240
 [0620] Leu Asp Thr Ala Gln Gln Ile Val Tyr Arg Asn Val Met Leu Glu Asn
 [0621] 245 250 255
 [0622] Tyr Lys Asn Leu Val Ser Leu Gly Tyr Gln Leu Thr Lys Pro Asp Val
 [0623] 260 265 270

[0624]	Ile Leu Arg Leu Glu Lys Gly Glu Glu Pro Trp Leu Val Glu Arg Glu
[0625]	275 280 285
[0626]	Ile His Gln Glu Thr His Pro Asp Ser Glu Thr Ala Phe Glu Ile Lys
[0627]	290 295 300
[0628]	Ser Ser Val
[0629]	305
[0630]	<210> 66
[0631]	<211> 295
[0632]	<212> PRT
[0633]	<213> 人工序列
[0634]	<220>
[0635]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽
[0636]	<400> 66
[0637]	Met Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly Ile His Gly Val Pro Ala
[0638]	1 5 10 15
[0639]	Ala Met Ala Glu Arg Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe
[0640]	20 25 30
[0641]	Ser Arg Ser Asp Asn Leu Ser Glu His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu
[0642]	35 40 45
[0643]	Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Lys Arg Cys
[0644]	50 55 60
[0645]	Asn Leu Arg Cys His Thr Lys Ile His Thr Gly Ser Gln Lys Pro Phe
[0646]	65 70 75 80
[0647]	Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp Asn Leu Ser
[0648]	85 90 95
[0649]	Glu His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile
[0650]	100 105 110
[0651]	Cys Gly Arg Lys Phe Ala Lys Arg Cys Asn Leu Arg Cys His Thr Lys
[0652]	115 120 125
[0653]	Ile His Thr Gly Ser Gln Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg
[0654]	130 135 140
[0655]	Asn Phe Ser Arg Ser Asp Asn Leu Ser Glu His Ile Arg Thr His Thr
[0656]	145 150 155 160
[0657]	Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Lys
[0658]	165 170 175
[0659]	Arg Cys Asn Leu Arg Cys His Thr Lys Ile His Leu Arg Gln Lys Asp
[0660]	180 185 190
[0661]	Ala Ala Arg Gly Ser Gly Met Asp Ala Lys Ser Leu Thr Ala Trp Ser
[0662]	195 200 205

[0663]	Arg Thr Leu Val Thr Phe Lys Asp Val Phe Val Asp Phe Thr Arg Glu
[0664]	210 215 220
[0665]	Glu Trp Lys Leu Leu Asp Thr Ala Gln Gln Ile Val Tyr Arg Asn Val
[0666]	225 230 235 240
[0667]	Met Leu Glu Asn Tyr Lys Asn Leu Val Ser Leu Gly Tyr Gln Leu Thr
[0668]	245 250 255
[0669]	Lys Pro Asp Val Ile Leu Arg Leu Glu Lys Gly Glu Glu Pro Trp Leu
[0670]	260 265 270
[0671]	Val Glu Arg Glu Ile His Gln Glu Thr His Pro Asp Ser Glu Thr Ala
[0672]	275 280 285
[0673]	Phe Glu Ile Lys Ser Ser Val
[0674]	290 295
[0675]	<210> 67
[0676]	<211> 270
[0677]	<212> PRT
[0678]	<213> 人工序列
[0679]	<220>
[0680]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽
[0681]	<400> 67
[0682]	Met Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly Ile His Gly Val Pro Ala
[0683]	1 5 10 15
[0684]	Ala Met Ala Glu Arg Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe
[0685]	20 25 30
[0686]	Ser Arg Ser Asp Asn Leu Ser Glu His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu
[0687]	35 40 45
[0688]	Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Lys Arg Cys
[0689]	50 55 60
[0690]	Asn Leu Arg Cys His Thr Lys Ile His Thr His Pro Arg Ala Pro Ile
[0691]	65 70 75 80
[0692]	Pro Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Gln Ser
[0693]	85 90 95
[0694]	Ser Asp Leu Ser Arg His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe
[0695]	100 105 110
[0696]	Ala Cys Asp Ile Cys Gly Arg Lys Phe Ala Gln Trp Ser Thr Arg Lys
[0697]	115 120 125
[0698]	Arg His Thr Lys Ile His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Gln Cys Arg Ile
[0699]	130 135 140
[0700]	Cys Met Arg Lys Phe Ala Gln Ser Gly Asp Leu Thr Arg His Thr Lys
[0701]	145 150 155 160

[0702]	Ile His Leu Arg Gln Lys Asp Ala Ala Arg Gly Ser Gly Met Asp Ala
[0703]	165 170 175
[0704]	Lys Ser Leu Thr Ala Trp Ser Arg Thr Leu Val Thr Phe Lys Asp Val
[0705]	180 185 190
[0706]	Phe Val Asp Phe Thr Arg Glu Glu Trp Lys Leu Leu Asp Thr Ala Gln
[0707]	195 200 205
[0708]	Gln Ile Val Tyr Arg Asn Val Met Leu Glu Asn Tyr Lys Asn Leu Val
[0709]	210 215 220
[0710]	Ser Leu Gly Tyr Gln Leu Thr Lys Pro Asp Val Ile Leu Arg Leu Glu
[0711]	225 230 235 240
[0712]	Lys Gly Glu Glu Pro Trp Leu Val Glu Arg Glu Ile His Gln Glu Thr
[0713]	245 250 255
[0714]	His Pro Asp Ser Glu Thr Ala Phe Glu Ile Lys Ser Ser Val
[0715]	260 265 270
[0716]	<210> 68
[0717]	<211> 20
[0718]	<212> DNA
[0719]	<213> 人工序列
[0720]	<220>
[0721]	<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0722]	<400> 68
[0723]	cagcagcagc agcagcagca 20
[0724]	<210> 69
[0725]	<211> 7
[0726]	<212> PRT
[0727]	<213> 人工序列
[0728]	<220>
[0729]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[0730]	<400> 69
[0731]	Asp Thr Gly Leu Leu Asn Arg
[0732]	1 5
[0733]	<210> 70
[0734]	<211> 7
[0735]	<212> PRT
[0736]	<213> 人工序列
[0737]	<220>
[0738]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[0739]	<400> 70
[0740]	Ser Ser Tyr Asn Leu Lys Thr

- [0741] 1 5
- [0742] <210> 71
- [0743] <211> 60
- [0744] <212> DNA
- [0745] <213> 智人(Homo sapiens)
- [0746] <220>
- [0747] <221> misc_feature
- [0748] <222> (1) .. (60)
- [0749] <223> 该序列可以包括15-20个“CAG”重复
- [0750] <400> 71
- [0751] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 60
- [0752] <210> 72
- [0753] <211> 150
- [0754] <212> DNA
- [0755] <213> 人工序列
- [0756] <220>
- [0757] <223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸
- [0758] <400> 72
- [0759] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 60
- [0760] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 120
- [0761] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 150
- [0762] <210> 73
- [0763] <211> 240
- [0764] <212> DNA
- [0765] <213> 人工序列
- [0766] <220>
- [0767] <223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸
- [0768] <400> 73
- [0769] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 60
- [0770] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 120
- [0771] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 180
- [0772] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 240
- [0773] <210> 74
- [0774] <211> 327
- [0775] <212> DNA
- [0776] <213> 人工序列
- [0777] <220>
- [0778] <223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸
- [0779] <400> 74

[0780]	cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag	60
[0781]	cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag	120
[0782]	cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag	180
[0783]	cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag	240
[0784]	cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag	300
[0785]	cagcagcagc agcagcagca gcagcag	327
[0786]	<210>	75
[0787]	<211>	540
[0788]	<212>	DNA
[0789]	<213>	人工序列
[0790]	<220>	
[0791]	<223>	人工序列的描述:合成的多核苷酸
[0792]	<400>	75
[0793]	cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag	60
[0794]	cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag	120
[0795]	cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag	180
[0796]	cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag	240
[0797]	cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag	300
[0798]	cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag	360
[0799]	cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag	420
[0800]	cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag	480
[0801]	cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag	540
[0802]	<210>	76
[0803]	<211>	51
[0804]	<212>	DNA
[0805]	<213>	人工序列
[0806]	<220>	
[0807]	<223>	人工序列的描述:合成的寡核苷酸
[0808]	<400>	76
[0809]	cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca g	51
[0810]	<210>	77
[0811]	<211>	129
[0812]	<212>	DNA
[0813]	<213>	人工序列
[0814]	<220>	
[0815]	<223>	人工序列的描述:合成的多核苷酸
[0816]	<400>	77
[0817]	cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag	60
[0818]	cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag	120

- [0819] cagcagcag 129
- [0820] <210> 78
- [0821] <211> 144
- [0822] <212> DNA
- [0823] <213> 人工序列
- [0824] <220>
- [0825] <223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸
- [0826] <400> 78
- [0827] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 60
- [0828] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 120
- [0829] cagcagcagc agcagcagca gcag 144
- [0830] <210> 79
- [0831] <211> 54
- [0832] <212> DNA
- [0833] <213> 人工序列
- [0834] <220>
- [0835] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
- [0836] <400> 79
- [0837] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcag 54
- [0838] <210> 80
- [0839] <211> 135
- [0840] <212> DNA
- [0841] <213> 人工序列
- [0842] <220>
- [0843] <223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸
- [0844] <400> 80
- [0845] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 60
- [0846] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 120
- [0847] cagcagcagc agcag 135
- [0848] <210> 81
- [0849] <211> 45
- [0850] <212> DNA
- [0851] <213> 人工序列
- [0852] <220>
- [0853] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
- [0854] <400> 81
- [0855] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcag 45
- [0856] <210> 82
- [0857] <211> 201

- [0858] <212> DNA
- [0859] <213> 人工序列
- [0860] <220>
- [0861] <223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸
- [0862] <400> 82
- [0863] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 60
- [0864] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 120
- [0865] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 180
- [0866] cagcagcagc agcagcagca g 201
- [0867] <210> 83
- [0868] <211> 63
- [0869] <212> DNA
- [0870] <213> 人工序列
- [0871] <220>
- [0872] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
- [0873] <400> 83
- [0874] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 60
- [0875] cag 63
- [0876] <210> 84
- [0877] <211> 114
- [0878] <212> DNA
- [0879] <213> 人工序列
- [0880] <220>
- [0881] <223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸
- [0882] <400> 84
- [0883] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 60
- [0884] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcag 114
- [0885] <210> 85
- [0886] <211> 210
- [0887] <212> DNA
- [0888] <213> 人工序列
- [0889] <220>
- [0890] <223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸
- [0891] <400> 85
- [0892] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 60
- [0893] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 120
- [0894] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 180
- [0895] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 210
- [0896] <210> 86

- [0936] <400> 89
- [0937] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 60
- [0938] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 117
- [0939] <210> 90
- [0940] <211> 14
- [0941] <212> DNA
- [0942] <213> 人工序列
- [0943] <220>
- [0944] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
- [0945] <400> 90
- [0946] gcagcagcag cagc 14
- [0947] <210> 91
- [0948] <211> 120
- [0949] <212> DNA
- [0950] <213> 人工序列
- [0951] <220>
- [0952] <223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸
- [0953] <400> 91
- [0954] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 60
- [0955] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 120
- [0956] <210> 92
- [0957] <211> 57
- [0958] <212> DNA
- [0959] <213> 人工序列
- [0960] <220>
- [0961] <223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸
- [0962] <400> 92
- [0963] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 57
- [0964] <210> 93
- [0965] <211> 84
- [0966] <212> DNA
- [0967] <213> 人工序列
- [0968] <220>
- [0969] <223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸
- [0970] <400> 93
- [0971] cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag 60
- [0972] cagcagcagc agcagcagca gcag 84

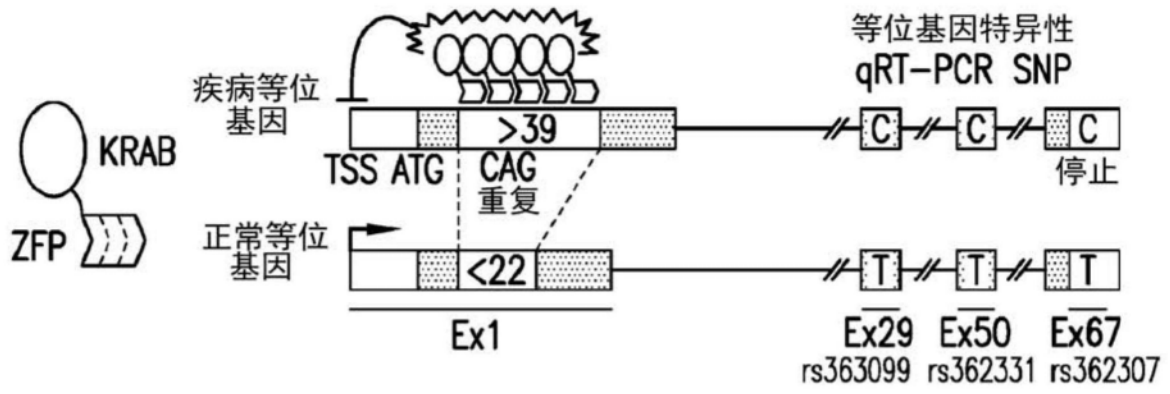


图1A

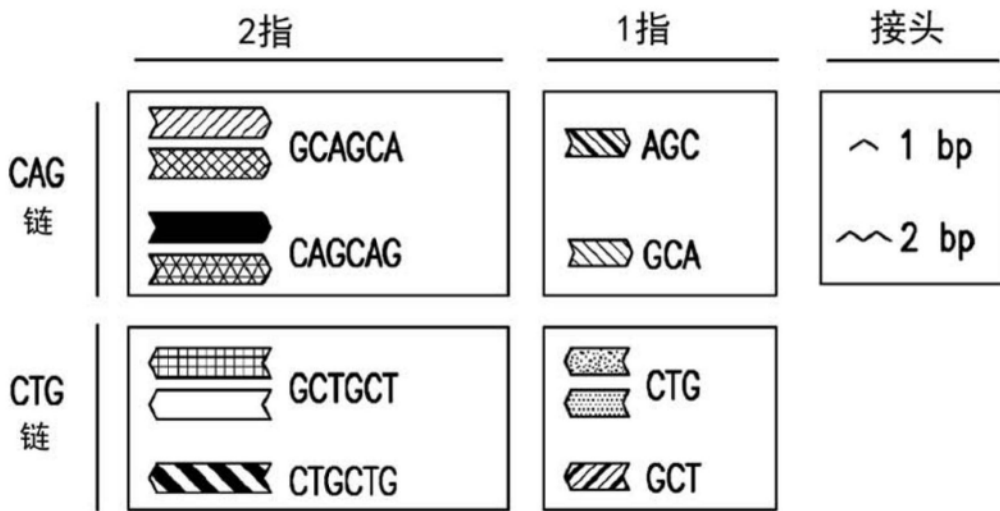


图1B

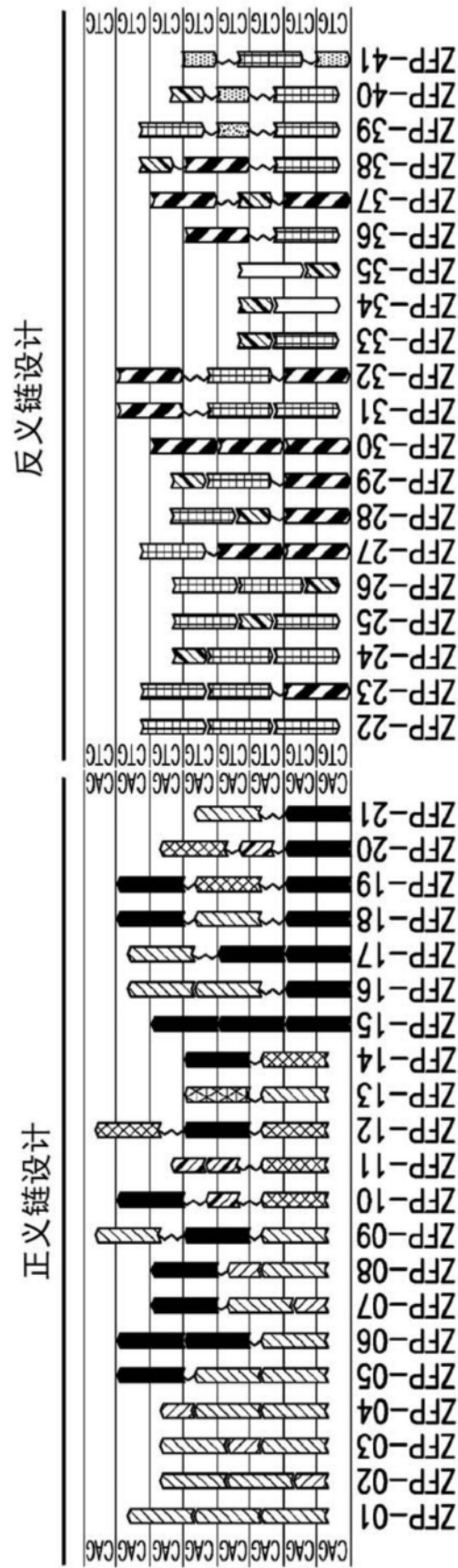


图1C

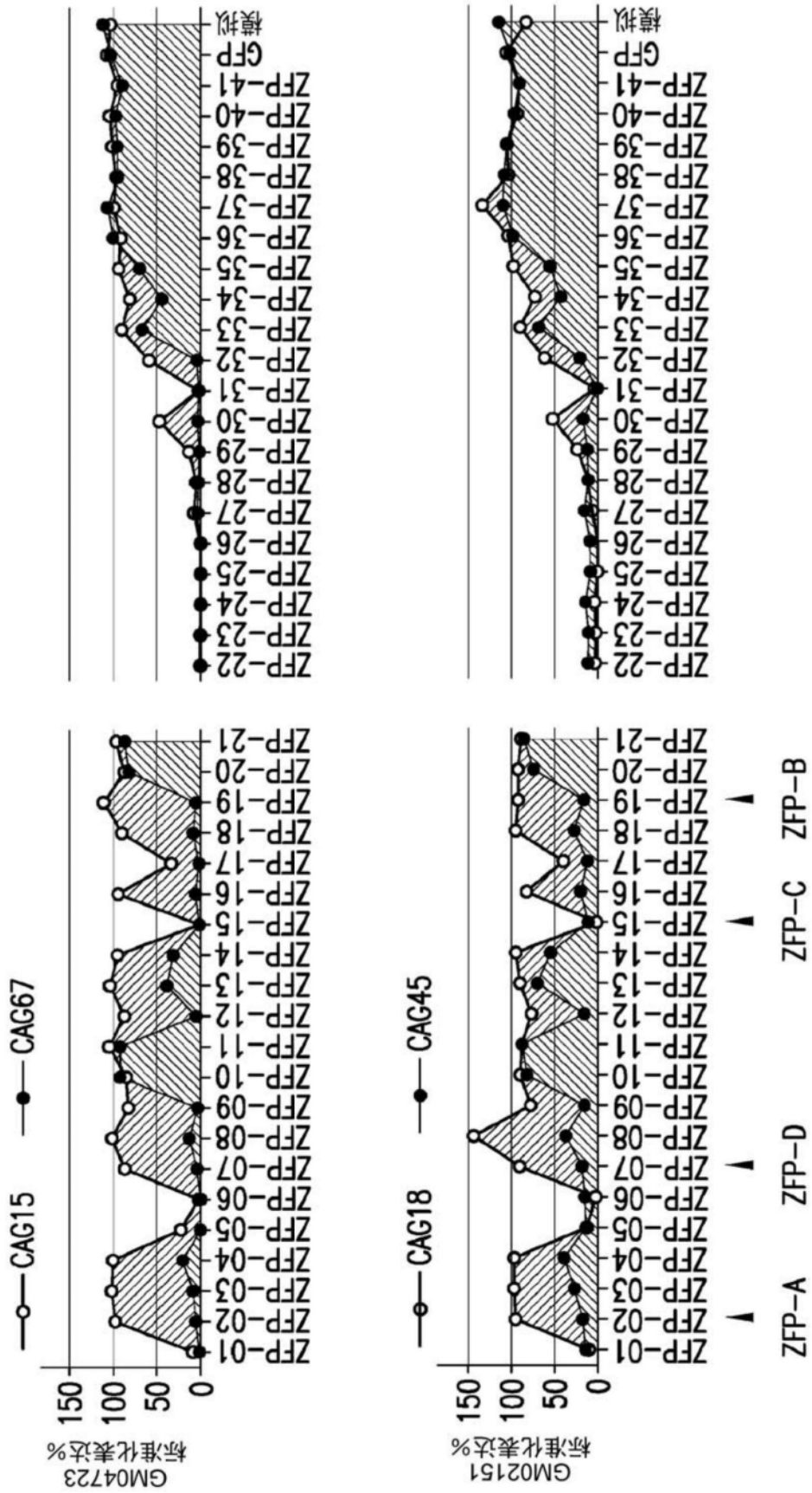


图1D

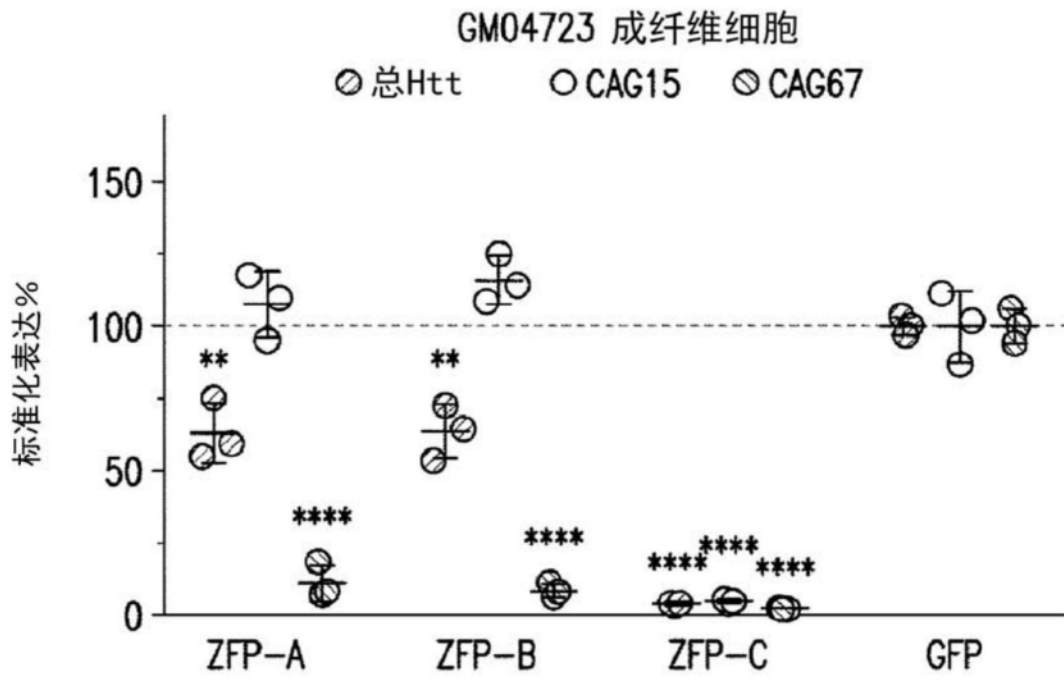


图1E

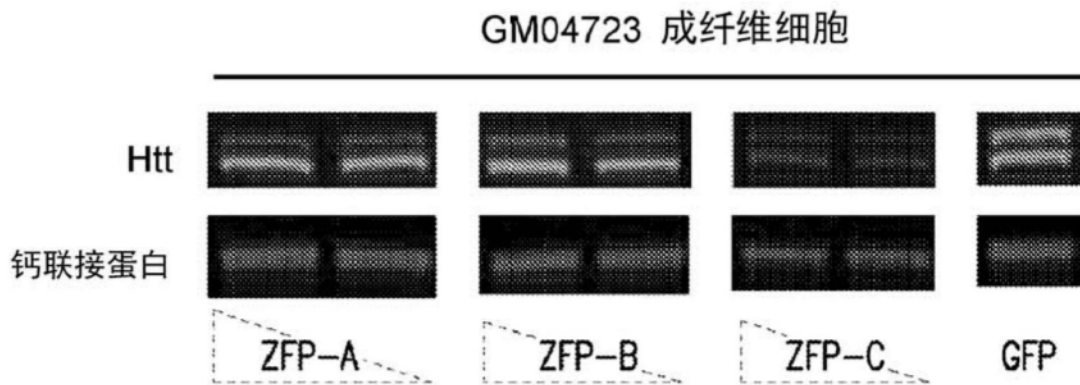


图1F

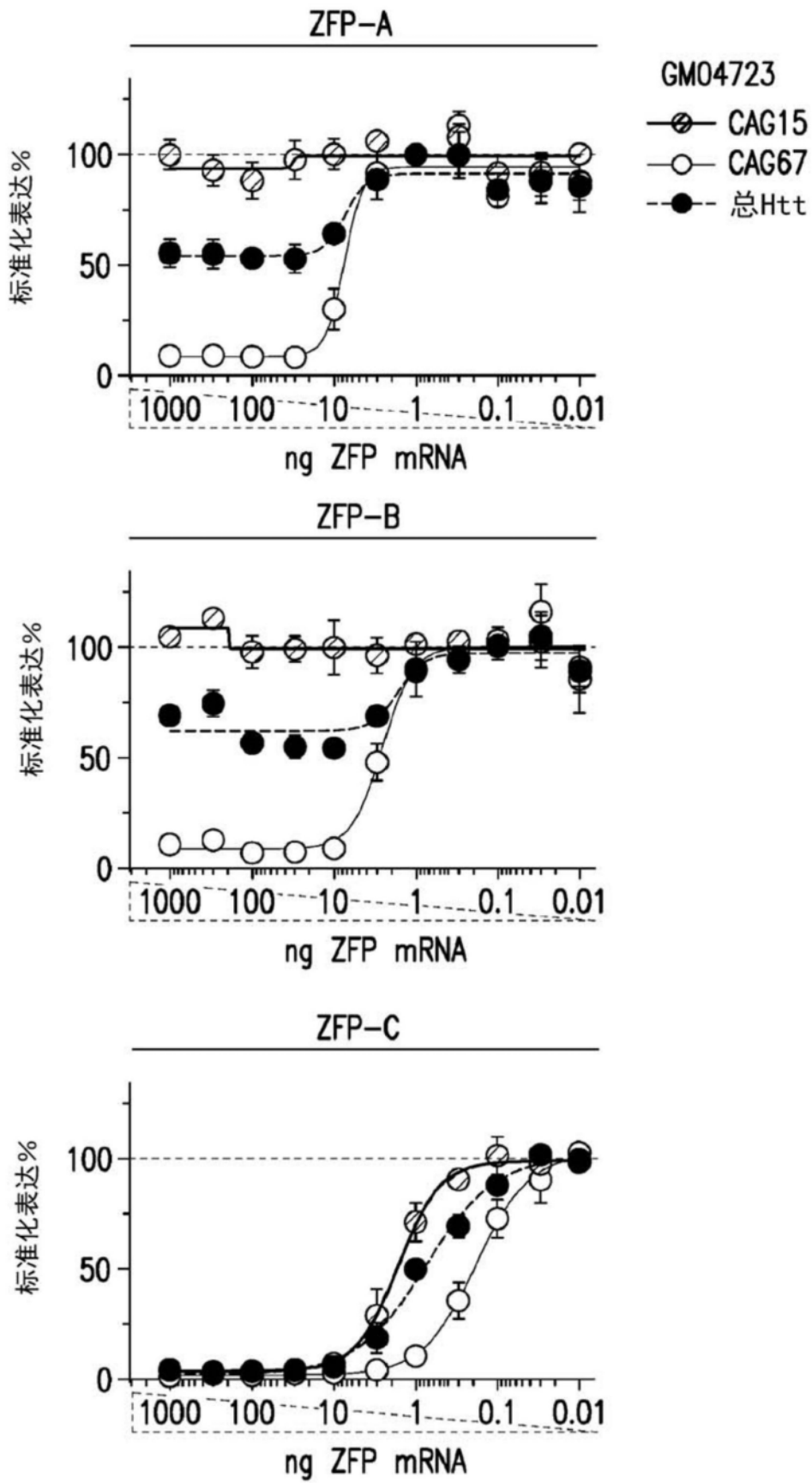


图1G

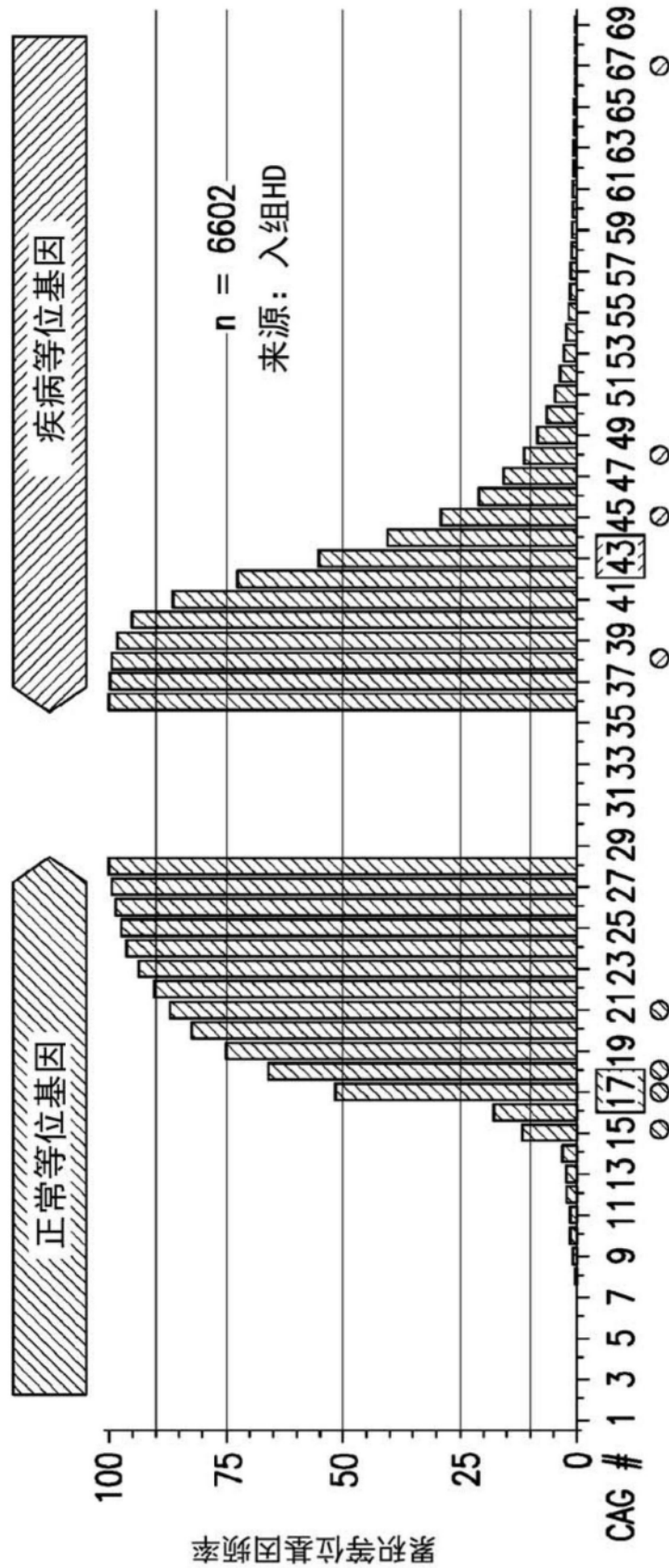


图1H

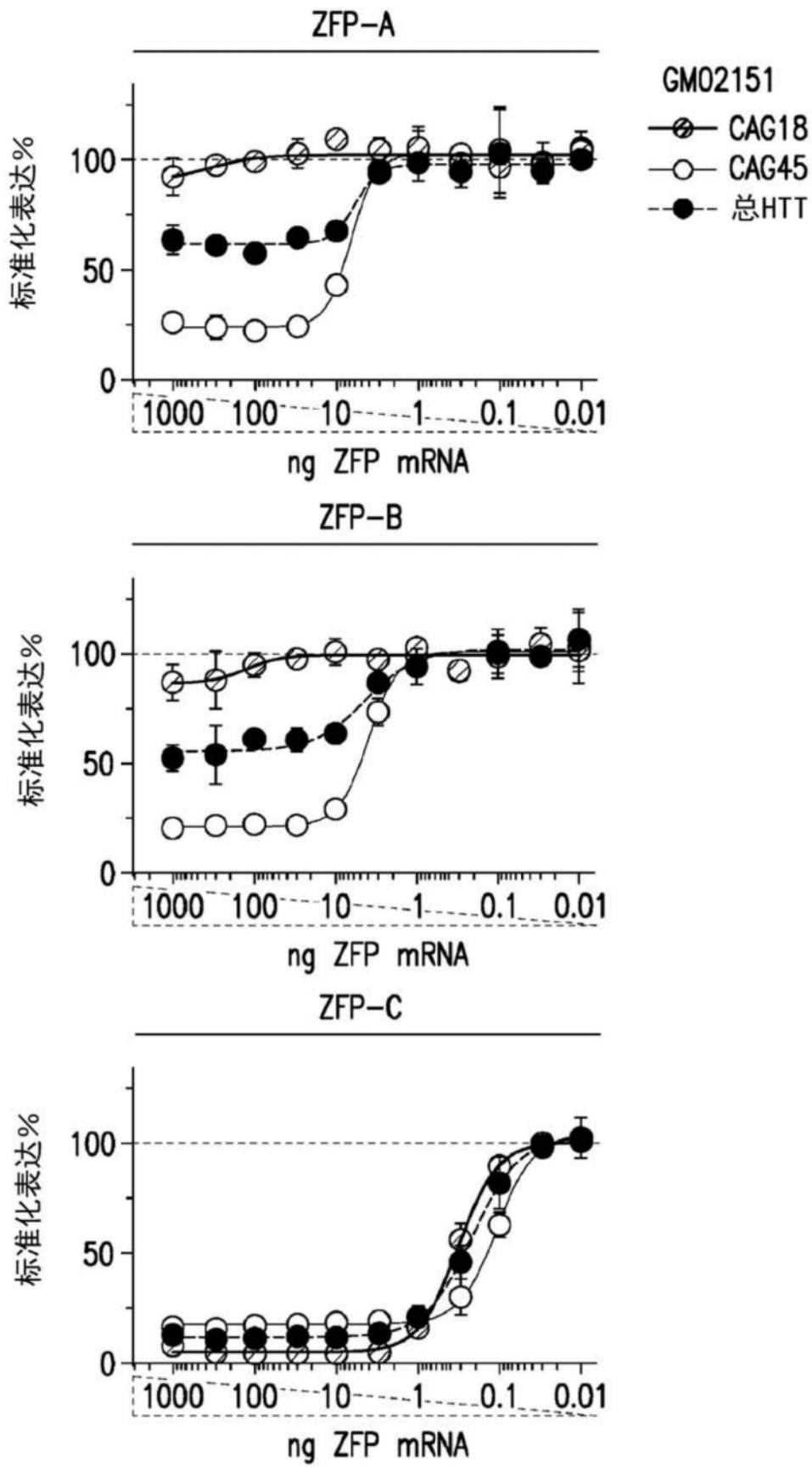


图1I

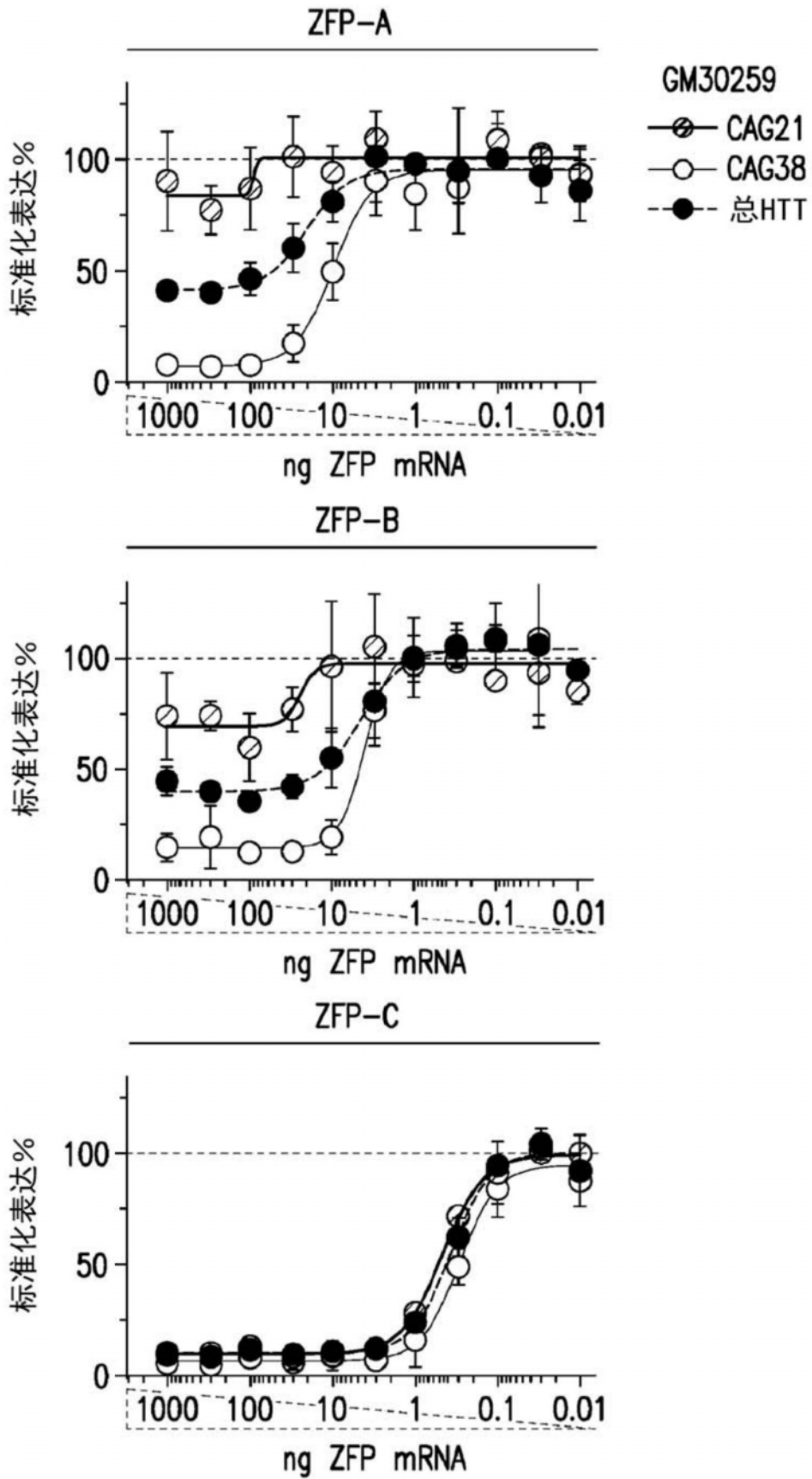


图1J

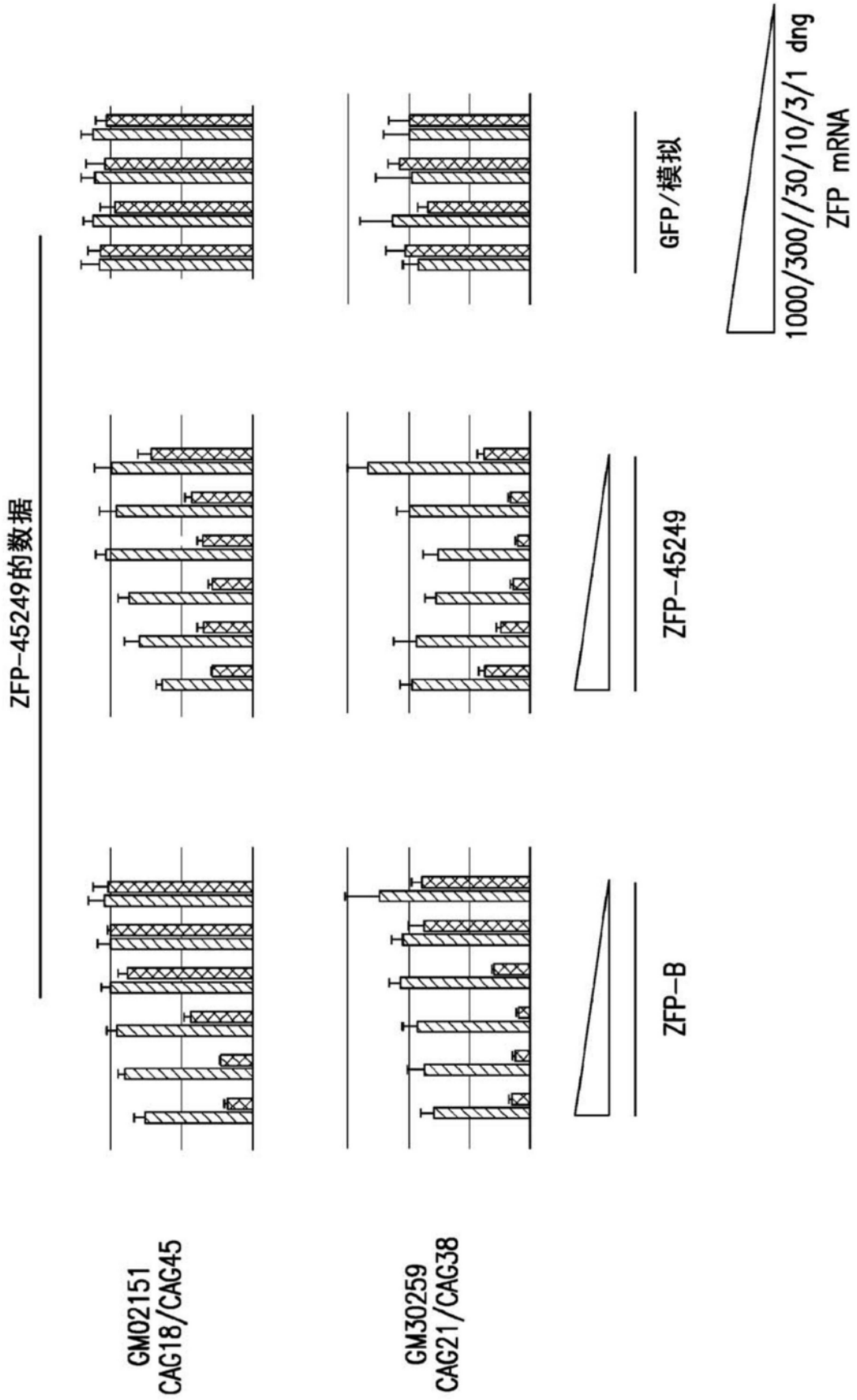


图1K

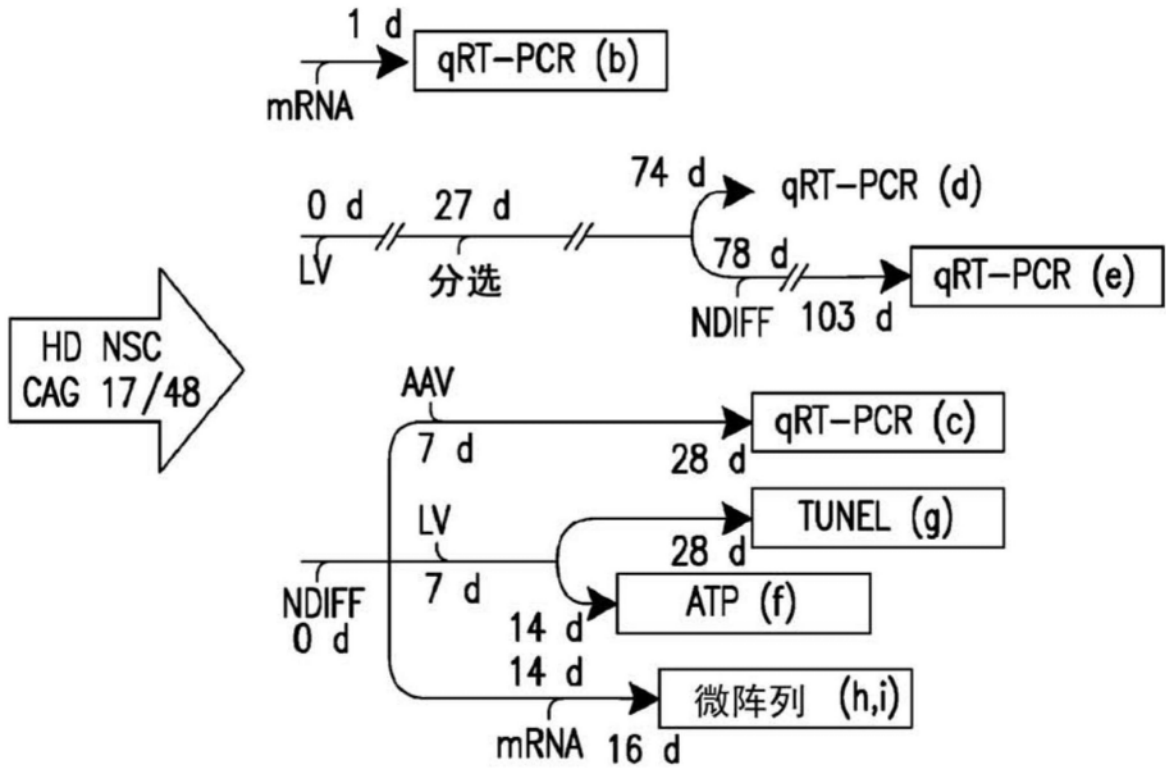


图2A

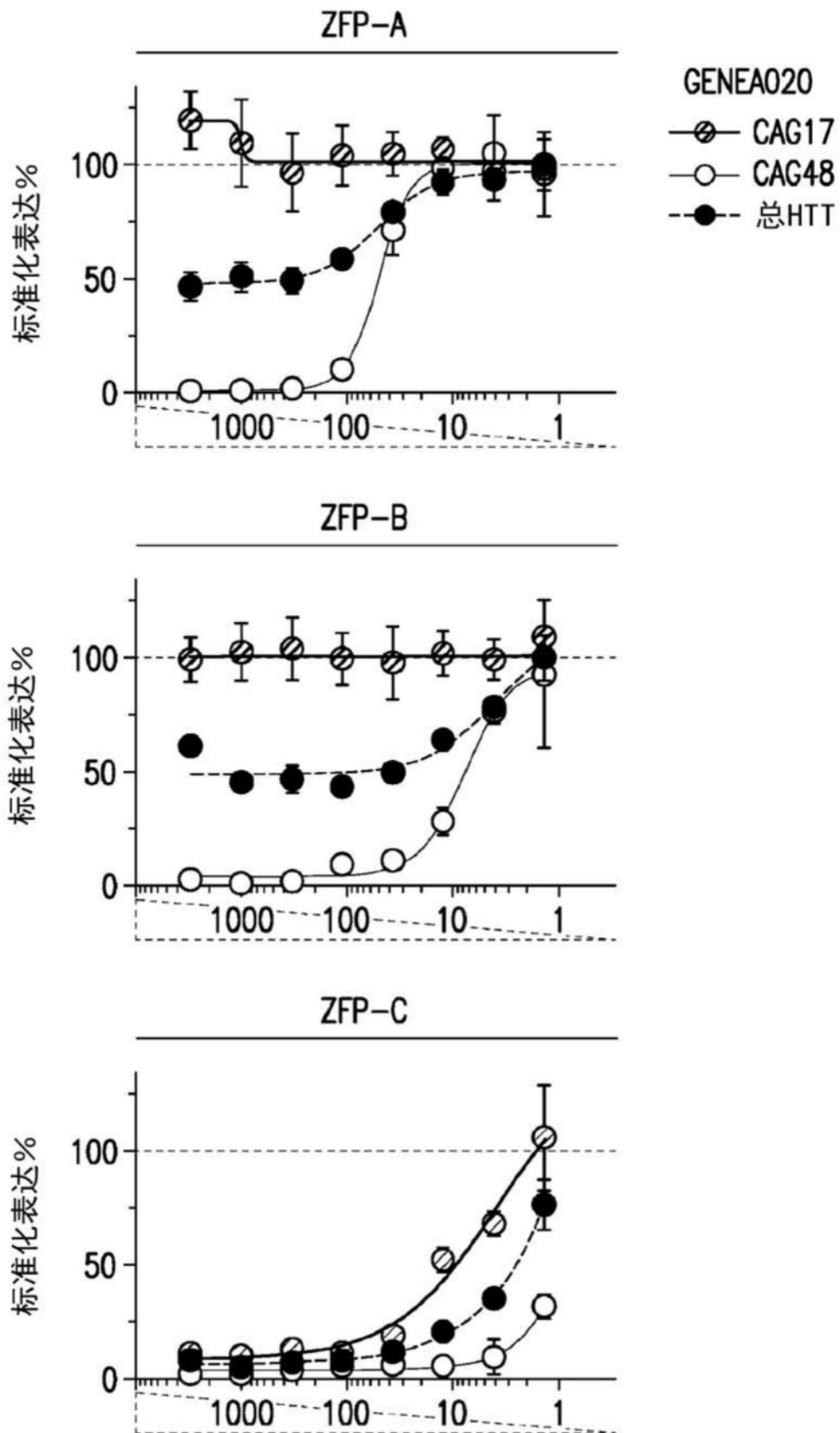


图2B

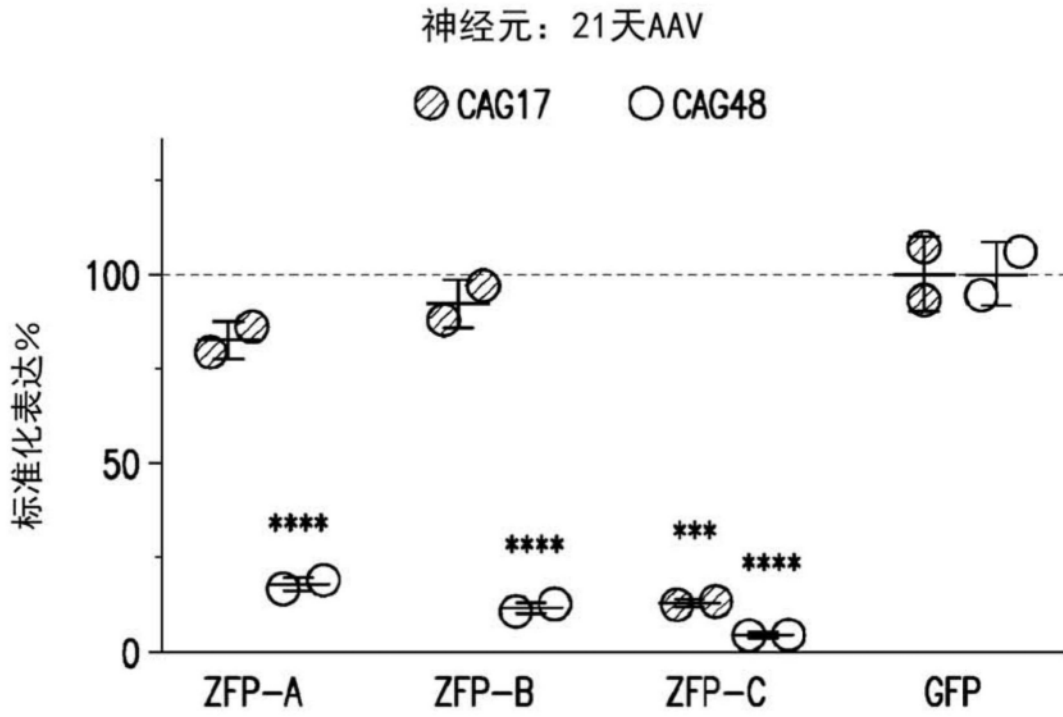


图2C

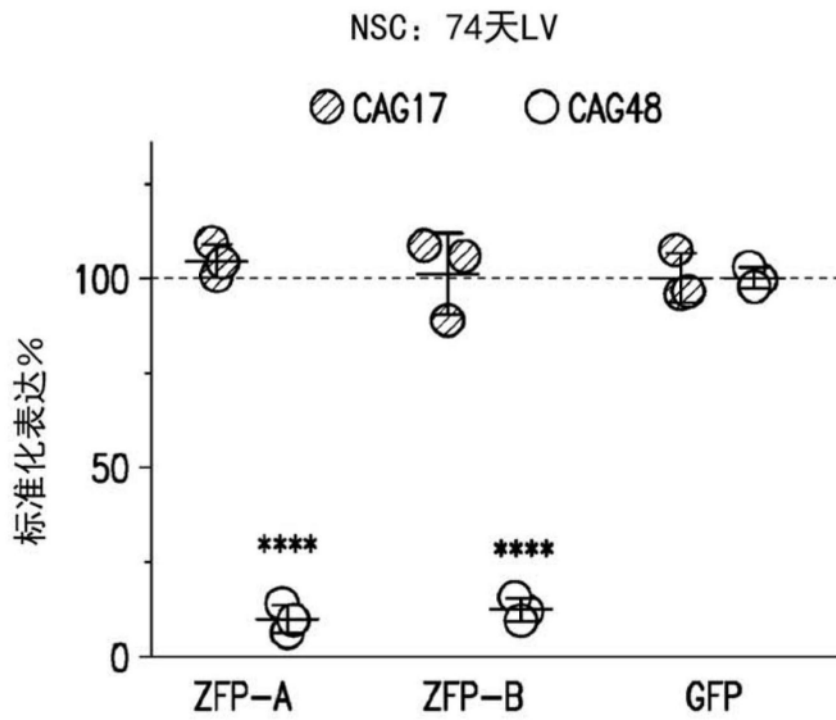


图2D

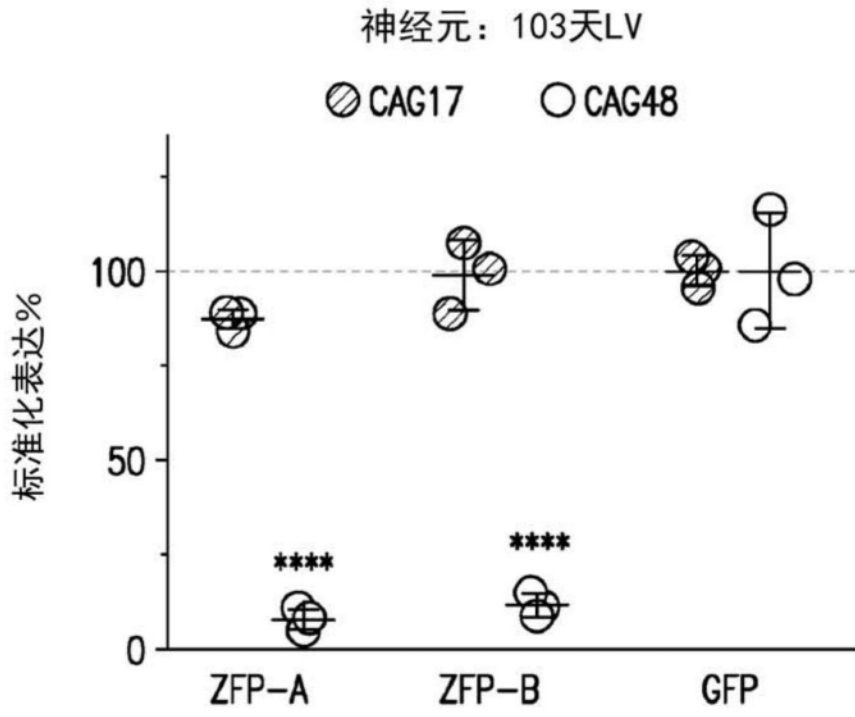


图2E

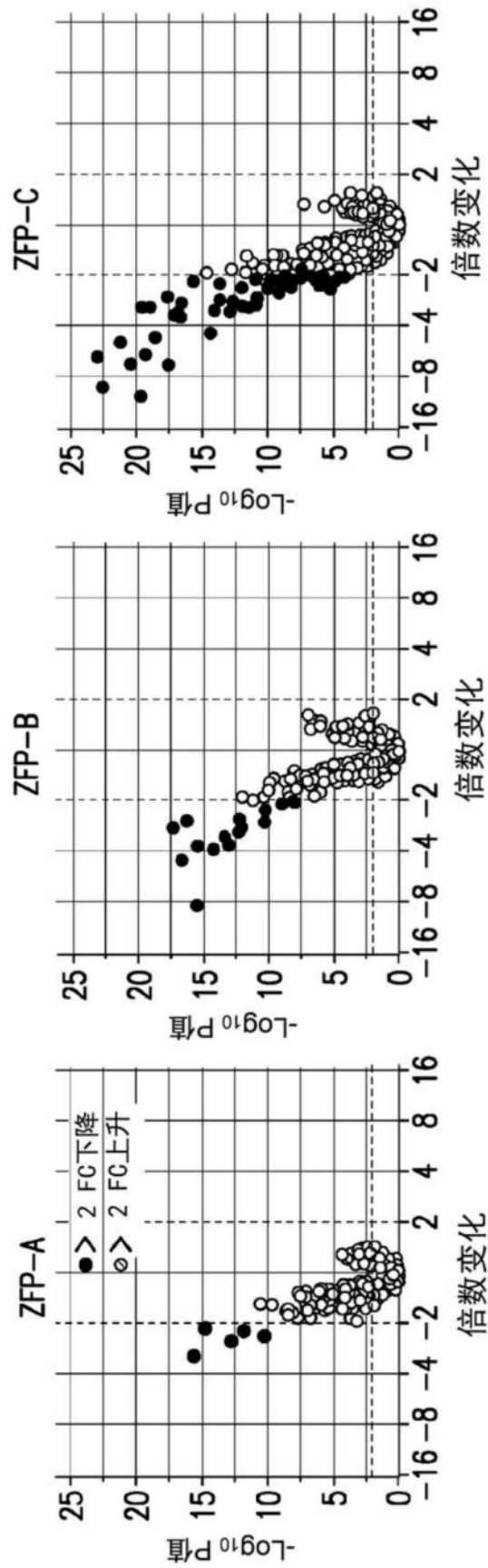


图2F

神经元脱靶

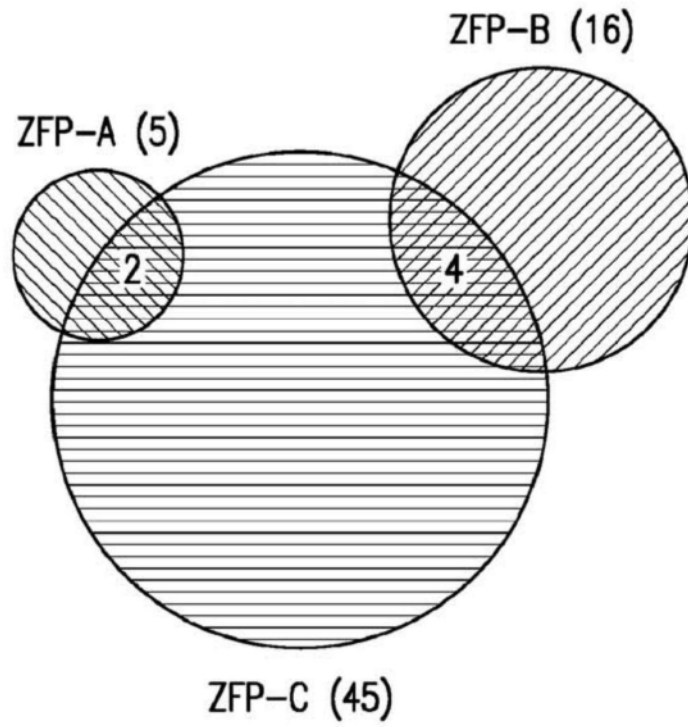


图2G

神经元: 21天LV

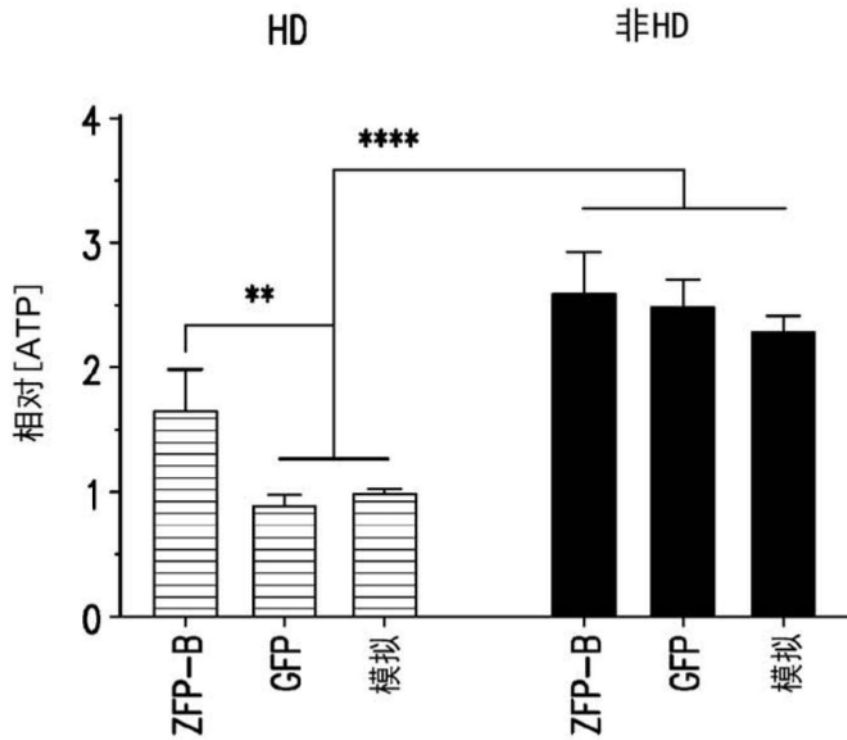


图2H

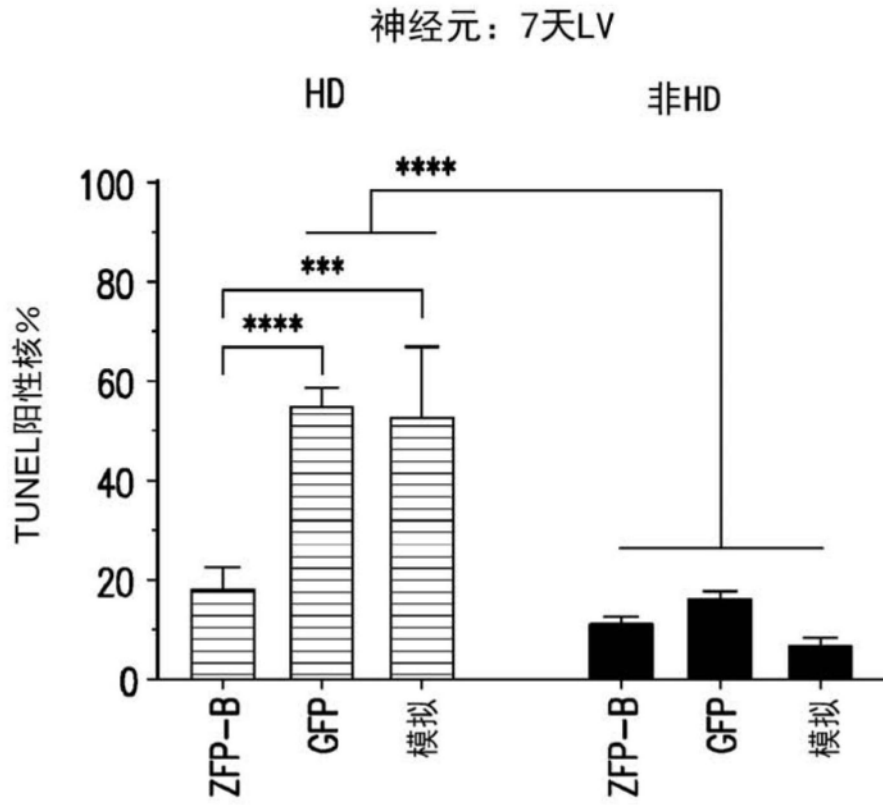


图2I

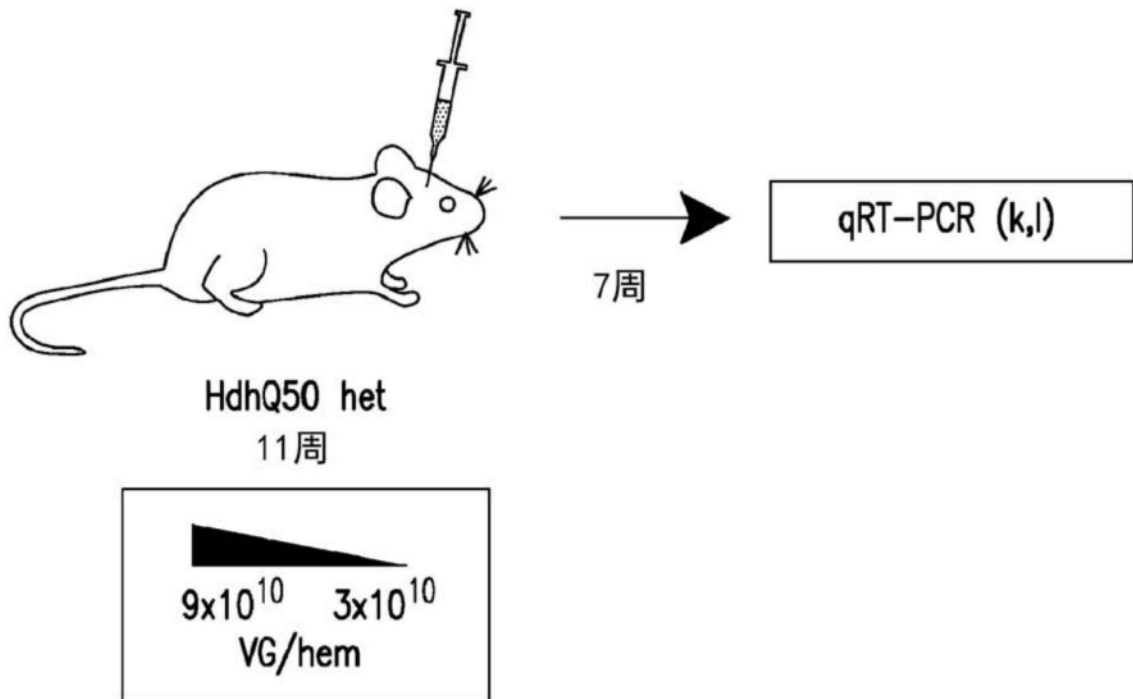


图2J

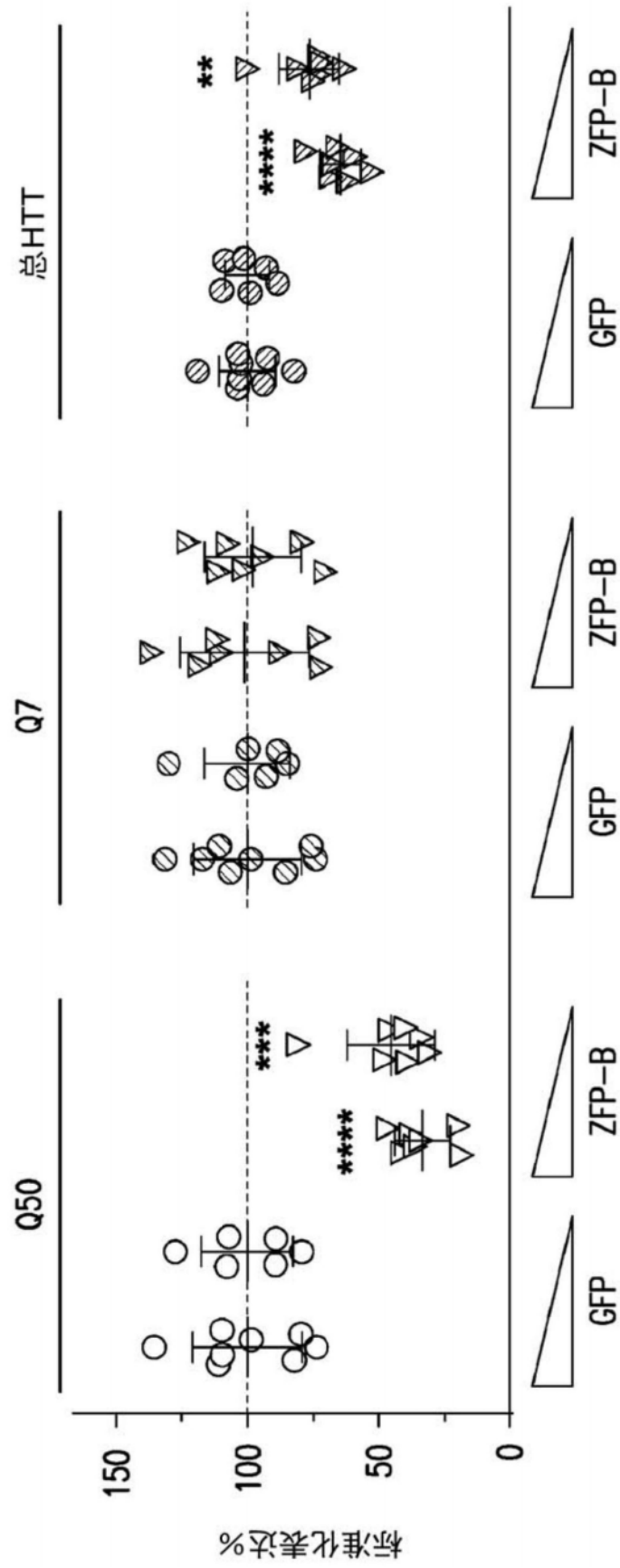


图2K

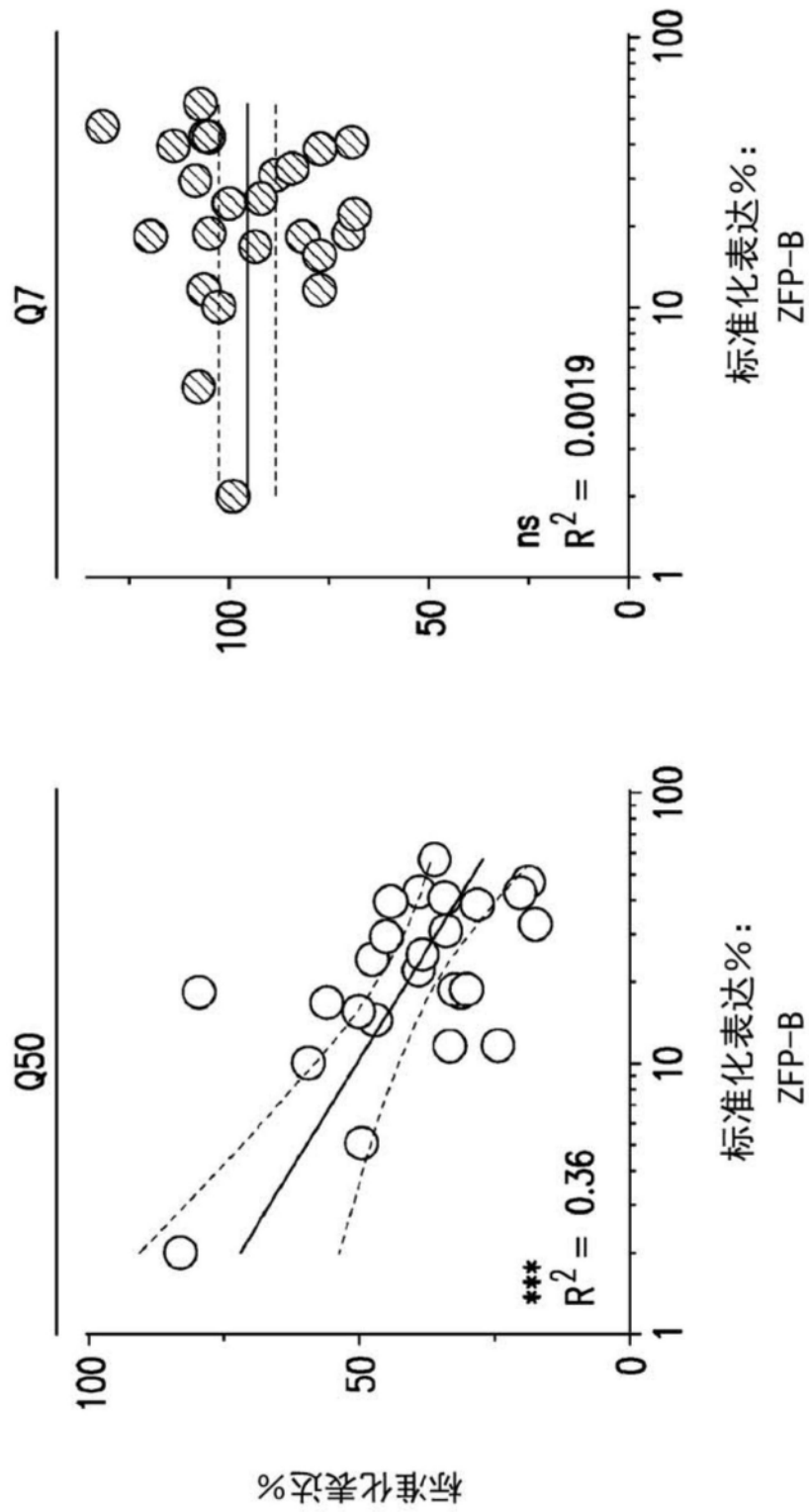


图2L

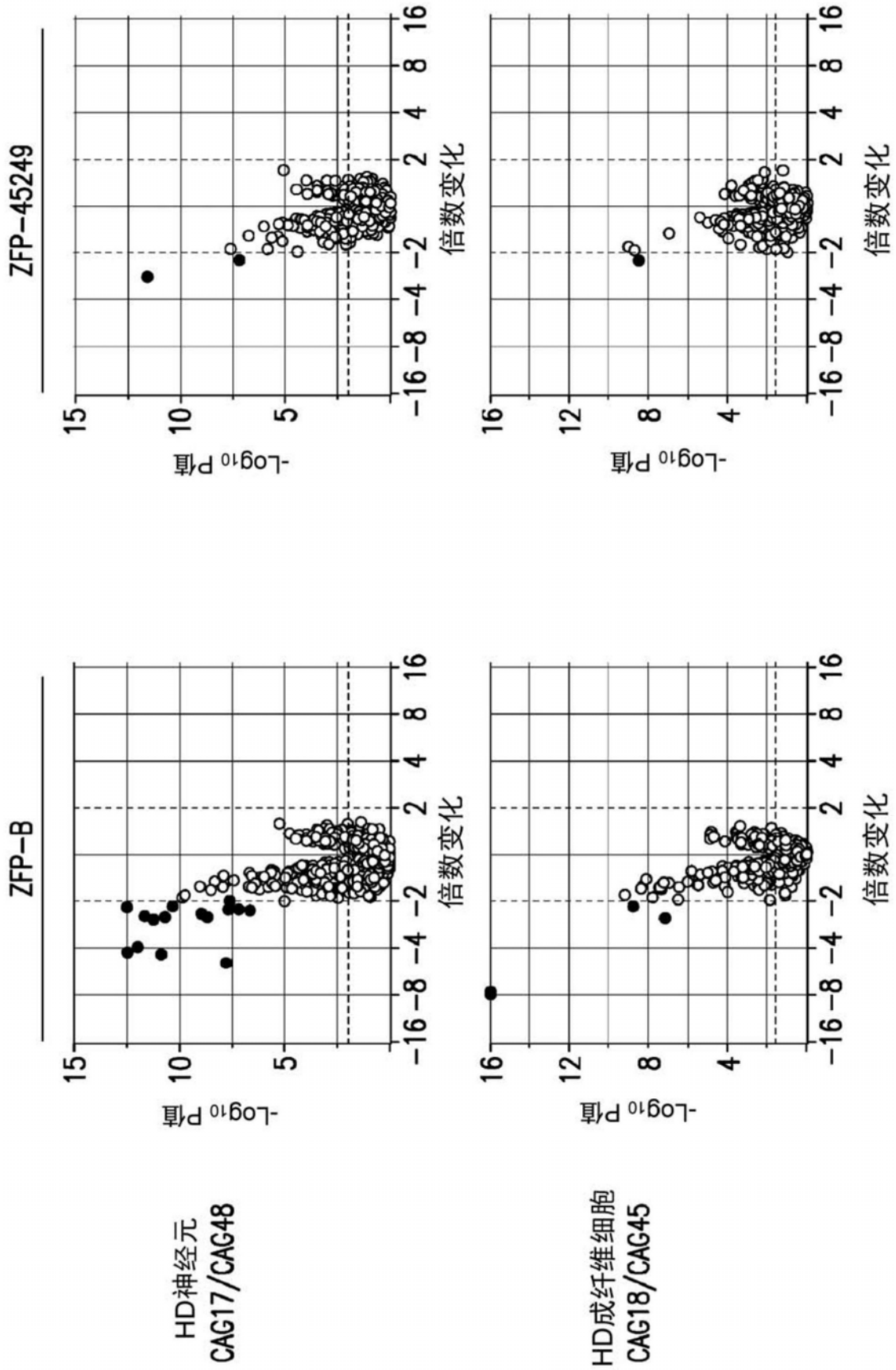


图2M

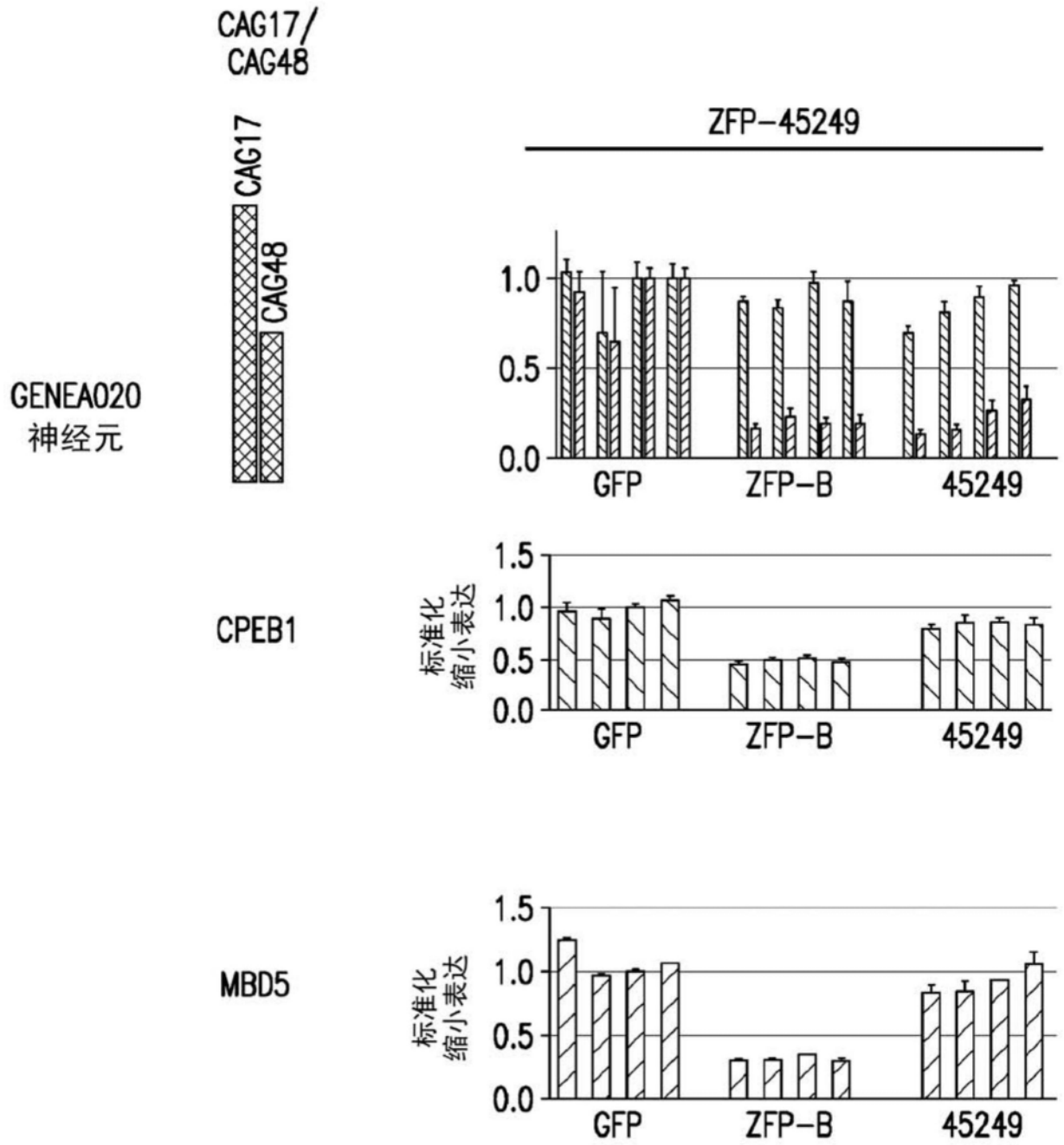


图2N

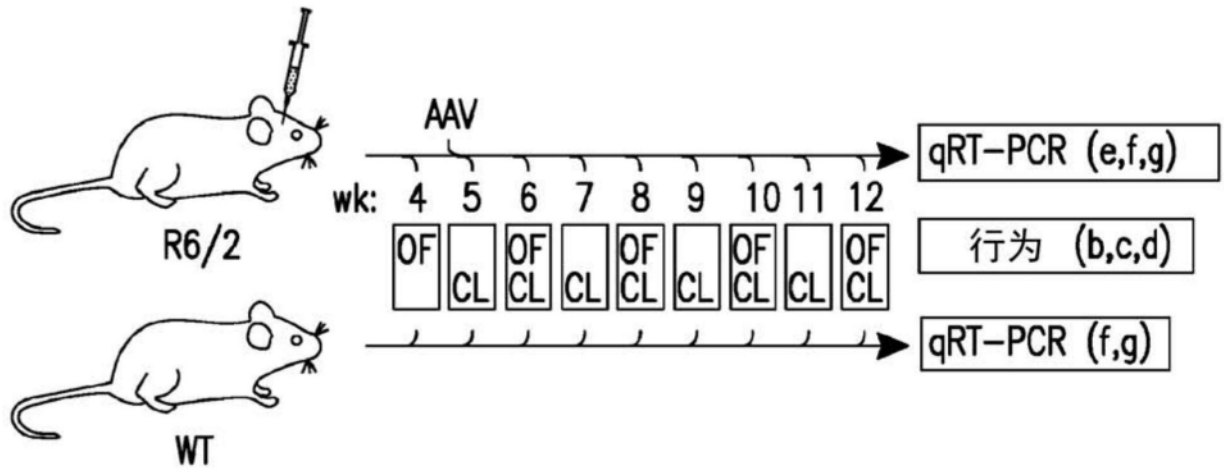


图3A

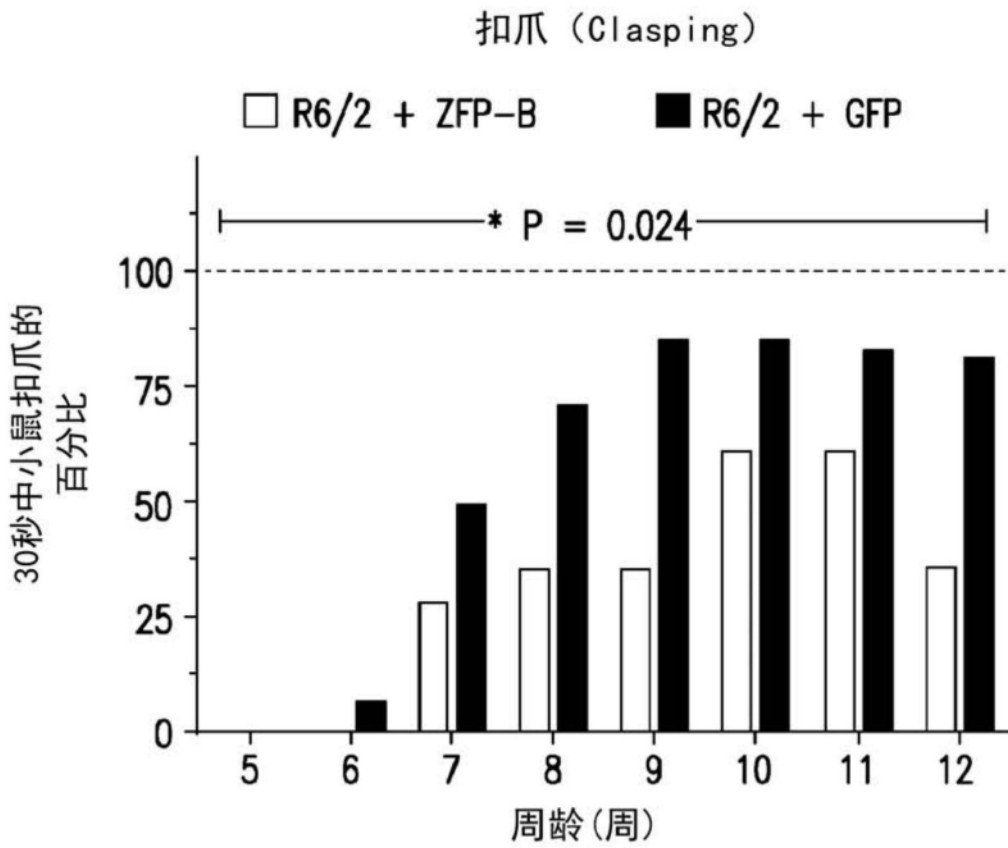


图3B

空场：饲养

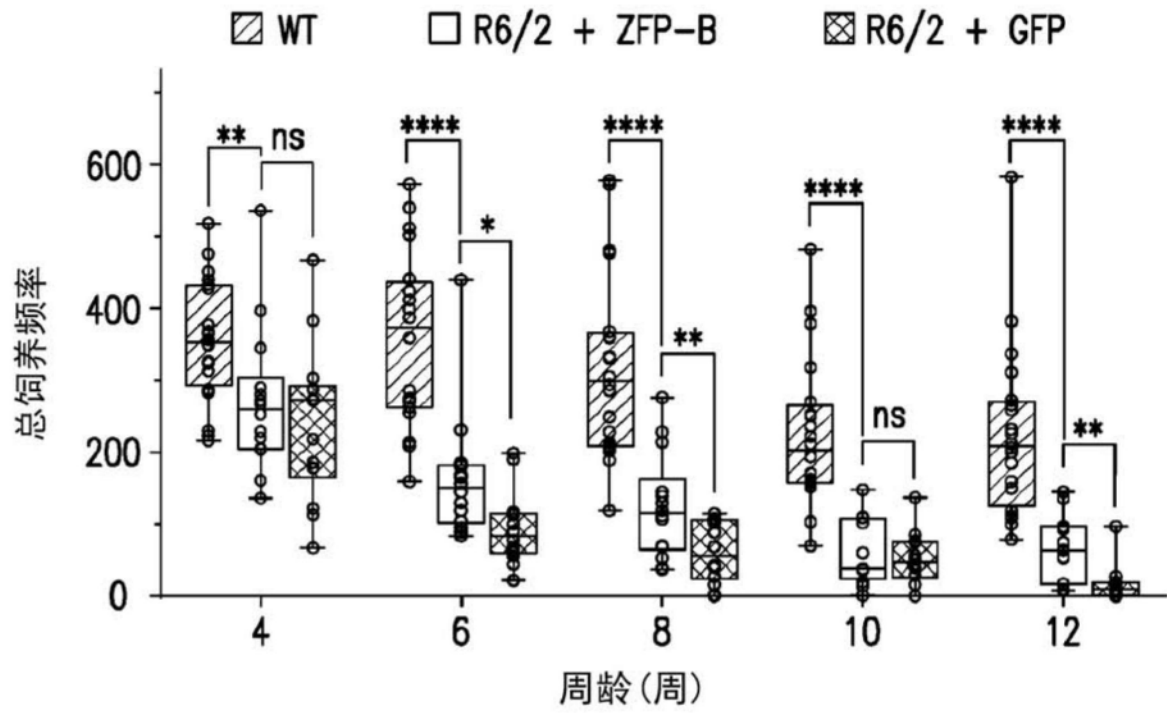


图3C

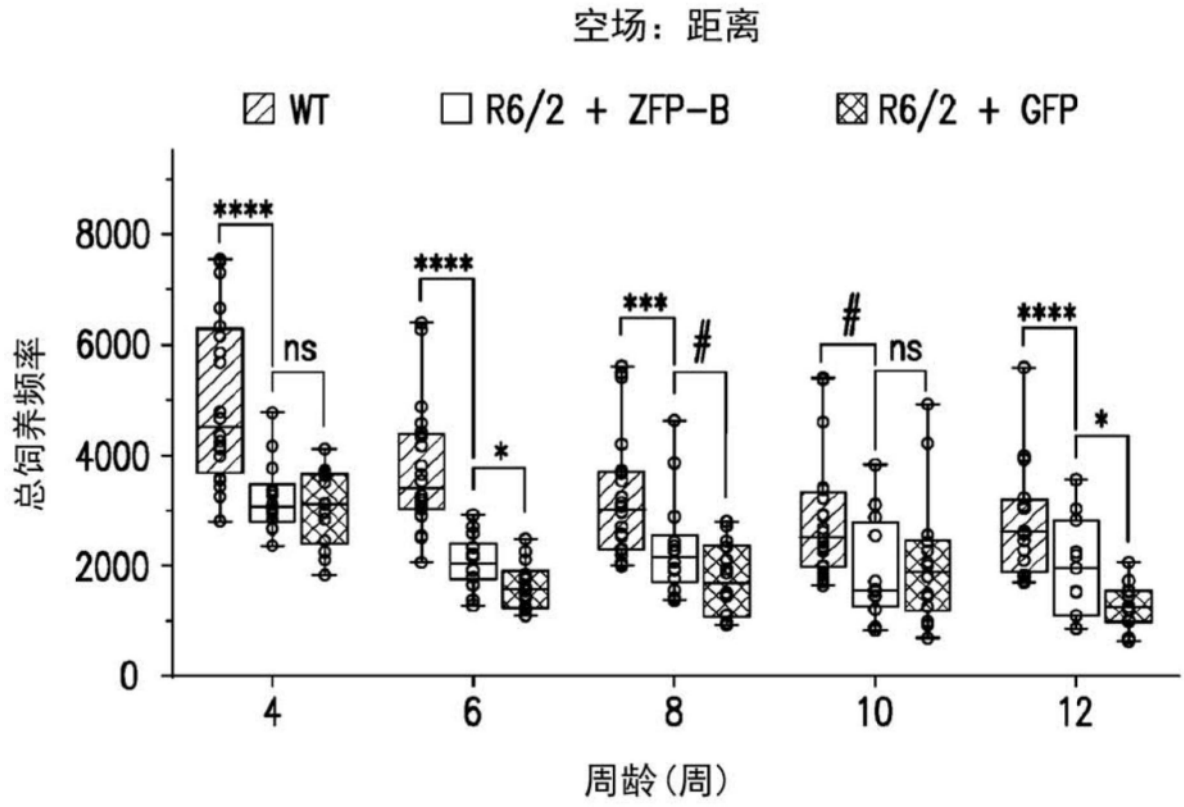


图3D

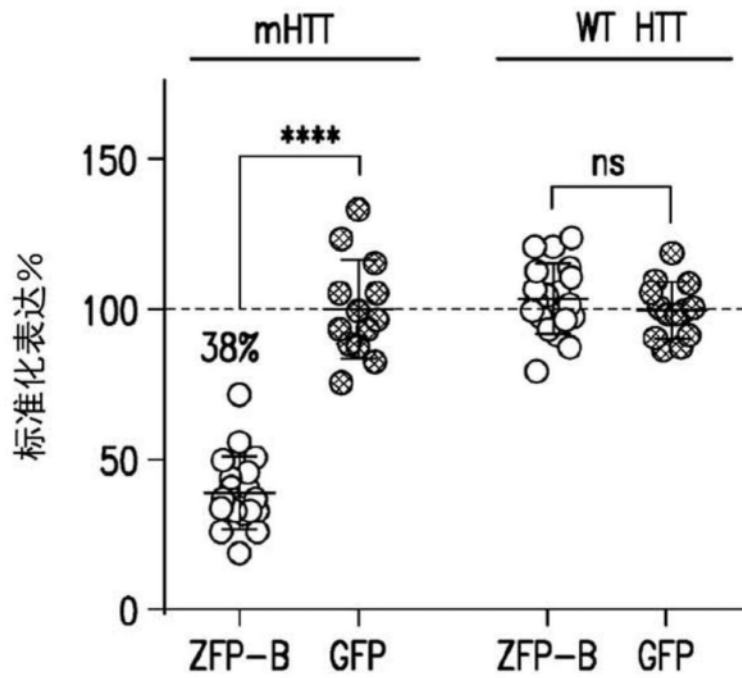


图3E

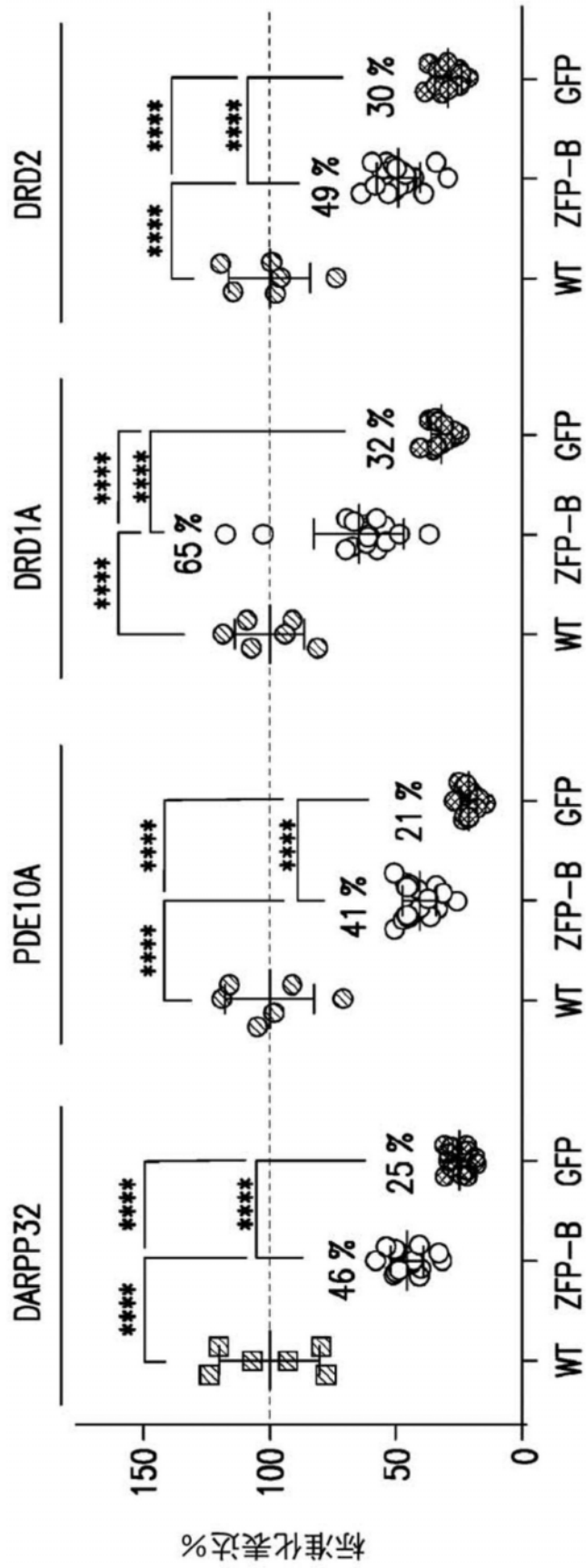


图3F

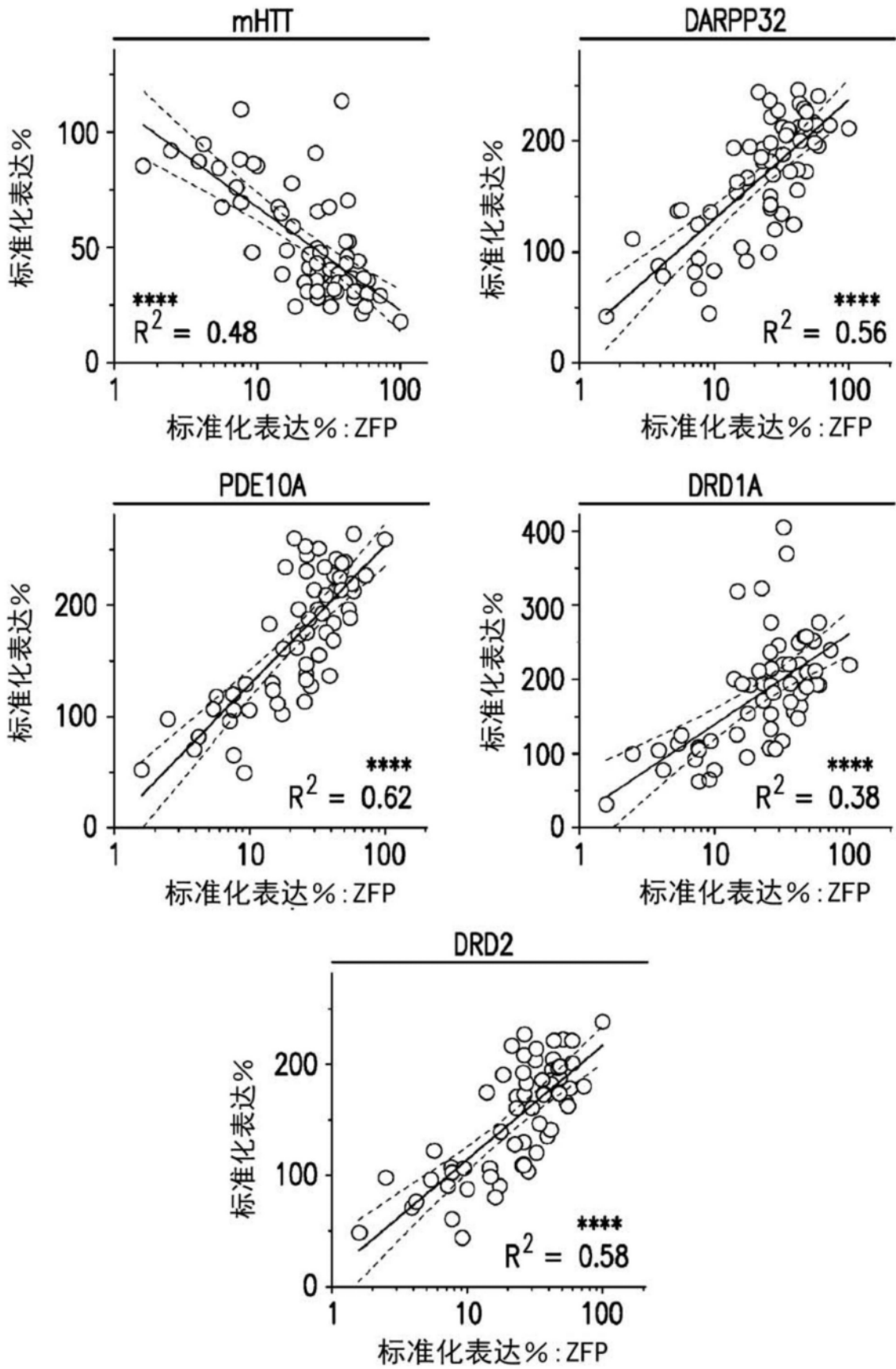


图3G

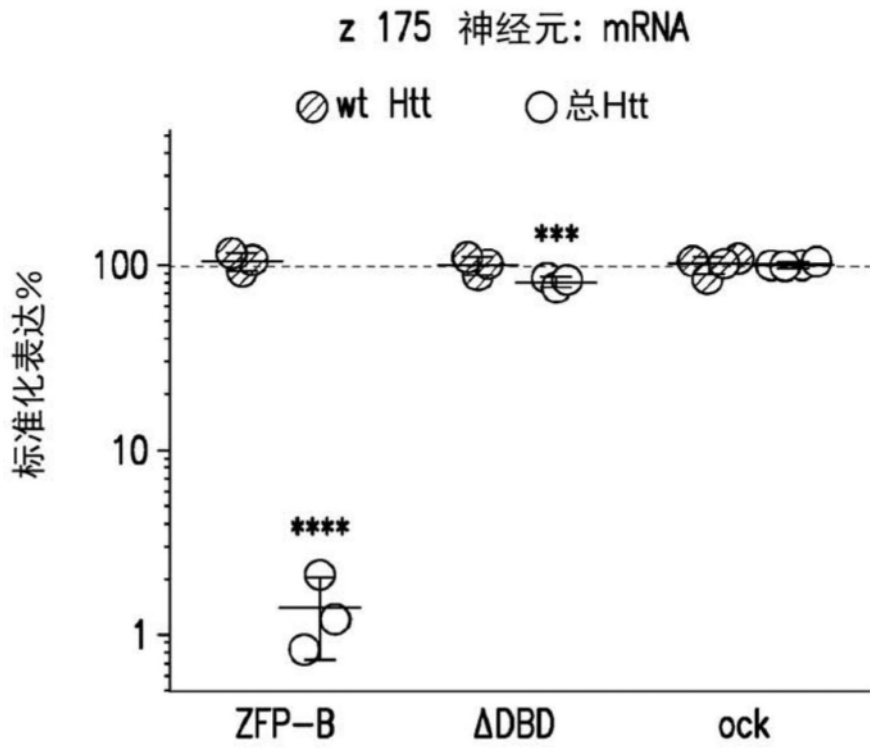


图4A

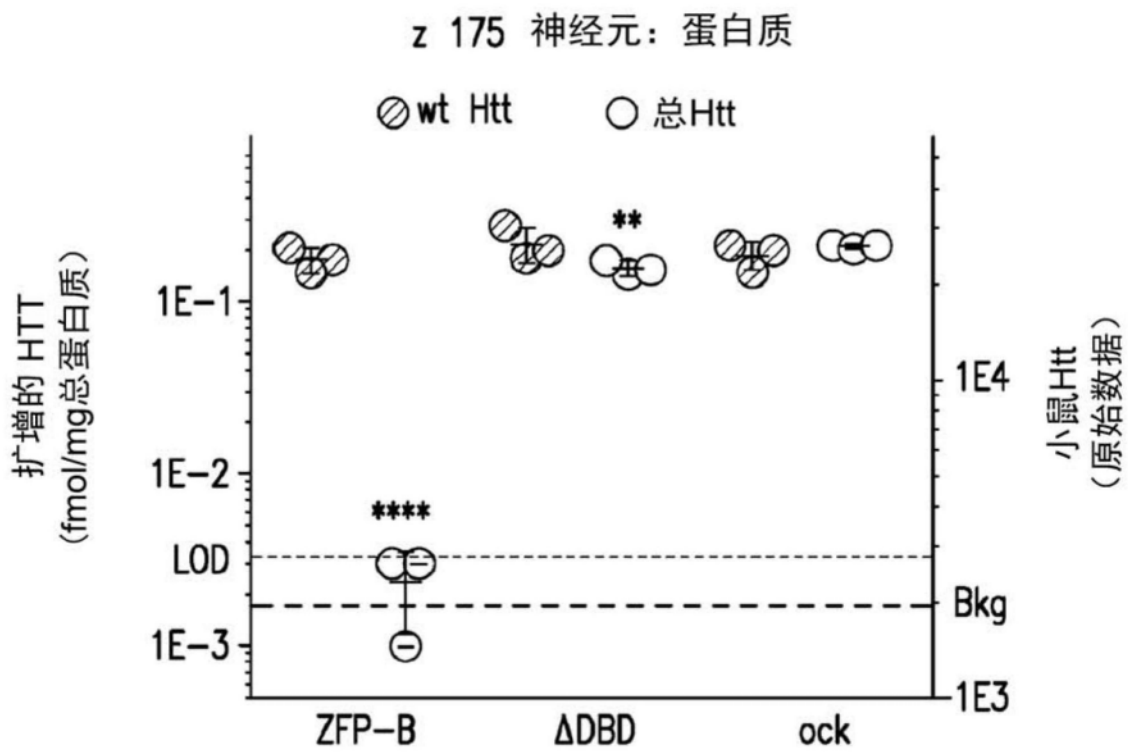


图4B

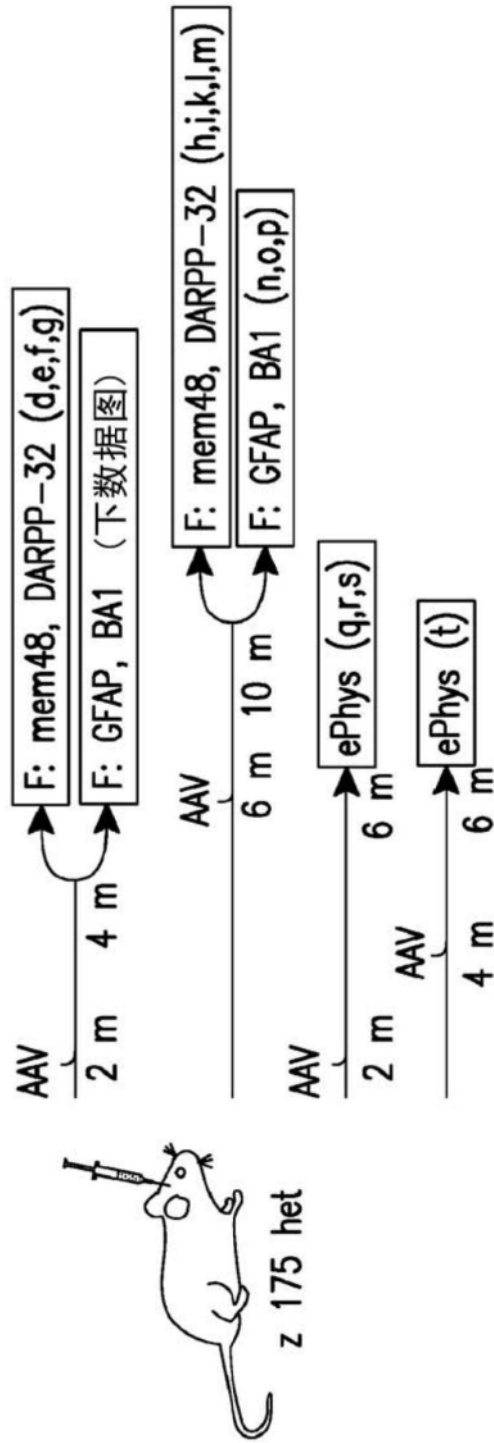


图4C

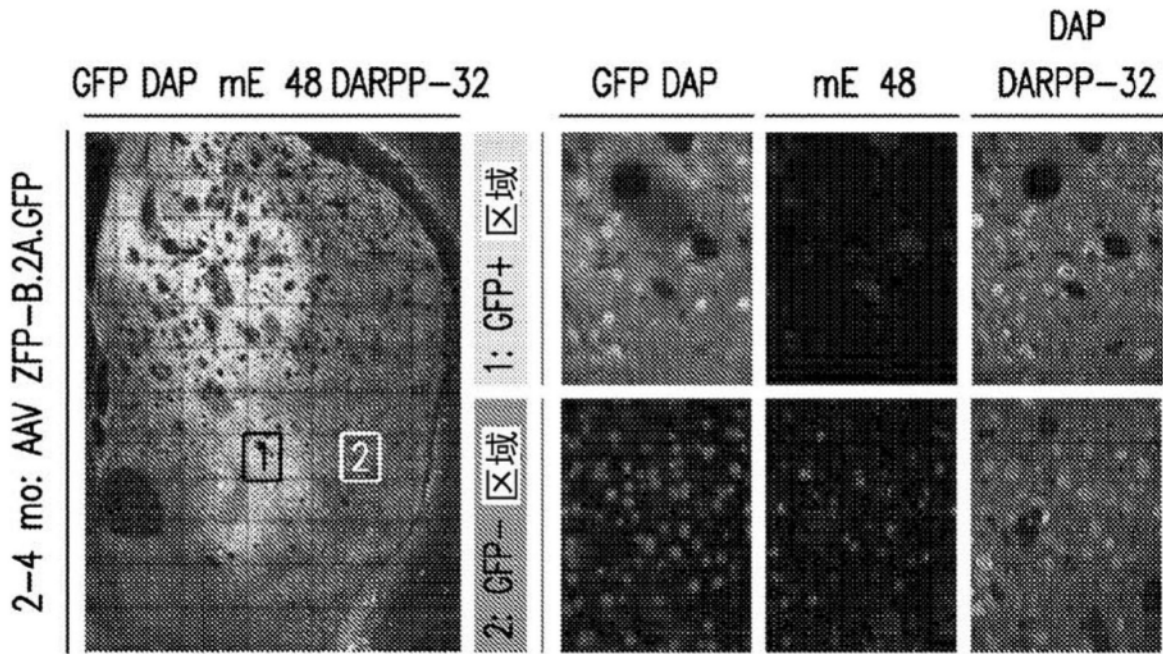


图4D

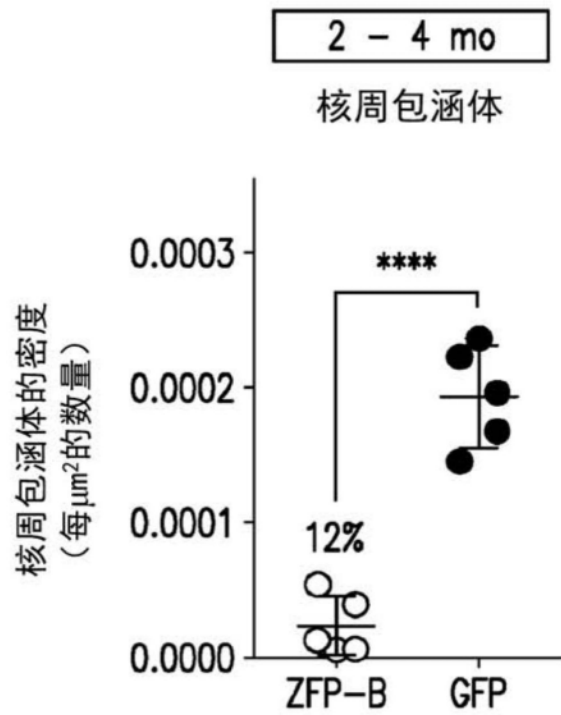


图4E

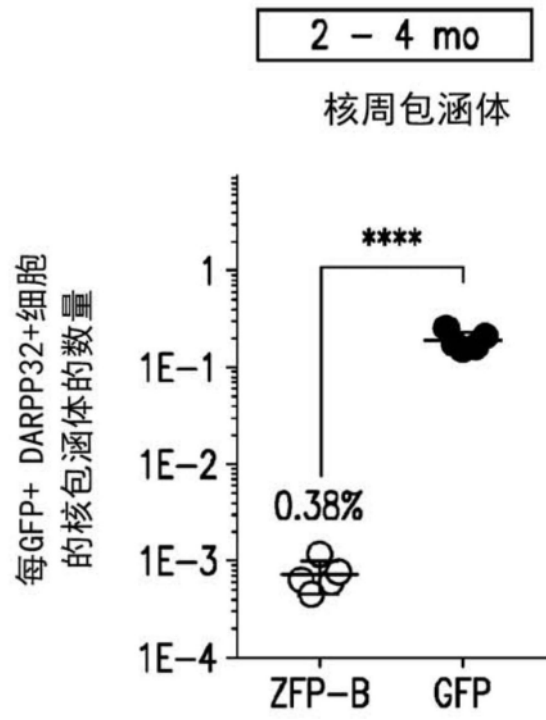


图4F

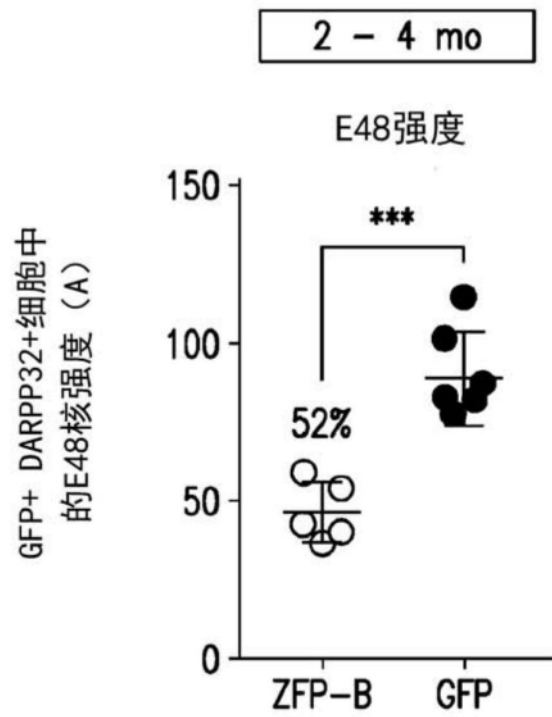


图4G

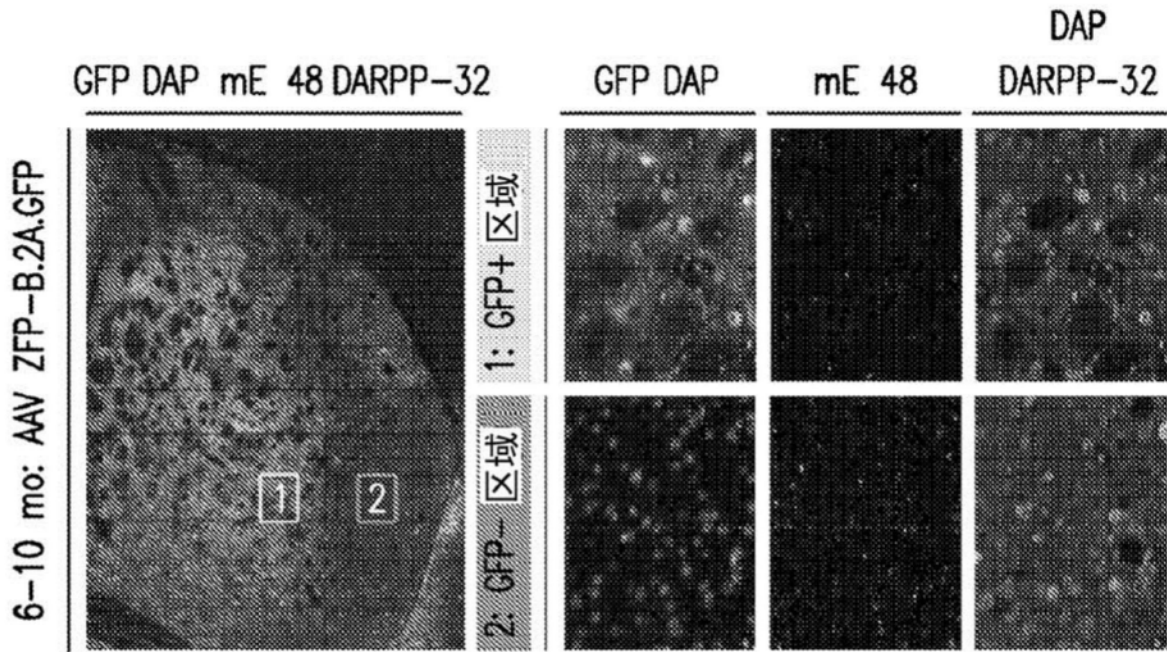


图4H

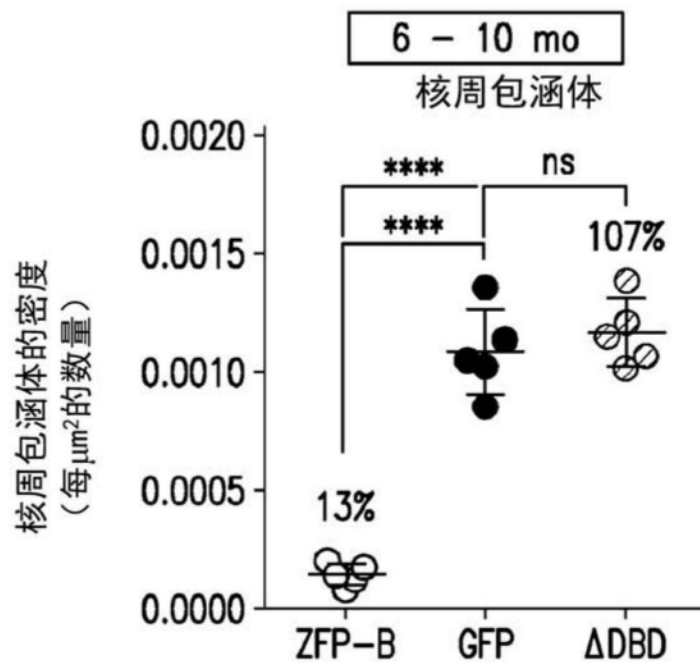


图4I

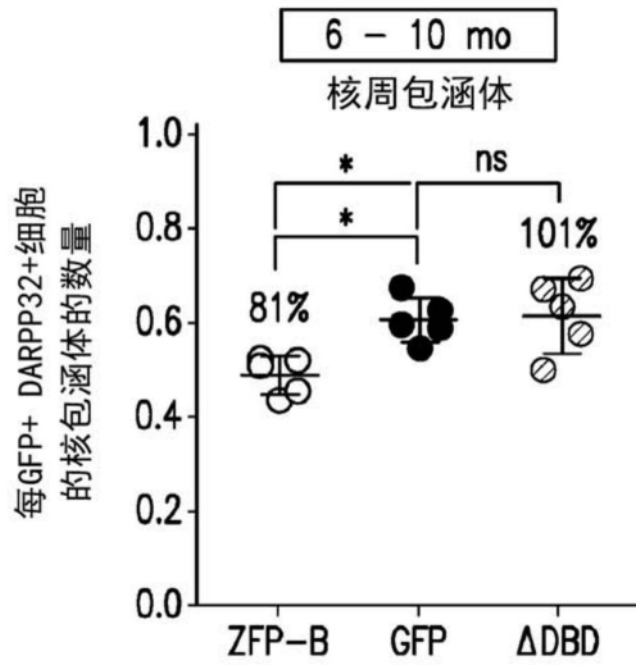


图4J

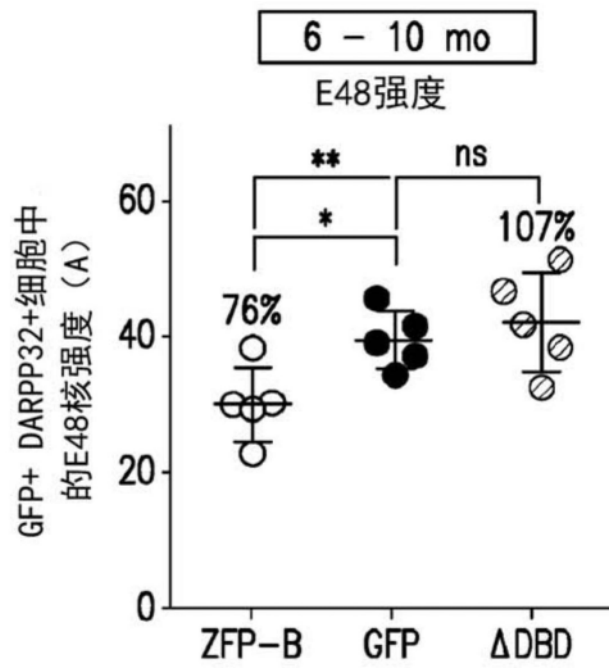


图4K

32/66

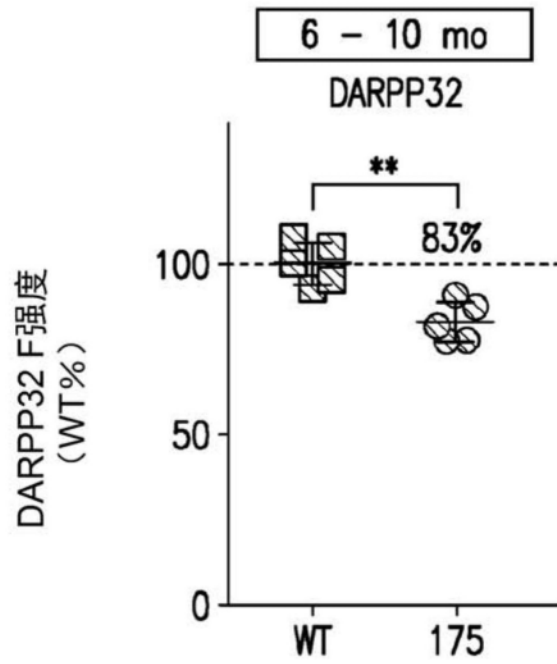


图4L

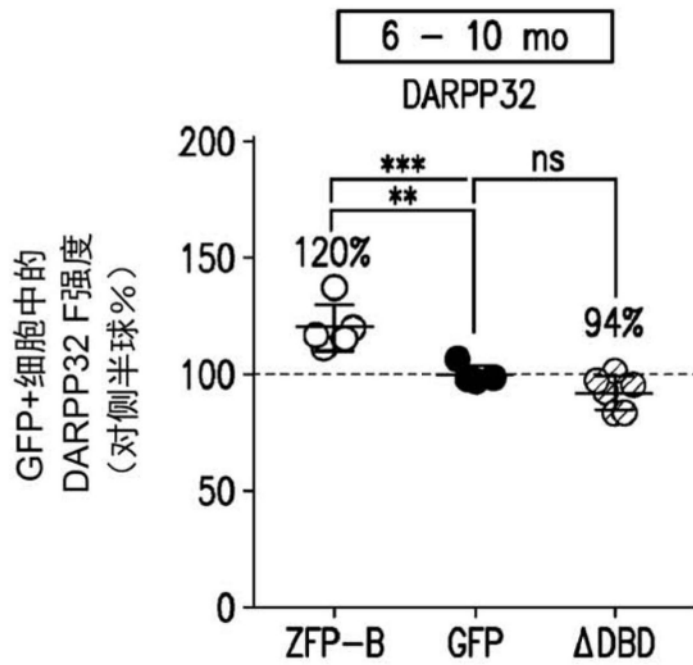


图4M

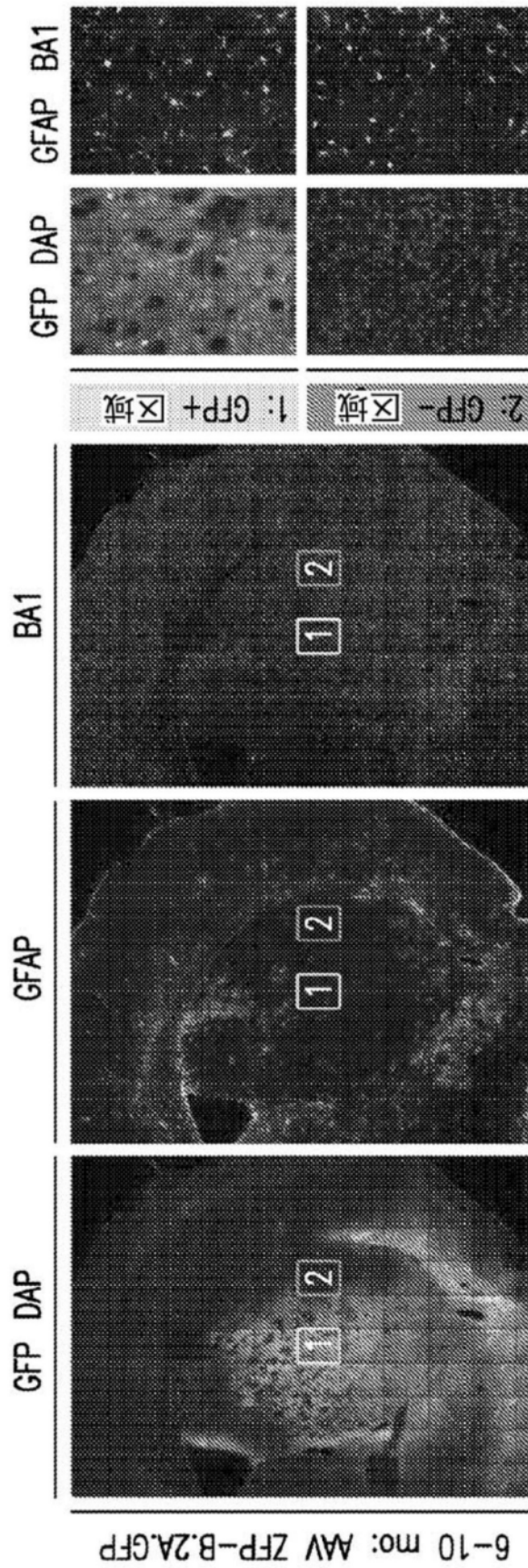


图4N

34/66

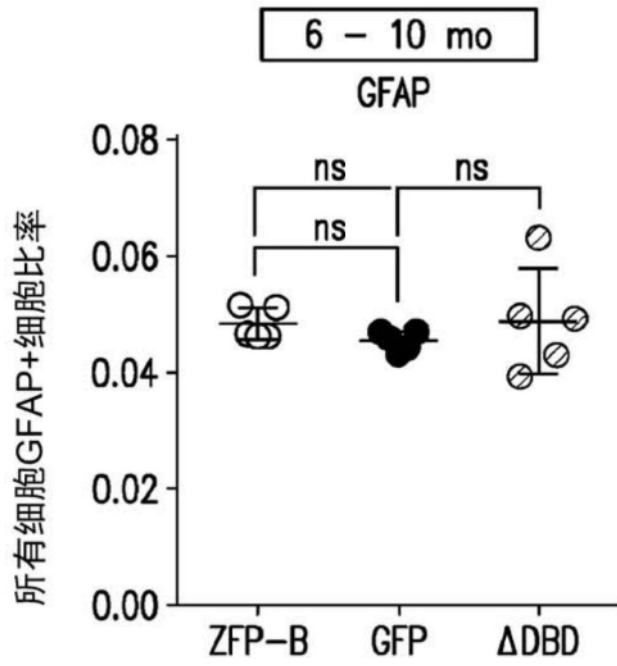


图40

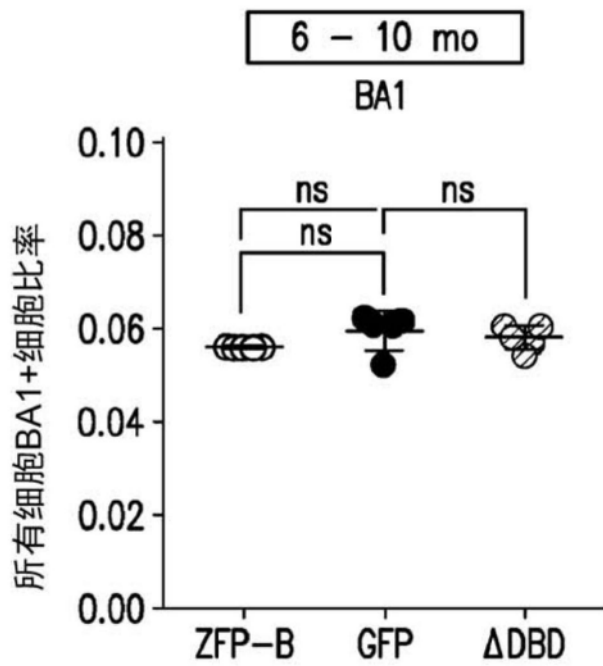


图4P

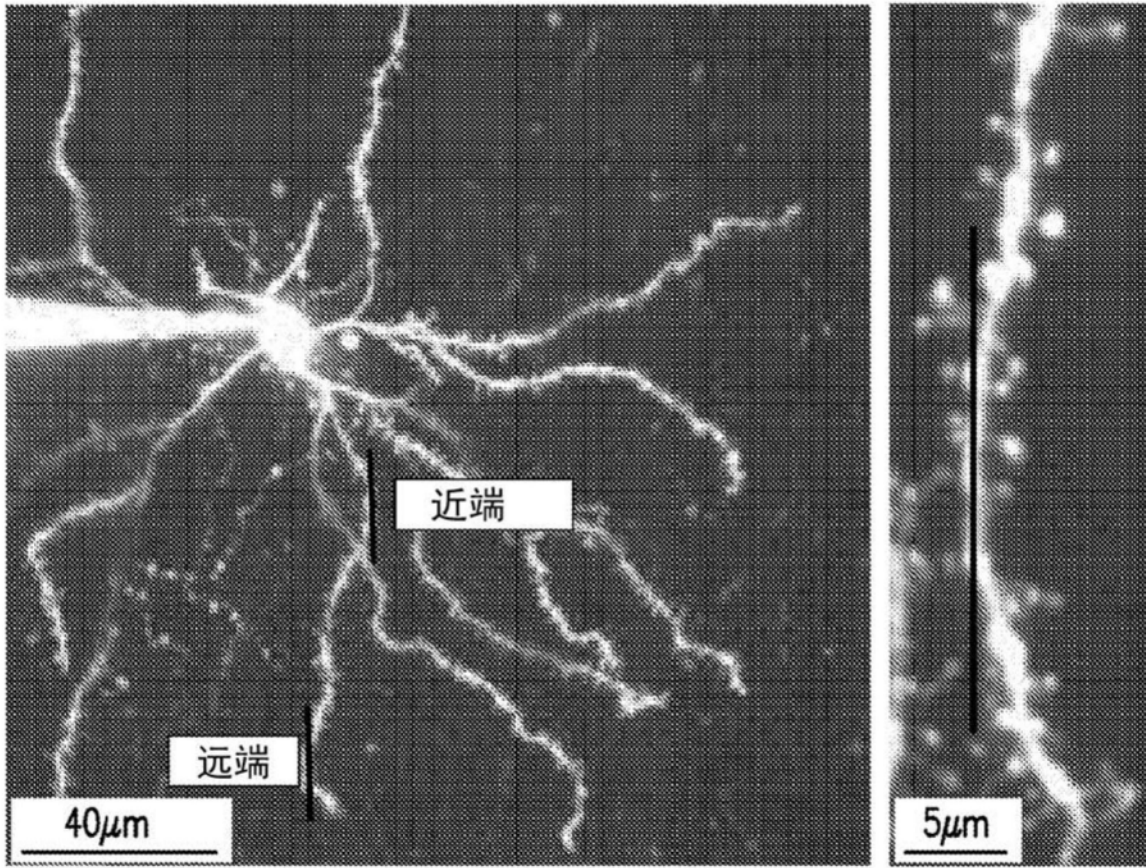


图4Q

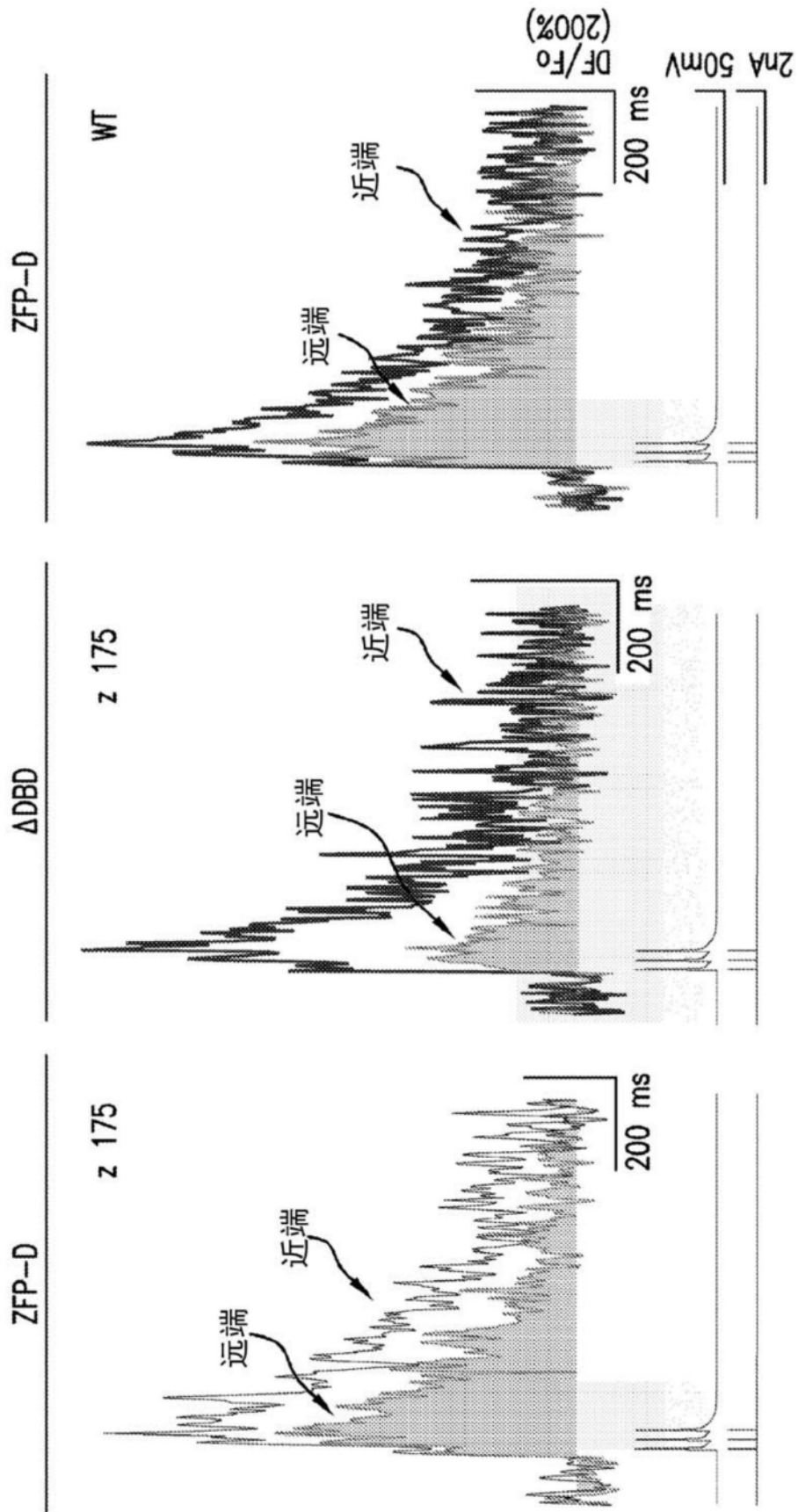


图4R

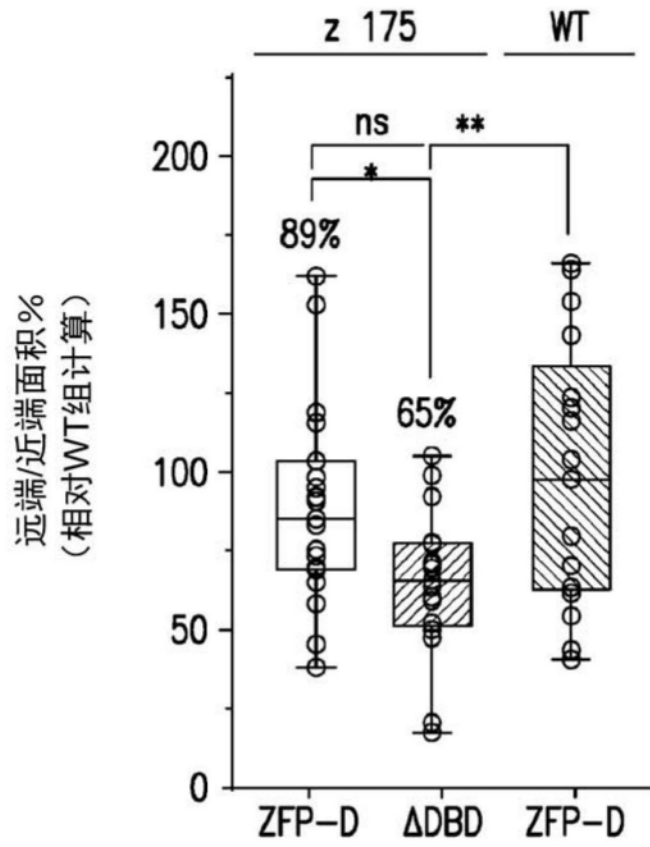


图4S

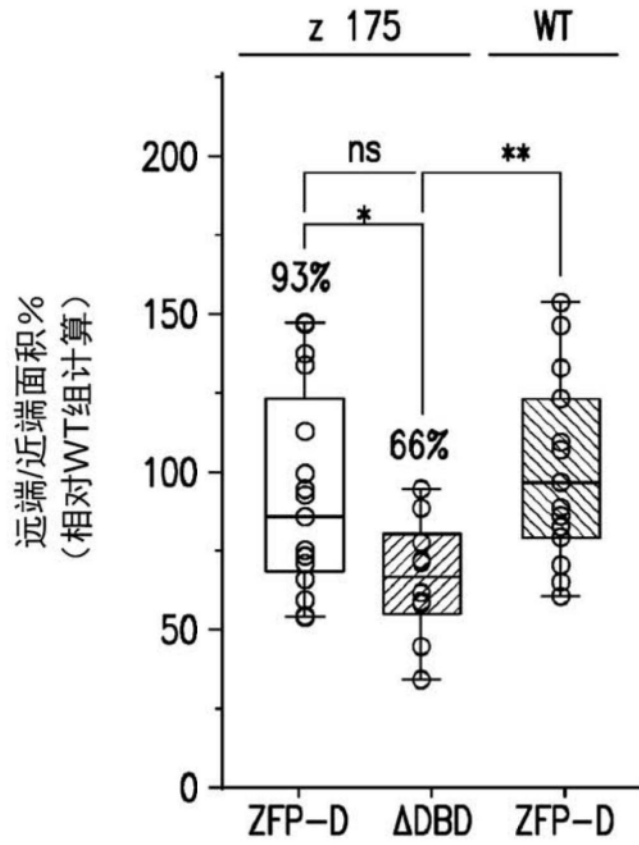


图4T

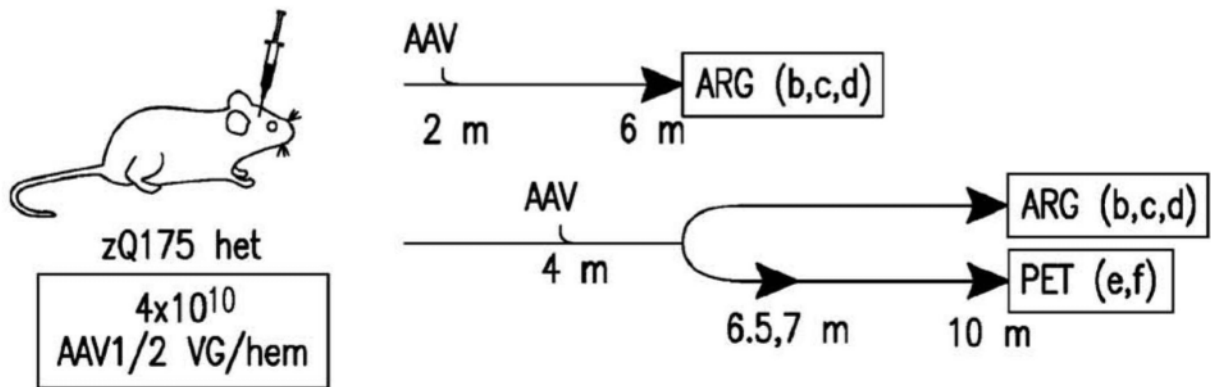


图5A

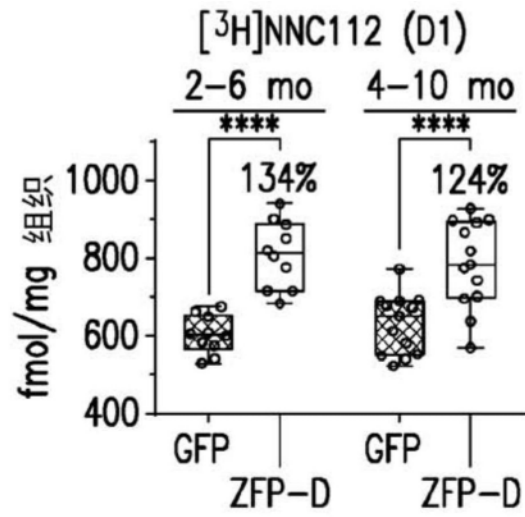


图5B

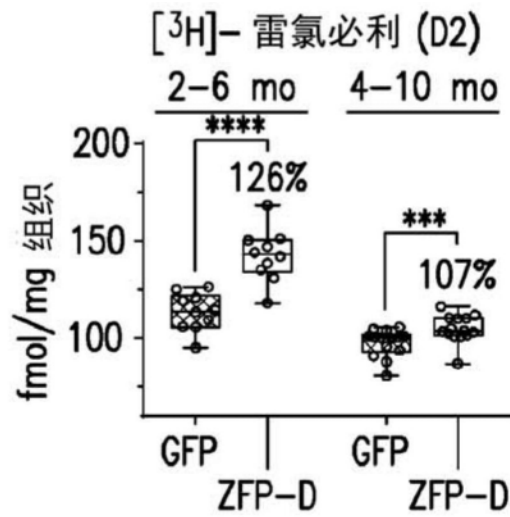


图5C

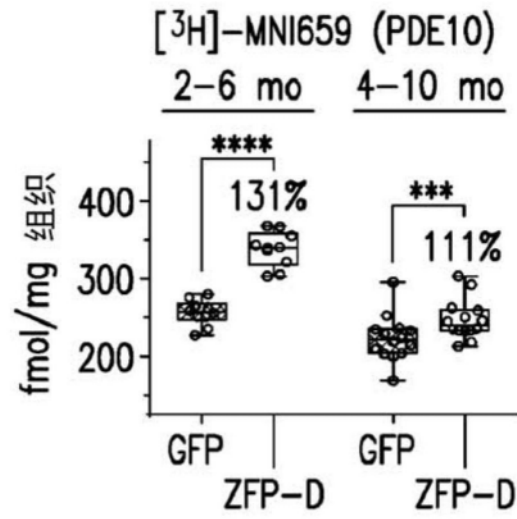


图5D

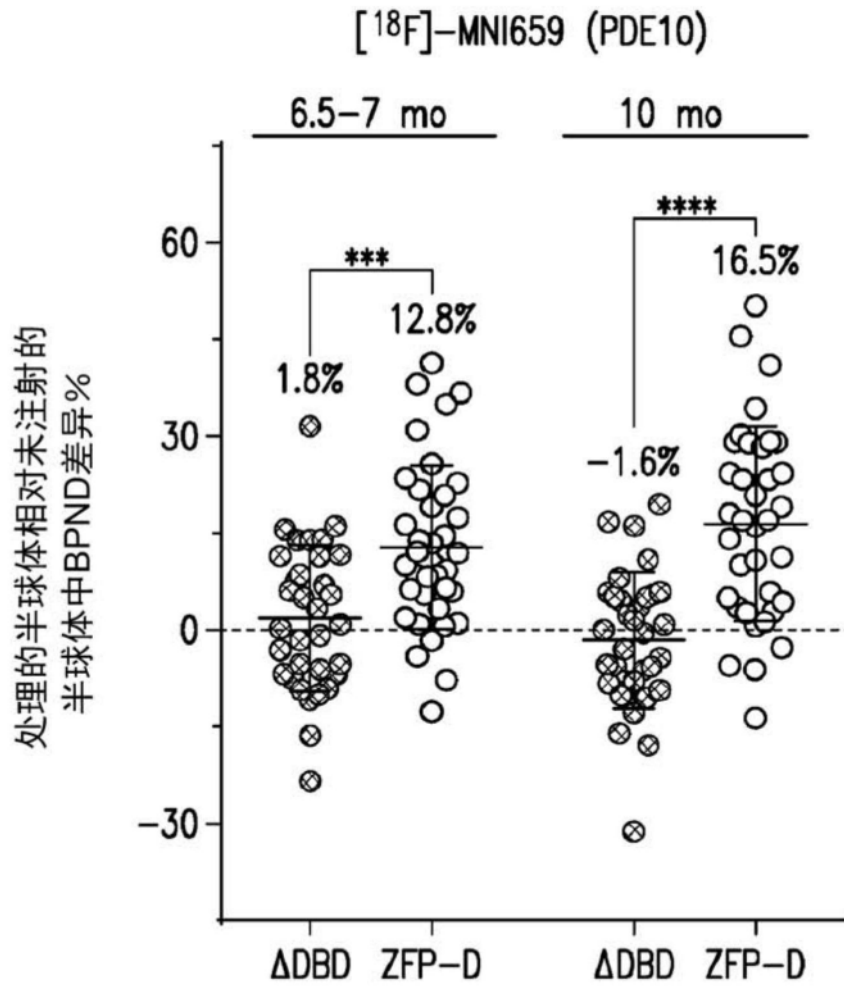


图5E

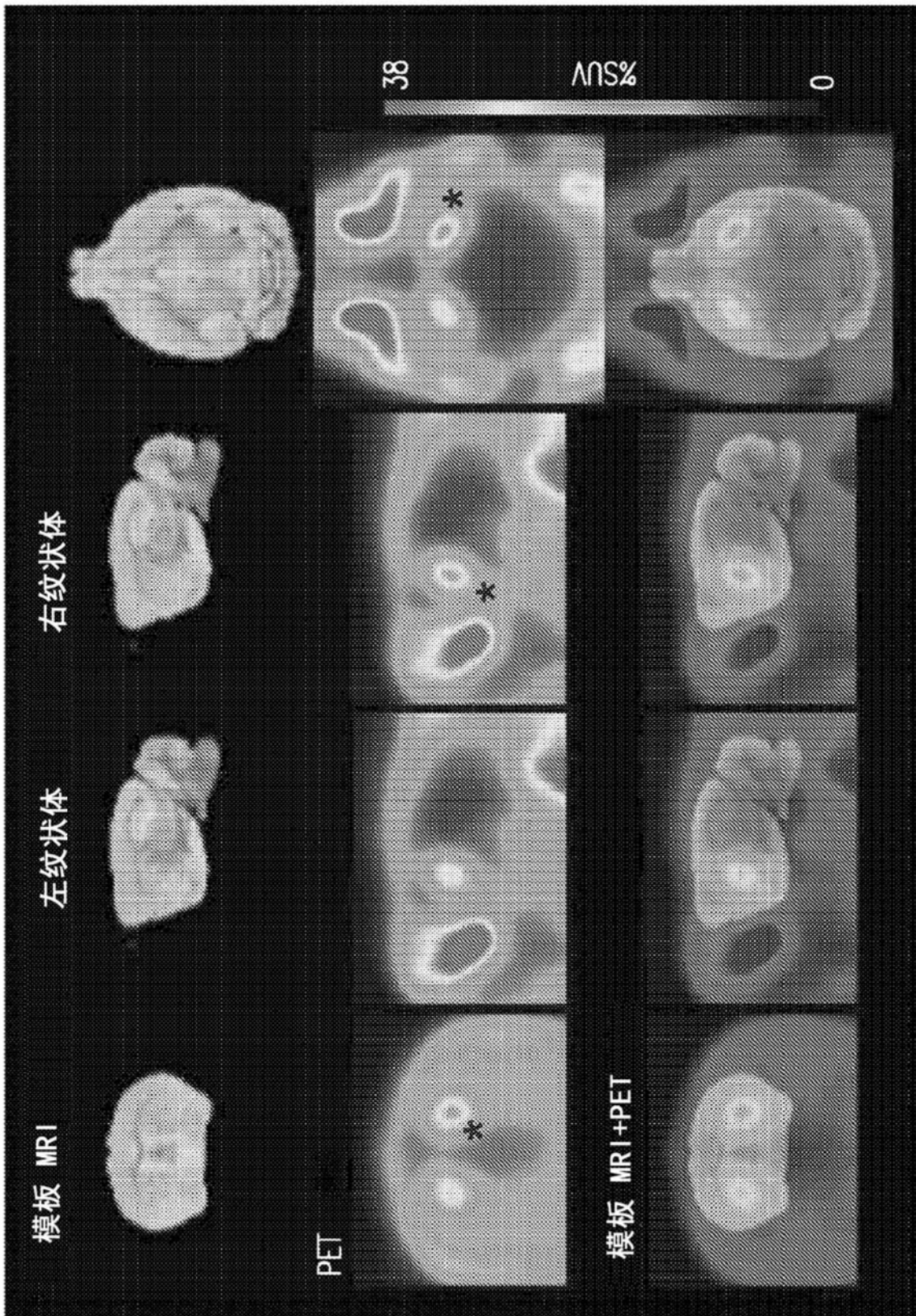


图5F

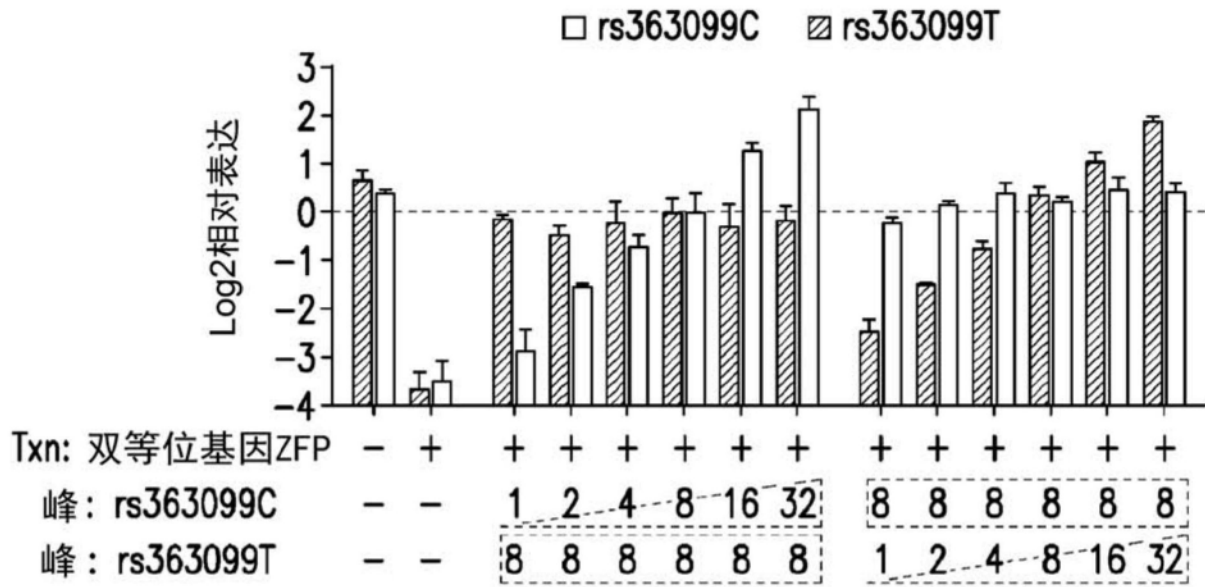


图6A

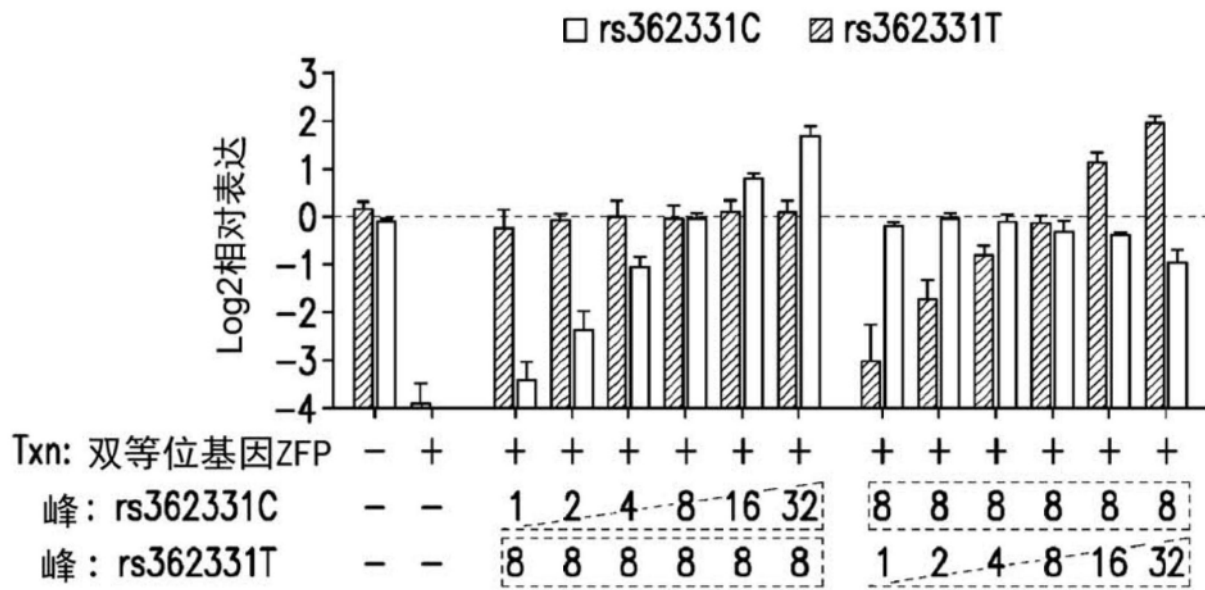


图6B

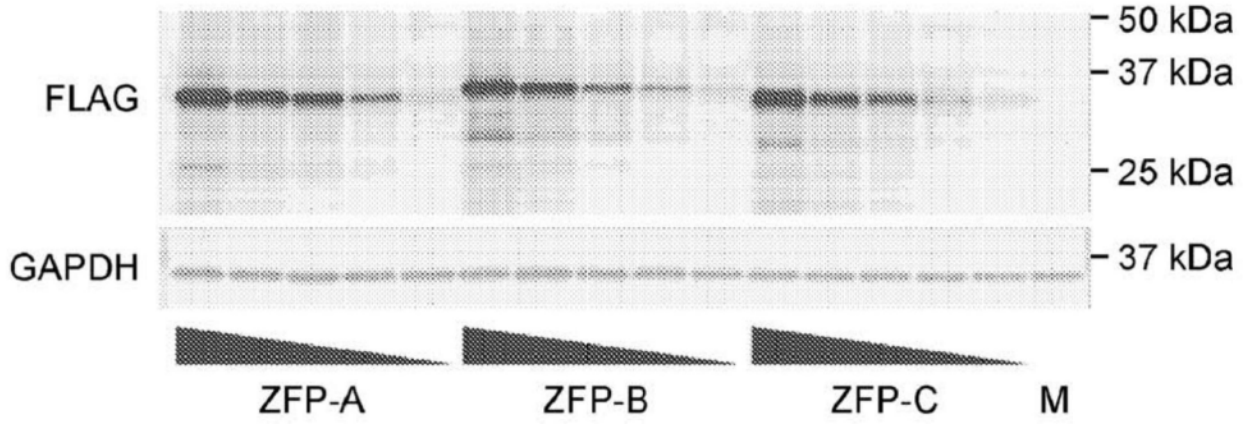


图7A

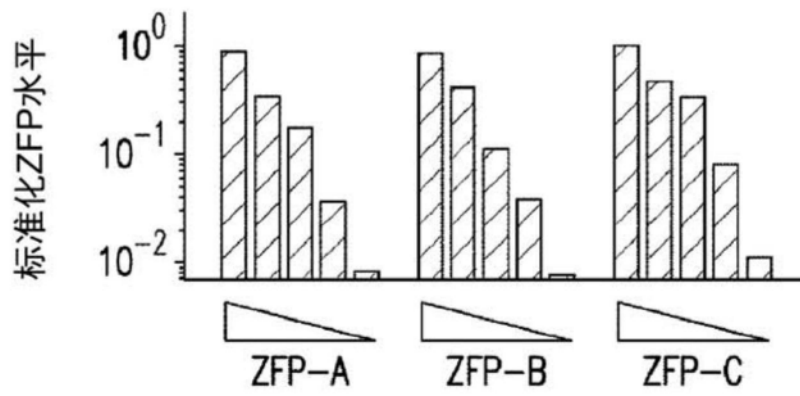


图7B

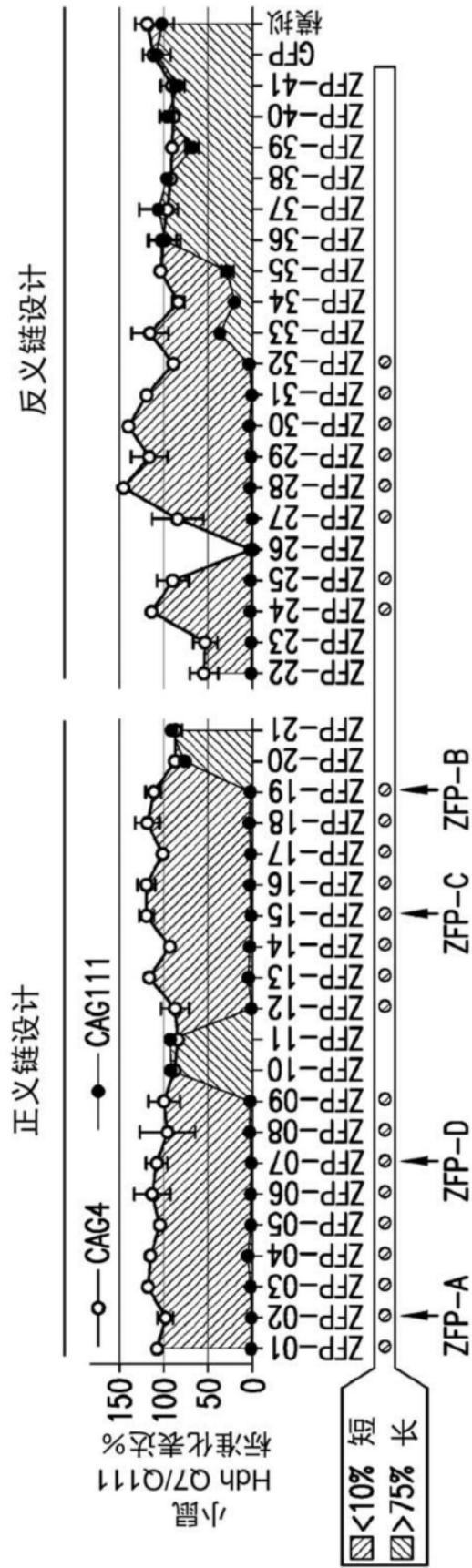


图8A

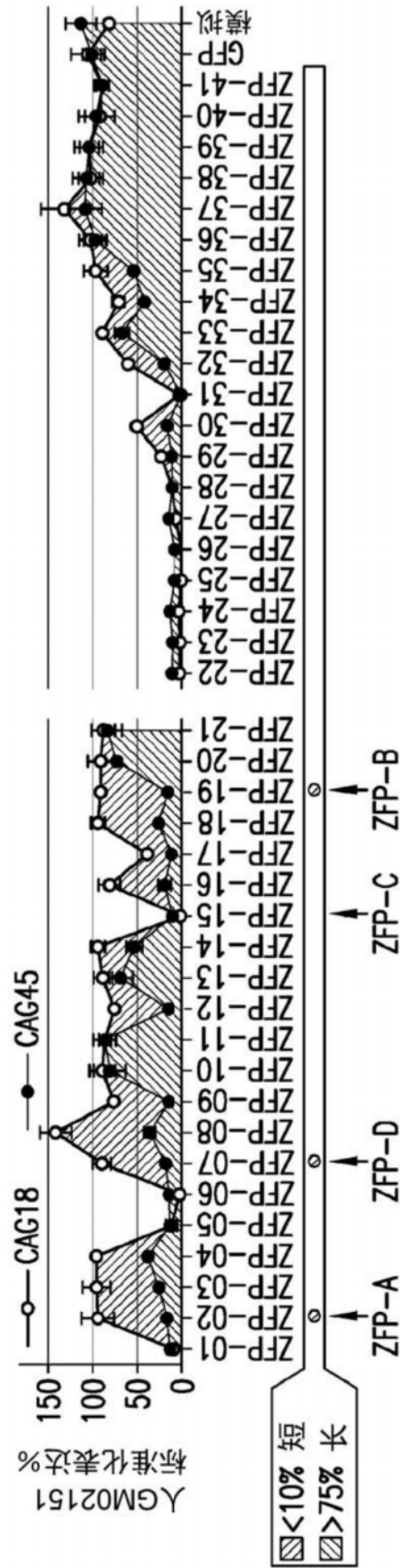


图8B

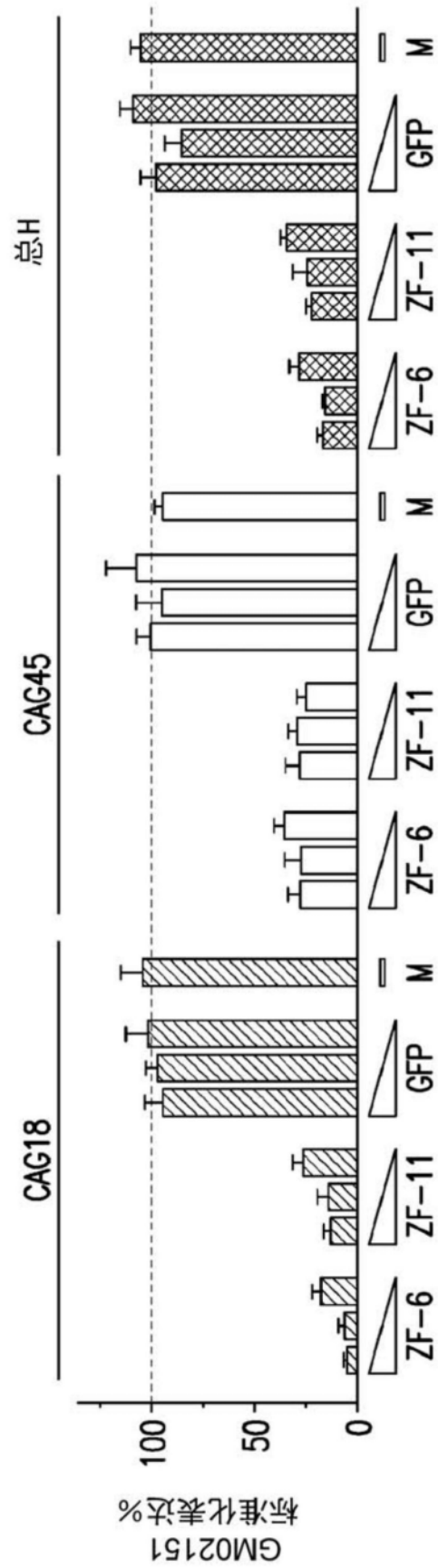


图9

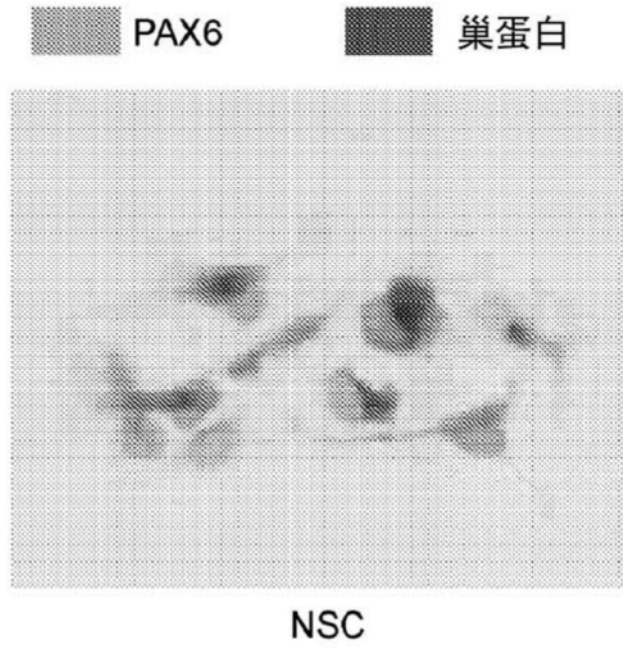


图10A

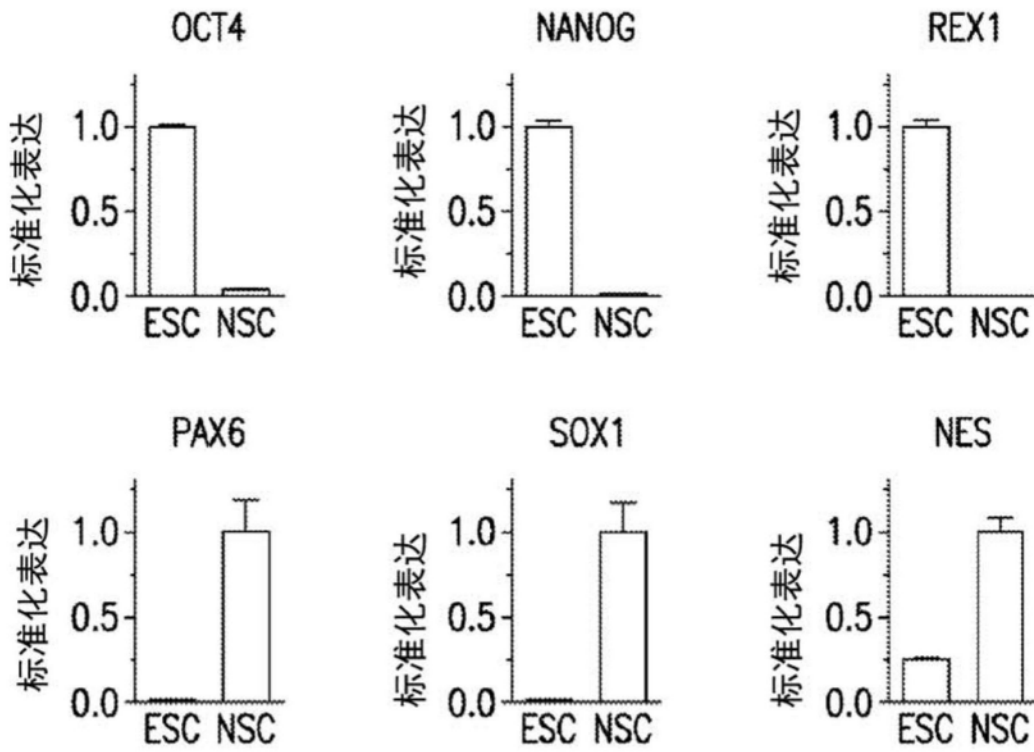


图10B

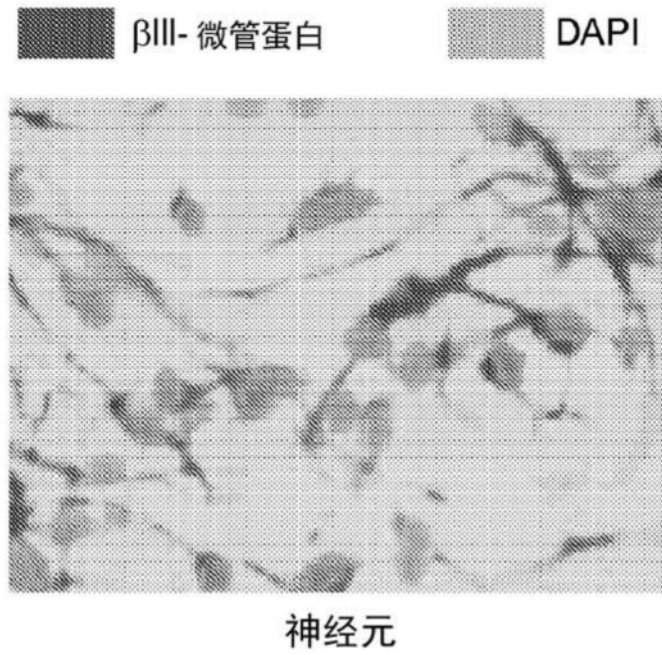


图10C

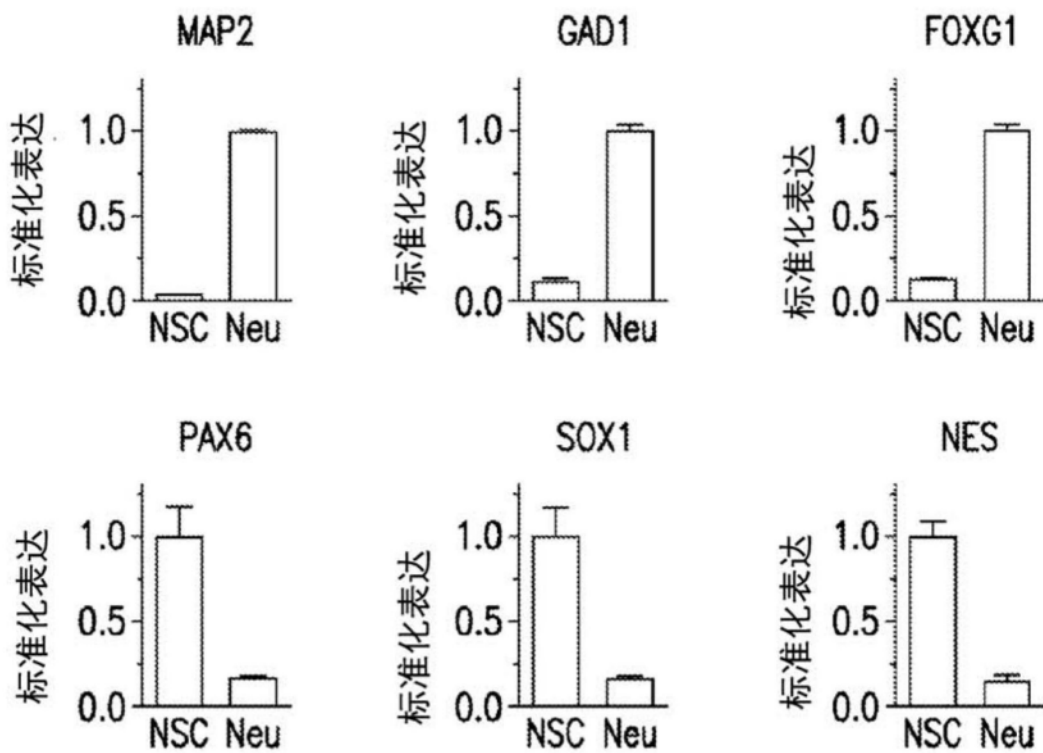


图10D

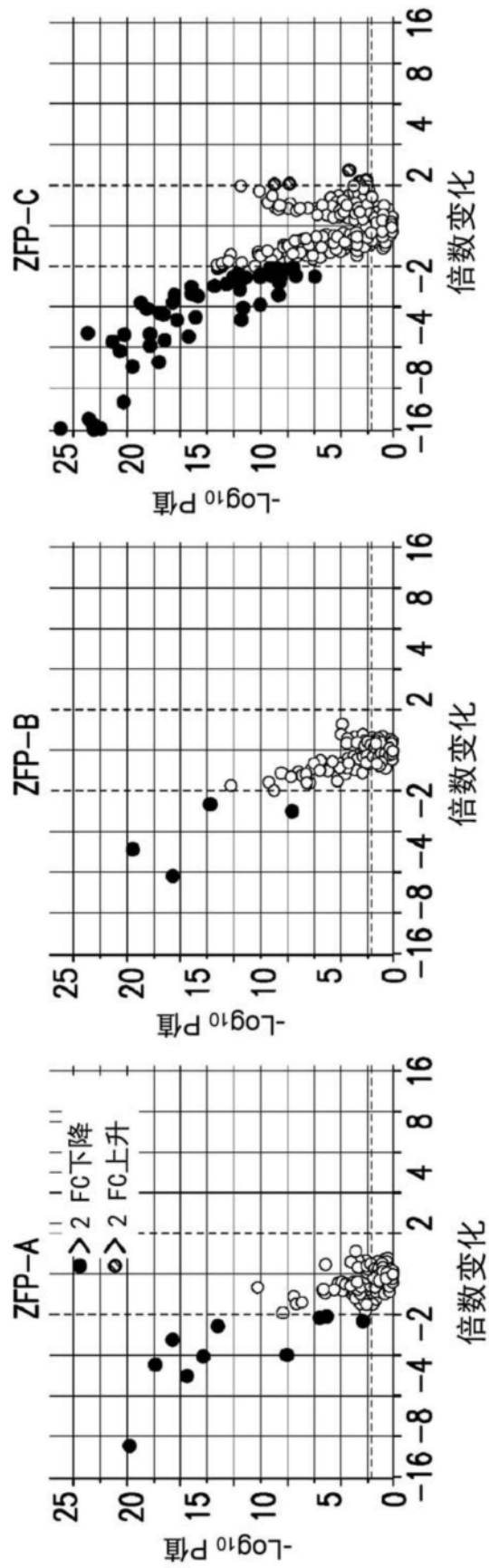


图11A

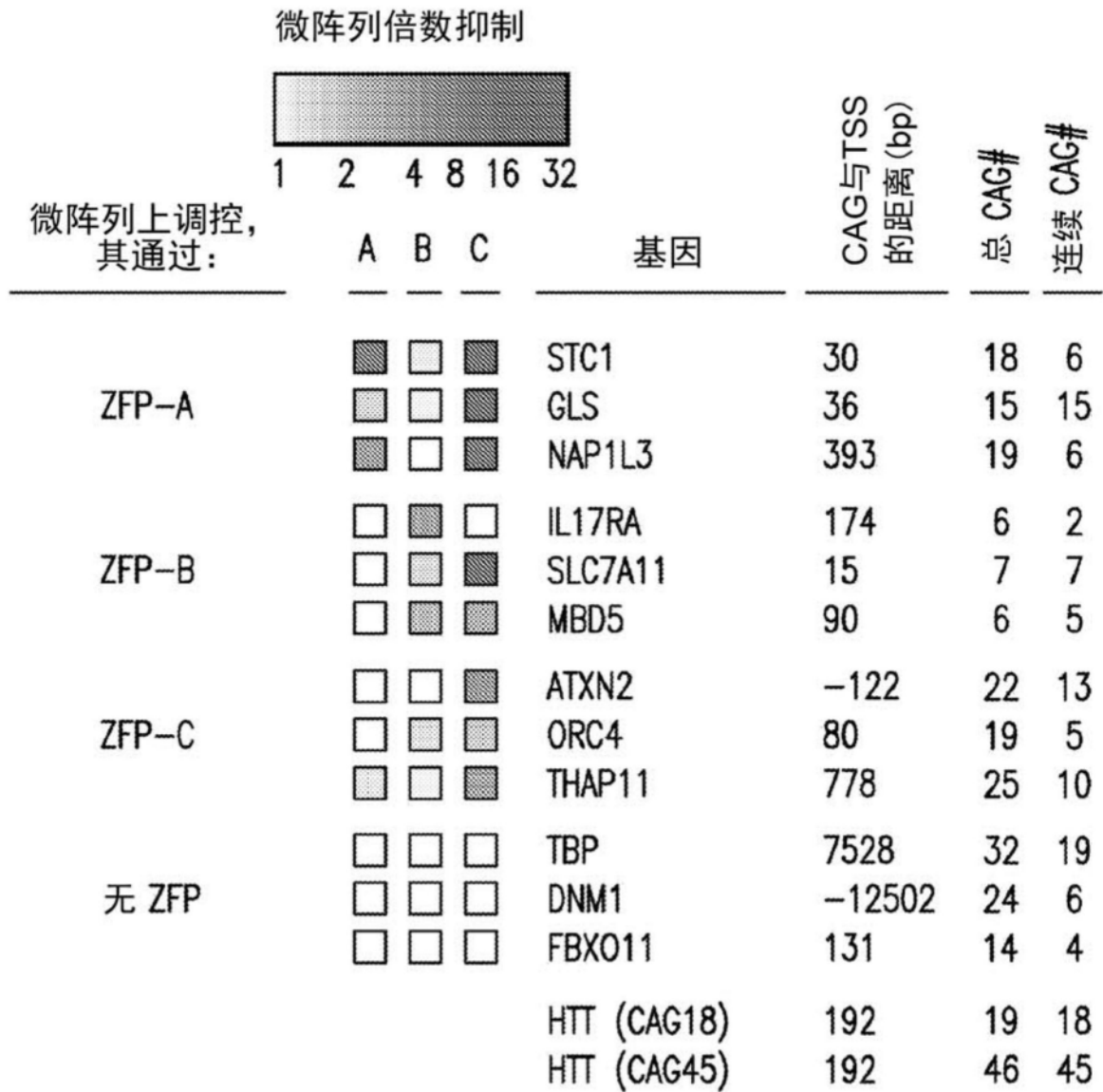


图11B

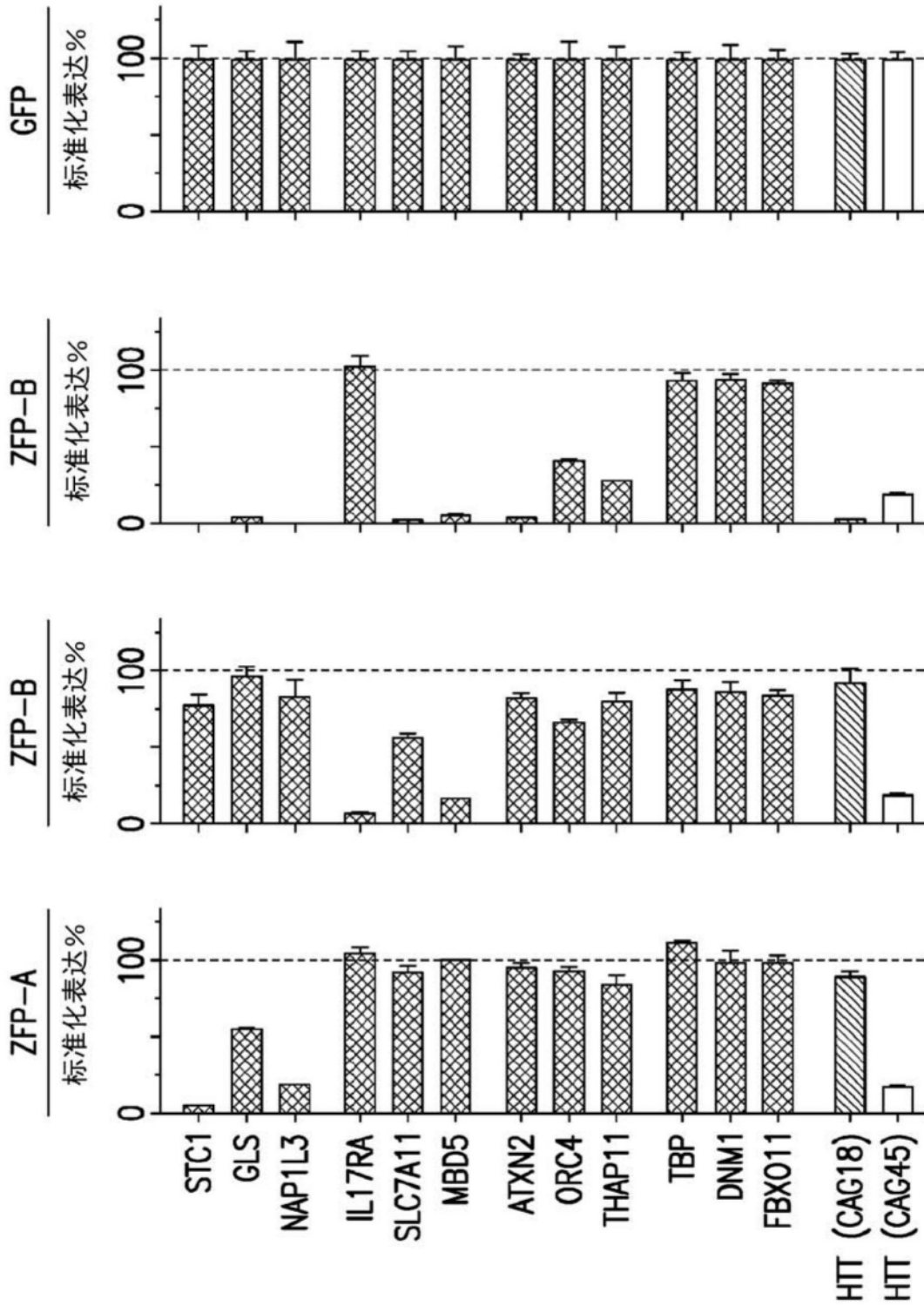


图11C

成纤维细胞脱靶

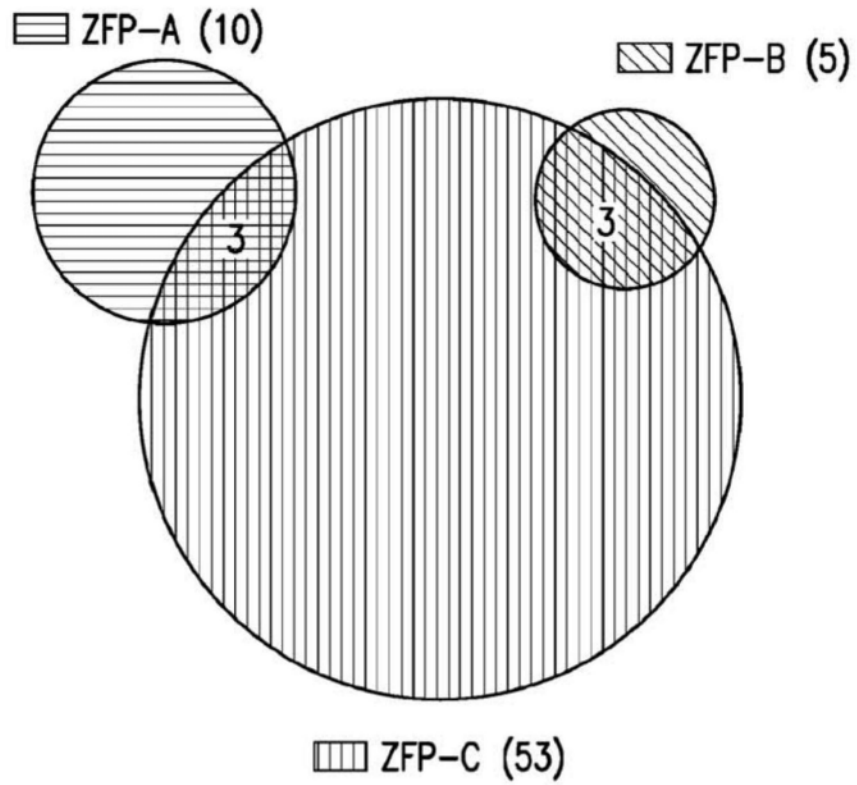


图11D

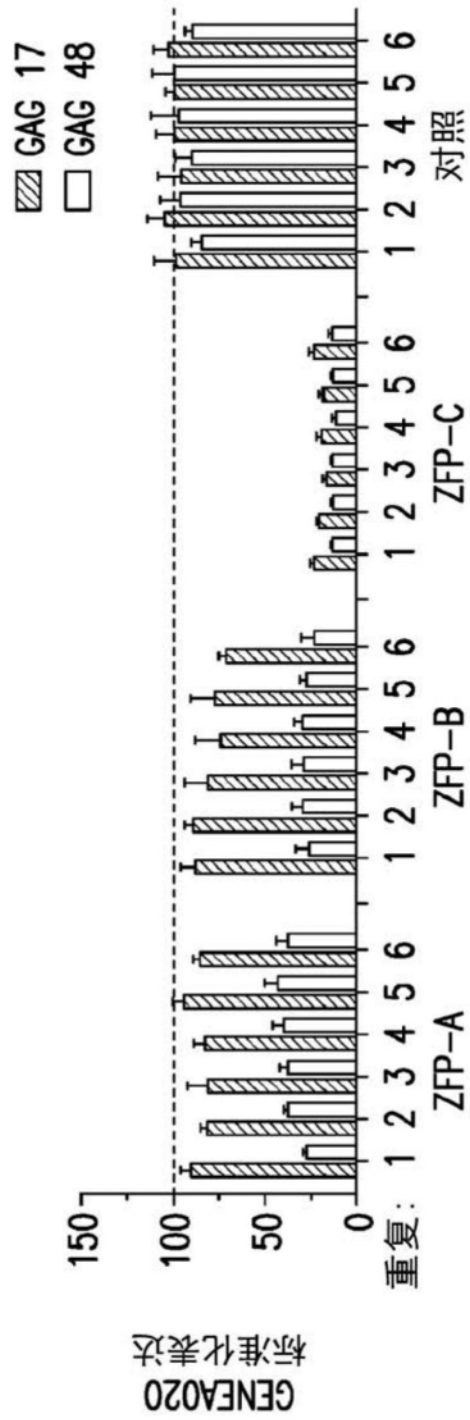


图12A

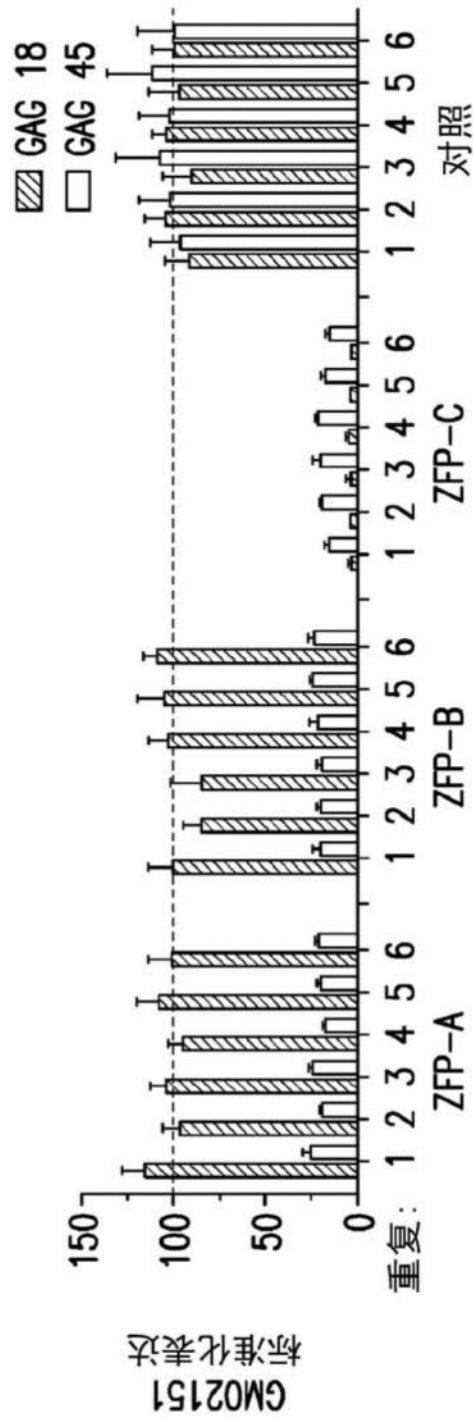


图12B

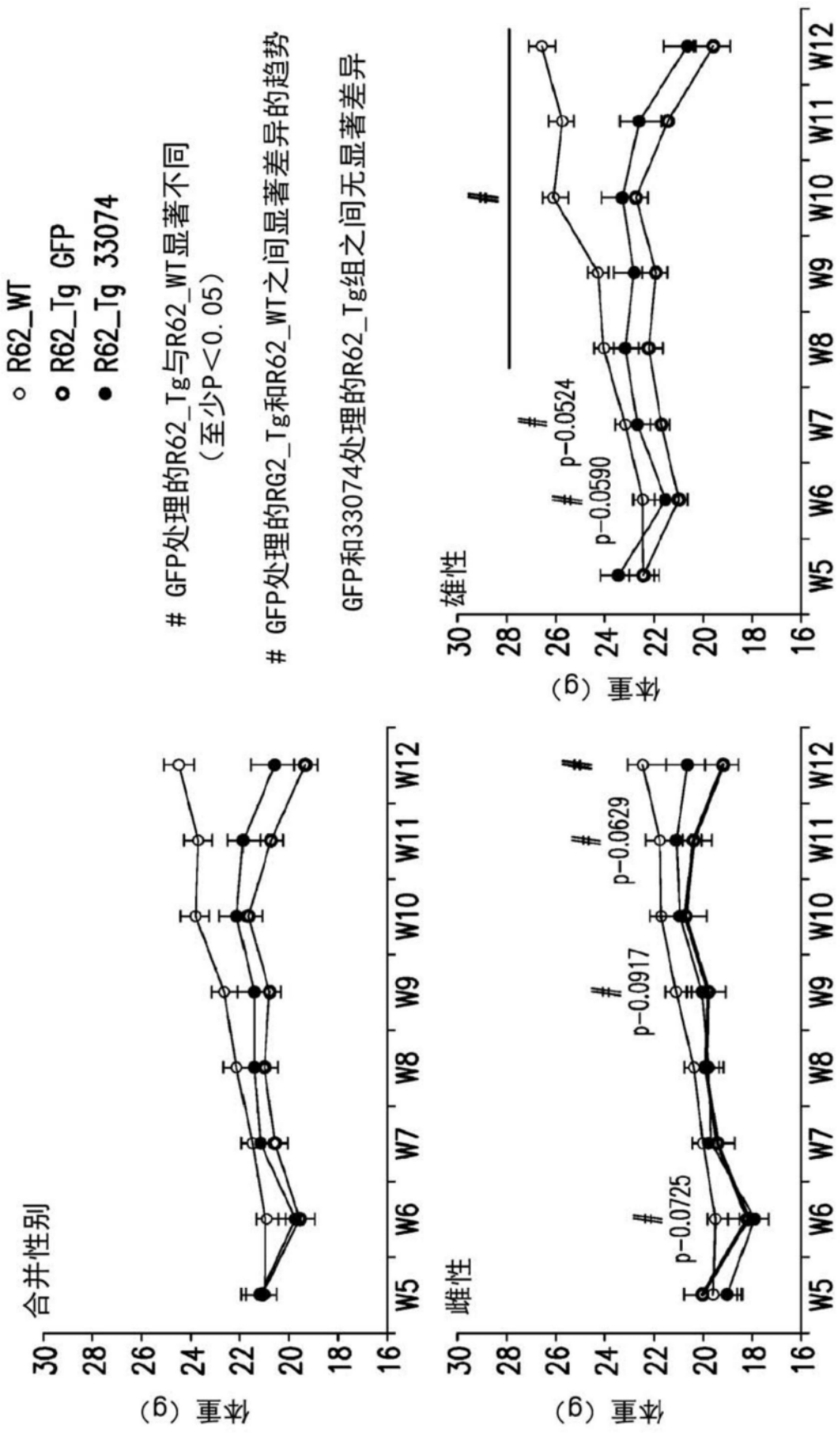


图13A

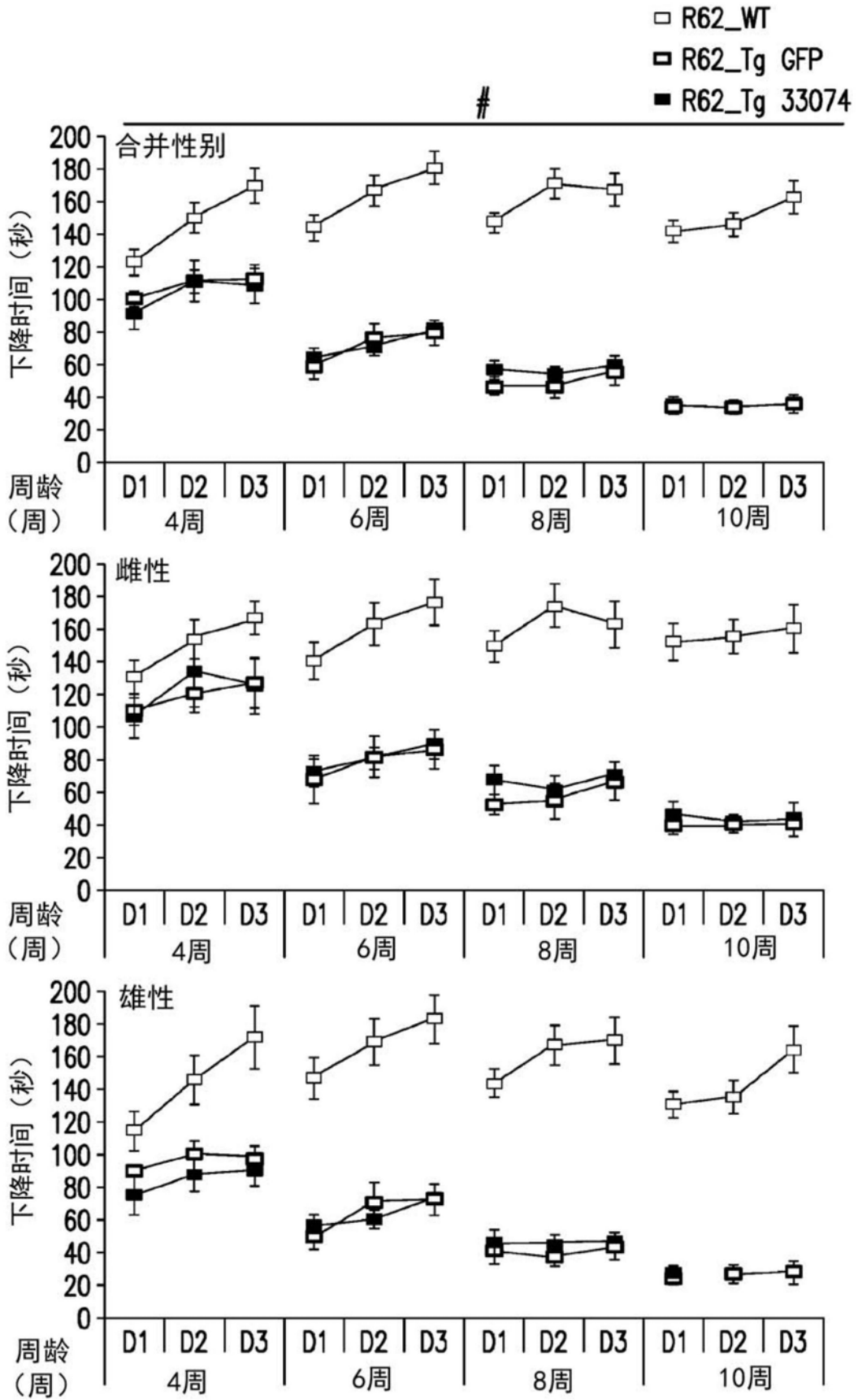


图13B

R62_Tg GFP与R62_WT显著不同 *R62_Tg 33074与R62_Tg GFP显著不同
(至少P<0.05) (至少P<0.05)

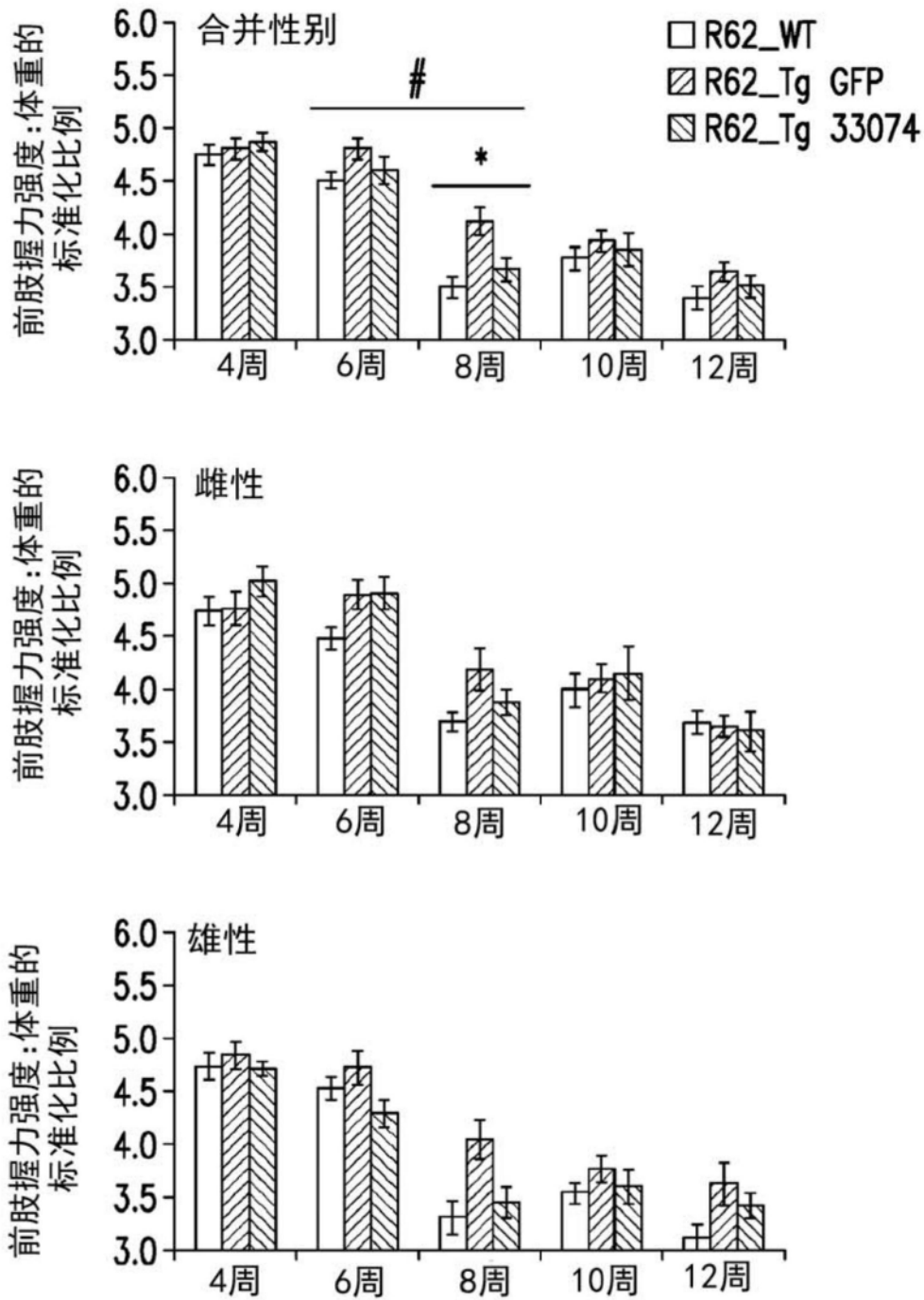


图13C

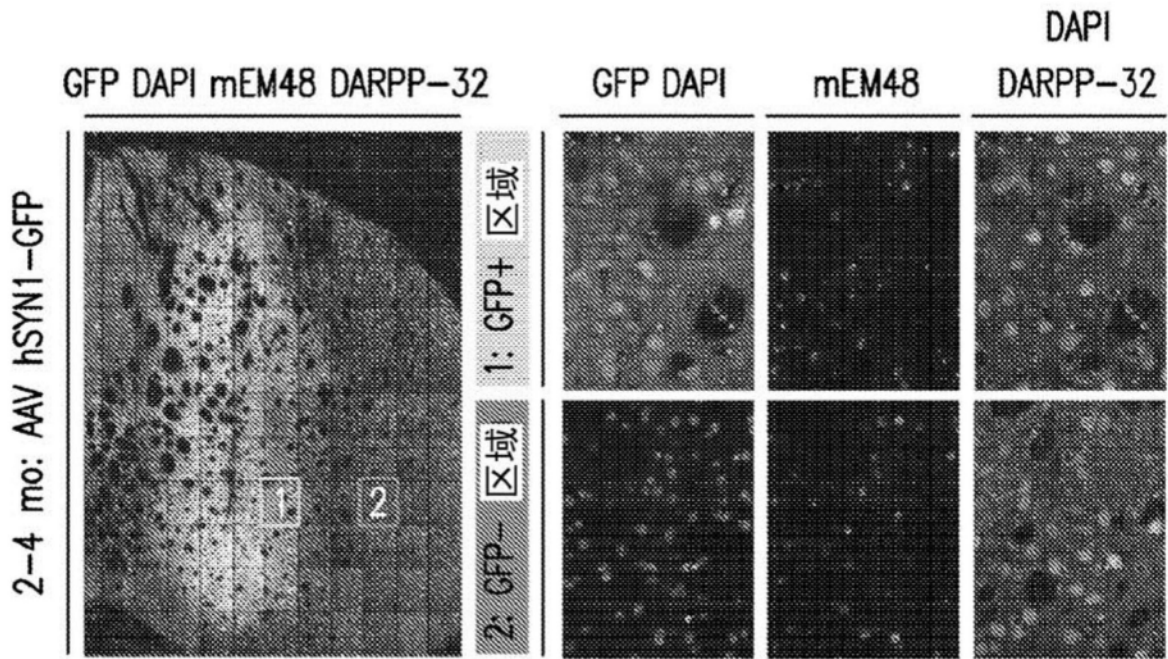


图14A

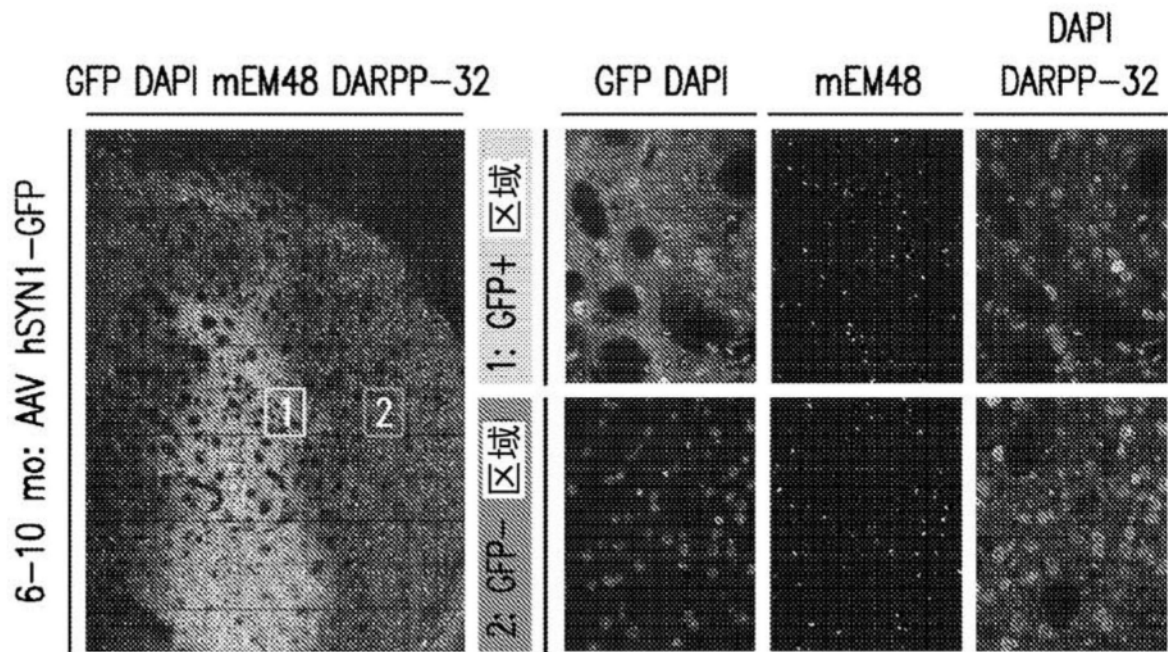


图14B

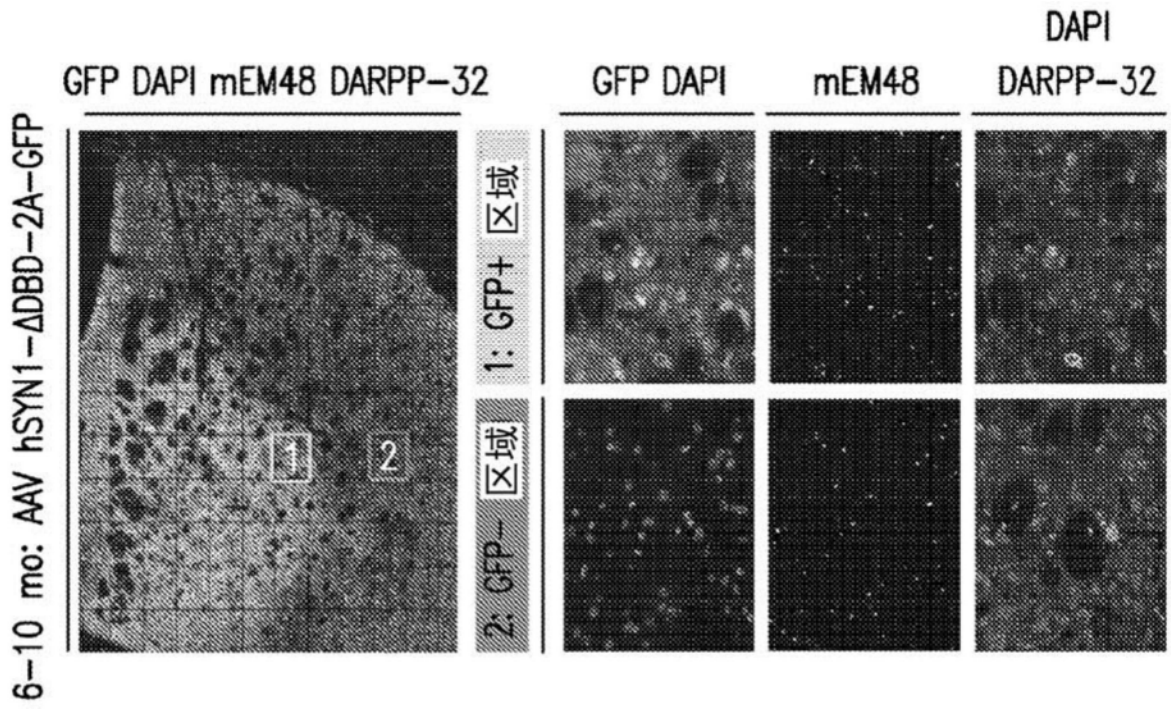


图14C

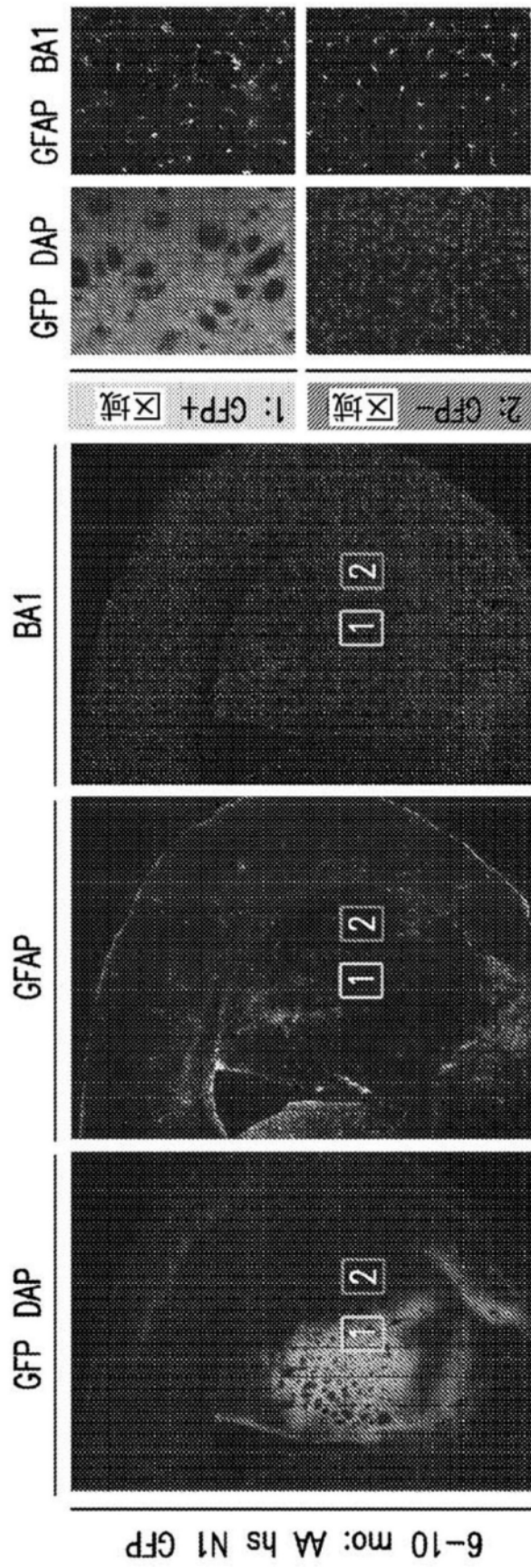


图15A

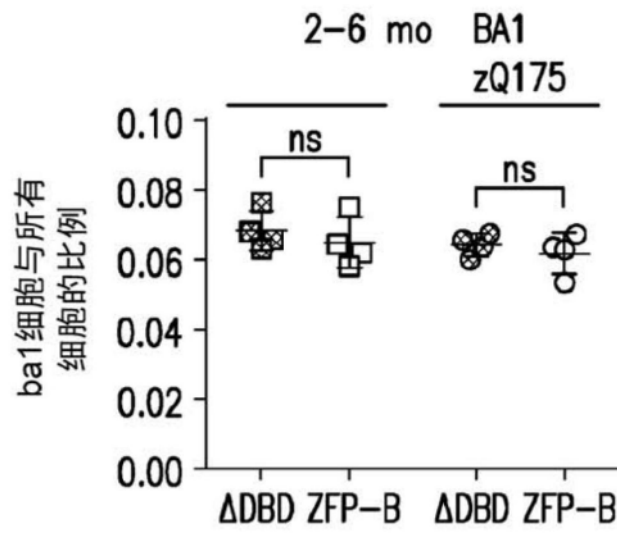


图15B

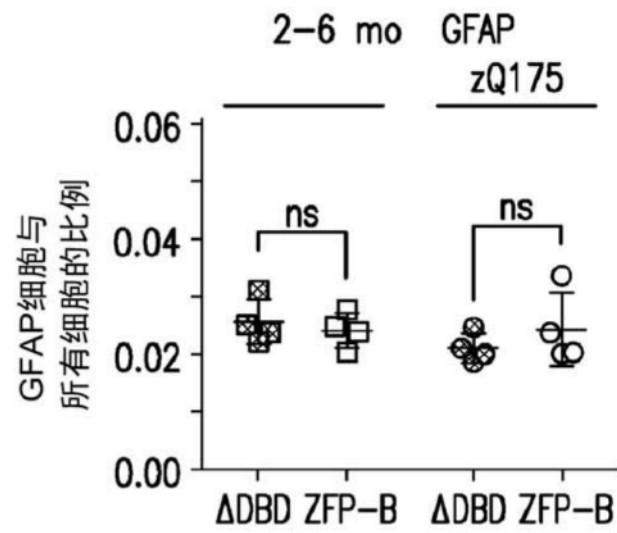


图15C

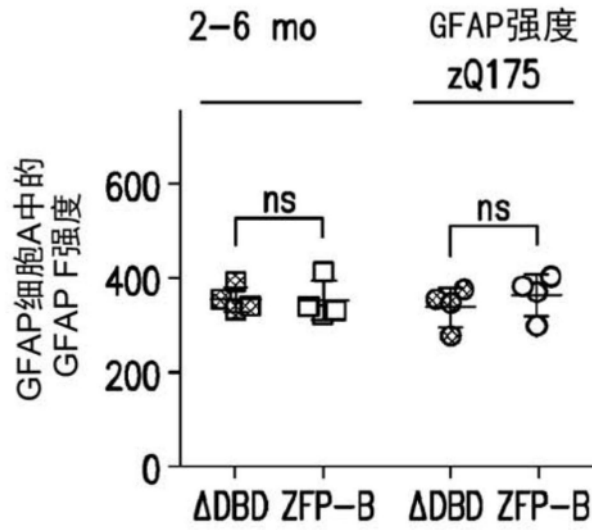


图15D

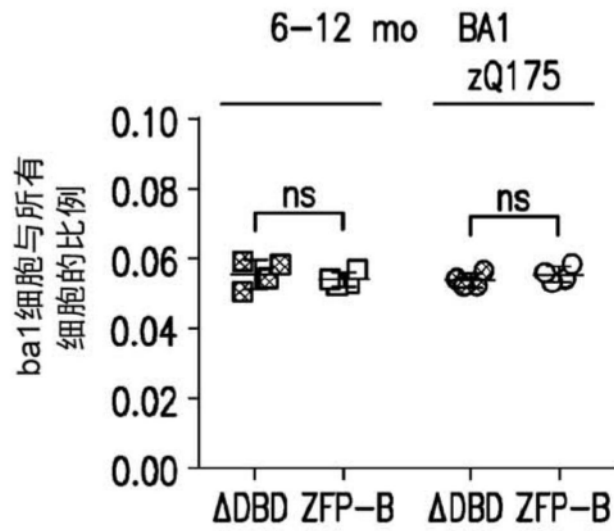


图15E

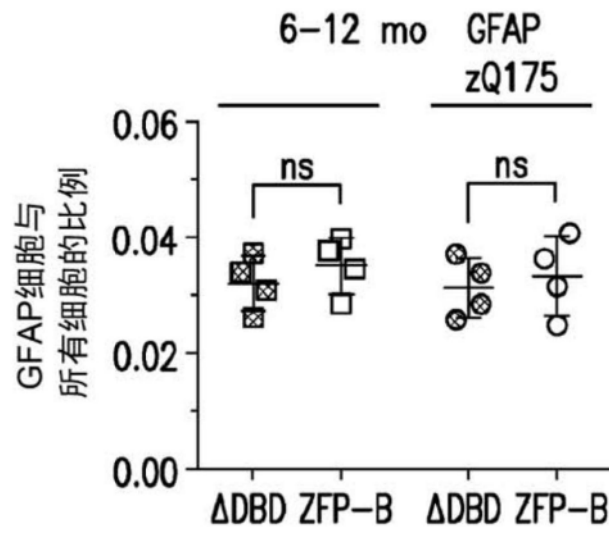


图15F

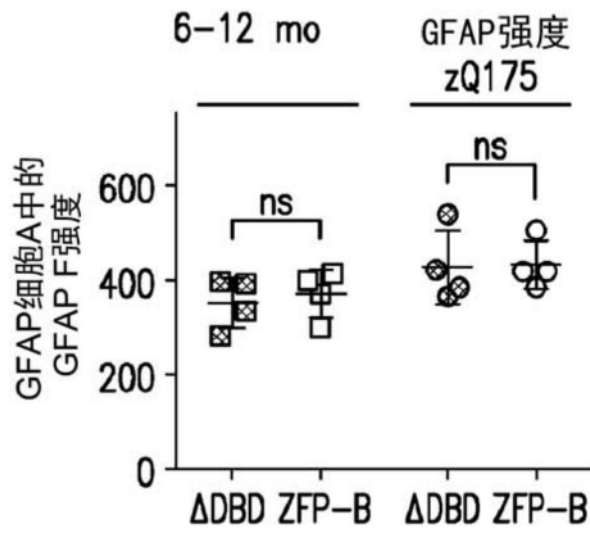


图15G

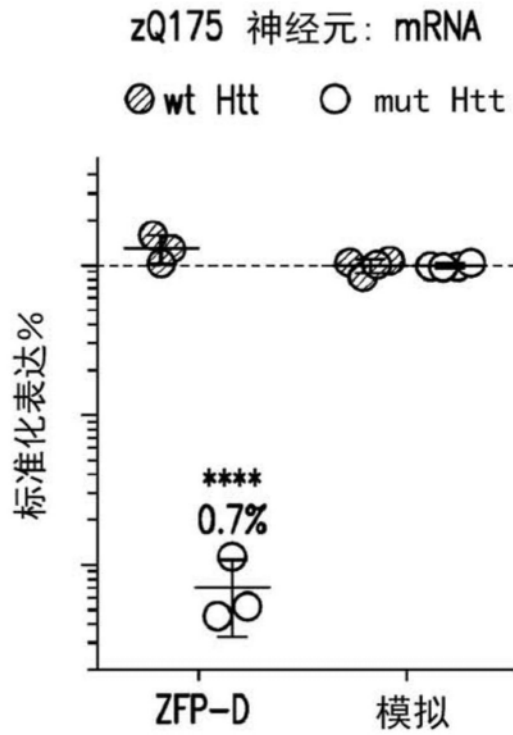


图16A

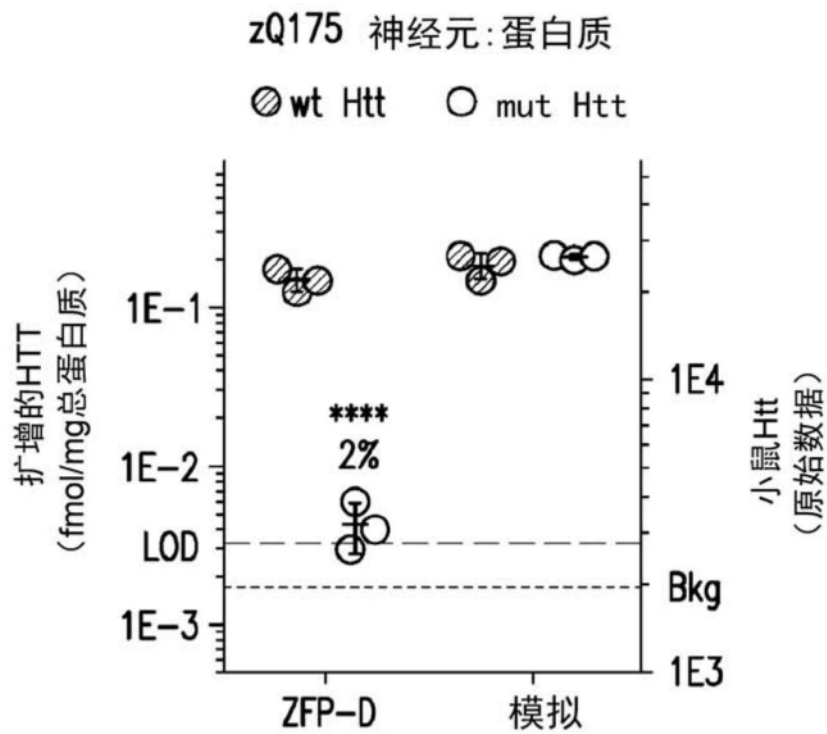


图16B

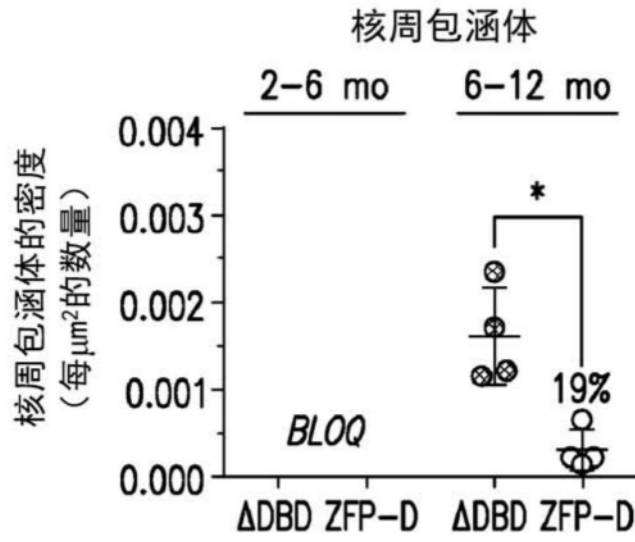


图16C

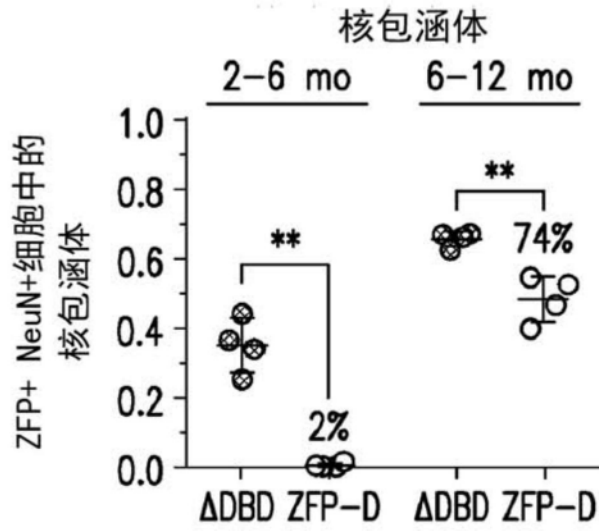


图16D

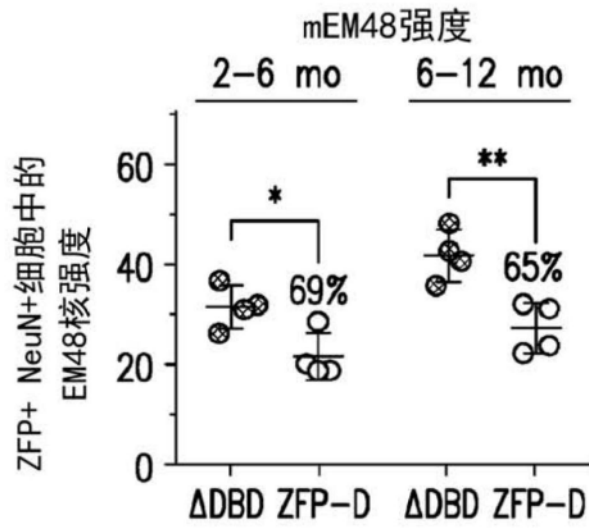


图16E

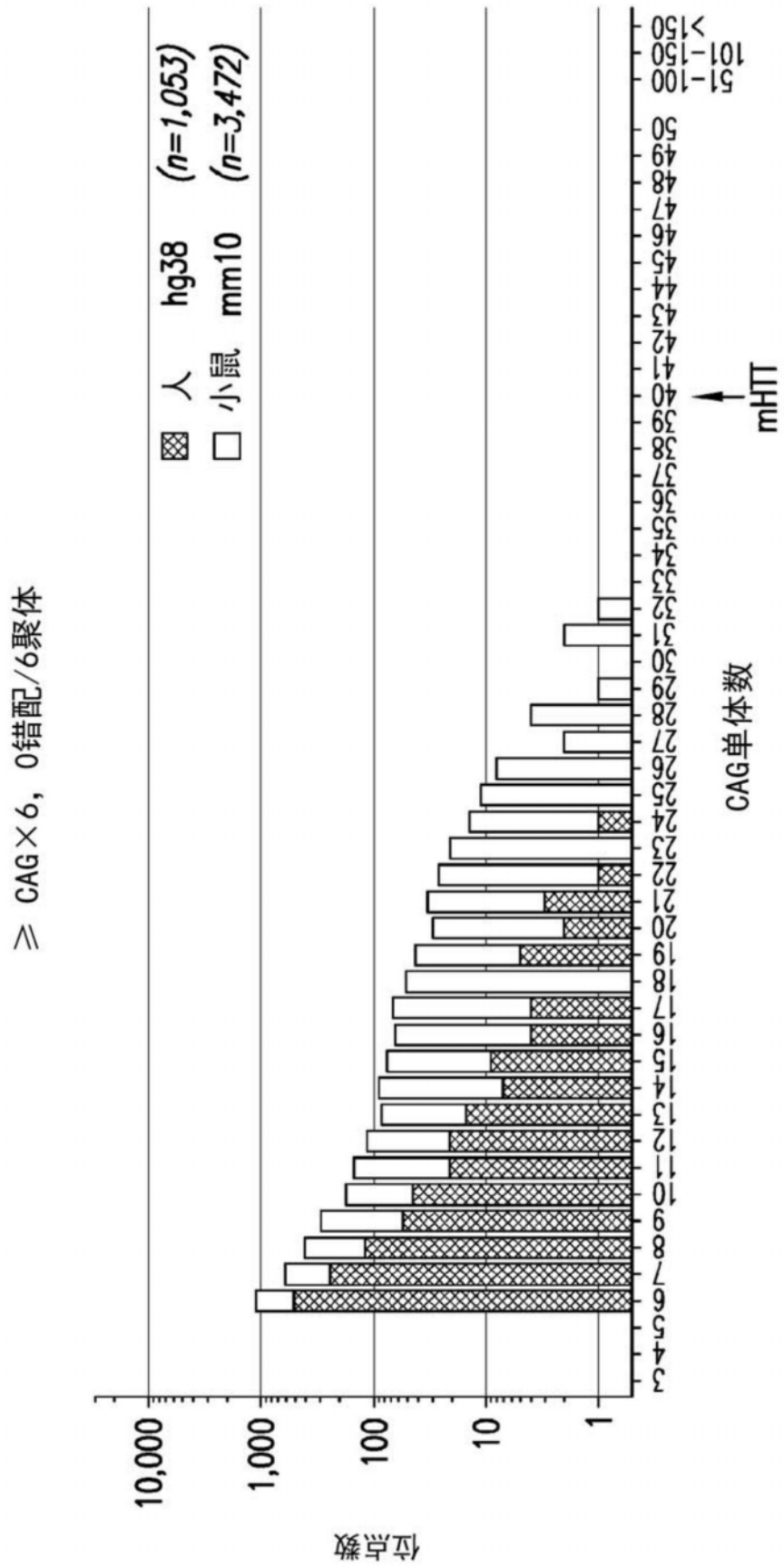


图17A

≥ CAG × 6, 1kb的TSS内0个错配的基因

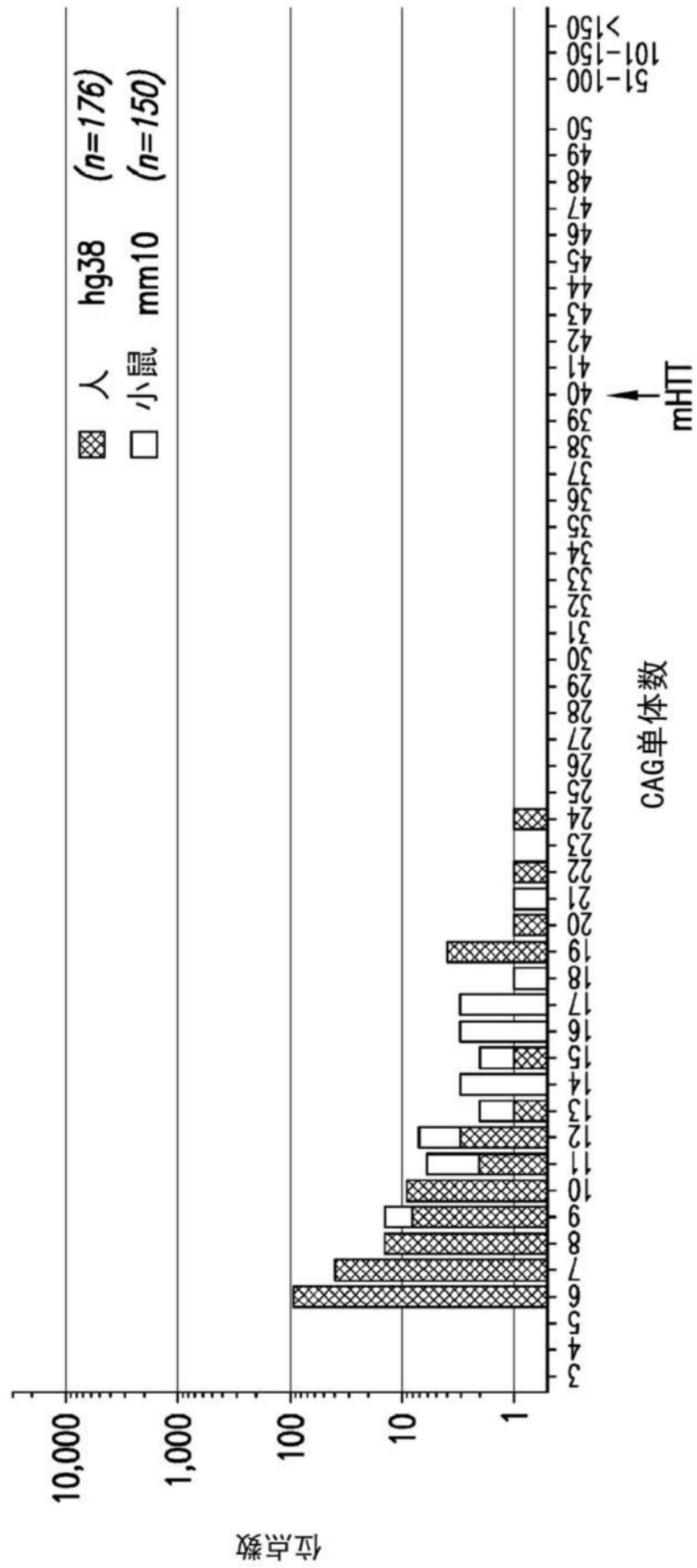


图17B

$\geq CAG \times 6$, ≤ 3 个错配/6聚体

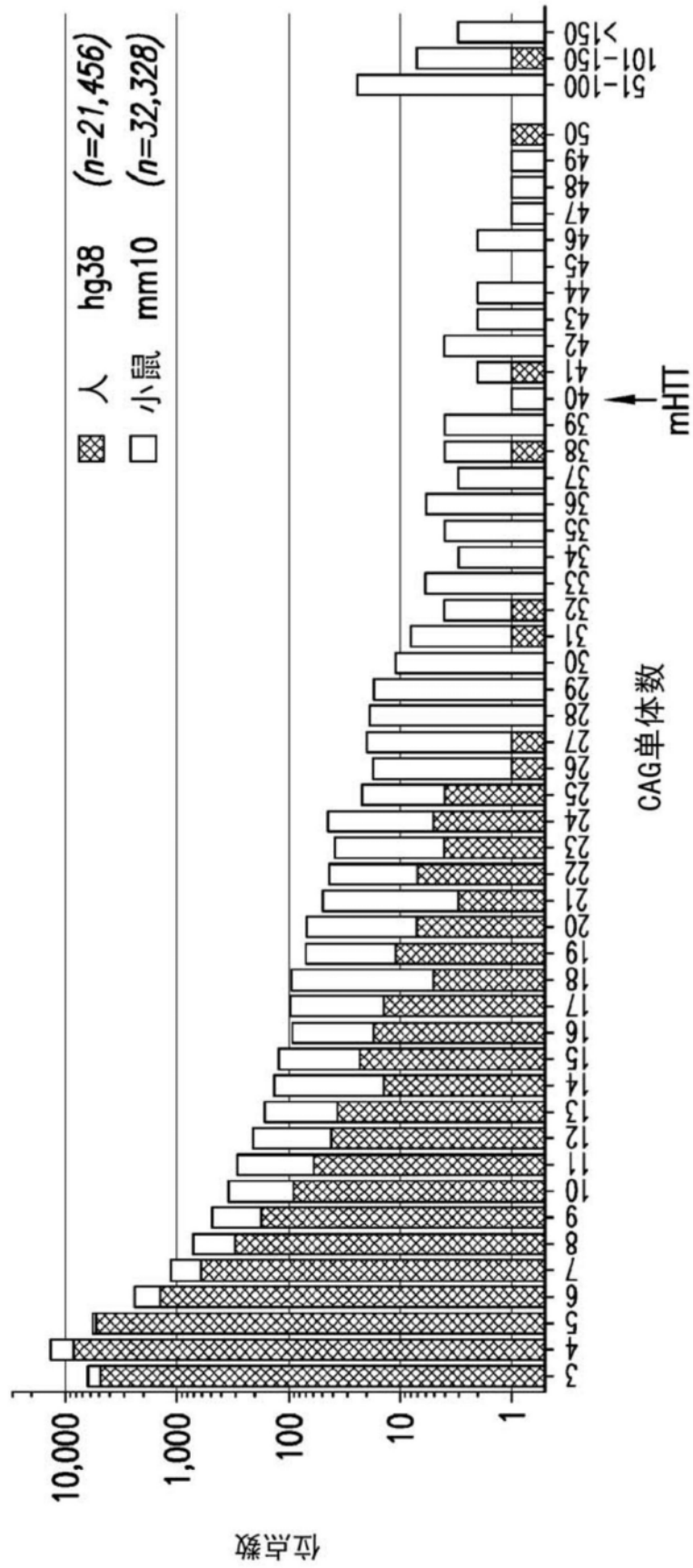


图17C

≥ CAG × 6, 1kb的TSS内 ≤ 3个错配的基因

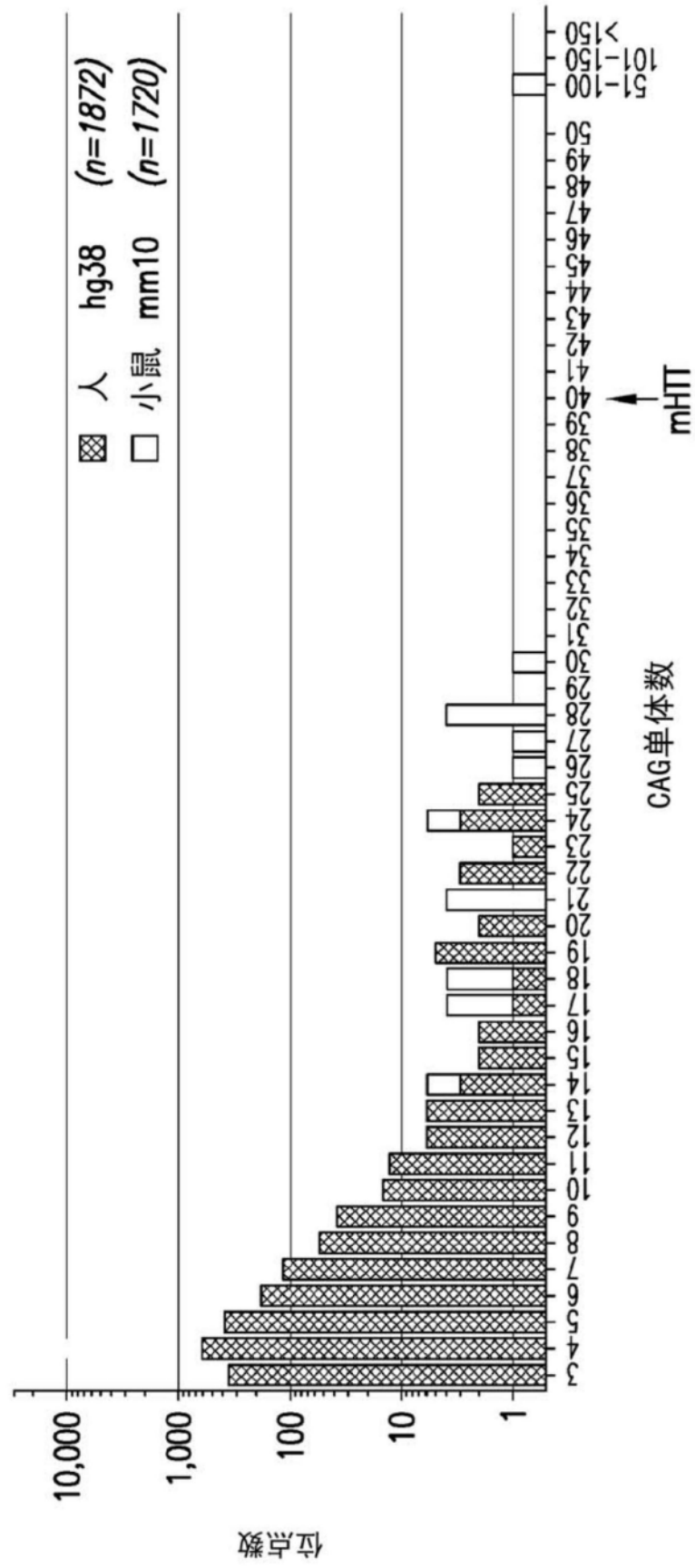


图17D

小鼠相对人

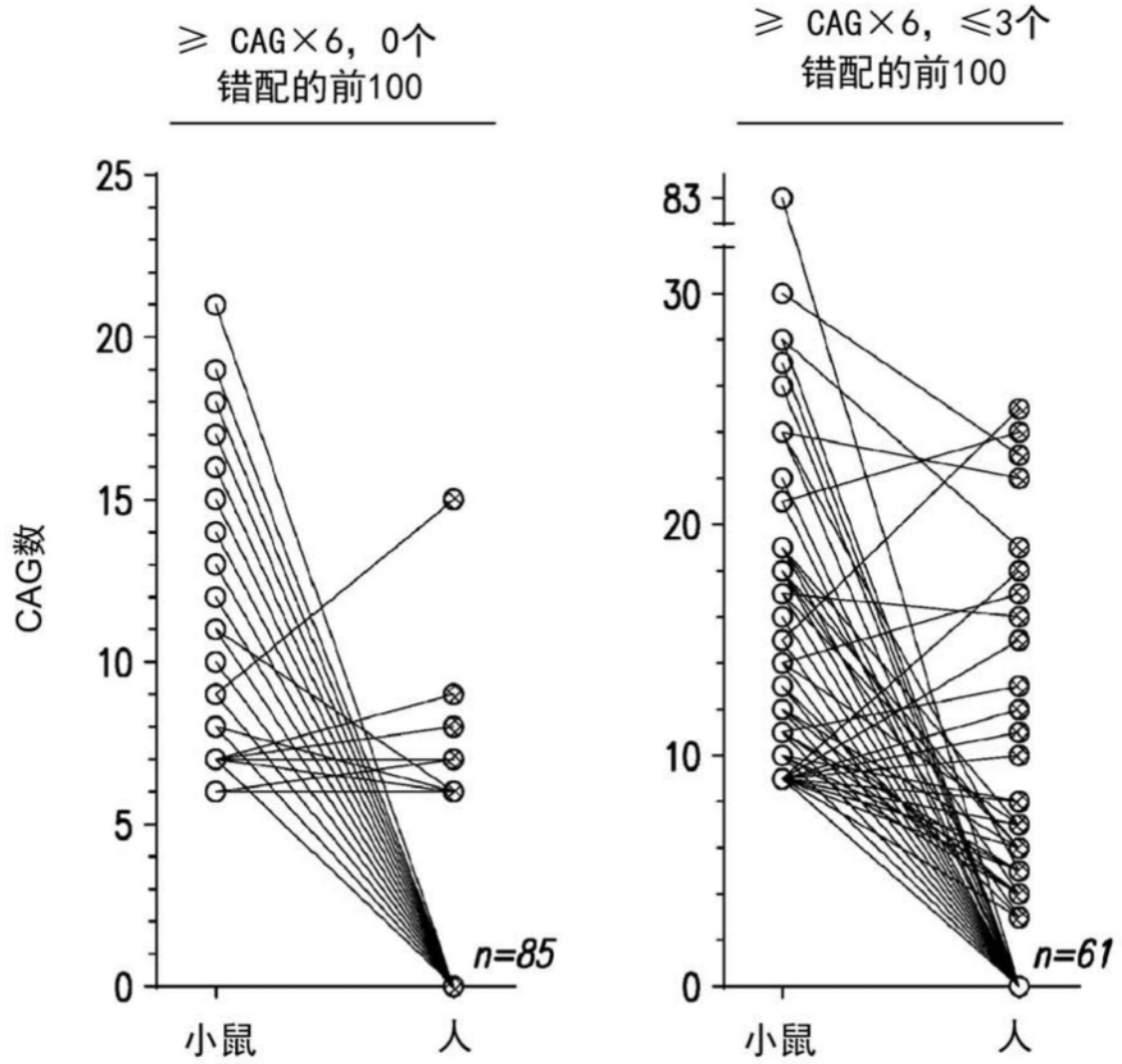


图17E

人相对小鼠

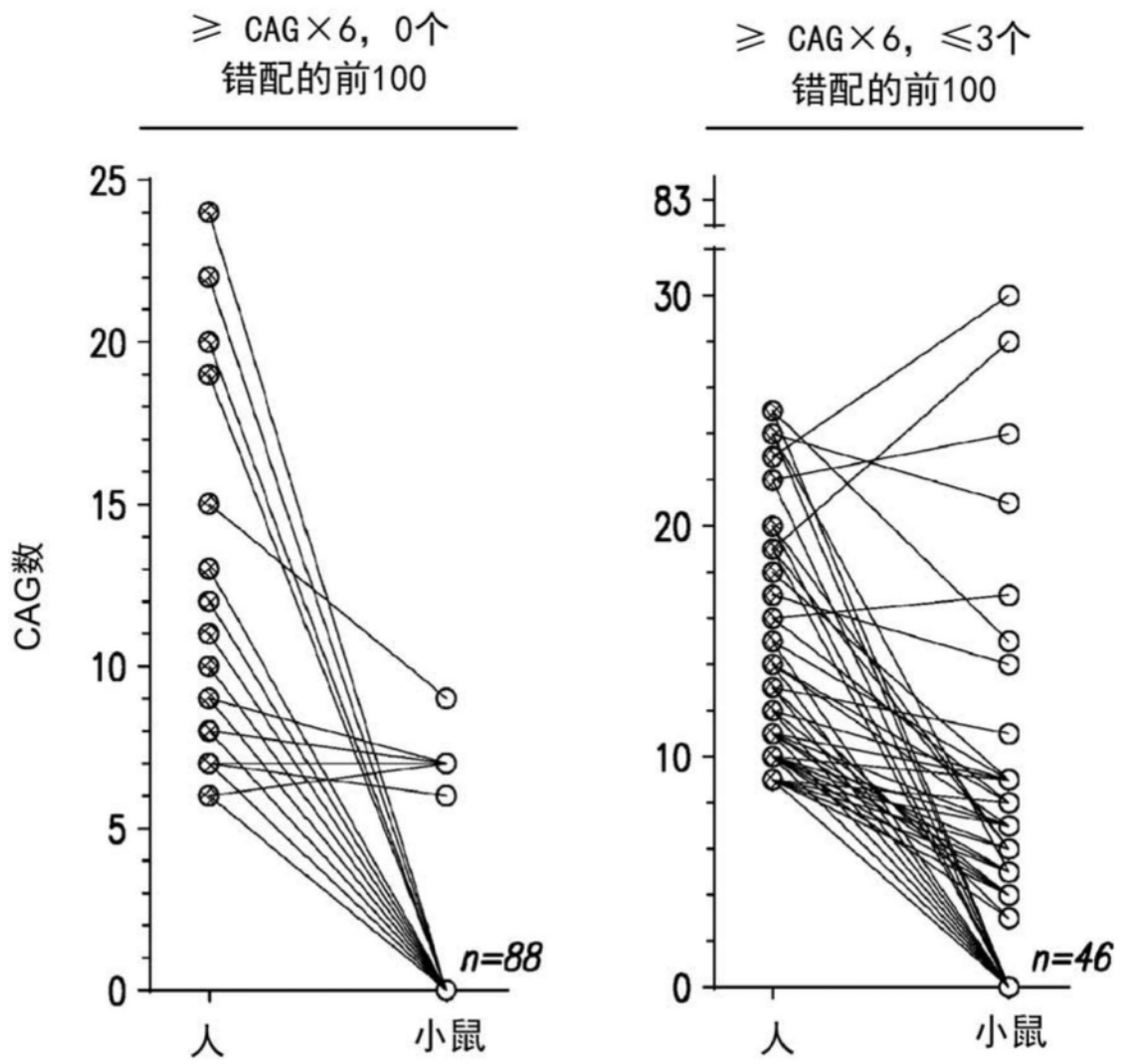


图17F