



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118434876 A

(43) 申请公布日 2024.08.02

(21) 申请号 202280078693.9

(22) 申请日 2022.10.26

(30) 优先权数据

63/263,175 2021.10.28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.05.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/080020 2022.10.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/073071 EN 2023.05.04

(71) 申请人 UCB生物制药有限责任公司

地址 比利时

(72) 发明人 N·罗德里格斯阿尔瓦雷斯

C·西佩基 B·N·瓦莱特

C·G·J·沃尔夫 徐美瑜

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

专利代理师 张小勇

(51) Int.Cl.

C12N 15/86 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书74页

序列表(电子公布) 附图34页

(54) 发明名称

核酸构建体、病毒载体和病毒颗粒

(57) 摘要

本发明涉及一种包含编码突触融合蛋白结合蛋白1(STXBP1、Munc-18)的转基因的核酸构建体、用于将所述核酸包装在病毒颗粒中的病毒载体;和此类病毒颗粒用于治疗与STXBP1功能活性损失相关的疾病的用途。

1. 一种核酸构建体,其包含编码以下的转基因:
 - i. 包含亚型a、b、c、d、e、f、g或h的突触融合蛋白结合蛋白1 (STXBP1),所述亚型分别具有SEQ ID NO:9、10、11、12、13、14、15或16中所示的序列;或
 - ii. 与SEQ ID NO:9、10、11、12、13、14、15或16具有至少95%序列同一性并且保留作为STXBP1的功能性的序列;或
 - iii. 天然存在的变体,其相对于SEQ ID NO:9包含如表7中所示的一个或多个突变。
2. 根据权利要求1的核酸构建体,其中所述转基因编码:
 - i. STXBP1转录变体1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12,其分别具有SEQ ID NO:22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32或33中所示的序列;或
 - ii. 与SEQ ID NO:22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32或33具有至少95%或96%或97%或98%或99%或99.5%序列同一性的序列。
3. 根据权利要求1的核酸构建体,其中所述转基因编码STXBP1亚型a并且包含SEQ ID NO:7的cDNA序列;或与SEQ ID NO:7具有至少95%或96%或97%或98%或99%或99.5%序列同一性的序列。
4. 根据权利要求1至3中任一项的核酸构建体,其进一步包含可操作地连接至所述转基因的启动子,其中所述启动子包含:
 - i. SEQ ID NO:1的CAG 1.6kb启动子;或
 - ii. SEQ ID NO:2的hSYN启动子;或
 - iii. SEQ ID NO:3的MECP2启动子;或
 - iv. SEQ ID NO:4的hNSE启动子;或
 - v. SEQ ID NO:5的CamKII启动子;或
 - vi. SEQ ID NO:6的内源性hSTXBP1启动子;或
 - vii. SEQ ID NO:3的MECP2启动子,其在5'至3'方向上可操作地连接至SEQ ID NO:37的MECP2内含子。
5. 前述权利要求中任一项的核酸构建体,其中所述构建体包含SEQ ID NO:8的SV40多腺苷酸化信号序列。
6. 一种病毒载体,其包含前述权利要求中任一项的核酸构建体,其中所述病毒载体在所述核酸构建体的5'和/或3'侧进一步包含反向末端重复序列(ITR)。
7. 根据权利要求6的病毒载体,其中所述5' ITR和/或所述3' ITR包含天然腺相关病毒(AAV)的ITR。
8. 根据权利要求6或权利要求7的病毒载体,其中所述3' ITR包含SEQ ID NO:18和/或所述5' ITR包含SEQ ID NO:19。
9. 一种病毒颗粒,其包含根据权利要求1至5中任一项的核酸构建体或根据权利要求6至8中任一项的病毒载体。
10. 根据权利要求9的病毒颗粒,其包含来自选自AAV2、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9、AAV10、AAVtt或其组合的AAV的VP1衣壳蛋白。
11. 根据权利要求10的病毒颗粒,其中所述衣壳蛋白来自AAVtt或AAV9并且分别包含SEQ ID NO:20或21或与SEQ ID NO:20或21具有至少98.5%或99%或99.5%序列同一性的序列。

12. 根据权利要求9至11中任一项的病毒颗粒,其用于疗法中。

13. 根据权利要求12的病毒颗粒,其用于治疗和/或预防与严重早发性癫痫性脑病相关的STXBP1遗传病症。

14. 根据权利要求12或权利要求13的病毒颗粒,其用于治疗大田原综合征、韦斯特综合征或德拉韦综合征。

15. 一种治疗和/或预防特征在于STXBP1功能活性损失的疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用根据权利要求9至11中任一项的病毒颗粒。

16. 根据权利要求15的方法,其中所述疾病与患者中引起病理性STXBP1变体的至少一种突变相关联,其中所述病理性STXBP1变体相对于SEQ ID NO:9包含如表5和/或表6中所示的突变或突变的组合。

核酸构建体、病毒载体和病毒颗粒

技术领域

[0001] 本发明涉及用于治疗 and/或预防与突触融合蛋白结合蛋白1 (STXBP1) 功能活性损失相关的疾病的核酸构建体、病毒载体和病毒颗粒,所述STXBP1功能活性损失例如在诸如大田原综合征 (Ohtahara syndrome)、韦斯特综合征 (West syndrome) 和德拉韦综合征 (Dravet syndrome) 的与癫痫症相关的神经发育病症中鉴别出。

背景技术

[0002] 许多神经发育病症与基因改变相关,导致生命早期显现严重临床症状。STXBP1的基因改变与严重早发性癫痫性脑病 (EOEE) 相关,诸如大田原综合征、韦斯特综合征和德拉韦综合征 (Saitou等人2008,Stamberger等人2016)。STXBP1脑病 (STXBP1-E) 的特征在于大范围症状,但现已确定所有患者均具有深度智能障碍并且高达85% 患者出现癫痫发作 (Abramov等人2020)。STXBP1-E可由STXBP1 (Munc-18) 基因中的显性、杂合、新发 (de novo) 突变引起。已报导多种基因变体,包括错义、无义、移码、缺失、重复和剪接位点变体。大多数情况由杂合功能丧失 (LoF) 突变引起,通常为新发的,但在罕见情况下由杂合或嵌合亲本遗传。已描述了引起STXBP1的纯合突变的新近变体。基因型-表型相关性研究迄今为止未能鉴定出突变类型与STXBP1-E的不同表达之间的明确关联。

[0003] STXBP1 (Munc-18;突触融合蛋白结合蛋白1) 是控制神经元和神经内分泌细胞中SNARE介导 (N-乙基顺丁烯二酰亚胺敏感性因子附着蛋白受体) 的膜融合的分子机制的必要组分。STXBP1通过结合突触融合蛋白-1的封闭构象 (一种驱动突触处突触囊泡融合和神经递质释放的过程) 调节SNARE复合物的形成。

[0004] 图1显示了在正常条件 (A) 和疾病条件 (B) 下STXBP1对突触传递的影响的示意图。STXBP1 (Munc18) 为突触机制的主要组分并且其在突触前膜与突触融合蛋白-1的相互作用是触发神经递质释放的关键步骤。在正常条件 (A) 下,STXBP1在突触前膜处大量表达,并且与突触融合蛋白-1形成复合物确保有效的突触囊泡融合,这引起神经递质释放和突触后电流产生。在疾病条件 (B) 下,突变STXBP1不表达或不能直接结合突触融合蛋白-1并且剩余正常STXBP1水平不足以维持有效的神经递质释放,导致突触后电流减少 [Patzke等人2015]。

[0005] STXBP1敲除 (KO) 研究已证明,神经元中缺乏所述蛋白质引起整个发育中神经递质从突触囊泡的分泌完全丧失 (Verhage等人2000)。针对STXBP1的杂合KO模型 (HET) 的表征表明,STXBP1蛋白水平降低约50% 引起强癫痫表型,其特征为肌痉挛抽动和棘波放电 (Kovacevic等人2018,Orock等人2018,Chen等人2020)。此类HET小鼠的长期表型分型还显示认知表现减弱、活动过度和焦虑样行为。仅在GABA能神经元中具有杂合表达的小鼠的产生通过突出显示从GABA能中间神经元至谷氨酸能锥体神经元的突触传递的差异而提供对STXBP1突变机制的进一步见解 (Chen等人2020)。

[0006] STXBP1 HET小鼠神经元显示正常的突触传递,但更详细的分析表明,在谷氨酸能、GABA能和神经肌肉突触处进行密集刺激期间,STXBP1水平降低引起突触抑制增加 (Toonen等人2006)。利用干细胞来源的人类神经元的实验表明,STXBP1水平降低20%-30% 导致正

常突触功能显著减少 (Patzke等人2015),进一步突出显示STXBP1突变的作用可能在神经元亚型与物种背景之间有所变化。相反,正常小鼠神经元中STXBP1的过度表达引起突触功能增加 (Toonen等人2006) 并且在大脑中过表达蛋白质亚型munc18-1a的转基因小鼠品系的表型分析显示几种精神分裂症相关行为 (Urigen等人2013)。已描述STXBP1的额外非突触作用,并且表明其调节皮质神经元的辐射型迁移机制。因此,STXBP1还可调节质膜处的囊泡融合以将各种蛋白质分布在细胞表面上以及从高尔基体至质膜的囊泡转运 (Hamada等人2016)。

[0007] STXBP1中引起功能活性丧失的突变已在体外和模型系统中表征,以确定对神经元功能的影响。在神经元系统中未检测到导致STXBP1蛋白截短(一般与无义、移码或缺失有关)的突变,并且假设此类突变蛋白由其RNA信使的无义介导的衰减机制快速下调。STXBP1中约40-50%突变为错义突变 (Abramov等人2020) 并且体外实验已证明,此类点突变引起STXBP1蛋白的稳定性降低并且引起神经元系统中的表达水平降低 (Kovacevik等人2018, Zhu等人2020)。来自携带STXBP1错义突变的Othahara患者的干细胞来源的神经元的研究还指示STXBP1蛋白水平降低 (Yamashita等人2016)。新近,鉴别出纯合STXBP1突变,并且体外研究指示,纯合L446F突变引起功能获得型表型,同时对蛋白质水平的影响小于先前针对杂合突变所报导的 (Lammertse等人2020)。

[0008] 总体而言,STXBP1遗传病症与STXBP1蛋白的功能丧失有关并且已提出多种治疗方法,包括小分子伴侣,其用于预防突变形式和反义寡核苷酸的聚集以下调负调节STXBP1表达的特定miRNA (Abramov等人2020)。开发用于STXBP1的疾病改善疗法的复杂性在于开发能够恢复正常STXBP1功能活性并且可转化至临床的新特定工具。此时,未有经批准的解决潜在疾病机制的药物疗法。

[0009] 对STXBP1遗传病症的有效治疗存在明显未满足的医疗需求。本公开内容提供一种疾病改善基因疗法,其过表达STXBP1以恢复正常STXBP1功能活性,具有治愈潜力。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明借助于基因疗法提供STXBP1基因的健康副本,其能够补偿STXBP1突变的作用并且恢复正常STXBP1功能活性。

[0012] 本发明提供:

[0013] 一种核酸构建体,其包含编码以下的转基因:

[0014] i. 包含亚型a、b、c、d、e、f、g或h的突触融合蛋白结合蛋白1 (STXBP1),所述亚型分别具有SEQ ID NO:9、10、11、12、13、14、15或16中所示的序列;或

[0015] ii. 与SEQ ID NO:9、10、11、12、13、14、15或16具有至少95%或96%或97%或98%或99%或99.5%序列同一性并且保留作为STXBP1的功能性的序列;或

[0016] iii. 天然存在的变体,其相对于SEQ ID NO:9包含如表7中所示的一个或多个突变。

[0017] 本发明进一步提供:

[0018] 一种病毒载体,其包含所述核酸构建体。

[0019] 一种病毒颗粒,其包含所述病毒载体。

[0020] 病毒颗粒的医疗用途,其用于治疗 and/或预防STXBP1遗传病症。

[0021] 一种治疗和/或预防特征在于STXBP1突变的疾病的方法,其包括向有需要的受试

者施用病毒颗粒。

[0022] 附图的简要说明

[0023] 图1:在正常条件(A)和疾病条件(B)下STXBP1对突触传递的影响的示意图。STXBP1(Munc18)为突触机制的主要组分并且其在突触前膜与突触融合蛋白-1的相互作用是触发神经递质释放的关键步骤。在正常条件(A)下,STXBP1在突触前膜处大量表达,并且与突触融合蛋白-1形成复合物确保有效的突触囊泡融合,这引起神经传递素释放和突触后电流产生。在疾病条件(B)下,突变STXBP1不表达或不能直接结合突触融合蛋白-1并且剩余正常STXBP1水平不足以维持有效的神经传递素释放,导致突触后电流减少[Patzke等人2015]。

[0024] 图2:人类、猴和小鼠STXBP1序列(根据SEQ ID NO:9的人类亚型a)的蛋白质序列比对。比对显示物种间高序列同源性。猴和小鼠氨基酸序列与人类氨基酸序列相同。

[0025] 图3:设计的构建体的示意图。在该图中,“prom”意指启动子;“INT”意指内含子,“h”意指人类,SV40意指聚腺苷酸化序列SV40;“标签”意指HA或Myc标签,位于构建体的N端或C端。

[0026] 图4:(A)用抗STXBP1抗体检测的用各种启动子(CAG、MECP2和MECP2-内含子)驱动的hSTXBP1质粒转染的AD-HEK293细胞的免疫荧光成像。(B)放大部分显示STXBP1定位至细胞膜。AD=粘附,NC=阴性对照。

[0027] 图5:(A)用抗STXBP1抗体检测的用各种启动子(CAG、MECP2和MECP2-内含子)驱动的hSTXBP1质粒转染的Neuro-2A细胞的免疫荧光成像。(B)放大显示STXBP1定位至细胞膜。NC=阴性对照。

[0028] 图6:用各种启动子(CAG、MECP2和MECP2-内含子)驱动的hSTXBP1转染的Neuro-2A细胞的蛋白质印迹分析。显示了各条件的两个技术重复。NC=阴性对照,1=MECP2-内含子-hSTXBP1,2=CAG-hSTXBP1,3=MECP2-hSTXBP1。

[0029] 图7:以下的蛋白质印迹分析:(A)用抗Myc抗体检测的AD-HEK293细胞中由CAG启动子驱动经Myc标记的hSTXBP1;和(B)用抗HA抗体检测的AD-HEK293细胞、SH-SY5Y细胞和Neuro-2a细胞中由hSYN启动子驱动经HA标记的hSTXBP1。显示了各条件的两个技术重复。(C)还使用抗STXBP1抗体检测AD-HEK293细胞中的经表位标记的蛋白质。NC=阴性对照,1=CAG-hSTXBP1-Myc,2=CAG-Myc-hSTXBP1,3=hSYN-HA-hSTXBP1。(A)中NC泳道中背景蛋白质条带归因于抗Myc抗体对内源性Myc的检测。

[0030] 图8:iPSC来源的谷氨酸能神经元中SXTBP1表达盒的慢病毒载体转导。图像显示在对照条件下(未经转导)和在hSyn或MECP2启动子的控制下转导表达盒之后STXBP1表达的代表性图像。

[0031] 图9:小鼠原代神经元中STXBP1的AAV9转导。(A)用AAV9病毒载体以MOI 5.0E+5GC/细胞转导的原代小鼠皮质神经元中STXBP1染色的代表性图像。图像显示在对照条件(未经转导)和在hSyn、MECP2或MECP2-内含子启动子的控制下的STXBP1表达。(B)相同原代小鼠皮质神经元中HA染色(右)与STXBP1染色(左)的比较。

[0032] 图10:MAP2阳性神经元中STXBP1过表达的共定位。图像为AAV9病毒载体转导后小鼠原代神经元中的抗HA标签染色(左图)和抗MAP2染色(右图)的代表性图像。箭头指示表达STXBP1(HA)和神经元标记物(MAP2)的细胞的实例。

[0033] 图11:病毒载体DNA拷贝分析。SV40pA(猿猴病毒40的多聚A信号)的qPCR数据通过

AAV处理后5周龄小鼠的左海马回和左额叶皮质的二倍体小鼠基因组的数目标准化。显示了媒介物和四个AAV9转导的组(对照病毒、hSyn、MECP2、MECP2-内含子)的数据。结果显示为平均值 $\pm$ SD。

[0034] 图12:STXBP1 mRNA表达分析。数据表示为针对两种参考基因标准化的相对表达并且针对所有组的平均表达按比例调整(平均值 $\pm$ SD)。对AAV处理后5周龄小鼠的左海马回和左额叶皮质的组织进行分析。显示了媒介物和四个AAV9转导的组(对照病毒、hSyn、MECP2、MECP2-内含子)的数据。

[0035] 图13:通过蛋白质印迹法的蛋白质分析。(A)显示皮质中不同表达盒的HA-标签表达的蛋白质印迹($n=5-7$ /组)。GAPDH用作上样对照。(B)HA-标签条带强度的定量,各样品相对于GAPDH上样对照标准化。结果显示为平均值 $\pm$ SD。

[0036] 图14:使用来自AAV9-hSyn-NLS-eGFP-NLS病毒的GFP报告物测定的感染细胞在小鼠脑中的分布。(A)接受AAV9-hSyn1-NLS-GFP-NLS icv的1个月后处死并且进行免疫染色以标记GFP的小鼠脑的矢状切片。从整个脑的前部至背部观察到表达GFP的细胞的分布。展现GFP+细胞的一些主要脑区域用矩形突出显示。(B-G):显示来自A的GFP+细胞的脑区域的高度放大(箭头指向GFP+细胞)。

[0037] 图15:表达来自AAV9-hSyn-NLS-eGFP-NLS病毒的GFP报告物的细胞的表征。进行双重免疫荧光标记以检测(A-F)GFP和神经元标记物NeuN、(G-L)GFP和星形细胞标记物GFAP。在所有脑区域(箭头指向经双重标记的细胞)中观察到对(A-C)GFP和(D-F)NeuN呈阳性的细胞,表明神经元被转导并且表达报告基因。相反,在GFAP阳性细胞(J-L)中未检测到GFP(G-I)信号,表明星形细胞不表达报告基因。

[0038] 图16:在AAV9施用后小鼠脑中来自不同启动子的HA-STXBP1融合蛋白的分布。通过针对HA的免疫组织化学研究小鼠脑中从不同启动子过表达的经HA标记的STXBP1的分布。作为阴性对照条件,在接受(A)仅PBS或(B)AAV9-hSyn-GFP病毒icv的动物中未观察到HA信号。(C)作为抗体选择性的阴性对照(NC),在接受AAV9-MECP2-内含子-HA-STXBP1病毒但在免疫组织化学程序期间省略一抗HA抗体的动物中未观察到HA信号。(D-F)在注射从不同启动子表达HA-STXBP1的不同病毒的所有动物的脑中观察到HA信号。3种启动子引起整个脑中HA分布的共同模式,其中在大脑皮质、海马回、纹状体、嗅球、黑质和前脑中的纤维束中观察到主要表达。表16中报道了启动子之间的HA分布的明显差异。

[0039] 图17:在AAV9施用后海马回中来自不同启动子的HA-STXBP1融合蛋白的分布。进行双重免疫荧光标记以检测(A-C)HA和(D-F)神经元标记物NeuN,其用于鉴别海马回的不同部分。所有3种启动子引起整个海马回中的HA表达,主要在神经元突出物(Mo1、LMo1或MF)中并且偶尔在细胞体中。(F)MECP2-内含子启动子相比于其他2种启动子(D、E)产生更好的覆盖度和更高的HA信号强度。LMo1:海马回腔隙分子层;MF:苔状纤维;Mo1:齿状回分子层;Or:起层。

[0040] 图18:从不同启动子表达HA-STXBP1的细胞的表征。进行双重免疫荧光标记以检测(A-C)HA和(D-F)神经元标记物NeuN。对HA呈阳性并且偶尔在脑不同区域中观察到的细胞体还对NeuN呈阳性,证实所有3个启动子均驱动神经元中的转基因表达。箭头指向双重标记的细胞。

[0041] 图19:通过qPCR分析小鼠脑中的STXBP1变体mRNA水平。来自WT(野生型)同窝小鼠

和HET(杂合)小鼠的尾侧皮质(右半球)的脑组织样品的mRNA分析(n=11-13/组)。(A):对总内源性STXBP1的mRNA表达分析(识别所有STXBP1转录物的常见探针)。(B)和(C):使用两种特异性识别长亚型(B)或短蛋白质亚型(C)的不同探针对STXBP1变体进行mRNA表达分析。通过计算 $2^{-\Delta Ct}$ 值,数据显示为mRNA表达水平,其中表达相对于两种参考基因的平均值标准化。结果显示为平均值 $\pm$ SD。

[0042] 图20:通过蛋白质印迹分析小鼠脑中的STXBP1蛋白水平。已分析了来自WT(野生型)同窝小鼠和HET(杂合)小鼠的右额叶(内侧)皮质的组织样品(n=11-13/组)。(A):代表总STXBP1蛋白表达的蛋白质印迹。(B):(A)中各自蛋白质印迹的定量数据。B-肌动蛋白用作上样对照,用于标准化。“WT”组用作按比例调整组。结果显示为平均值 $\pm$ SD。

[0043] 图21:通过LC-MS分析小鼠脑中的STXBP1变体蛋白水平。已分析了来自WT(野生型)同窝小鼠和HET(杂合)小鼠的额叶皮质侧半部的组织样品(n=11-13/组)。(A):总STXBP1肽相对STXBP1长亚型相对STXBP1短亚型的定量。结果显示为平均值 $\pm$ SD。(B):代表STXBP1短和长亚型的蛋白质印迹。(C):(B)中各自蛋白质印迹的组合定量数据。B-肌动蛋白用作上样对照。数据显示为各STXBP1亚型的条带强度与各自B-肌动蛋白条带之间的比。结果显示为平均值 $\pm$ SD。

[0044] 图22:通过蛋白质印迹分析小鼠脑中的突触融合蛋白-1A(STX1A)蛋白水平。对小鼠脑组织样品中的STX1A蛋白表达进行定量(n=11-13/组)。B-肌动蛋白用作上样对照,用于标准化。“WT”组用作按比例调整组。结果显示为平均值 $\pm$ SD。

[0045] 图23:通过qPCR分析小鼠脑中的AAV转导效率(注射后7周)。(A)通过qPCR对注射媒介物-PBS的WT小鼠(WT)、注射媒介物-PBS的HET小鼠(HET)、注射STXBP1长变体的HET小鼠(HET-AAV9(L))和注射STXBP1短变体的HET小鼠(HET-AAV9(S))中的病毒基因组拷贝进行绝对定量。从尾侧皮质(右半球)收集样品并且使用相对于二倍体小鼠基因组的绝对数目标准化的SV40pA定量。结果显示为平均值 $\pm$ SD。每组,分析n=14-15只动物,并且应用非参数单向ANOVA(Kruskal-Wallis检验),接着应用Dunn事后分析多重比较检验。经转导的组之间未观察到显著差异。(B)SV40多聚A和(C)人类特异性STXBP1的mRNA表达分析。通过计算 $2^{-\Delta Ct}$ 值,数据显示为mRNA表达水平,其中表达相对于两种参考基因的平均值标准化。结果显示为平均值 $\pm$ SD。每组,分析n=14-15只动物,并且应用非参数单向ANOVA(Kruskal-Wallis检验),接着应用Dunn事后分析多重比较检验。经转导的组之间未观察到显著差异。

[0046] 图24:通过qPCR分析小鼠脑中AAV处理后的STXBP1变体表达(注射后7周)。使用特异性探测短变体(A)或长变体(B)的总(小鼠和人类)水平的探针进行STXBP1变体mRNA表达的分析。通过计算 $2^{-\Delta Ct}$ 值,数据显示为mRNA表达水平,其中表达相对于两种参考基因的平均值标准化。结果显示为平均值 $\pm$ SD。每组,分析n=14-16只动物。

[0047] 图25:通过蛋白质印迹分析小鼠脑中AAV处理后的STXBP1变体表达(注射后7周)。通过蛋白质印迹对注射媒介物-PBS的WT小鼠(WT)、注射媒介物-PBS的HET小鼠(HET)、注射STXBP1长变体的HET小鼠(HET-AAV9(L))和注射STXBP1短变体的HET小鼠(HET-AAV9(S))中来自右额叶(内侧)皮质的样品进行蛋白质分析。

[0048] (A) 总STXBP1(长变体和短变体)蛋白表达的蛋白质印迹数据的定量。

[0049] (B) 对长STXBP1变体蛋白表达的蛋白质印迹数据的定量。

[0050] (C) 对短STXBP1变体蛋白表达的蛋白质印迹数据的定量。

[0051] (D) 对突触融合蛋白-1A蛋白表达的蛋白质印迹数据的定量

[0052] B-肌动蛋白用作上样对照,用于各STXBP1和STX1A条带强度的标准化。媒介物WT组(WT)用作按比例调整组。结果显示为平均值 $\pm$ SD。使用非参数单向ANOVA(Kruskal-Wallis检验),随后进行Dunn事后分析多重比较检验来分析数据(* $<p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$)。

[0053] 图26:通过免疫组织化学分析小鼠脑中AAV处理后经HA标记的STXBP1表达的脑分布(注射后7周)。对注射经HA标记的STXBP1长变体的HET小鼠的矢状切片进行HA标签染色并且与经媒介物(PBS)处理的小鼠进行比较。显示了AAV处理组(动物6023)和经媒介物处理的组(动物6009)的代表性脑切片的实例。在动物6023(经AAV处理)中的主要脑区域中观察到强HA染色,而在经PBS处理的组(动物6009)中未观察到HA染色。

[0054] 图27:在注射后(6-7周)(A、B)和24周(C、D)通过EEG分析STXBP1 HET小鼠脑中AAV处理后的棘波放电(SWD)。(A)注射媒介物-PBS的WT小鼠(WT, $n=10$)、注射媒介物-PBS的HET小鼠(HET, $n=19$)、注射STXBP1长变体的HET小鼠(HET-AAV9(L), $n=15$)和注射STXBP1短变体的HET小鼠(HET-AAV9(S), $n=16$)中的SWD平均数目。在注射后6-7周在连续7日24小时的时期中分析SWD。(B)对“无癫痫发作”的动物数目(在记录期间未检测到任何SWD)和“有癫痫发作”的动物(在记录期间检测到SWD)的分析。(C)注射媒介物-PBS的WT小鼠(WT, $n=5$)、注射媒介物-PBS的HET小鼠(HET, $n=12$)、注射STXBP1长变体的HET小鼠(HET-AAV9(L), $n=9$)和注射STXBP1短变体的HET小鼠(HET-AAV9(S), $n=11$)中的SWD平均数目。在注射后24周在连续7日24小时的时期中分析SWD。(D)在注射后24周对“无癫痫发作”的动物数目(在记录期间未检测到任何SWD)和“有癫痫发作”的动物(在记录期间检测到SWD)的分析。通过非参数单向ANOVA(Kruskal-Wallis检验),接着Dunn事后分析多重比较检验分析组之间的差异(**** $p<0.0001$), (***) $p<0.001$),并且对于无癫痫发作分析,使用卡方偶发检验(chi-square contingency test)。

[0055] 图28:对STXBP1 HET小鼠中AAV处理后的体重的分析(注射后1-22周)。(A)注射媒介物-PBS的WT($n=17$)和HET小鼠($n=16$)中随年龄而变化的平均体重。通过双向重复量度ANOVA,接着未校正的费舍尔LSD事后分析多重比较检验分析组之间的差异(* $<p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$)。(B)注射媒介物-PBS的WT小鼠(WT, $n=17$)和注射媒介物-PBS的HET小鼠(HET, $n=16$)、注射STXBP1长变体的HET小鼠(HET-AAV9(L), $n=10$)和注射STXBP1短变体的HET小鼠(HET-AAV9(S), $n=13$)中22周龄时测量的平均体重。通过参数单向ANOVA,接着未校正的费舍尔LSD事后分析多重比较检验分析组之间的差异(** $p<0.01$; **** $p<0.0001$; ns, 不显著)。条形图为平均值 $\pm$ SEM。

[0056] 图29:对STXBP1 HET小鼠中AAV处理后的后肢抱拢的分析(注射后4-22周)。(A)注射媒介物-PBS的WT小鼠(WT, $n=17$)和注射媒介物-PBS的HET小鼠(HET, $n=16$)、注射STXBP1长变体的HET小鼠(HET-AAV9(L), $n=10$)和注射STXBP1短变体的HET小鼠(HET-AAV9(S), $n=13$)中随年龄而变的平均后肢抱拢分数。(B)注射媒介物-PBS($n=17$)的WT小鼠和注射媒介物-PBS($n=16$)、AAV9/MECP2-int-STXBP1-L($n=10$)和AAV9/MECP2-int-STXBP1-S($n=13$)的HET小鼠中在22周龄时记录的平均后肢抱拢分数。通过非参数单向ANOVA(Kruskal-Wallis检验),接着未校正的Dunn事后分析多重比较检验分析组之间的差异(* $<p<0.05$; ** $p<0.01$; **** $p<0.0001$; ns, 不显著)。条形图为平均值 $\pm$ SEM。

[0057] 图30: AAV处理后(注射后8周), 丝线悬挂测试中STXBP1 HET小鼠的分析。注射媒介物-PBS的WT小鼠(WT, $n=17$)和注射媒介物-PBS的HET小鼠(HET, $n=16$)、注射STXBP1长变体的HET小鼠(HET-AAV9(L), $n=10$)和注射STXBP1短变体的HET小鼠(HET-AAV9(S), $n=13$)中8周龄时在四肢丝线悬挂测试中测量的掉落潜伏期。通过参数单向ANOVA, 接着未校正的费舍尔LSD事后分析多重比较检验分析组之间的差异($****p<0.0001$; ns, 不显著)。条形图为平均值 $\pm$ SEM。

[0058] 图31: 在恐惧条件测试中对AAV处理后(注射后10周)的STXBP1HET小鼠的分析。(A) 注射媒介物-PBS的WT小鼠(WT, $n=17$)和注射媒介物-PBS的HET小鼠(HET, $n=16$)、注射STXBP1长变体的HET小鼠(HET-AAV9(L), $n=10$)和注射STXBP1短变体的HET小鼠(HET-AAV9(S), $n=13$)中10周龄时在恐惧条件训练期之后24小时进行的情境恐惧记忆测试期间的平均冻结(freezing, 或称为僵直)行为。通过参数单向ANOVA, 接着未校正的费舍尔LSD事后分析多重比较检验分析组之间的差异($* < p.0.05$; $****p<0.0001$)。(B) 在情境恐惧记忆测试之后1小时, 在与(A)中相同的动物中进行的线索恐惧记忆测试期间的平均冻结行为。通过参数单向ANOVA, 接着未校正的费舍尔LSD事后分析多重比较检验分析组之间的差异($*p<0.05$; $***p<0.001$; $****p<0.0001$)。条形图为平均值 $\pm$ SEM。

[0059] 序列的简要说明

[0060] 表1: 序列概述

[0061]

序列识别符	序列名称
SEQ ID NO: 1	CAG 1.6kb 启动子
SEQ ID NO: 2	hSYN 启动子
SEQ ID NO: 3	MECP2 启动子
SEQ ID NO: 4	hNSE 启动子
SEQ ID NO: 5	CamKII 启动子
SEQ ID NO: 6	内源性 hSTXBP1 启动子
SEQ ID NO: 7	编码亚型 a 的人类 STXBP1 cDNA 序列
SEQ ID NO: 8	SV40 多聚 A
SEQ ID NO: 9	人类 STXBP1 亚型 a(603 个氨基酸)
SEQ ID NO: 10	人类 STXBP1 亚型 b(594 个氨基酸)
SEQ ID NO: 11	人类 STXBP1 亚型 c
SEQ ID NO: 12	人类 STXBP1 亚型 d
SEQ ID NO: 13	人类 STXBP1 亚型 e
SEQ ID NO: 14	人类 STXBP1 亚型 f
SEQ ID NO: 15	人类 STXBP1 亚型 g
SEQ ID NO: 16	人类 STXBP1 亚型 h
SEQ ID NO: 17	AAV9.hu14 DNA 序列
SEQ ID NO: 18	3' ITR
SEQ ID NO: 19	5' ITR
SEQ ID NO: 20	AAVtt (氨基酸序列)
SEQ ID NO: 21	AAV9 (氨基酸序列)
SEQ ID NO: 22	编码亚型 a 的人类 STXBP1(转录变体 1)
SEQ ID NO: 23	编码亚型 b 的人类 STXBP1(转录变体 2)

[0062]

SEQ ID NO: 24	编码亚型 c 的人类 STXBP1(转录变体 3)
SEQ ID NO: 25	编码亚型 d 的人类 STXBP1(转录变体 4)
SEQ ID NO: 26	编码亚型 d 的人类 STXBP1(转录变体 5)
SEQ ID NO: 27	编码亚型 e 的人类 STXBP1(转录变体 6)
SEQ ID NO: 28	编码亚型 e 的人类 STXBP1(转录变体 7)
SEQ ID NO: 29	编码亚型 e 的人类 STXBP1(转录变体 8)
SEQ ID NO: 30	编码亚型 e 的人类 STXBP1(转录变体 9)
SEQ ID NO: 31	编码亚型 f 的人类 STXBP1(转录变体 10)
SEQ ID NO: 32	编码亚型 g 的人类 STXBP1(转录变体 11)
SEQ ID NO: 33	编码亚型 h 的人类 STXBP1(转录变体 12)
SEQ ID NO: 34	AAVtt DNA 序列
SEQ ID NO: 35	myc 标签
SEQ ID NO: 36	HA 标签
SEQ ID NO: 37	MECP2 内含子
SEQ ID NO: 38	Munc18-1a (aa 568-603)
SEQ ID NO: 39	Munc18-1b (aa 568-594)
SEQ ID NO: 40	实施例 4 中所用的正向引物。
SEQ ID NO: 41	实施例 4 中所用的反向引物。
SEQ ID NO: 42	实施例 4 中所用的探针 6-Fam/Zen/3'IB FQ。
SEQ ID NO: 43	STXBP1 肽(实施例 9)。
SEQ ID NO: 44	STXBP1 肽(实施例 9)。
SEQ ID NO: 45	STXBP1 肽(实施例 9)。
SEQ ID NO: 46	STXBP1 肽长亚型特异性(实施例 9)。
SEQ ID NO: 47	STXBP1 肽短亚型特异性(实施例 9)。

[0063] 发明详述

[0064] 现将参照特定的非限制性方面和其实施方案并且参考某些附图和实施例描述本发明。

[0065] 除非另外指示,否则技术术语根据其常见含义使用。如果向某些术语传递特定含义,则将在使用所述术语的上下文中给定术语的定义。

[0066] 在涉及单数名词时,使用不定冠词或定冠词,例如“一(a/an)”或“所述(the)”的情况下,除非特别陈述其他某物,否则这包括复数个该名词。

[0067] 如本文所用,术语“包含”不排除其他要素。出于本发明的目的,术语“由……组成”视为术语“包含”的优选实施方案。

[0068] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”和其类似术语是指获得所要的药理学和/或生理学作用。所述作用就完全或部分预防疾病或其症状而言可以是预防性的,和/或就部分或完全治愈疾病和/或由所述疾病引起的不良病状而言可以是治疗性的。因此,治疗涵盖对哺乳动物,尤其人类的疾病的任何治疗,并且包括:(a) 预防疾病症状在可能易患所述疾病但尚未诊断为患有所述疾病的受试者(即人类)中发生;(b) 抑制疾病,即遏制其发展;和(c) 减轻疾病,即引起疾病消退。

[0069] 突触融合蛋白结合蛋白1

[0070] 已鉴别出编码8种蛋白质亚型的人类STXBP1的12种转录变体。氨基酸序列在啮齿动物与人类之间高度保守。在中枢神经系统中,STXBP1在神经元中特异性表达并且跨越主要脑区广泛分布,包括皮质、小脑、海马回和基底神经节(Kalidas等人2000)。已描述两种主要剪接变体,包括短形式和长形式:

[0071] Munc18-1a(aa 568-603):GSTHILTPTKFLMDLRHPDFRESSRVSFEDQAPTME(SEQ ID NO:38)。

[0072] Munc18-1b(aa 568-594):GSTHILTPQKLLDTLKKLNKTDEEISS(SEQ ID NO:39)。

[0073] 较长剪接形式(M18L、Munc18-1a,603个氨基酸)显示最后25个C端氨基酸的差异,并且据报道,其在大鼠脑中的突触水平和GABA能神经元中的主要部分表达(Ramos等人2015)。较小剪接形式(M18S、Munc18-1b,594个氨基酸)定位在不同细胞区室中,并且更普遍存在地在GABA能和谷氨酸能神经元中表达。功能性研究表明STXBP1剪接变体可在突触可塑性中起不同作用(Meijer等人2015)。

[0074] STXBP1基因位于染色体9q34.11(GRCh38基因组坐标:chr9:127,579,370-127,696,029)上并且人类编码的蛋白质与大鼠和鼠类STXBP1具有高水平同一性(Swanson等人1998)。STXBP1基因含有25个外显子。STXBP1初级转录物中最终外显子的选择性剪接可包括或跳过含有终止密码子的110bp序列,产生STXBP1的两个不同C端氨基酸序列。STXBP1-202转录物(ENST00000373302.8)(SEQ ID NO:22)最长,编码603氨基酸蛋白质(SEQ ID NO:9)。STXBP1-201(ENST00000373299.5)(SEQ ID NO:23)编码594氨基酸蛋白质(SEQ ID NO:10)。在中枢神经系统中检测到这两种变体,但其表达模式可在脑组织与细胞类型之间变化(Ramos-Miguel等人2015)。

[0075] 表2中概述了人类STXBP1的12种转录变体和8种蛋白质亚型。

[0076] 表2:STXBP1转录变体和蛋白质亚型

[0077]	人类 STXBP1 亚型	蛋白质序列识别符	转录变体	DNA 序列识别符
	亚型 a	SEQ ID NO:9	编码亚型 a 的转录变体 1	SEQ ID NO:22
	亚型 b	SEQ ID NO:10	编码亚型 b 的转录变体 2	SEQ ID NO:23
	亚型 c	SEQ ID NO:11	编码亚型 c 的转录变体 3	SEQ ID NO:24
	亚型 d	SEQ ID NO:12	编码亚型 d 的转录变体 4	SEQ ID NO:25
			编码亚型 d 的转录变体 5	SEQ ID NO:26
	亚型 e	SEQ ID NO:13	编码亚型 e 的转录变体 6	SEQ ID NO:27
			编码亚型 e 的转录变体 7	SEQ ID NO:28
			编码亚型 e 的转录变体 8	SEQ ID NO:29
			编码亚型 e 的转录变体 9	SEQ ID NO:30
	亚型 f	SEQ ID NO:14	编码亚型 f 的转录变体 10	SEQ ID NO:31
[0078]	亚型 g	SEQ ID NO:15	编码亚型 g 的转录变体 11	SEQ ID NO:32
	亚型 h	SEQ ID NO:16	编码亚型 h 的转录变体 12	SEQ ID NO:33

[0079] 本领域中有时通过表3中所列的替代名称指代突触融合蛋白结合蛋白1或STXBP1。最常见的是“Munc18-1”并且其次为“Sec1”。公认基因名称为STXBP1。

[0080] 表3:突触融合蛋白结合蛋白1替代名称

[0081]	突触融合蛋白结合蛋白1
	突触融合蛋白-结合蛋白1
	MUNC18-1
	蛋白质Unc-18同源物1
	蛋白质Unc-18同源物A
	Unc-18A
	Unc18-1
	N-Sec1
	UNC18
	P67
	神经元SEC1
	RBSEC1
	STXBP1
	HUNC18
	RbSec1
	UNC18A

NSEC1
M18

[0082] 图2中显示人类、猴和小鼠STXBP1序列(人类亚型a根据SEQ ID NO:9)的蛋白质序列比对。比对显示物种间高序列同源性。猴和小鼠氨基酸序列与人类氨基酸序列相同。

[0083] 转基因

[0084] 本发明提供一种核酸构建体,其包含编码以下的转基因:

[0085] i.包含亚型a、b、c、d、e、f、g或h的突触融合蛋白结合蛋白1(STXBP1),所述亚型分别具有SEQ ID NO:9、10、11、12、13、14、15或16中所示的序列;或

[0086] ii.与SEQ ID NO:9、10、11、12、13、14、15或16具有至少95%或96%或97%或98%或99%或99.5%序列同一性并且保留作为STXBP1的功能性的序列;或

[0087] iii.天然存在的变体,其相对于SEQ ID NO:9包含如表7中所示的一个或多个突变。

[0088] 术语“转基因”是指编码用作基因疗法中的活性成分的基因产物的核酸分子(“核酸分子”与“核酸”可互换使用)、DNA或cDNA。基因产物可以是一种或多种肽或蛋白质。

[0089] 在一个实施方案中,转基因编码具有SEQ ID NO:9中所示的序列,或与SEQ ID NO:9具有至少95%或96%或97%或98%或99%或99.5%序列同一性的序列的STXBP1亚型a。

[0090] 在一个实施方案中,转基因编码具有SEQ ID NO:10中所示的序列,或与SEQ ID NO:10具有至少95%或96%或97%或98%或99%或99.5%序列同一性的序列的STXBP1亚型b。

[0091] 在一个实施方案中,转基因编码具有SEQ ID NO:11中所示的序列,或与SEQ ID NO:11具有至少95%或96%或97%或98%或99%或99.5%序列同一性的序列的STXBP1亚型c。

[0092] 在一个实施方案中,转基因编码具有SEQ ID NO:12中所示的序列,或与SEQ ID NO:12具有至少95%或96%或97%或98%或99%或99.5%序列同一性的序列的STXBP1亚型d。

[0093] 在一个实施方案中,转基因编码具有SEQ ID NO:13中所示的序列,或与SEQ ID NO:13具有至少95%或96%或97%或98%或99%或99.5%序列同一性的序列的STXBP1亚型e。

[0094] 在一个实施方案中,转基因编码具有SEQ ID NO:14中所示的序列,或与SEQ ID NO:14具有至少95%或96%或97%或98%或99%或99.5%序列同一性的序列的STXBP1亚型f。

[0095] 在一个实施方案中,转基因编码具有SEQ ID NO:15中所示的序列,或与SEQ ID NO:15具有至少95%或96%或97%或98%或99%或99.5%序列同一性的序列的STXBP1亚型g。

[0096] 在一个实施方案中,转基因编码具有SEQ ID NO:16中所示的序列,或与SEQ ID NO:16具有至少95%或96%或97%或98%或99%或99.5%序列同一性的序列的STXBP1亚型h。

[0097] 在一个实施方案中,转基因编码:

[0098] i.STXBP1转录变体1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12,其分别具有SEQ ID NO:22、

23、24、25、26、27、28、29、30、31、32或33中所示的序列；或

[0099] ii. 与SEQ ID NO:22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32或33具有至少95%或96%或97%或98%或99%或99.5%序列同一性的序列。

[0100] 如本领域中的常规实践,为了与参考基因组序列一致,STXBP1转录变体1至12的mRNA序列以DNA序列形式报告。(National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov)。其目标是更直接进行报告的具有较少错配的基因组比对。为了表达STXBP1亚型a、b或c,例如本领域技术人员将从转录变体1、2或3表达cDNA。

[0101] 在一个实施方案中,转基因编码STXBP1亚型a并且包含SEQ ID NO:7的cDNA序列,或与SEQ ID NO:7具有至少95%或96%或97%或98%或99%或99.5%序列同一性的序列。

[0102] 术语“核酸”和“多核苷酸”或“核苷酸序列”可互换使用,是指由单体核苷酸构成或包含单体核苷酸的任何分子。核酸可以是寡核苷酸或多核苷酸。核苷酸序列可以是DNA或RNA。核苷酸序列可经化学修饰或为人工的。核苷酸序列包括肽核酸(PNA)、吗啉基核酸和锁核酸(LNA)以及乙二醇核酸(GNA)和苏糖核酸(TNA)。这些序列中的每一个与天然存在的DNA或RNA的区别在于分子主链的变化。可使用硫代磷酸酯核苷酸。其他脱氧核苷酸类似物包括甲基磷酸酯、胺基磷酸酯、二硫代磷酸酯、N3'P5'-氨基磷酸酯和寡核糖核苷酸硫代磷酸酯和其2'-O-烯丙基类似物和2'-O-甲基核糖核苷甲基磷酸酯。

[0103] 术语“核酸构建体”是指由使用重组DNA技术产生的非天然存在的核酸。特别地,核酸构建体为已被修饰以含有以自然界中不存在的方式组合或并接的核酸序列区段的核酸分子。

[0104] 在特定实施方案中,所述核酸构建体包含与STXBP1的天然存在或重组的功能变体的编码序列具有至少70%、80%、90%、95%、99%或100%同一性的编码核酸序列的全部或片段。

[0105] 如本文所用,术语“片段”是指参考序列的连续部分。举例而言,具有1000个核苷酸长度的序列的片段可指所述序列的5、50、500个连续核苷酸。

[0106] 如本文所用,术语“病理性变体”是指相对于参考序列经修饰并且与所述参考序列相比功能减弱的核酸或氨基酸序列。表5和6中分别显示STXBP1的病理性变体和可能病理性变体。

[0107] 如本文所用,术语“功能变体”是指相对于参考序列经修饰但保留所述参考序列的功能的核酸或氨基酸序列。表7显示STXBP1的功能变体。

[0108] 术语“序列同一性”或“同一性”是指在两个多核苷酸或多肽序列比对的位置中匹配的数目(相同的核酸或氨基酸残基)。序列同一性通过在对序列进行比对以最大化重叠和同一性同时最小化序列间隙的情况下比较所述序列来确定。具体地,取决于两个序列的长度,可使用多种数学全局或局域比对算法中的任一种来确定序列同一性。类似长度的序列优选使用全局比对算法(例如,Needleman和Wunsch算法;Needleman和Wunsch,1970,J Mol Biol.;48(3):443-53)进行比对,其在整个长度上最佳地比对序列,而基本上不同长度的序列优选使用局域比对算法(例如,Smith和Waterman算法(Smith和Waterman,1981,J Theor Biol.;91(2):379-80)或Altschul算法(Altschul SF等人,1997,Nucleic Acids Res.;25(17):3389-402;Altschul SF等人,2005,Bioinformatics.;21(8):1451-6)进行比对。用于确定核酸或氨基酸序列同一性百分比的目的比对可以本领域技能内的各种方式实现,例如

使用可在诸如<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>或<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/>的网际网络网站上获得的公开可用的电脑软件。本领域技术人员可确定用于测量比对的适当参数,包括在所比较序列的全长内实现最大比对所需的任何算法。出于本文的目的,核酸或氨基酸序列同一性%值是指使用逐对序列比对程序EMBOSS Needle产生的值,所述程序EMBOSS Needle使用Needleman-Wunsch算法来产生两个序列的最佳全局比对,其中所有搜寻参数均设定成预设值,即得分矩阵=BLOSUM62,空位开口=10,空位延伸=0.5,末端空位罚分=假,末端空位开口=10,并且末端空位延伸=0.5。

[0109] 根据本发明的核酸构建体包含转基因和至少适合其在宿主中例如在宿主细胞中表达的核酸组件。

[0110] 例如,所述核酸构建体包含编码STXBP1的转基因和在相关宿主中表达STXBP1所需的一个或多个控制序列。一般而言,核酸构建体包含转基因和在转基因之前(5'非编码序列)和之后(3'非编码序列)为STXBP1表达所需的调节序列。

[0111] 启动子

[0112] 在一个实施方案中,核酸构建体包含编码STXBP1的转基因和可操作地连接至所述转基因的启动子。优选地,转基因在启动子的控制下。

[0113] 术语“启动子”是指引导其可操作地连接的核酸的转录的调节组件。启动子可调节可操作地连接的核酸的转录速率和效率两者。启动子还可以可操作地连接至增强(“增强子”)或阻遏(“阻遏子”)核酸的启动子依赖性转录的其他调节组件。这些调节组件包括但不限于转录因子结合位点、阻遏子和活化子蛋白结合位点,和本领域技术人员已知的直接或间接起作用以调节从启动子的转录量的任何其他核苷酸序列,包括例如衰减子、增强子和沉默子。启动子位于可操作地连接的基因或编码序列的转录起始位点附近,位于相同链上并且位于DNA序列上游(朝向有义链的5'区)。启动子可以是约100-1000个碱基对长。启动子中的位置相对于特定基因的转录起始位点指定(即,上游位置为从-1计数返回的负数值,例如,-100为上游100个碱基对的位置)。

[0114] 术语“在5'至3'方向上可操作地连接”或简称“可操作地连接”是指两个或更多个核苷酸序列以允许所述两个或更多个序列中的每一个执行其正常功能的功能关系连接。通常,术语可操作地连接用于指例如启动子的调节组件和编码感兴趣的蛋白质的转基因的并接。举例而言,启动子与转基因之间的可操作连接允许启动子起作用于驱动转基因在适合表达系统中(例如在细胞中)的5'表达。

[0115] 启动子可以是组织或细胞类型特异性启动子,或器官特异性启动子,或对多个器官具有特异性的启动子,或全身性或普遍存在的启动子。

[0116] 术语“普遍存在的启动子”更具体地是指在各种不同细胞或组织中,例如在神经元和星形细胞两者中具有活性的启动子。

[0117] 适合于在中枢神经系统中表达转基因的启动子的实例包括鸡 β 肌动蛋白(CBA)启动子(Miyazaki 1989, Gene 79:269-277)、CAG启动子(Niwa 1991, Gene 108:193-199)、延伸因子1 α 启动子(EF1 α)(Nakai 1998, Blood 91:4600-4607)、人类突触蛋白1基因启动子(hSyn)(Kugler S.等人 Gene Ther. 2003.10(4):337-47)或磷酸甘油酸激酶1启动子(PGK1)(Hannan 1993, Gene 130:233-239)、甲基CPG结合蛋白2(MECP2)启动子(Adachi等人, Hum. Mol. Genetics. 2005;14(23):3709-3722)、人类神经元特异性烯醇酶(NSE)启动子

(Twyman, R.M. 和 E.A. Jones (1997) . J Mol Neurosci 8(1):63-73)、钙/调钙蛋白依赖性蛋白质激酶II (CAMKII) 启动子 (Nathanson, J.L. 等人, (2009) . Neuroscience 161(2):441-450) 和人类泛素C (UBC) 启动子 (Schorpp, M. 等人, (1996) . Nucleic Acids Res 24(9):1787-1788)。

[0118] 在一个实施方案中,启动子为SEQ ID NO:1的CAG 1.6kb启动子。

[0119] 在一个实施方案中,启动子为SEQ ID NO:2的hSYN启动子。

[0120] 在一个实施方案中,启动子为SEQ ID NO:3的MECP2启动子。

[0121] 在一个实施方案中,启动子为SEQ ID NO:4的hNSE启动子。

[0122] 在一个实施方案中,启动子为SEQ ID NO:5的CamKII启动子。

[0123] 在一个实施方案中,启动子为SEQ ID NO:6的内源性hSTXBP1启动子。

[0124] 在一个实施方案中,启动子为SEQ ID NO:3的MECP2启动子,其在5'至3'方向上可操作地连接至SEQ ID NO:37的MECP2内含子。

[0125] 在替代实施方案中,核酸构建体包含编码STXBP1的转基因和可操作地连接至所述转基因的启动子,其中所述启动子与以下至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同:

[0126] (a) CAG 1.6kb启动子 (SEQ ID NO:1)。

[0127] (b) hSYN启动子 (SEQ ID NO:2)。

[0128] (c) MECP2启动子 (SEQ ID NO:3)。

[0129] (d) hNSE启动子 (SEQ ID NO:4)。

[0130] (e) CamKII启动子 (SEQ ID NO:5)。

[0131] (f) 内源性hSTXBP1启动子 (SEQ ID NO:6)。

[0132] (g) MECP2启动子 (SEQ ID NO:3),其在5'至3'方向上可操作地连接至MECP2内含子 (SEQ ID NO:37)。

[0133] 启动子可以是本文所述的启动子的功能变体或片段。启动子的功能变体或片段可在其保留对应非变体或全长启动子的特征的意义具有功能性。因此,启动子的功能变体或片段保留驱动其可操作地连接的转基因转录的能力,由此驱动由所述转基因编码的STXBP1表达。启动子的功能变体或片段可保留对特定组织类型的特异性。举例而言,启动子的功能变体或片段可对CNS细胞具有特异性。启动子的功能变体或片段可特异性地驱动神经元中STXBP1的表达。

[0134] 启动子可包含“最小序列”,其意指启动子的核苷酸序列具有足够长度并且含有充当启动子所需的组件,即能够驱动所述启动子可操作地连接的转基因的转录,由此驱动STXBP1的表达。

[0135] 本发明的核酸构建体中所用的最小启动子可以是例如包含SEQ ID NO:1的CAG启动子,或包含SEQ ID NO:2的hSYN启动子,或包含SEQ ID NO:3的MECP2启动子。

[0136] 启动子可包含一个或多个内含子。术语“内含子”是指基因内非编码核苷酸序列。通常,内含子在基因转录期间从DNA转录成信使RNA (mRNA),但在基因翻译之前通过剪接从mRNA转录物中切除。

[0137] 启动子可包含本文所述的内含子的功能变体或片段。内含子的功能变体或片段可在其保留对应非变体或全长内含子的特征的意义具有功能性。因此,本文所述的内含子

的功能变体或片段为非编码的。本文所述的内含子的功能变体或片段还可保留从DNA转录为mRNA的能力和/或通过剪接从mRNA切除的能力。

[0138] 可并入本发明中使用的启动子中的内含子可来自天然非编码区或可经工程改造。

[0139] 在一个实施方案中,内含子为MECP2内含子,其包含SEQ ID NO:37或与SEQ ID NO:37具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一性的其功能变体或片段或由其组成。

[0140] 启动子和/或内含子可与一个或多个非表达型外显子序列组合。非表达型外显子序列不能产生转录物,而是其可侧接内含子序列以提供剪接位点。

[0141] 或者,启动子可以是化学诱导型启动子。化学诱导型启动子为通过向有需要的受试者体内施用化学诱导剂而调节的启动子。适合化学诱导型启动子的实例包括但不限于四环素/米诺环素诱导型启动子(Chtarto 2003,Neurosci Lett.352:155-158)或雷帕霉素诱导型系统(Sanftner 2006,Mol Ther.13:167-174)。

[0142] 多腺苷酸化信号序列

[0143] 核酸构建体可包含3'非翻译区,其包含多腺苷酸化信号序列和/或转录终止子。

[0144] 术语“多腺苷酸化信号序列”(或“多腺苷酸化位点”或“多聚(A)信号”,均可互换使用)是指基因的3'非翻译区(3'UTR)内的特异性识别序列,其转录为前驱mRNA并且引导基因转录终止。多腺苷酸化信号序列充当新形成的前驱mRNA在其3'端的核酸内切酶裂解信号,并且用于添加至仅由腺嘌呤碱基组成的RNA延伸物的此3'端(多腺苷酸化过程;多聚(A)尾)。多腺苷酸化信号序列对于mRNA的核输出、翻译和稳定性是重要的。在本发明的上下文中,多腺苷酸化信号序列为可在哺乳动物细胞中指引哺乳动物基因和/或病毒基因多腺苷酸化的识别序列。

[0145] 多腺苷酸化信号序列通常由以下组成:(a)共有序列AAUAAA,其已显示为前信使RNA(前mRNA)的3'端裂解和多腺苷酸化所需以及促进下游转录终止;和(b)在AAUAAA上游和下游的控制AAUAAA作为多聚(A)信号的利用效率的额外组件。哺乳动物基因中这些基序存在相当大的变化性。

[0146] 在一个实施方案中,任选与本文所述的各种实施方案的一个或多个特征组合,本发明的核酸构建体的多腺苷酸化信号序列为哺乳动物基因或病毒基因的多腺苷酸化信号序列。适合的多腺苷酸化信号尤其包括SV40早期多腺苷酸化信号、SV40晚期多腺苷酸化信号、HSV胸苷激酶多腺苷酸化信号、鱼精蛋白基因多腺苷酸化信号、腺病毒5E1b多腺苷酸化信号、生长激素多腺苷酸化信号、PBGD多腺苷酸化信号或电脑模拟设计的合成多腺苷酸化信号。

[0147] 在一个实施方案中,多腺苷酸化信号序列为包含SEQ ID NO:8的SV40多腺苷酸化信号序列。

[0148] 其他调节组件

[0149] 核酸构建体可包含额外调节组件,例如增强子序列、内含子、微RNA靶向序列、促进DNA片段插入载体内的多接头序列和/或剪接信号序列。

[0150] 病毒载体

[0151] 本发明进一步提供一种病毒载体,其包含如本文所述的核酸构建体。

[0152] 术语“病毒载体”是指如本文所公开的病毒颗粒的核酸部分,其可包装在衣壳中。

[0153] 病毒载体通常至少包含(i)核酸构建体,其包括转基因和适用于其在宿主中表达的核酸组件;和(ii)病毒基因组的全部或一部分,例如病毒基因组的反向末端重复序列。

[0154] 术语“反向末端重复序列”(ITR)是指位于病毒5'-端的核苷酸序列(5' ITR)和位于病毒3'端(3' ITR)的核苷酸序列,其含有回文序列并且可折叠过去形成在DNA复制起始期间充当引物的T形发夹结构。其还是病毒基因组整合至宿主基因组中、从宿主基因组挽救以及将病毒核酸衣壳化为成熟病毒体所需的。呈顺式的ITR是载体基因组复制和将其包装至病毒颗粒中所需的。

[0155] 在一个实施方案中,病毒载体包含病毒的5' ITR和3' ITR。

[0156] 在一个实施方案中,病毒载体包含独立地选自微小病毒(特别是腺相关病毒)、腺病毒、 α 病毒、反转录病毒(特别是 γ 反转录病毒和慢病毒)、疱疹病毒和SV40的病毒的5' ITR和3' ITR。

[0157] 在一个实施方案中,病毒为腺相关病毒(AAV)、腺病毒(Ad)或慢病毒。

[0158] 在一个实施方案中,病毒为AAV。

[0159] 在一个实施方案中,病毒载体包含AAV的5' ITR和3' ITR。

[0160] AAV作为一种潜在的人类基因疗法载体引起人们极大关注。病毒的有利特性是其与任何人类疾病的关联的缺乏,其能够感染分裂和非分裂细胞,并且可感染来源于不同组织的广泛细胞系。AAV基因组由含有4681个碱基的线性单链DNA分子构成(Berns和Bohenzky,1987,Advances in Virus Research(Academic Press,Inc.)32:243-307)。基因组包括每个末端处的反向末端重复序列(ITR),其呈顺式充当DNA复制起点并且充当病毒的包装信号。ITR的长度通常为约100-150bp。

[0161] AAV ITR可具有野生型核苷酸序列或可通过一个或多个核苷酸的插入、缺失或取代而改变,其与已知AAV ITR相比通常具有不超过5、4、3、2或1个核苷酸插入、缺失或取代。AAV载体的反向末端重复序列(ITR)的血清型可选自任何已知的人类或非人类AAV血清型。

[0162] 在特定实施方案中,病毒载体可包含任何AAV血清型的ITR。已知的AAV ITR包括但不限于AAV1、AAV2、AAV3(包括类型3A和3B)、AAV-LK03、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10(AAVrh10)、AAV11、AAV12、禽类AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、羊AAV。还包括从灵长类动物脑鉴别的重组血清型,例如Rec2和Rec3。

[0163] 或者,病毒载体可包含合成5' ITR和/或3' ITR。

[0164] 在一个实施方案中,本发明的核酸构建体包含在病毒载体中,所述病毒载体进一步包含血清型AAV2的AAV的5' ITR和/或3' ITR。

[0165] 在一个实施方案中,病毒载体包含血清型AAV2的AAV的5' ITR和/或3' ITR,其分别具有SEQ ID NO:18和/或19中所示的序列;或分别与SEQ ID NO:18和/或19具有至少80%或至少90%同一性的序列。

[0166] 病毒颗粒

[0167] 本发明进一步提供一种病毒颗粒,其包含如本文所述的核酸构建体或病毒载体。

[0168] 术语“病毒颗粒”是指一种感染性并且通常复制缺陷的病毒颗粒,其包含(i)包装在内的病毒载体(任选包含核酸构建体)和(ii)衣壳。

[0169] 在一个实施方案中,衣壳由腺相关病毒的衣壳蛋白形成。

[0170] 腺相关病毒的病毒衣壳的蛋白质包括衣壳蛋白VP1、VP2和VP3。各种AAV血清型的

衣壳蛋白序列之间的差异导致使用不同细胞表面受体用于细胞进入。与替代性细胞内加工途径组合,这产生每种AAV血清型的不同组织向性。

[0171] 靶向CNS的基于AAV的基因疗法综述于Pignataro D,Sucunza D,Rico AJ等人,J Neural Transm 2018;125:575-589中。可选择和/或工程改造病毒颗粒以至少靶向脑和CNS的各个区域中的神经元细胞。

[0172] AAV病毒通常根据其血清型来提及。血清型对应于AAV的变异亚种,其由于衣壳表面抗原的表达概况而具有独特反应性,这可用于将其与其他变异亚种区分开来。AAV血清型包括AAV1、AAV2、AAV3 (包括A和B) AAV-LK03、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10 (AAVrh10) 或AAV11或其组合。AAV可以是重组血清型,例如从灵长类动物脑鉴别的Rec2和Rec3;和AAV2-真型 (AAVtt)。AAVtt详细描述于Tordo等人,Brain.2018;141 (7) :2014-2031和WO 2015/121501。AAV血清型的综述可见于Choi等人 (Curr Gene Ther.2005;5 (3) ;299-310) 和Wu等人 (Molecular Therapy.2006;14 (3) ,316-327) 。

[0173] 在本发明的病毒颗粒中,衣壳可来源于任何AAV血清型或血清型的组合 (例如来自一个AAV血清型的VP1和来自不同血清型的VP2和/或VP3) 。

[0174] 在特定实施方案中,衣壳蛋白可来源于AAV2、AAV5、AAV8、AAV9、AAV2-retro或AAVtt。

[0175] 在一个实施方案中,病毒颗粒至少包含来自AAV的VP1衣壳蛋白,其中所述衣壳蛋白来源于AAV2、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9 (例如如SEQ ID NO:21中所示的AAV9.hu14)、AAV10、AAV-真型 (如SEQ ID NO:20中所示的AAVtt) 或其组合。

[0176] 在一个实施方案中,病毒颗粒包含如SEQ ID NO:20中所示的来自AAVtt的衣壳蛋白。在一个实施方案中,衣壳蛋白与SEQ ID NO:20至少98.5%、99%或99.5%相同。

[0177] 在一个实施方案中,病毒颗粒包括来自AAV9的如SEQ ID NO:21中所示的衣壳蛋白。在一个实施方案中,衣壳蛋白与SEQ ID NO:21至少98.5%、99%或99.5%相同。

[0178] 用于本发明的包括ITR序列、rep或cap基因的AAV基因组或AAV基因组组件可来源于AAV全基因组序列的以下登录号:腺相关病毒1NC_002077、AF063497;腺相关病毒2NC_001401;腺相关病毒3NC_001729;腺相关病毒3B NC_001863;腺相关病毒4NC_001829;腺相关病毒5Y18065、5AF085716;腺相关病毒6NC_001862;禽类AAV ATCC VR-865AY186198、AY629583、NC_004828;禽类AAV株DA-1NC_006263、AY629583;牛AAV NC_005889、AY388617。

[0179] AAV病毒还可根据进化枝或克隆来提及。这是指天然来源的AAV病毒的系统发育关系,并且通常是指可追溯至共同祖先并且包括其所有后代的AAV病毒的系统发育群。另外,AAV病毒可根据特定分离株,即自然界中发现的特定AAV病毒的基因分离株来提及。

[0180] 术语“基因分离株”描述与其他天然存在的AAV病毒进行有限基因混合,由此在基因水平上定义可识别的独特群体的AAV病毒群体。可用于本发明的AAV进化枝和分离株的实例包括:

[0181] ●进化枝A:AAV1 NC_002077、AF063497、AAV6 NC_001862、Hu.48AY530611、Hu43AY530606、Hu 44AY530607、Hu 46AY530609;

[0182] ●进化枝B:Hu.19AY530584、Hu.20AY530586、Hu 23AY530589、Hu22 AY530588、Hu24 AY530590、Hu21 AY530587、Hu27 AY530592、Hu28 AY530593、Hu 29AY530594、Hu63 AYS30624、Hu64 AY530625、Hu13 AY530578、Hu56 AY530618、Hu57 AY530619、Hu49

AY530612、Hu58 25AY530620、Hu34 AY530598、Hu35 AY530599、AAV2NC_001401、Hu45 AY530608、Hu47 AY530610、Hu51 AY530613、Hu52 AY530614、Hu T41 AY695378、Hu S17 AY695376、Hu T88AY695375、Hu T71 AY695374、HuT70 AY695373、Hu T40 AY695372、Hu T32 AY695371、Hu T17 AY695370、Hu LG15 AY695377;

[0183] ●进化枝C:Hu9 AY530629、Hu10 AY530576、Hu11 AY530577、Hu53 AY530615、Hu55 AY530617、Hu54 AY530616、Hu7 AY530628、Hu18 AY530583、Hu15 AY530580、Hu16 AY530581、Hu25 AY530591、Hu60 AY530622、Ch5 AY243021、Hu3 AY530595、Hu1 AY530575、Hu4 AY530602Hu2、AY530585、Hu61 AY530623;

[0184] ●进化枝D:Rh62 AY530573、Rh48 AY530561、Rh54 AY530567、Rh55 AY530568、C5 y2 AY243020、AAV7 AF513851、Rh35 AY243000、Rh37 AY242998、Rh36 AY242999、Cy6 AY243016、Cy4 AY243018、Cy3 AY243019、Cy5 AY243017、Rh13 AY243013;

[0185] ●进化枝E:Rh38 AY530558、Hu66 AY530626、Hu42 AY530605、Hu67 AY530627、Hu40 AY530603、Hu41 AY530604、Hu37 AY530600、Rh40 10AY530559、Rh2 AY243007、Bb1 AY243023、Bb2 AY243022、Rh10 AY243015、Hu17 AY530582、Hub AY530621、Rh25 AY530557、Pi2 AY530554、Pi1 AY530553、Pi3 AY530555、Rh57 AY530569、Rh50AY530563、Rh49 AY530562、Hu39 AY530601、Rh58 AY530570、Rhbl AY530572、Rh52AY530565、Rh53 AY530566、Rh51 AY530564、Rh64AY530574、Rh43 15AY530560、AAV8 AF513852、Rh8 AY242997、Rh1 AY530556;和

[0186] ●进化枝F:Hu 14 (AAV9) AY530579、Hu31 AY530596、Hu32AY530597;克隆分离株 AAV5 Y18065、AF085716、AAV 3NC_001729、AAV 3B NC_001863、AAV4 15NC_001829、Rh34 AY243001、Rh33AY243002、Rh32 AY243003。

[0187] 本发明涵盖在相同载体内来自不同AAV血清型、进化枝、克隆或分离株的衣壳蛋白序列的用途。本发明还涵盖将一种血清型的基因组包装至另一血清型的衣壳中,即假型化。嵌合、改组或衣壳修饰的衍生物可经选择以提供一个或多个所需功能。因此,与包含天然存在的AAV衣壳的AAV病毒载体相比,这些衍生物可显示增加的基因递送效率、降低的免疫原性(体液或细胞)、改变的向性范围和/或改良的特定细胞类型靶向。增加的基因递送效率可通过细胞表面处改善的受体或共受体结合、改善的内化、细胞内和至细胞核中改善的迁移、改善的病毒颗粒的脱壳或改善的单链基因组至双链形式的转变来实现。增加的效率还可与改变的向性范围或特定细胞群体的靶向相关,使得载体剂量不因递送至不需要其的组织而稀释。

[0188] 嵌合衣壳蛋白包括通过天然存在的AAV血清型的两个或更多个衣壳编码序列之间的重组产生的那些嵌合衣壳蛋白。这可例如通过标记物挽救方法执行,其中一种血清型的非感染性衣壳序列与不同血清型的衣壳序列共转染,并且使用定向选择来选择具有所需特性的衣壳序列。不同血清型的衣壳序列可通过细胞内的同源重组来改变,以产生新的嵌合衣壳蛋白。

[0189] 嵌合衣壳蛋白还包括通过工程改造衣壳蛋白序列以在两种或更多种衣壳蛋白之间,例如在不同血清型的两种或更多种衣壳蛋白之间转移特定衣壳蛋白结构域、表面环或特定氨基酸残基所产生的那些嵌合衣壳蛋白。改组或嵌合衣壳蛋白可通过DNA改组或通过易错PCR产生。可通过以下方式产生混合型AAV衣壳基因:将相关AAV基因的序列,例如编码

多种不同血清型的衣壳蛋白的那些序列随机分割并且随后在自引发聚合酶反应中重组所述片段,其还可在序列同源性区域中引起交叉互换。可筛选以此方式通过改组几种血清型的衣壳基因而产生的混合型AAV基因文库以鉴别具有所需功能性的病毒克隆。类似地,易错PCR可用于随机突变AAV衣壳基因以产生不同变体文库,所述变体随后可根据所需特性选择。

[0190] 衣壳基因的序列可经基因修饰以相对于天然野生型序列引入特定缺失、取代或插入。例如,衣壳基因可通过将不相关蛋白质或肽的序列插入衣壳编码序列的开放阅读框架内或衣壳编码序列的N端和/或C端处来进行修饰。不相关蛋白质或肽可有利地为充当特定细胞类型的配体的蛋白质或肽,由此赋予改良的与目标细胞的结合或改善病毒颗粒靶向特定细胞群体的特异性。不相关蛋白质还可以是作为生产过程的一部分帮助纯化病毒颗粒的蛋白质,即表位或亲和标签。插入位点将通常经选择以避免干扰病毒颗粒的其他功能,例如病毒颗粒的内化或迁移。适合的插入位点公开于Choi等人(Curr Gene Ther.2005;5(3);299-310)。

[0191] 在一个实施方案中,病毒颗粒可通过将来源于特定AAV血清型的AAV病毒载体包封在由与相同血清型的AAV对应的天然Cap蛋白形成的病毒颗粒中来制备。

[0192] 然而,已研发出几种技术来调节和改善天然存在的病毒颗粒的结构和功能特性(Bünning H等人J Gene Med 2008;10:717-733)。

[0193] 因此,在另一实施方案中,病毒颗粒可包括核酸构建体,其包含编码STXBP1的转基因,由给定AAV血清型的ITR侧接,被包装至以下中:

[0194] (a) 病毒颗粒,其包含来源于不同AAV血清型的衣壳蛋白,例如AAV2 ITR和AAV9衣壳蛋白;或AAV2 ITR和AAVtt衣壳蛋白;或

[0195] (b) 嵌合病毒颗粒,其包含来自不同AAV血清型或突变体的衣壳蛋白的混合物,例如AAV2 ITR与由两种或更多种AAV血清型的蛋白质形成的衣壳;或

[0196] (c) 包含衣壳蛋白的嵌合病毒颗粒,所述衣壳蛋白已通过在不同AAV血清型或变体之间进行结构域交换而截短,例如AAV2 ITR与包含AAV3结构域的AAV5衣壳蛋白;或

[0197] (d) 病毒颗粒,其经工程改造以显示选择性结合结构域,使得能够与目标细胞特异性受体进行严格相互作用。

[0198] 还命名为AAV2-真型衣壳的AAVtt衣壳描述于W02015/121501中。在一个实施方案中,AAVtt VP1衣壳蛋白相对于野生型VP1衣壳蛋白在与AAV2蛋白序列(NCBI参考序列:YP_680426.1)中以下位置中的一个或多个相对应的位置处包含至少一个氨基酸取代:125、151、162、205、312、457、492、499、533、546、548、585、588和/或593。

[0199] 在一个实施方案中,AAVtt相对于野生型AAV2 VP1衣壳蛋白(NCBI参考序列:YP_680426.1)包含以下氨基酸取代中的一个或多个:V125I、V151A、A162S、T205S、N312S、Q457M、S492A、E499D、F533Y、G546D、E548G、R585S、R588T和/或A593S。

[0200] 在一个实施方案中,AAVtt相对于野生型AAV2 VP1衣壳蛋白在位置457、492、499和533处包含四个或更多个突变。

[0201] 重组AAV病毒颗粒的构建通常为本领域中已知的并且已描述于例如US 5,173,414;US 5,139,941;WO 92/01070;WO 93/03769;Lebkowski等人(1988)Molec.Cell.Biol.8:3988-3996;Vincent等人(1990)Vaccines 90(Cold Spring Harbor

Laboratory Press);Carter,B.J.(1992)Current Opinion in Biotechnology 3:533-539;Muzyczka,N.(1992)Current Topics in Microbiol.and Immunol.158:97-129;和Kotin,R.M.(1994)Human Gene Therapy 5:793-801。

[0202] 病毒颗粒的产生

[0203] 携带如本文所述的病毒载体和核酸构建体的病毒颗粒的产生可借助于常规方法和方案进行,所述方法和方案通过考虑待产生的病毒颗粒的结构特征来选择。

[0204] 简言之,病毒颗粒可在宿主细胞中,更具体地在特定的产生病毒的细胞(包装细胞)中产生,所述细胞在辅助载体或病毒或其他DNA构建体的存在下用核酸构建体或病毒载体转染。

[0205] 术语“包装细胞”是指可用核酸构建体或病毒载体转染并且以反式提供病毒载体的完整复制和包装所需的所有缺失功能的细胞或细胞系。包装细胞可以以组成性或诱导性方式表达此类缺失病毒功能。包装细胞可以是粘附或悬浮细胞。

[0206] 典型地,产生病毒颗粒的方法包含以下步骤:

[0207] (a) 在培养基中培养包含核酸构建体或病毒载体的包装细胞;和

[0208] (b) 从细胞培养物上清液和/或在细胞内部收获所述病毒颗粒。

[0209] 常规方法可用于产生病毒颗粒,其涉及用携带编码STXBP1的转基因的核酸构建体或表达载体(例如质粒)对细胞短暂共转染;编码rep和cap基因但不携带ITR序列的第二核酸构建体(例如AAV辅助质粒);和提供AAV复制所需的腺病毒功能的第三核酸构建体(例如质粒)。

[0210] AAV复制所需的病毒基因被称为病毒辅助基因。通常,AAV复制所需的所述基因为腺病毒辅助基因,例如E1A、E1B、E2a、E4或VA RNA。在一个实施方案中,腺病毒辅助基因为Ad5或Ad2血清型。

[0211] 或者通过用重组杆状病毒的组合感染昆虫细胞产生AAV颗粒(Urabe等人Hum.Gene Ther.2002;13:1935-1943)。SF9细胞用分别表达AAV rep、AAV cap和待包装的AAV载体的两种或三种杆状病毒载体共感染。重组杆状病毒载体将提供病毒复制和/或包装所需的病毒辅助基因功能。Smith等人2009(Molecular Therapy,第17卷,第11期,第1888-1896页)描述用于昆虫细胞中AAV颗粒的大规模产生的双重杆状病毒表达系统。

[0212] 适合的培养基为本领域技术人员所已知的。构成此类培养基的成分可取决于待培养细胞的类型而变化。除营养组成以外,摩尔渗透压浓度和pH值被视为培养基的重要参数。细胞生长培养基包含本领域技术人员熟知的多种成分,包括氨基酸、维生素、有机和无机盐、碳水化合物来源、脂质、微量元素(仅举几例,CuSO₄、FeSO₄、Fe(NO₃)₃、ZnSO₄),各成分以支持体外培养细胞(即细胞存活和生长)的量存在。成分还可包括辅助物质,例如缓冲物质(例如碳酸氢钠、Hepes、Tris或类似效能的缓冲液)、氧化稳定剂、抵消机械应力的稳定剂、蛋白酶抑制剂、动物生长因子、植物水解产物、抗结块剂、消泡剂。细胞生长培养基的特征和组成取决于特定细胞需求而变化。市售细胞生长培养基的实例包括:MEM(最小必需培养基)、BME(基础Eagle培养基)、DMEM(Dulbecco改良Eagle培养基)、Iscove DMEM(Iscove改良Dulbecco培养基)、GMEM、RPMI 1640、Leibovitz L-15、McCoy's、培养基199、Ham(Ham培养基)F10和衍生物、Ham F12、DMEM/F12。

[0213] 用于构建和产生根据本发明使用的病毒载体的进一步指导可见于Viral Vectors

for Gene Therapy, Methods and Protocols. Series: Methods in Molecular Biology, 第737卷. Merten和Al-Rubeai (编辑); 2011 Humana Press (Springer); Gene Therapy. M. Giacca. 2010 Springer-Verlag; Heilbronn R. 和 Weger S. Viral Vectors for Gene Transfer: Current Status of Gene Therapeutics. Drug Delivery, Handbook of Experimental Pharmacology 197; M. **Schäfer**-Korting (编辑). 2010 Springer-Verlag; 第143-170页; Adeno-Associated Virus: Methods and Protocols. R. O. Snyder和P. Moullier (编辑). 2011 Humana Press (Springer); Bünning H. 等人 Recent developments in adeno-associated virus technology. J. Gene Med. 2008; 10: 717-733; Adenovirus: Methods and Protocols. M. Chillón和A. Bosch (编辑); 第三版 2014 Humana Press (Springer)。

[0214] 宿主细胞

[0215] 本发明进一步提供一种宿主细胞, 其包含如本文所述的编码STXBP1的核酸构建体或病毒载体。根据本发明的宿主细胞是产生病毒的细胞, 还命名为包装细胞, 其在辅助载体或病毒或其他DNA构建体的存在下用核酸构建体或病毒载体转染; 并且以反式提供病毒颗粒的完整复制和包装所需的所有缺失功能。所述包装细胞可以是粘附或悬浮细胞。

[0216] 包装细胞可以是真核细胞, 例如哺乳动物细胞, 包括猿猴、人类、犬和啮齿类动物细胞。人类细胞的实例为PER.C6细胞 (W001/38362)、MRC-5 (ATCC CCL-171)、WI-38 (ATCC CCL-75)、HEK-293细胞 (ATCC CRL-1573)、HeLa细胞 (ATCC CCL2) 和胎恒河猴肺细胞 (ATCC CL-160)。非人类灵长类细胞的实施例为Vero细胞 (ATCC CCL81)、COS-1细胞 (ATCC CRL-1650) 或COS-7细胞 (ATCC CRL-1651)。犬细胞的实例为MDCK细胞 (ATCC CCL-34)。啮齿类动物细胞的实例为仓鼠细胞, 例如BHK21-F、HKCC细胞或CHO细胞。

[0217] 作为哺乳动物来源的替代方案, 用于产生病毒颗粒的包装细胞可来源于禽类来源, 例如鸡、鸭、鹅、鹌鹑或野鸡。禽类细胞系的实例包括禽类胚胎干细胞 (W001/85938; W003/076601)、永生化鸭视网膜细胞 (W02005/042728) 和禽类胚胎干细胞源性细胞, 包括鸡细胞 (W02006/108846) 或鸭细胞, 例如EB66细胞系 (W02008/129058; W02008/142124)。

[0218] 在另一实施方案中, 宿主细胞可以是任何容许杆状病毒感染和复制的包装细胞。在一个实施方案中, 所述细胞为昆虫细胞, 例如SF9细胞 (ATCC CRL-1711)、Sf21细胞 (IPLB-Sf21)、MG1细胞 (BTI-TN-MG1) 或High Five™细胞 (BTI-TN-5B1-4)。

[0219] 在一个实施方案中, 宿主细胞包含:

[0220] (a) 包含编码人类STXBP1的转基因的第一核酸构建体或病毒载体;

[0221] (b) 编码AAV rep和/或cap基因的第二核酸构建体, 例如质粒, 其中所述第二核酸构建体不携带ITR序列; 和任选地,

[0222] (c) 包含病毒辅助基因的第三核酸构建体, 例如质粒或病毒。

[0223] 本发明进一步提供经本发明的病毒颗粒转导的宿主细胞, 并且如本文所用的术语“宿主细胞”是指易被感兴趣的病毒感染并且能够体外培养的任何细胞系。

[0224] 药物组合物

[0225] 本发明进一步提供一种药物组合物, 其包含本发明的核酸构建体、病毒载体、病毒颗粒以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载剂。

[0226] 术语“药学上可接受”意指被监管机制或公认药典 (例如欧洲药典) 批准用于动物

和/或人类。术语“赋形剂”是指与治疗剂一起施用的稀释剂、佐剂、载剂或媒介物。

[0227] 任何适合的药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂可用于制备药物组合物(参见例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Alfonso R.Gennaro(Editor) Mack Publishing Company,1997年4月)。药物组合物在制造和储存条件下通常无菌并且稳定。药物组合物可配制为溶液(例如,盐水、右旋糖溶液或缓冲溶液或其他药学上可接受的无菌流体)、微乳液、脂质粒或适合于容纳高产品浓度的其他有序结构(例如,微粒或纳米粒子)。载剂可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,丙三醇、丙二醇和液体聚乙二醇和其类似物)和其适合混合物的溶剂或分散介质。举例而言,可通过使用包衣(例如卵磷脂)、在分散液情况下通过维持所需粒径和通过使用表面活性剂来维持适当流动性。在许多情况下,组合物中优选包括等张剂,例如糖、多元醇(例如甘露糖醇或山梨糖醇)或盐,例如氯化钠。

[0228] 在一个实施方案中,药物组合物配制为溶液,例如缓冲盐水溶液。

[0229] 还可将补充活性化合物并入本发明的药物组合物中。可在Compendium of Pharmaceutical and Specialties(CPS)of the Canadian Pharmacists Association中找到关于共同施用额外治疗剂的指南。

[0230] 在一个实施方案中,药物组合物为适合于实质内、脑内、静脉内或鞘内施用的组合物。这些药物组合物仅为示例性的并且不限适用于其他肠胃外和非肠胃外施用途径的药物组合物。本文所述的药物组合物可以以单一单位剂量或以多剂量形式包装。

[0231] 医疗用途

[0232] 本发明的药物组合物、核酸构建体、病毒载体和病毒颗粒可用于治疗或预防与STXBP1功能活性损失相关的任何病况;例如与STXBP1突变相关的任何病况。

[0233] 此类病况包括德拉韦综合征、Lennox-Gastaut综合征、婴儿痉挛、肌痉挛癫痫症、癫痫性脑病、早期肌痉挛脑病、非综合征候癫痫症、大田原综合征、早发性癫痫性脑病、韦斯特综合征、发育延迟、自闭症谱系障碍、共济失调-震颤-阻滞综合征、雷特氏综合征和无癫痫症的智能障碍。

[0234] 本发明的药物组合物、核酸构建体、病毒载体和病毒颗粒特别是适用于治疗或预防与STXBP1基因中的基因突变(例如促成例如大田原、德拉韦和韦斯特综合征的综合征的发展的突变)相关的神经发育和/或癫痫病症。

[0235] 因此,在一个实施方案中,提供药物组合物、核酸构建体、病毒载体或病毒颗粒以用于疗法中。

[0236] 在一个实施方案中,提供药物组合物、核酸构建体、病毒载体或病毒颗粒以用于治疗STXBP1遗传病症。

[0237] 在一个实施方案中,STXBP1遗传病症为德拉韦综合征、Lennox-Gastaut综合征、婴儿痉挛、肌痉挛癫痫症、癫痫性脑病、早期肌痉挛脑病、非综合征候癫痫症、大田原综合征、早发性癫痫性脑病、韦斯特综合征、发育延迟、自闭症谱系障碍、共济失调-震颤-阻滞综合征、雷特氏综合征或无癫痫症的智能障碍。

[0238] 在一个实施方案中,STXBP1遗传病症为德拉韦综合征、大田原综合征或韦斯特综合征。

[0239] 在一个实施方案中,提供核酸构建体、病毒载体或病毒颗粒的用途,其用于制造用于治疗STXBP1遗传病症的药剂。

[0240] 在一个实施方案中,本发明提供一种治疗STXBP1遗传病症的方法,其包括向有需要的患者施用治疗有效量的药物组合物或病毒颗粒。

[0241] 术语“治疗有效量”是指在向患者或受试者施用时实现所需治疗结果的多个病毒颗粒或包含此类病毒颗粒的药物制剂的量。所需治疗结果包括:

[0242] ●不同癫痫发作类型的频率或持续时间显著减少,例如失张力癫痫发作(跌倒发作)、肌痉挛癫痫发作、全面性癫痫发作、部分性癫痫发作、发热性癫痫发作、婴儿痉挛;

[0243] ●显著实现无持续癫痫发作;

[0244] ●对神经发育症状例如发育延迟、智能障碍、语言障碍、认知障碍、非自主运动、步态紊乱、自闭特征的进展具有显著影响。

[0245] 术语“患者”或“受试者”可互换地使用,是指哺乳动物。任何哺乳动物物种可受益于治疗方法。通常,患者为人类。患者可以是新生儿、婴儿、儿童或青少年。

[0246] STXBP1遗传病症可通过已知基因突变鉴别。

[0247] 在一个实施方案中,STXBP1遗传病症与包含突变或突变组合的病理性STXBP1变体相关。

[0248] 术语“病理性STXBP1变体”意指患者样品中发现并且经由临床测试或研究鉴别的STXBP1变体,其被报道为与病理性表型相关。实施例3中描述了描述病理性和可能病理性的STXBP1变体并在表5和6中分别显示。

[0249] 在一个实施方案中,病理性STXBP1变体包含选自表5中所列的群的一种或多种突变。

[0250] 在一个实施方案中,病理性STXBP1变体包含选自表6中所列的群的一种或多种突变。

[0251] 本文所述的STXBP1基因疗法可与抗癫痫药物或其他神经调节治疗组合施用。

[0252] 药物组合物、核酸构建体、病毒载体或病毒颗粒可施用至患者的脑和/或脑脊髓液(CSF)。举例而言,其可通过注射或通过使用目的特异性施用装置施用。向脑的递送可选自大脑内递送、脑实质内递送、皮质内递送、海马回内递送、壳核内递送、小脑内递送和其组合。向CSF的递送可选自脑池内递送、鞘内递送、脑室内(ICV)递送和其组合。

[0253] 治疗可以以单剂量提供,但可考虑重复剂量,例如在治疗可能未靶向正确区域的情况下,或在未来数年和/或采用不同AAV血清型。

[0254] 序列

[0255] 本发明中所包括的序列显示于表4中。

[0256] 表4:序列

[0257]

序列识别符 和名称	序列
SEQ ID NO: 1 CAG 1.6kb 启动子	CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATT GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCA ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC AAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTA CATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTAC CATGCGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCAC CCCCAATTTTGTATTATTATTTATTTTAAATTATTTTATGCAGCGATGGGGCGGGGGGGG GGGGGGCGCGGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGAGGCGGAGA GGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGG CGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGG
SEQ ID NO: 2 hSYN 启动子	AGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTGGGGGTGCCTACCTGACGACCGA CCCCGACCCACTGGACAAGCACCCAACCCCCATTCCCCAAATTGCGCATCCCCTATCAGA GAGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGCGAGGCGCGTGCGCACTGCCAGCTTACGACCCGCG GACAGTGCCTTCGCCCCCGCTTGGCGGCGCGCGCCACCGCCGCTCAGCACTGAAGGCGC GCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCCGAACTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTTCGCGTCCG CGCCGCCGCCGGCCAGCCGACCGCACACGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGCGACGGGCG CGACCATCTGCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGG AGGAGTCGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAG
SEQ ID NO: 3 MECP2 启动子	AGCTGAATGGGGTCCGCCTCTTTTCCCTGCCTAAACAGACAGGAACCTCTGCCAATTGAG GGCGTCACCGCTAAGGCTCCGCCCCAGCCTGGGCTCCACAACCAATGAAGGGTAATCTCG ACAAAGAGCAAGGGGTGGGGCGCGGGCGCGCAGGTGCAGCAGCACACAGGCTGGTCGGGA GGGCGGGGCGCGACGTCTGCCGTGCGGGGTCCCGGCATCGGTTGCGCGC
SEQ ID NO: 4 hNSE 启动子	ATGCAGCTGGACCTAGGAGAGAAGCAGGAGAGGAAGATCCAGCACAAAAAATCCGAAGCT AAAAACAGGACACAGAGATGGGGGAAGAAAAGAGGGCAGAGTGAGGCAAAAAGAGACTGA AGAGATGAGGGTGGCCGCCAGGCACCTTAGATAGGGGAGAGGCTTTATTTACCTCTGTTT GTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCAGGTAGTCTTGCTTAGTCTCCAGGC TGGAGTGCAGTGGCACAACTCTCAGCTCACTGCAACTTCCACCTCCTGGGTTCAAGCAATT CTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGACTACAGGCGCATGCAACCGCGCCTGGCTAA TTTTTGTATTTTATAGAAACGGGGTTTCACCACGTTAGCCAGGATGGTCTGGATCTCC TGACCTCGTGATCTGCCCCGCTCCGCCTTCCAAAGTGCTGGGATTACAGGGGTGAGCCAC AGCGCCTGGTCCCTATTTACTTCTGTCTTCTACCTCCAGGAGATCAAAGACGCTGGCCTT CAGACCTGATCAGACTCCCAGGGGCGAGCCACCACATGTATGACAGAGAACAGAGGATGCC TGTTTTTGGCCCCAAGCTGGAAATTCATCACAACTGAGGCCAGGATCTGCTCTGTGCC GGTCCTCTGGGCAGTGTGGGGTGCAGAATGGGGTGCCTAGGCCTGAGCGTTGCCCTGGAGC CTAGGCCGGGGGCCGCCCTCGGGCAGGCGTGGGTGAGAGCCAAGACCGCTGGGCCGCGG GGTGCTGGTAGGAGTGGTTGGAGAGACTTGCGAAGGCGGCTGGGGTGTTTCGATTTCCAA TAAAGAAACAGAGTGATGCTCCTGTGTCTGACCGGGTTTGTGAGACATTGAGGCTGTCTT GGGCTTCACTGGCAGTGTGGGCCTTCGTACCCGGGCTACAGGGGTGCGGCTCTGCCTGTT ACTGTCGAGTGGGTGCGGCCGTGGGTATGAGCGCTTGTGTGCGCTGGGGCCAGGTCTGTG GTGCCCCACCCCTTCCCCCATCTCCTCCCTTCCCCACTCCACCCTCGTCGGTCCCCCAC CCGCGCTCGTACGTGCGCCTCCGCCGCGAGCTCCTGACTCATCGGGGCTCCGGGTACA TGCGCCCGCGCGGCCCTATAGGCGCCTCCTCCGCCCGCGCCCGGGAGCCGAGCCGCCG CCGCCACTGCCACTCCCGCTCTCTCAGCGCGCGCGTCCGCCACCGCCACCGCCACCGCCAC TACCACCGAGATCTGCGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCC
SEQ ID NO:	CATTATGGCCTTAGGTCACTTCATCTCCATGGGGTTCTTCTTGATTTTCTAGAAAATG

[0258]

5 CamKII 启动子	AGATGGGGGTGCAGAGAGCTTCTCAGTGACCTGCCAGGGTGCATCAGAAATGTCAGA GCTAGAACTTGAATCAGATTACTAATCTTAAATTCCATGCCTTGGGGGCATGCAAGTAC GATATACAGAAGGAGTGAATCATTAGGGCAGATGACCAATGAGTTTAGGAAAGAAGAGT CCAGGGCAGGGTACATCTACACCACCCGCCAGCCCTGGGTGAGTCCAGCCACGTTCAACC TCATTATAGTTGCCCTCTCTCCAGTCTACCTTGACGGGAAGCACAAGCAGAAACTGGGAC AGGAGCCCCAGGAGACCAATCTTCATGGTCCCTCTGGGAGGATGGGTGGGGAGAGCTGT GGCAGAGGCCCTCAGGAGGGGGCCCTGCTGCTCAGTGGTGACAGATAGGGGTGAGAAAGCAG ACAGAGTCATTCCGTGAGCATTCTGGGTCTGTTTGGTACTTCTTCTCACGCTAAGGTGGC GGTGTGATATGCACAATGGCTAAAAAGCAGGGAGAGCTGGAAAGAAACAAGGACAGAGAC AGAGGCCAAGTCAACCAGACCAATTCCCAGAGGAAGCAAAGAAACCATTACAGAGACTAC AAGGGGGAAGGGAAGGAGAGATGAATTAGCTTCCCCTGTAAACCTTAGAACCCAGCTGTT GCCAGGGCAACGGGGCAATACCTGTCTCTTCAGAGGAGATGAAGTTGCCAGGGTAACCTAC ATCCTGTCTTTCTCAAGGACCATCCCAGAATGTGGCACCCTAGCCGTTACCATAGCAA CTGCCTCTTTGCCCCACTTAATCCCATCCCCTGCTGTAAAAGGGCCCTATAGTTGGAGGT GGGGGAGGTAGGAAGAGCGATGATCACTTGTGGACTAAGTTTGTTCGACCTCCCTTCTCC AACCCCTCAGTACATCACCTGGGGGAACAGGGTCCACTTGCTCCTGGGCCACACAGT CCTGCAGTATTGTGTATATAAGGCCAGGGCAAAGAGGAGCAGGTTTTAAAGTGAAAGGCA GGCAGGTGTTGGGGAGGCAGTTACCGGGGCAACGGGAACAGGGCGTTTTCGGAGGTGGTTG CCATGGGGACCTGGATGCTGACGAAGGCTCGCGAGGCTGTGAGCAGCCACAGTGCCCTGC TCAGAAGCCCCAAGCTCGTCAGTCAAGCCGGTTCTCCGTTTGCACTCAGGAGCACGGGCA GGCGAGTGGCCCTAGTTCTGGGGCAGC
SEQ ID NO: 6 内源 hSTXBP1 启动子	TAAAAAGCAATGCCAGTGATTGGAGGATTTGATGAGATGATGCCCGCAGAGGTGCTTGGC ACGGAGTTTGACACAAGAACTCAGTGTTGGTGAATGCACGAATGCAGGTACCCAGCGACA GGGAGGTGCTGTGGGTGGATTACCCCTGGCTTCGCTGCGGCTGGGAGTGGGCGCTGCTAG TAAGAGATCTCGCTCCAAGCTCCTTCCGTGGGCAGGAAAAACGGAAGCTCCCAGAAAG AGGAAAGACAGGACCCGAGCGGGGTTTTAGGCAGATGGAGCGCGTCCGTAGCCTGTGGCC AGGGATCCCAGCACCGACGGGAAGAGGAGGCCCTGGGTACCCTGCGCCCCGGGCGCGCGC GGCGCGTGAGGTGAGGGGAGGGCGGGCTCCGCACCAGCCAGCGGCGCCTGGCGCCCA GCCGCATCTCGGGGGCGGGTTGAGCCTCCGGGGCCGAGTGCAGATTGGCGGAGGCGAGT GGGTGACGCCAACGGCCGGCGCGAGGCCCGCCCCCGGCTTGCCCCGCCCCCGCGCGCGC CGGCGGCGGGGCGAGCTCGCTCTGGCTCGCGCCGCGCCCCGCGCCAGTCCGCGCGTCA GTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCCACCTGA GGAGGCGGGGGTCCGCGAGGCGTGCGGGACGAGGAGATCGGAGCCGGGAGACTCGCGC AGCGCC
SEQ ID NO: 7 人 STXBP1 启动子	ATGGCCCCATTGGCTCAAAGCTGTTGTGCGAGAGAAGATTATGCATGATGTGATAAAG AAGGTCAAGAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAGTTAAGCATGAGGATG CTGTCTCTCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAGAT ATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCACTCCATCC GAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCCGACTGCTAAATACCGG GCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTCTTGTCCAGATGCCCTGTTAATGAAGTGGTAAAA TCCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAAATCAATATTGCATTTCTCCCGTAT GAATCCCAGGTCTATTCTTGGACTCTGCTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCAC AAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCCTTTGT GCCACCCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTG CTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTGATGATCCAACAATGGGG GAGGGCCCAGACAAGGCACGCTCCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGACCCAGC TCCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAA AATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCGGCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTC CTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCC CAGGAAGTCACCCGGTCTCTGAAAGATTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAG AAGACCACCATGCGGGACCTGTCCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAGAG CTCAGCAAGTACTCCACCCACCTGCACCTTGTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGC ACCGTAGACAACTCTGCCGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGA GAGAAGATCAAGGACCCTATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAATGTCAGC ACTTATGACAAAATCCGCATCATCTTCTTACATCTTTTGAAGAATGGCATCACGGAG GAAAACCTGAACAACTGATCCAGCAGCGCCAGATACCCCCGGAGGATAGTGAGATCATC ACCAACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTCGCGGAGC AAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCACGGTGGACTCCG ATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAACTTGACACCAAACACTACCCT

[0259]

	TATATCTCTACCCGTTCTCTGCCTCCTTCAGCACCACCGCCGTCAGCGCCCGCTATGGG CACTGGCATAAGAACAAGGCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCCTCATCATTTTC ATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCTACGAGGTGACCCAGGCCAAC GGAAAGTGGGAGGTGCTGATAGGTTCTACTCACATTCTACTCCCACCAAATTTCTCATG GACCTGAGACACCCGACTTCAGGGAGTCCTCTAGGGTATCTTTTGAGGATCAGGCTCCA ACAATGGAGTGA
SEQ ID NO: 8 SV40 多聚 A	GATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGA AAAAATGCTTTATTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGC TGCAATAACAAGTT
SEQ ID NO: 9 人 类 STXBP1 亚 型 a	MAPIGLKAVVGEKIMHDVIKKVKKKGWVKLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGITIVED INKRREPLPSLEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSCPDALFNLVK SRAAKVIKTLTEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNPILERLAEQIATLC ATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPMTGEGPDKARSQLLILDRGFDP SPVLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSGIGEARVKEVLLDEDDDLWIALRHKHIAEVS QEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQMLKKMPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKHYQG TVDKLCRVEQDLAMGTDAEGEKIKDPMRAIVPILLDANVSTYDKIRIILLYIFLKNGIT ENLNKLIQHAQIPPEDESEIITNMAHLGVPIVTDSTLRRRSKPERKERISEQTYQLSRWTP IIKDIMEDTIEDKLDTKHYPYISTRSSASFSTTAVSARYGHWKKNKAPGEYRSGPRLIIF ILGGVSLNEMRCAYEVTQANGKWEVLIGSTHILTPKFLLMDLRHPDFRESSRVSFEDQAP TME
SEQ ID NO: 10 人 类 STXBP1 亚 型 b	MAPIGLKAVVGEKIMHDVIKKVKKKGWVKLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGITIVED INKRREPLPSLEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSCPDALFNLVK SRAAKVIKTLTEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNPILERLAEQIATLC ATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPMTGEGPDKARSQLLILDRGFDP SPVLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSGIGEARVKEVLLDEDDDLWIALRHKHIAEVS QEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQMLKKMPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKHYQG TVDKLCRVEQDLAMGTDAEGEKIKDPMRAIVPILLDANVSTYDKIRIILLYIFLKNGIT ENLNKLIQHAQIPPEDESEIITNMAHLGVPIVTDSTLRRRSKPERKERISEQTYQLSRWTP IIKDIMEDTIEDKLDTKHYPYISTRSSASFSTTAVSARYGHWKKNKAPGEYRSGPRLIIF ILGGVSLNEMRCAYEVTQANGKWEVLIGSTHILTPQKLLDTLKKLNKTDEEISS
SEQ ID NO: 11 人 类 STXBP1 亚 型 c	MAPIGLKAVVGEKIMHDVIKKVKKKGWVKLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGITIVED INKRREPLPSLEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDYALFNLVKSRA AKVIKTLTEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNPILERLAEQIATLCATL KEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPMTGEGPDKARSQLLILDRGFDPSSPV LHELTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSGIGEARVKEVLLDEDDDLWIALRHKHIAEVSQEV TRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQMLKKMPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKHYQGTVD KLCRVEQDLAMGTDAEGEKIKDPMRAIVPILLDANVSTYDKIRIILLYIFLKNGITENL NKLIQHAQIPPEDESEIITNMAHLGVPIVTDSTLRRRSKPERKERISEQTYQLSRWTP IIKDIMEDTIEDKLDTKHYPYISTRSSASFSTTAVSARYGHWKKNKAPGEYRSGPRLIIF ILGGVSLNEMRCAYEVTQANGKWEVLIGSTHILTPQKLLDTLKKLNKTDEEISS
SEQ ID NO: 12 人 类 STXBP1 亚 型 d	MHDVIKKVKKKGWVKLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGITIVEDINKRREPLPSLEAV YLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSCPDALFNLVKSRAAKVIKTLTEIN IAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNPILERLAEQIATLCATLKEYPAVRYRGE YKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPMTGEGPDKARSQLLILDRGFDPSSPVHELTFQAMSY DLLPIENDVYKYETSGIGEARVKEVLLDEDDDLWIALRHKHIAEVSQEVTRSLKDFSSSK RMNTGEKTTMRDLSQMLKKMPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKHYQGTVDKLCRVEQDLAM GTDAEGEKIKDPMRAIVPILLDANVSTYDKIRIILLYIFLKNGITENLNKLIQHAQIPP EDSEIITNMAHLGVPIVTDSTLRRRSKPERKERISEQTYQLSRWTPIIKDIMEDTIEDKL DTKHYPYISTRSSASFSTTAVSARYGHWKKNKAPGEYRSGPRLIIFILGGVSLNEMRCAY EVTQANGKWEVLIGSTHILTPKFLLMDLRHPDFRESSRVSFEDQAPTME
SEQ ID NO: 13 人 类 STXBP1 亚 型 e	MHDVIKKVKKKGWVKLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGITIVEDINKRREPLPSLEAV YLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSCPDALFNLVKSRAAKVIKTLTEIN IAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNPILERLAEQIATLCATLKEYPAVRYRGE YKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPMTGEGPDKARSQLLILDRGFDPSSPVHELTFQAMSY DLLPIENDVYKYETSGIGEARVKEVLLDEDDDLWIALRHKHIAEVSQEVTRSLKDFSSSK RMNTGEKTTMRDLSQMLKKMPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKHYQGTVDKLCRVEQDLAM GTDAEGEKIKDPMRAIVPILLDANVSTYDKIRIILLYIFLKNGITENLNKLIQHAQIPP EDSEIITNMAHLGVPIVTDSTLRRRSKPERKERISEQTYQLSRWTPIIKDIMEDTIEDKL

[0260]

	DTKHYPYISTRSSASFSTTAVSARYGHHWNKAPGEYRSGPRLIIFILGGVSLNEMRCAY EVTQANGKWEVLIGSTHILTPQKLLDTLKKNKTDEEISS
SEQ ID NO: 14 人 类 STXBP1 亚 型 f	MAPIGLKAVVGEKIMHDVIKKVKKKGWVKLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGITIVED INKRREPLPSLEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSCPDALFNELVK SRAAKVIKTLTEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNPILERLAEQIATLC ATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPMTMGEKPDKARSQLLILDRGFDP SPVLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSGIGEARVKEVLLDEDDDLWIALRHKHIAEVS QEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQMLKKMPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKHYQG TVDKLCRVEQDLAMGTDAEGEKIKDPMRAIVPILLDANVSTYDKIRIILLYIFLKNGITTE ENLNKLIQHAQIPPEDESEIITNMAHLGVPIVTDSTLRRRSKPERKERISEQTYQLSRWTP IIKDIMEDTIEDKLDTKHYPYISTRSSASFSTTAVSARYGHHWNKAPGEYRSGPRLIIF ILGGVSLNEMRCAYEVTQANGKWEVLIGWPFRTLAR
SEQ ID NO: 15 人 类 STXBP1 亚 型 g	MAPIGLKAVVGEKIMHDVIKKVKKKGWVKLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGITIVED INKRREPLPSLEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSCPDALFNELVK SRAAKVIKTLTEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNPILERLAEQIATLC ATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPMTMGEKPDKARSQLLILDRGFDP SPVLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSGIGEARVKEVLLDEDDDLWIALRHKHIAEVS QEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQMLKKMPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKHYQG TVDKLCRVEQDLAMGTDAEGEKIKDPMRAIVPILLDANVSTYDKIRIILLYIFLKNGITTE ENLNKLIQHAQIPPEDESEIITNMAHLGVPIVTDSTLRRRSKPERKERISEQTYQLSRWTP IIKDIMEDTIEDKLDTKHYPYISTRSSASFSTTAVSARYGHHWNKAPGEYRSGPRLIIF ILGGVSLNEMRCAYEVTQANGKWEVLIVPEAGS
SEQ ID NO: 16 人 类 STXBP1 亚 型 h	MAPIGLKAVVGEKIMHDVIKKVKKKGWVKLVVDQLSMRMLSSCCKMTDIMTEGITIVED INKRREPLPSLEAVYLITPSEKSVHSLISDFKDPPTAKYRAAHVFFTDSCPDALFNELVK SRAAKVIKTLTEINIAFLPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNPILERLAEQIATLC ATLKEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPMTMGEKPDKARSQLLILDRGFDP SPVLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKEVTRSLKDFSSSKRMNTGEKTTMRDLSQMLKKMPQ YQKELSKYSTHLHLAEDCMKHYQGTVDKLCRVEQDLAMGTDAEGEKIKDPMRAIVPILL ANVSTYDKIRIILLYIFLKNGITTEENLNKLIQHAQIPPEDESEIITNMAHLGVPIVTDSTL RRRSKPERKERISEQTYQLSRWTPIIKDIMEDTIEDKLDTKHYPYISTRSSASFSTTAVS ARYGHHWNKAPGEYRSGPRLIIFILGGVSLNEMRCAYEVTQANGKWEVLIGSTHILTP KFLMDLRHPDFRESSRVSFEDQAPTME
SEQ ID NO: 17 AAV9.hu14 DNA 序列	AGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAATTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATAC CATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCATA GGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTA TTAATTTCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTG AATCCGGTGAGAAATGGCAAAAGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGC CATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAAAACCGTTATTCATTCTGTGATTGCG CCTGAGCGAGGCGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAGT GCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTTCACCTGAATCAGGATATT CTTCTAATACCTGGAACGCTGTTTTTCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCAT CAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCCGAAGTGGCATAAATCCGTACGCCAGTTTA GTCTGACCATCTCATCTGTAAACATCATTTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTTAGAAACA ACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAAGCGATAGATTGTGCGACCTGATTGCCCCGACAT TATCGCGAGCCCATTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCC TCGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATATTTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTT ATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAA TAGGGGTCAGTGTTACAACCAATTAACCAATTCTGAACATTATCGCGAGCCCATTATATAC CTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTTTGGCTGGCGGAGTAGCGCGGTGGTCCACCT GACCCCATGCCGAACCTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGACTCCC CATGCGAGAGTAGGGAACCTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTG GGCCTTTTCGCCCGGGCTAATTAGGGGGTGTGCGCCTTCGCTGAAGTCCTGTATTAGAGGT CACGTGAGTGTTTTGCGACATTTTTCGACACCATGTGGTCACGCTGGGTATTTAAGCCCG AGTGAGCACGCAGGGTCTCCATTTTGAAGCGGGAGGTTTGAACGCGCAGCCGCCATGCCG GGGTTTTACGAGATTGTGATTAAGGTCCCCAGCGACCTTGACGAGCATCTGCCGGCATT TCTGACAGCTTTGTGAACCTGGGTGGCCGAGAAGGAATGGGAGTTGCCGCCAGATTCTGAC ATGGATCTGAATCTGATTGAGCAGGCACCCCTGACCGTGGCCGAGAAGCTGCAGCGCGAC TTTCTGACGGAATGGCGCCGTGTGAGTAAGGCCCGGAGGCCCTTTTCTTTGTGCAATTT GAGAAGGGAGAGAGCTACTTCCACATGCACGTGCTCGTGAAACACCGGGGTGAAATCC

[0261]

ATGGTTTTGGGACGTTTCTGAGTCAGATTTCGCGAAAACTGATTTCAGAGAATTTACCGC
 GGGATCGAGCCGACTTTGCCAAACTGGTTCGCGGTACAAAAGACCAGAAATGGCGCCGGA
 GGCGGGAACAAGGTGGTGGATGAGTGCTACATCCCCAATTACTTGCTCCCCAAAACCCAG
 CCTGAGCTCCAGTGGGCGTGGACTAATATGGAACAGTATTTAAGCGCTGTTTGAATCTC
 ACGGAGCGTAAACGTTGGTGGCGCAGCATCTGACGCACGTGTGCGAGACGCAGGAGCAG
 AACAAAGAGAATCAGAATCCCAATTCTGATGCGCCGGTGATCAGATCAAAAACCTTCAGCC
 AGGTACATGGAGCTGGTCGGGTGGCTCGTGGACAAGGGGATTACCTCGGAGAAGCAGTGG
 ATCCAGGAGGACCAGGCCTCATACATCTCCTTCAATGCGGCCTCCAACCTCGCGGTCCCAA
 ATCAAGGCTGCCTTGGACAATGCGGGAAAGATTATGAGCCTGACTAAAACCGCCCCGAC
 TACCTGGTGGGCCAGCAGCCCGTGGAGGACATTTCCAGCAATCGGATTTATAAAATTTTG
 GAACTAAACGGGTACGATCCCCAATATGCGGCTTCCGTCTTTCTGGGATGGGCCACGAAA
 AAGTTTCGGCAAGAGGAACACCATCTGGCTGTTTGGGCTGCAACTACCGGGAAGACCAAC
 ATCGCGGAGGCCATAGCCACACTGTGCCCTTCTACGGGTGCGTAAACTGGACCAATGAG
 AACTTTCCCTTCAACGACTGTGTGCGACAAGATGGTGATCTGGTGGGAGGAGGGGAAGATG
 ACCGCCAAGGTTCGTGGAGTCGGCCAAAGCCATTCTCGGAGGAAGCAAGCTGGAC
 CAGAAATGCAAGTCTCGGCCAGATAGACCCGACTCCCGTGATCGTCACCTCCAACACC
 AACATGTGCGCCGTGATTGACGGGAACCAACGACCTTCGAACACCAGCAGCCGTTGCAA
 GACCGGATGTTCAAATTTGAACTCACCCGCCGTCTGGATCATGACTTTGGGAAGGTCACC
 AAGCAGGAAGTCAAAGACTTTTTCCGGTGGGCAAAGGATCACGTGGTTGAGGTGGAGCAT
 GAATTCTACGTCAAAAAGGGTGGAGCCAAGAAAAGACCCGCCCCAGTGACGCAGATATA
 AGTGAGCCCAAACGGGTGCGCGAGTCAGTTGCGCAGCCATCGACGTCAGACGCGGAAGCT
 TCGATCAACTACGCAGACAGGTACCAAAACAAATGTTCTCGTCAGTGGGCATGAATCTG
 ATGCTGTTTCCCTGCAGACAATGCGAGAGACTGAATCAGAATTCAAATATCTGCTTCACT
 CACGGTGTCAAAGACTGTTTAGAGTGCTTTCCCGTGTGAGAATCTCAACCCGTTTCTGTC
 GTCAAAAAGGCGTATCAGAACTGTGCTACATTCATCACATCATGGGAAAGGTGCCAGAC
 GCTTGCACTGCTTGCAGCTGGTCAATGTGGACTTGGATGACTGTGTTTCTGAACAATAA
 ATGACTTAAACCAGGTATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAACCT
 TAGTGAAGGAATTTCGCGAGTGGGTGGCTTTGAAACCTGGAGCCCCCAACCCAAGGCAAA
 TCAACAACATCAAGACAACGCTCGAGGTCTTGTGCTTCCGGGTACAAATACCTTGGACC
 CGGCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCGTCAACGCAGCAGACGCGGCGGCCCTCGAGCA
 CGACAAGGCCCTACGACCAGCAGCTCAAGGCCGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCA
 CGCCGACGCCGAGTTCAGGAGCGGCTCAAAGAAGATACGTCTTTTGGGGGAACCTCGG
 GCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAAAGAGGCTTCTTGAACCTCTTGGTCTGGTTGAGGAAGC
 GGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGGCTGTAGAGCAGTCTCCTCAGGAACCGGACTC
 CTCGCGGGTATTGGCAAATCGGGTGACACAGCCCGCTAAAAAGAGACTCAATTTCCGTCA
 GACTGGCGACACAGAGTCAGTCCCAGACCCTCAACCAATCGGAGAACCTCCCGCAGCCCC
 CTCAGGTGTGGGATCTCTTACAATGGCTTCAGGTGGTGGCGACCCAGTGGCAGACAATAA
 CGAAGGTGCCGATGGAGTGGGTAGTTCTCGGGAATTTGGCATTGCGATTCCCAATGGCT
 GGGGGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTGGGCCCTGCCACCTACAACAATCA
 CCTCTACAAGCAAATCTCCAACAGCACATCTGGAGGATCTTCAAATGACAACGCCTACTT
 CGGCTACAGCACCCCTGGGGGTATTTTGAATTCAACAGATTCCACTGCCACTTCTCACC
 ACGTGAATGGCAGCGACTCATCAACAACAACCTGGGGATTCCGGCCTAAGCGACTCAACTT
 CAAGCTCTTCAACATTCAGGTCAAAGAGGTTACGGACAACAATGGAGTCAAGACCATCGC
 CAATAACCTTACCAGCACGGTCCAGGTCTTCACGGACTCAGACTATCAGCTCCCGTACGT
 GCTCGGGTCGGCTCACGAGGGCTGCCTCCCGCCGTCCAGCGGACGTTTTTCATGATTCC
 TCAGTACGGGTATCTGACGCTTAATGATGGAAGCCAGGCCGTGGGTCTGTCCTTTTA
 CTGCCTGGAATATTTCCCGTCGCAAATGCTAAGAACGGGTAACAACTTCCAGTTTCAGCTA
 CGAGTTTGAGAACGTACCTTTCCATAGCAGCTACGCTCAGAGCAAAGCCTGGACCGACT
 AATGAATCCACTCATCGACCAATACTTGTACTATCTCTCAAAGACTATTAACGGTTCTGG
 ACAGAATCAACAACGCTAAAATTCAGTGTGGCCGGACCCAGCAACATGGCTGTCCAGGG
 AAGAACTACATACCTGGACCCAGCTACCGACAACAACGTGTCTCAACCACTGTGACTCA
 AAACAACAACAGCGAATTTGCTTGGCCTGGAGCTTCTTCTTGGGCTCTCAATGGACGTAA
 TAGCTTGATGAATCCTGGACCTGCTATGGCCAGCCACAAAAGAGAGAGGACCGTTTCTT
 TCCTTTGTCTGGATCTTTAATTTTGGCAAACAAGGAACCTGGAAGAGACAACGTGGATGC
 GGACAAAGTCATGATAACCAACGAAGAAGAAATTAATACTACTAACCCTGGTAGCAACGGA
 GTCCTATGGACAAGTGGCCACAAACCACAGAGTGGCCAGCACAGGCGCAGACCGGCTG
 GGTTCAAAACCAAGGAATACTTCCGGGTATGGTTTGGCAGGACAGAGATGTGTACCTGCA
 AGGACCCATTTGGGCCAAAATTCCTCACACGGACGGCAACTTTCACCCTTCTCCGCTGAT
 GGGAGGGTTTGAATGAAGCACCCGCTCCTCAGATCCTCATCAAAAACACACCTGTACC

[0262]

	TGCGGATCCTCCAACGGCCTTCAACAAGGACAAGCTGAACCTTTTCATCACCCAGTATTC TACTGGCCAAGTCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAAGGAAAACAGCAAGCGCTG GAACCCGGAGATCCAGTACACTTCCAATAATTACAAGTCTAATAATGTTGAATTTGCTGT TAATACTGAAGGTGTATATAGTGAACCCCGCCCCATTGGCACCAGATACCTGACTCGTAA TCTGTAATTGCTTGTAAATCAATAAACCGTTTAAATTCGTTTCAGTTGAACCTTTGGTCTCT GCGCGTCAAAAGGGCGACACAAAATTTATTCTAAATGCATAATAAATACTGATAACATCT TATAGTTTGTATTATATTTTGTATTATCGTTGACATGTATAATTTTGATATCAAAAAGT ATTTTCCCTTTATTATTTTCGAGATTATTTTCTTAATTCCTCTTAACAAACTAGAAAATA TTGTATATACAAAAATCATAAATAATAGATGAATAGTTTAAATTATAGGTGTTTCATCAAT CGAAAAAGCAACGTATCTATTTAAAGTGCCTTGGCTTTTCTCATTTATAAGGTTAAAT AATTCTCATATATCAAGCAAAGTGACAGGCGCCCTTAAATATTCTGACAAATGCTCTTTC CCTAAACTCCCCCATAAAAAACCCGCCGAAGCGGGTTTTTACGTTATTTGCGGATTAA CGATTACTCGTTATCAGAACC GCCAGGGGGCCGAGCTTAAGACTGGCCGTCGTTTTAC AACACAGAAAGAGTTTGTAGAAACGCAAAAGGCCATCCGTCAGGGGCCTTCTGCTTAGT TTGATGCCTGGCAGTTCCTACTCTCGCCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGC TCGGTCTGTTGGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCC ACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGG AACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCAT CACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAG GCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACC TACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCAGCTGTAGG TATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGGTT CAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACAC GACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGC GGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGGCTAACTACGCTACACTAGAAGAACAGTATTT GGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCC GGCAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGC AGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGCTGACGCTCAGTGG AACGACGCGCGCTAACTACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGCTTGCGCCGTCCTGCA AGTCAGCGTAATGCTCTGCTT
SEQ ID NO: 18 3' ITR	aggaacccctagtgatggaggttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgagg ccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagc gagcgcg
SEQ ID NO: 19 5' ITR	GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG TCGCCCCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAG GGGTTTCCT
SEQ ID NO: 20 AAVtt	MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFGNGLD KGEFVNADAAALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ AKKRILEPLGLVEEPVKTA PGKKRPVEHSPAEPDSSSGTGKSGQQPARKRLNFGQTDAD SVPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMASGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHDSTWMDRVI TTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQR LINNNWGFPRKRLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQ CLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQA VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVFP HSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTMSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPG PCYRQQRVSKTAADNNNSDYSWTGATKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHKDDEEKYFPQSGVL IFGKQDSGKTNDIEKVMITDEEERTTNPVATEQYGSVSTNLQSGNTQAATSDVNTQGV LPGMVWQDRDVYLQGP I WAKIPHTDGHFHPSPMLMGFGFLKHPPPQILIKNTPVPANPST FSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNKNKSVNVDFTVDTNGVY SEPRPIGTRYLTRNL
SEQ ID NO: 21 AAV9	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPFGNGLD KGEFVNADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ AKKRILLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTDTE SVPDPQPIGEPPAAPSGVGS LTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCD SQWLGD RVI TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFS PRDWQR LINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAH EGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQA VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENV PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIP

[0263]

	GPSYRQQRVSTTVTQNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGS LIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNG ILPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPQILIKNTVPADPPT AFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGV YSEPRPIGTRYLTRNL
SEQ ID NO: 22 编码亚型 a 的 人 类 STXBP1(转 录变体 1)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCCAGCGCGCCACCTG AGGAGGCGGCGGGGTCCGCAGGCGTTCGCGGGACGAGGAGATCGGAGCCGGGAGACTCGCG CAGCGCCATGGCCCCATTGGCCTCAAAGCTGTTGTCGGAGAGAAGATTATGCATGATGT GATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAGTTAAGCAT GAGGATGCTGTCTCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCATAACGATTGT GGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCAC TCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCGGACTGCTAA ATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTCTTGTCAGATGCCCTGTTTAATGAACT GGTAAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAAATCAATATTGCATTCT CCCGTATGAATCCAGGTCTATTCTTGGACTCTGCTGACTCTTCCAAAGCTCTACAG TCCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGAC CCTTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGACAA TGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTGATGATCCAAC AATGGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCAGCTCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGA CCCCAGCTCCCCGTGTCTCCATGAATTGACTTTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCC TATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCGGCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGA GGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCACAAGCAGATCGCAGA GGTGTCAGGAAGTCACCCGGTCTCTGAAAGATTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATAC TGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGTCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCA GAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATT CCAAGGCACCGTAGACAACTCTGCCGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGC TGAGGGAGAGAAGATCAAGGACCCTATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAA TGTCAGCACTTATGACAAAATCCGCATCATCCTTCTTACATCTTTTGAAGAATGGCAT CACGGAGGAAAACCTGAACAAACTGATCCAGCAGCGCCAGATACCCCGGAGGATAGTGA GATCATCACCAACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTCG CCGGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCACGGTG GACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAAACTTGACACCAACA CTACCCTTATATCTCTACCCGTTCTCTGCCTCCTTCAGCACCACCGCCGTCAGCGCCCG CTATGGGCACTGGCATAAGAACAAGGCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGGCCCCGCCCTCAT CATTTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCTACGAGGTGACCCA GGCCAACGGAAGTGGGAGGTGCTGATAGTTTCTACTCACATTCTTACTCCCACCAATT TCTCATGGACCTGAGACACCCGACTTCAGGGAGTCTCTAGGGTATCTTTTGGAGATCA GGCTCCAACAATGGAGTGAGAGCCAAAGAAACAAAGATCCACACACATCTCACCCACA GAAACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAA AAATAAGTCGCCCCCTCCAAAACACGCCCCATCCACAGCGCTCCGCAGCTTCCCACCAC CGCCCGCTCAGTTCTTTGCGTCTGTTGCCCTCCCAGCCCTGCACGCCCTGGCTGGCAC TGTTGCCGCTGCATTCTCGTGTTTCACTGATGCCCTCTTCTGTTTGAACAAAAGAAAAT AATGCATTGTGTTTTTTAAAAAGAGTATCTTATACATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCAT GTGCAATTGGTGACAGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTAGGATGAATGGACGCCTTCTC CCCGTTATTTAAGATTTGTGACCTTGTACATAACCTGGGTGACGTGCACATTGCTTGGG TATGGAACGGTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAACCTTGTTGGGGTTGTTCTGTCTTG TTGAGAATCATAGAGATGTCTGTGTTCTTGGAGTATTTACACTGAGGACTAATCTGCTA TCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCTGCTCTCATCAAATAACCTGGGAGGTGAC AATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACAGACCTCTTTGCCTTTCCAGCGTCTC ATACCCCGGTAGTGCAGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAGC GTCCTCCTCCACAGCTGTCACTGCCCCCTCCCAGCCTGTGTCCACAGTGTGTGATCC CGAGGGAAGTCTCCAGTCTAAGTCACAGTGCCCTGACAGGTGAGAAGCAAACCTCCCGCT GGAAGCCTCCATCTCTTTGAAAAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCAGGCCCTTCTG TCCCCAGGCATCATCCCAACAGCTCATTTTCCCTAGTCCGCCTTCGTTCAAGGGTCAGGA ATGGACCAGAACAGATGGGTCTTGAGAGGCCCTGAACAGAGGCTATGGCTGTGGAGAAG GTTCTTGGCCCGTTGGACTCACACAGACCCTGTACCCTCTCGGCAAGCATCTTCAAGTCAG ATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATACCTTGTGTGTGTGGGGTCATACATCATCG TGTTTGTAAGAGAAGATGGTCATTTTATTCTCTGTATAAACTTAGCTCTAAAGCAGAAA CTAAAGCAGCAAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCATCCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATTC

[0264]

	TCCAGTGGTGAGCACACCATTGTGCTGCTGCTGTTGTCGTGAAATATAATAACAGTGGA AGTCACAAAAATGTCCCTGCCCAGCCCCCTCGCCGCCCTTGACCTCCTGCAGGCCATGT GTGTATTACTTGTCTAGTGATGTCTCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCTCGGCGCCACCTC CGCCTCCCTTTTCAAGCCTGCTCCCCGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGGTGTCTCTT CTCAAGGCTTTGAAATCTCCCTTGCACTGAGATTAGTCGTGAGATCTCTCCCCGTCTCC CTCCCACTTATACGACCTGATTTCCCTTAGGACGGAACCGCAGGCACCTGCGCCGGGCGT CTTACTCCCGCTGCTTGTCTGTCCCCCTCCCTCGGACCAACAGTGCTCATGCTTCAGGA CCTTGTGTTGTCGAAGATGTTGGTTTCCCTTTCTCTGTTATTTATATAAAAAATAATTTATC AAAAGGATATTTTAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAACTTGTTTACCTTAAATTTATCAGA ATCTCAGTGTTTGAAGTACTGAAGCACAAACATATATCATCTCTGTACCATTCTGTACT AAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAAGAAATCAGCACCCCT
SEQ ID NO: 23 编码亚型 b 的 人 类 STXBP1(转 录变体 2)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCCCAGCGCGCCACCTG AGGAGGCGGCGGGGTCCGCAGGCGTGC GGGGACGAGGAGATCGGAGCCGGGAGACTCGCG CAGCGCCATGGCCCCATTGGCCTCAAAGCTGTTGTCGGAGAGAAGATTATGCATGATGT GATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGATCAGTTAAGAT GAGGATGCTGTCTCCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCATAACGATTGT GGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCAC TCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCCGACTGCTAA ATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTCTTGTCCAGATGCCCTGTTTAAATGAACT GGTAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAAATCAATATTGCATTCTC CCCGTATGAATCCAGGTCTATTCTTGGACTCTGCTGACTCTTCCAAAGCTTCTACAG TCCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCTGGCAGAGCAGATCGCGAC CCTTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGACAA TGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTGATGATCCAAC AATGGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGA CCCCAGCTCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAAGCTATGAGTTATGATCTGCTGCC TATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCGCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGA GGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGA GGTGTCCCAGGAAGTCACCGGTCTCTGAAAGATTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATAC TGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGTCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCA GAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTA CCAAGGCACCGTAGACAACTCTGCCGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGC TGAGGGAGAGAAGATCAAGGACCCTATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAA TGTCAGCACTTATGACAAAATCCGCATCATCTTCTTACATCTTTTGAAGAATGGCAT CACGGAGGAAAACCTGAACAAACTGATCCAGCAGCGCCAGATACCCCGGAGGATAGTGA GATCATCACCAACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTCG CCGGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCACGGTG GACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAACTTGACACCAAACA CTACCCTTATATCTTACCCGTTCTCTGCTCCTTCAAGCACCACCGCCGTGAGCGCCCG CTATGGGCACTGGCATAAGAACAAGGCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCCTCAT CATTTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCCTACGAGGTGACCCA GGCCAACGGAAGTGGGAGGTGCTGATAGGATCCACACACATCCTCACCCACAGAACT GCTGGACACACTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAATAA GTCGCCCCCTCCAAAACACGCCCCCATCCCACAGCGCTCCGCAGCTTCCCACCACCGCCCG CCTCAGTTCCCTTGCCTCTGTTGCCTCCCCAGCCCTGCACGCCCTGGCTGGCACTGTTGC CGCTGCATTCTCGTGTTCAGTGATGCCCTCTTCTTGTGTTGAAACAAAAGAAAATAATGCA TTGTGTTTTTTAAAAAGAGTATCTTATACATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCAA TTGGTGACAGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTTAGGATGAATGGACGCCTTCTCCCGTT ATTTAAGATTTGTGACCTTGACATAACCCTGGGTGACGTGCACATTGCTTGGGTATGGA ACGGTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAACCTTGTGTTGGGGTGTTCCTGTCTTGTGAGA ATCATAGAGATGTCTGTGTTCTTGGAGTATTTCACTGAGGACTAATCTGCTATCTTCA TTCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCTGCTCTCATCCAAATAACCTGGGAGGTGACAATCAG GATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACAGACCTCTTGCCTTTCCAGCGTCTCATACCC CCGGTAGTGACGTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAGCGTCCCT CTCCACAGCCTGTCACTGCCCCCTCCCGAGCCTGTGTCCACAGTGCTGTGATCCCGAGG AAGTCTCCAGTCTAAGTCACAGTGCCCTGACAGGTGAGAAGCAAACCTCCCGCTGGAAGC CTCCATCTCTTTGGAAAAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCAGGCCCTTCTGTCCCCA GGCATCATCCCAACAGCTCATTTTCCCTAGTCCGCCTTCGTTCAAGGGTCAGGAATGGAC CAGAACAGATGGGTCTGAGGCCCCCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTGGAGAAGGTTCTT

[0265]

	GGCCCGTTGGACTCACACAGACCCTGTACCCTCTCGGCAAGCATCTTCAGTCAGATTATC CTCAGTTTTAGATACTTCATAATACCTTGTGTTGTGTTGGGTCATACATCATCGTGTGTTG TAAGAGAAGATGGTCATTTTATTCTCTGTATAAACTTAGCTCTAAAGCAGAACTAAAG CAGCAAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCATCCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATTCTCCAGT GGTGAGCACACCATTGTGCTGCTGCTGTTGTCTGAAATATAATAACAGTGGAAGTCAC AAAAATGTCCCTGCCCAGCCCCCTCGCCGCCCTTGACCTCCTGCAGGCCATGTGTGTAT TACTTGTCTAGTGATGTCTCTCAAAGTGTGTACGCGAGCTCGGCGCCACCTCCGCCTC CCTTTCAGAGCCTGCTCCCCGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGGTGTCTCTTCTCAAG GCTTTGAAATCTCCCTTGCACTGAGATTAGTCGTGAGATCTCTCCCCGTCTCCCTCCCA ACTTATACGACCTGATTTCTTAGGACGGAACCGCAGGCACCTGCGCCGGGCGTCTTACT CCCGCTGCTTGTCTGTCCCTCCCTCGGACCAAACAGTGCTCATGCTTCAGGACCTTGT TTGTGGAAGATGTTGGTTTCCCTTTCTCTGTTATTTATATAAAAAATAATTTATCAAAAGG ATATTTTAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAACCTTGTTTACCTTAAAAATTATCAGAATCTCA GTGTTTGAAGTACTGAAGCACAACATATCATCTCTGTACCATTCTGTACTAAAGCA CTTGAGTCTAATAAATAAAGAAATCAGCACCCCT
SEQ ID NO: 24 编码亚型 c 的 人 类 STXBP1(转 录变体 3)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCCAGCGCGCCACCTG AGGAGGCGGCGGGGTCCGACGGCGTCTCGGGGACGAGGAGATCGGAGCCGGGAGACTCGCG CAGCGCCATGGCCCCCATTGGCCCTCAAAGCTGTTGTGCGAGAGAAGATTATGCATGATGT GATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAGTTAAGCAT GAGGATGCTGTCTCCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCATAACGATTGT GGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCAC TCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGACCCCGGACTGCTAA ATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTATGCCCTGTTAATGAAGTGGTAAATC CCGAGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAAATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGA ATCCAGGTCTATTCTTGGACTCTGCTGACTCTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACAA GGCTCAGATGAAGATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCCTTTGTGC CACCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTGCT GGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCATATAAGCTGATGATCCAACAATGGGGGA GGGCCCAGACAAGGCACGCTCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGACCCCGACTC CCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAAA TGATGTATACAAGTATGAGACCAGCGGCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCT GGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCCCA GGAAGTCACCCGGTCTCTGAAAGATTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAA GACCACCATGCGGGACCTGTCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAGAGCT CAGCAAGTACTCCACCACCTTGCACTTGTGAGGACTGTATGAAGCATTAACCAAGGCAC CGTAGACAAACTCTGCCGAGTGAGACGAGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGA GAAGATCAAGGACCCTATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAATGTGAGCAC TTATGACAAAATCCGCATCATCTTCTCTACATCTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGA AAACCTGAACAACTGATCCAGCAGCCCCAGATACCCCGGAGGATAGTGAGATCATCAC CAACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTGCCTGAGCAA GCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCACGGTGGACTCCGAT TATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAACTTGACACCAAAACACTACCCCTA TATCTCTACCCGTTCCCTCTGCCTCCTTCAGCACCACCGCCGTCAGCGCCCGCTATGGGCA CTGGCATAAGAACAAGGCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCCTCATCATTTTTCAT CCTTGGGGGTGTGAGCTGAATGAGATGCGCTGCGCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGG AAAGTGGGAGGTGCTGATAGGATCCACACACATCCTCACCCACAGAACTGCTGGACAC ACTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAATAAGTCGCCCT CCAAAACAGCCCCATCCCACAGCGCTCCGAGCTTCCACACCGCCCGCCTCAGTTC CTTTGCGTCTGTTGCCTCCCCAGCCCTGCACGCCCTGGCTGGCAGCTGTTGCCGCTGCATT CTCGTGTTCACTGATGCCCTCTTCTGTTTGAACAAAAAGAAATAATGCATTGTGTTTT TTAAAAAGAGTATCTTATACATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCAATTGGTGCAC AGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTTAGGATGAATGGACGCCTTCTCCCGTTATTTAAGAT TTGTGACCTTGTACATAACCCTGGGTGACGTGCACATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAA ATTTGGGTGTTTTTAAAACTTGTGTTGGGGTGTTCCTGTCCTTGTGAGAATCATAGAG ATGTCTGTGTTCTTGGAGTATTTACACTGAGGACTAATCTGCTATCTTCAATCCAGTCC CTACCCCTCAGTGCCTGCTCTCATCAAATAACCTGGGAGGTGACAATCAGGATATCTCA GGAGGTCCAAGGTGGAACAGACCTCTTGCCTTTCCAGCGTCTCATACCCCGGTAGTG CAGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAGCGTCTCTCTCCACAGC CTGTCACTGCCCCCTCCCCAGCCTGTGTCCACAGTGTGTGATCCCGAGGGAAGTCTCTC

[0266]

	AGTCTAAGTCACAGTGCCCTGACAGGTGAGAAGCAAACCTCCCGCTGGAAGCCTCCATCTC TTTGAAAAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCAGGCCCTTCTGTCCCAGGCATCATC CCAACAGCTCATTTTCCCTAGTCCGCTTCGTTCAAGGGTCAGGAATGGACCAGAACAGA TGGGTTCTGGAGGCCCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTGGAGAAGGTTCTTGGCCCGTTG GACTCACACAGACCTGTACCCTCTCGGCAAGCATCTCAGTCAGATTATCCTCAGTTTC AGATACTTCATAATACCTTGTGTTGTGTGGGGTCATACATCATCGTGTTTGTAAAGAGAAG ATGGTCATTTTATTCTCTGTATAAACTTAGCTCTAAAGCAGAACTAAAGCAGCAAATG CAGGAAGGCTGTCTCGCCATCCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATTCTCCAGTGGTGAGCAC ACCATTTGTGCTGCTGTGTGTGTCGTGAAATATAATAACAGTGGAAGTCACAAAAATGTC CCCTGCCCAGCCCCCTCGCGCCCTTGACCTCCTGCAGGCCATGTGTGTATTACTTGTCT AGTGATGTCTCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCTCGGCGCCACCTCCGCCTCCCTTTTCAGA GCCTGTCTCCCGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGGTGTCTCTTCTCAAGGCTTTGAAA TCTCCCTTGCACTGAGATTAGTCGTGATCTCTCCCCGTCTCCCTCCCACTTATACG ACCTGATTTCCCTTAGGACGGAACCGCAGGCACCTGCGCCGGGCGTCTTACTCCGCTGCT TGTTCTGTCCCTCCCTCGGACCAACAGTGCTCATGCTTCAGGACCTTGTTTGTGCTGAAG ATGTTGGTTTCCCTTTCTCTGTTATTTATATAAAAAATAATTTATCAAAAGGATATTTTAA AAAAGCTAGTCTGTCTTGAACCTTGTTTACCTTAAATTTATCAGAATCTCAGTGTGTTGAA AGTACTGAAGCACAACATATATCATCTCTGTACCATTCTGTACTAAAGCACTTGAGTCT AATAAATAAGAAATCAGCACCCCT
SEQ ID NO: 25 编码亚型 d 的 人 类 STXBP1(转 录变体 4)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCCAGCGCGCCACCTG AGGAGGCGGCGGGGTCCGACGGCGTTCGCGGGACGAGGAGATCGGAGCCGGGAGACTCGCG CAGCGCCATGGCCCCCATTGGCCCTCAAAGCTGTTGTGCGAGAGAGAAAGAGAAAGACTAC CTAGACATGTTGCTCCAGAGCAGAATTTCCAGCAGTAGATTGAACCTTCGGAGGCCGAGT CCCAGCCCAGTGTAACCTGAGATTATGCATGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGG GAATGGAAGGTGCTGGTGGTGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTGTCTCCTGCTGCAAG ATGACAGACATCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAG CCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCT CTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTC ACTGACTCTTGTCCAGATGCCCTGTTTAAATGAAGTGGTAAATCCCGAGCAGCCAAAGTC ATCAAACTCTGACGGAAATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCAGGTCTATTCC TTGACTCTGCTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTCAGATGAAGAAT CCTATACTGGAGCGCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCCTTGTGCCACCCTGAAGGAGTAC CCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAG GACAAGCTCGATGCCATATAAGCTGATGATCCAACAATGGGGGAGGGGCCAGACAAGGCA CGCTCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCTGTGTCTCCATGAA TTGACTTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAAATGATGTATACAAGTAT GAGACCAGCGGCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGAC CTGTGGATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTCACCCGGTCT CTGAAAGATTTTTCTTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGAC CTGTCCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACC CACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAACTCTGC CGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGATCAAGGACCCCT ATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAATGTCAGCACTTATGACAAAATCCGC ATCATCCTTCTCTACATCTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGAAAACCTGAACAACTG ATCCAGCACGCCCAGATACCCCGGAGGATAGTGAGATCATCACCACATGGCTCACCTC GGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTCGCCGGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAA CGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCACGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATG GAGGACACTATTGAGGACAACTTGACACCAAACTACCTTATATCTCTACCCGTTC TCTGCCTCCTTCAGCACCAACGCGCTCAGCGCCCGCTATGGGCAGTGCATAGAACAAG GCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCTCATCATTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGC CTGAATGAGATGCGCTGCGCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAGTGGGAGGTGCTG ATAGGTTCTACTCACATTCTTACTCCACCAAATTTCTCATGGACCTGAGACACCCCGAC TTCAGGGAGTCTCTAGGGTATCTTTTGAAGATCAGGCTCCAACAATGGAGTGAGAGCCA AAGAAACAAAGATCCACACACATCTCACCCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAAA CTGAATAAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAATAAGTCGCCCCCTCCAAAACACG CCCCATCCCACAGCGCTCCGCGAGCTTCCACCACCGCCCGCTCAGTTCTTTGCGTCT GTTGCCTCCCCAGCCCTGCACGCCCTGGCTGGCACTGTTGCCGCTGCATTCTCGTGTTCA GTGATGCCCTCTTCTGTTTGAACAAAAGAAAATAATGCATTGTGTTTTTTAAAGAG TATCTTATACATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCAATTGGTGCACAGCAGGAGAA

[0267]

	ATTTCTGGACTGTTAGGATGAATGGACGCCTTCTCCCCGTTATTTAAGATTTGTGACCTT GTACATAACCCTGGGTGACGTGCACATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTGT TTTTAAACCTTGTTTGGGGTTGTTCTGTCTTGTGAGAATCATAGAGATGTCTGTGT TCTTGGAGTATTTCACTGAGGACTAATCTGCTATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCA GTGCCTGCTCTCATCCAAATAACCTGGGAGGTGACAAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAA GGTGAACAGACCTCTTTGCCTTTCCCAGCGTCTCATACCCCCGGTAGTGCAGCTGTGGG TGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAGCGTCTCTCCACAGCCTGTCACTGC CCCCCCCCAGCCTGTGTCCACAGTGTGTGATCCCGAGGGAAGTCCCTCAGTCTAAGTC ACAGTGCCCTGACAGGTGAGAAGCAAACCTCCCGCTGGAAGCCTCCATCTCTTTGGAAAA CAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCAGGCCCTTCTGTCCCCAGGCATCATCCCAACAGCTC ATTTTCCCTAGTCCGCCTTCGTTCAAGGGTCAGGAATGGACCAGAACAGATGGGTTCTGG AGGCCCCCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTGGAGAAGGTTCTTGGCCCCGTTGGACTCACACA GACCCTGTACCCCTCTCGGCAAGCATCTTCAGTCAGATTATCTCAGTTTCAGATACTTCA TAATACCTTGTGTTGTGTGGGGTCATACATCATCGTGTGTGTAAGAGAAGATGGTCATTT TATTCTCTGTATAAACTTAGCTCTAAAGCAGAAACTAAAGCAGCAAATGCAGGAAGGCT GTCTCGCCATCCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATTCTCCAGTGGTGAGCACACCATTGTG CTGCTGCTGTTGTGCTGAAATATAATAACAGTGGAAGTCACAAAAATGTCCCCTGCCAG CCCCCTCGCCGCCCTTGACCTCCTGCAGGCCATGTGTATTACTTGTCTAGTGATGTCC TCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCTCGGCGCCACCTCCGCCTCCCTTTTCAGAGCCTGTCCC CGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGGTGTCTCTTCTCAAGGCTTTGAAATCTCCCCCTG CACTGAGATTAGTCGTGAGATCTCTCCCCGTCTCCCTCCCAACTTATACGACCTGATTTC CTTAGGACGGAACCGCAGGCACCTGCGCCGGGCGTCTTACTCCCGCTGCTTGTCTGTCC CCTCCCTCGGACCAAACAGTGCTCATGCTTCAGGACCTTGTGTTGTCGAAGATGTTGGTTT CCCTTTCTCTGTTATTTATATAAAAAATAATTTATCAAAAGGATATTTTAAAAAAGCTAGT CTGTCTTGAACTTGTTTACCTTAAATTATCAGAACTCAGTGTGTTGAAAGTACTGAAG CACAAACATATATCATCTCTGTACCATTCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAA GAAATCAGCACCCCT
SEQ ID NO: 26 编码亚型 d 的人类 STXBP1(转 录变体 5)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCCACCTG AGGAGGCGGCGGGGTCCGCGAGGCGTCTCGGGGACGAGGAGATCGGAGCGGGGAGACTCGCG CAGCGCCATGGCCCCCATTTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGGAGAGAGATATATACCTAGGAA TGGAGTTGCTGGATCTCTATGTTTGGTTATTTGAGGAGCTGCCGGCCTGTTTTCCACATC AGCTGTACCATTTTACATTCTCACCAGCAGTGCATGACGGTCCAGTGCCTTTTTATCTTA CTGCGCTTAAGGTGTAATTCCTTCTTTCTCAGACTGGACTGTAAATTCTTTGAGAGATTA TGCATGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGATC AGTTAAGCATGAGGATGCTGTCTCCTCTGTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCA TAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGTGT ATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGC CGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTCTTGTCCAGATGCCCTGT TTAATGAACTGGTAAATCCCAGCAGCCAAAGTCAATAAACTCTGACGGAAATCAATA TTGCATTTCTCCCGTATGAATCCCAGGTCTATTCTTTGGACTCTGCTGACTCTTTCCAAA GCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGC AGATCGCGACCCCTTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAAT ACAAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTG ATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCCAGACAAGGCACGCTCCCAGCTCCTGATCCTGGATC GAGGCTTTGACCCAGCTCCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGAGTTATG ATCTGCTGCCTATCGAAAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCGGCATCGGGGAGGCAC GGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCACAAGC ACATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTCACCCGCTCTCTGAAAGATTTTCTTCTAGCAAGA GAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGTCCCAGATGTGAAGAAGATGC CTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTA TGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAAACTCTGCCGAGTGAGAGCAGGACCTGGCCATGG GCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGATCAAGGACCCTATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGC TGGATGCCAATGTCAGCACTTATGACAAAATCCGCATCATCTTCTCTACATCTTTTGA AGAATGGCATCACGGAGGAAAACCTGAACAACTGATCCAGCAGCCCCAGATACCCCGG AGGATAGTGAGATCATCACCAACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTACCGATTCCA CGCTGCGTCTCGCGGAGCAAGCCGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGC TCTCACGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAACTTG ACACCAACACTACCCTTATATCTCTACCCGTTCTCTGCCTCCTTCAGCACCACCGCCG TCAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAAGGCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCC

[0268]

	CCCGCTCATCATTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCCTACG AGGTGACCCAGGCCAACGGAAGTGGGAGGTGCTGATAGGTTCTACTCACATTCTTACTC CCACCAAATTTCTCATGGACCTGAGACACCCCGACTTCAGGGAGTCTCTAGGGTATCTT TTGAGGATCAGGCTCCAACAATGGAGTGAGAGCCAAAGAAACAAAGATCCACACACATCC TCACCCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAGAAATAA GCAGTTAAAAAATAAGTCGCCCCCTCCAAAACACGCCCCCATCCACAGCGCTCCGCAGC TTCCACACCGCCCGCCTCAGTTCCTTTGCGTCTGTTGCCTCCCCAGCCCTGCACGCCC TGGCTGGCAGTGTGCGCTGCATTCTCGTGTTCAAGTGATGCCCTCTTCTGTTTGAAC AAAAGAAAATAATGCATTGTGTTTTTTAAAAAGAGTATCTTATACATGTATCCTAAAAAG AGAAGCTCATGTGCAATTGGTGCACAGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTTAGGATGAATGG ACGCCTTCTCCCCGTTATTTAAGATTTGTGACCTTGTACATAACCTTGGGTGACGTGCAC ATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAAACCTTGTGTTGGGGTTGTT CCTGTCCTTGTGAGAATCATAGAGATGTCTGTGTTCTTGGAGTATTTACACTGAGGAC TAATCTGCTATCTTCATTCCAGTCCCCTACCCCTCAGTGCCTGCTCTCATCCAAATACCT GGGAGGTGACAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACAGACCTCTTTGCCTTTC CCAGCGTCTCATACCCCGGTAGTGCAGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAG TCAGGCCAGCGTCTCCTCCACAGCCTGTCACTGCCCCCTCCCCAGCCTGTGTCCACAGT GCTGTGATCCCGAGGAAGTCTCCTCAGTCTAAGTCACAGTGCCCTGACAGGTGAGAAGCA AACTCCCGCTGGAAGCCTCCATCTCTTTGGA AAAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCCA GGCCCTTCTGTCCCCAGGCATCATCCCAACAGCTCATTTTCCCTAGTCCGCTTCGTTCA AGGGTCAGGAATGGACCAGAACAGATGGGTTCCTGGAGGCCCTGAACAGAGGGCTATGGC TGTGGAGAAGGTTCTTGGCCCGTTGGACTCACACAGACCCTGTACCCTCTCGGCAAGCAT CTTCAAGTCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATACCTTGTGTTGTGTGGGGTCA TACATCATCGTGTGTTGTAAGAGAAGATGGTCATTTTATCTCTGTATAAACTTAGCTCT AAAGCAGAACTAAAGCAGCAAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCATCCTCAAGACTCAGCA GCTCTCATTCTCCAGTGGTGAGCACACCATTGTGTCTGCTGTGTGCTGAAATATAA TAACAGTGGAAGTCACAAAAATGTCCCCTGCCAGCCCCCTCGCCGCCCTTGACCTCCTG CAGGCCATGTGTGATTACTTGTCTAGTGATGTCTCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCTCG GCGCCACCTCCGCTCCCTTTTCAGAGCCTGCTCCCCGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTG GTGTTCTCTTCTCAAAGCTTTGAAATCTCCCCTTGCACTGAGATTAGTCGTCAGATCTCT CCCCCTCTCCCTCCCACTTATACGACCTGATTTCCCTAGGACGGAACCGCAGGCACCTG CGCCGGGCGTCTTACTCCCGCTGCTTGTCTGTCCCCCTCCCTCGGACCAAACAGTGTCTCA TGCTTCAGGACCTTGTGTCGAAGATGTTGGTTTCCCTTTCTCTGTTATTTATATAAAA ATAATTTATCAAAGGATATTTTAAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAAACTTGTGTTACCTTAA AATTATCAGAATCTCAGTGTGTTGAAAGTACTGAAGCACAAACATATATCATCTCTGTACC ATTCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAAGAAATCAGCACCCCT
SEQ ID NO: 27 编码亚型 e 的人类 STXBP1(转 录变体 6)	AGAAAGAGGAAAGACAGGACCCGAGCGGGGTTTCAGGCAGATGGAGCGCGTCCGTAGCCT GTGGCCAGGGATCCCAGCACCGACGGGAAGAGGAGGCTGGGTACCCTGCGCCCCGGGC GCGCGCGGCGCGTGAGAGATTATGCATGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGAA TGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTGTCTCCTGCTGCAAGATG ACAGACATCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCG CTCCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTC ATCAGTGACTTTAAGGACCCGCCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACT GACTCTTGTCCAGATGCCCTGTTAATGAACTGGTAAAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATC AAAACTCTGACGGAATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCAGGTCTATTCCCTTG GACTCTGCTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCCT ATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCCTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCCG GCTGTGCGGTATCGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGAC AAGCTCGATGCCTATAAAGCTGATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGC TCCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCTGTGCTCCATGAATTG ACTTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAG ACCAGCGGCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTG TGGATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTCACCCGGTCTCTG AAAGATTTTCTTCTAGCAAGAGAAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTG TCCCAGATGCTGAAGAAGATGCCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCAC CTGCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAAACTCTGCCGA GTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGATCAAGGACCTATG CGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAATGTCAGCACTTATGACAAAATCCGCATC ATCCTTCTCTACATCTTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGAAAACCTGAACAAACTGATC

[0269]

	CAGCAGCCCCAGATACCCCCGGAGGATAGTGAGATCATCACCAACATGGCTCACCTCGGC GTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTCGCCGGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGC ATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCACGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAG GACACTATTGAGGACAACTTGACACCAAACTACCCTTATATCTCTACCCGTTTCCTCT GCCTCCTTCAGCACCACCGCCGTGAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAAGGCC CCAGGCGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCCTCATCATTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTG AATGAGATGCGCTGCGCCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAAGTGGGAGGTGCTGATA GGATCCACACACATCCTCACCACACAGAAACTGCTGGACACACTGAAGAAACTGAATAAA ACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAATAAGTCGCCCTCCAAAAACAGCCCCCATCC CACAGCGCTCCGAGCTTCCCACCACCGCCCGCCTCAGTTCCTTTGCGTCTGTTGCCTCC CCAGCCCTGCACGCCCTGGCTGGCACTGTTGCCGCTGCATTCTCGTGTTTCACTGATGCCC TCTTCTTGTTTGAACAAAAAGAAATAATGCATTGTGTTTTTAAAAAGAGTATCTTATA CATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCAATTGGTGACAGCAGGAGAAATTTCTGGA CTGTTAGGATGAATGGACGCTTCTCCCCGTTATTTAAGATTTGTGACCTTGTACATAAC CCTGGGTGACGTGCACATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAAC CTTGTTTGGGGTTGTTCTGTCTTGTGAGAATCATAGAGATGTCTGTGTTCTTGGAGT ATTTCACTGAGGACTAATCTGCTATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCCTGCT CTCATCCAAATAACCTGGGAGGTGACAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACA GACCTCTTTGCCTTTCCAGCGTCTCATACCCCGGTAGTGACAGCTGTGGGTGGAGGCTG GGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAGCGTCTCCTCCACAGCCTGTCACTGCCCCCTCCCC AGCCTGTGTCCACAGTGTGTGATCCCCAGGGAAGTCTCCAGTCTAAGTCACAGTGCCCC TGACAGGTGAGAAGCAAACTCCCGTGGAGCCTCCATCTCTTTGGAAAAACAGTTAGTC TGGAGCCTGTGGCCAGGCCCTTCTGTCCCCAGGCATCATCCCAACAGCTCATTTTCCCT AGTCCGCTTCGTTCAAGGGTCAGGAATGGACCAGAACAGATGGGTTCTGGAGGCCCTG AACAGAGGGCTATGGCTGTGGAGAAGGTTCTTGGCCCGTTGGACTCACACAGACCCTGTA CCCTCTCGGCAAGCATCTTCAGTCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATACCTT GTGTTGTGTGGGGTCATACATCATCGTGTTTGTAAAGAGAAGATGGTCATTTTATCTCTG TATAAACTTAGCTCTAAAGCAGAACTAAAGCAGCAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCA TCCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATTCTCCAGTGGTGAGCACACCATTTGTGCTGCTGCTG TTGTGCTGAAATATAATAACAGTGGAAGTCACAAAAATGTCCCTGCCAGCCCCCTCGC CGCCCTTGACCTCTGCAGGCCATGTGTGTATTACTTGTCTAGTGATGTCCTCTCAAAGT GCTGTACGCGAGCTCGGCGCCACCTCCGCTCCCTTTCAGAGCCTGCTCCCCGCCCTCTC TGCTCGCTGCATTGTGGTGTTCTCTTCTCAAGGCTTTGAAATCTCCCTTGCACTGAGAT TAGTCGTGATCTCTCCCGTCTCCCTCCCACTTATACGACCTGATTTCCTTAGGACG GAACCGCAGGCACCTGCGCCGGGCGCTTACTCCGCTGCTTGTCTGTCTGCTCCCTCGC GACCAACAGTGCTCATGCTTCAGGACCTTGTGTTGTCGAAGATGTTGGTTTCCCTTTCTC TGTTATTTATATAAAAAATAATTTATCAAAAGGATATTTAAAAAAGCTAGTCTGTCTTGA AAGTTGTTTACCTTAAATATCAGAATCTCAGTGTGTTGAAAGTACTGAAGCACAAACAT ATATCATCTCTGTACCATTCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAAGAAATCAGC ACCCCT
SEQ ID NO: 28 编码亚型 e 的人类 STXBP1(转 录变体 7)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCAGCGCGCCACCTG AGGAGGCGGCGGGGTCCGCGAGGCGTCGCGGGACGAGGAGATCGGAGCCGGGAGACTCGCG CAGCGCCATGGCCCCCATTTGGCCTCAAAGCTGTTGTCGGAGAGAGATATATACCTAGGAA TGGAGTTGCTGGATCTCTATGTTTGTTATTTGAGGAGCTGCCGGCCTGTTTTCCACATC AGCTGTACCATTTTACATTCTCACCAGCAGTGCATGACGGTCCAGTGCCTTTTTATCTTA CTGCGCTTAAGGTGTAATTCCTTCTTCTCAGACTGGACTGTAAATTCCTTGAGAGATTA TGCATGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGATC AGTTAAGCATGAGGATGCTGTCTCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCA TAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGTGT ATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGC CGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTCTTGTCCAGATGCCCTGT TTAATGAACTGGTAAATCCCAGCAGCCAAAGTCAATAAACTCTGACGGAAATCAATA TTGCATTTCTCCCGTATGAATCCCAGGTCTATTCCTTGGACTCTGCTGACTCTTTCCAAA GCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCTGGCAGAGC AGATCGCGACCTTTGTGCCACCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAAT ACAAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTG ATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCAGCTCCTGATCCTGGATC GAGGCTTTGACCCAGCTCCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGAGTTATG ATCTGCTGCCTATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCGGCATCGGGGAGGCAC

[0270]

	GGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCACAAGC ACATCGCAGAGGTGTCCAGGAAGTCACCCGGTCTCTGAAAAGATTTTTCTTCTAGCAAGA GAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGTCCAGATGCTGAAGAAGATGC CTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTA TGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAAACTCTGCCGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGG GCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGATCAAGGACCCATATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGC TGGATGCCAATGTCAGCACTTATGACAAAATCCGCATCATCCTTCTCTACATCTTTTTGA AGAATGGCATCACGGAGGAAAACCTGAACAAACTGATCCAGCACGCCAGATACCCCGG AGGATAGTGAGATCATCACCAACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCA CGCTGCGTCGCCGGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGC TCTCACGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAAACTTG ACACCAACACTACCTTATATCTCTACCCGTTCTCTGCCTCCTTCAGCACCACCGCCG TCAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAAGGCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCC CCCGCCTCATCATTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCCTACG AGGTGACCCAGGCCAACGGAAGTGGGAGGTGCTGATAGGATCCACACACATCCTCACCC CACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTT AAAAAAATAAGTCGCCCCCTCCAAAACACGCCCCCATCCACAGCGCTCCGCAGCTTCCCA CCACCGCCCGCCTCAGTTCCTTTGCGTCTGTTGCCTCCCCAGCCCTGCACGCCCTGGCTG GCACTGTTGCCGCTGCATTCTCGTGTTTCAGTGATGCCCTCTTCTTGTGTTGAAACAAAAGA AAATAATGCATTGTGTTTTTAAAAAGAGTATCTTATACATGTATCCTAAAAAGAGAAGC TCATGTGCAATTGGTGACAGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTTAGGATGAATGGACGCCCT TCTCCCGTTATTTAAGATTTGTGACCTTGTACATAACCCTGGGTGACGTGCACATCGCT TGGGTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAACCTTGTGTTGGGGTGTTCCTGTG CTTGTGAGAATCATAGAGATGTCTGTGTTCTTGGAGTATTTACACTGAGGACTAATCT GCTATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCCTGCTCTCATCCAAATAACCTGGGAGG TGACAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACAGACCTCTTTGCCTTTCCCAGCG TCTCATACCCCGGTAGTGCAGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGC CAGCGTCTCTCCACAGCCTGTCACTGCCCCCTCCCCAGCCTGTGTCTCACAGTGTCTGTG ATCCCGAGGGAAGTCTCCAGTCTAAGTCACAGTGCCTTGACAGGTGAGAAGCAAACCTCC CGCTGGAAGCCTCCATCTCTTTGGA AAAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCAGGCCCT TCTGTCCCCAGGCATCATCCCAACAGCTCATTTTCCCTAGTCCGCTTCGTTCAAGGGTC AGGAATGGACCAGAACAGATGGGTCTGGAGGCCCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTGGA GAAGGTTCTTGGCCCGTTGGACTCACACAGACCCGTACCCCTCTCGGCAAGCATCTTCAG TCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATACCTTGTGTTGTGTGGGGTCATACATC ATCGTGTTTGTAAAGAGAAGATGGTCATTTTATTCTCTGTATAAAACCTTAGCTTAAAGCA GAAACTAAAGCAGCAAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCATCCTCAAGACTCAGCAGCTCTC ATTCTCCAGTGGTGAGCACACCATTTGTGCTGCTGCTGTGTGCTGAAATATAATAACAG TGGAAGTCACAAAAATGTCCCTGCCAGCCCCCTCGCCGCCCTTGACCTCCTGCAGGCC ATGTGTGTATTACTTGTCTAGTGATGTCTCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCTCGGCGCCA CCTCCGCTCCCTTTCAGAGCCTGCTCCCCGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGGTGTTC TCTTCTCAAGGCTTTGAAATCTCCCTTGCCTGAGATTAGTCGTCAGATCTCTCCCGT CTCCCTCCCAACTTATACGACCTGATTTCCCTTAGGACGGAACCGCAGGCACCTGCGCCG GCGTCTTACTCCCGCTGCTTGTCTGTCTCCCTCCCTCGGACCAAAACAGTGCTCATGCTTC AGGACCTTGTGTTGTCGAAGATGTTGGTTTCCCTTTCTCTGTATTATATAAAAAATAATT TATCAAAAGGATATTTTAAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAAACTTGTGTTACCTTAAATAT CAGAATCTCAGTGTTTGAAGTACTGAAGCACAAACATATATCATCTCTGTACCATTCTG TACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAAGAAATCAGCACCCCT
SEQ ID NO: 29 编码亚型 e 的 人 类 STXBP1(转 录变体 8)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGCGGAGAGCTGCGGCTGCCAGCGCGCCACCTG AGGAGGCGGCGGGGTCCGCGAGGCTCGCGGGACGAGGAGATCGGAGCGGGAGACTCGCG CAGCGCCATGGCCCCCATTTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGGAGAGAGAAAGAGGAAGACTAC CTAGACATGTTGCTCCAGAGCAGAATTTCCAGCAGTAGATTGAACCTTCGGAGGCCGAGT CCCAGCCCAGTGTAAGTGAAGTATGATGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGG GAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTGTCTCCTGCTGCAAG ATGACAGACATCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAG CCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCACTCCATCCGGAAGTCCGTCACCTCT CTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGCTCTTCTTC ACTGACTCTTGTCCAGATGCCCTGTTTAAATGAAGTGGTAAATCCCGAGCAGCCAAAGTC ATCAAACTCTGACGGAATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCAGGTCTATTCC TTGGACTCTGCTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTCAGATGAAGAAT

[0271]

	CCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCTTTGTGCCACCCTGAAGGAGTAC CCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAG GACAAGCTCGATGCTTATAAAGCTGATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCCAGACAAGGCA CGCTCCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCCTGTGCTCCATGAA TTGACTTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAAATGATGTATACAAGTAT GAGACCAGCGGCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGACGACGAC CTGTGGATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCCCAGGAAGTCACCCGGTCT CTGAAAGATTTTTCTTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGAC CTGTCCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACC CACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAAACTCTGC CGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGATCAAGGACCCT ATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAATGTCAGCACTTATGACAAAATCCGC ATCATCCTTCTCTACATCTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGAAAACCTGAACAACTG ATCCAGCACGCCCAGATACCCCGGAGGATAGTGAGATCATCACCAACATGGCTCACCTC GGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTCGCGGAGCAAGCCGAGCGGAAGGAA CGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCACGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATG GAGGACACTATTGAGGACAAACTTGACACCAAACTACCCTTATATCTCTACCCGTTCC TCTGCCTCCTTCAGCACCCACCGCGCTCAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAAG GCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCCTCATCATTTTCATCCTTGCGGGTGTGAGC CTGAATGAGATGCGCTGCGCCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAGTGGGAGGTGCTG ATAGGATCCACACATCCTCACCCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAAT AAAACAGATGAAGAAATAAGCAGTTAAAAAAATAAGTCGCCCCTCCAAAACAGCCCCCA TCCCACAGCGCTCCGCAGCTTCCCACCACCGCCCGCCTCAGTTCTTTGCGTCTGTTGCC TCCCCAGCCCTGCACGCCCTGGCTGGCACTGTTGCCGCTGCATTCTCGTGTTCAGTGATG CCCTCTTCTTGTGTTGAAACAAAAGAAAATAATGCATTGTGTTTTTAAAAAGAGTATCTT ATACATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCAATTGGTGACAGCAGGAGAAATTTCT GGACTGTTAGGATGAATGGACGCCTTCTCCCCGTTATTTAAGATTTGTGACCTTGTACAT AACCTTGGGTGACGTGCACATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTGTTTTTAA AACCTTGTGTTGGGGTGTCTCTGTCTTGTGAGAATCATAGAGATGTCTGTGTTCTTG AGTATTTACACTGAGGACTAATCTGCTATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCCT GCTCTCATCAAATAACCTGGGAGGTGACAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGA ACAGACCTCTTTGCCTTTCCCAGCGTCTCATACCCCGGTAGTGACAGCTGTGGGTGGAGG CTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAGCGTCTCTCCACAGCCTGTCACTGCCCCCTC CCCAGCCTGTGTCCACAGTGCTGTGATCCCCGAGGGAAGTCCCTCCAGTCTAAGTCACAGTG CCCTGACAGGTGAGAAGCAAACTCCCGCTGGAAGCCTCCATCTCTTTGGAACCAAGTAA GTCTGGAGCCTGTGGCCAGGCCCTTCTGTCCCCAGGCATCATCCCAACAGCTCATTTTC CCTAGTCCGCCTTCGTTCAAGGGTCAGGAATGGACCAGAACAGATGGGTTCTGGAGGCCC CTGAACAGAGGGCTATGGCTGTGGAGAAGGTTCTTGGCCGTTGGACTCACACAGACCCT GTACCCTCTCGGCAAGCATCTTCAGTCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATAC CTTGTGTTGTGTGGGGTCATACATCATCGTGTGTTGTAAGAGAAGATGGTCATTTTATTCT CTGTATAAACTTAGCTCTAAAGCAGAACTAAAGCAGCAAATGCAGGAAGGCTGTCTCG CCATCCTCAAGACTCAGCAGCTCTCATTCTCCAGTGGTGAGCACACCATTTGTGCTGTG CTGTTGTGCTGAAATATAATAACAGTGGAAGTCACAAAAATGTCCCCTGCCAGCCCCCT CGCCGCCCTTGACCTCCTGCAGGCCATGTGTGTATTACTTGTCTAGTGATGTCTCTCAA AGTGCTGTACGCGAGCTCGGCGCCACCTCCGCCTCCCTTTCAGAGCCTGCTCCCCGCCCT CTCTGCTCGCTGCATTGTGGTGTCTCTTCTCAAGGCTTTGAAATCTCCCCTTGCACTGA GATTAGTCGTGATCTCTCCCCGTCTCCCTCCCACTTATACGACCTGATTTCCCTTAGG ACGGAACCGCAGGCACCTGCGCCGGGCGTCTTACTCCCGCTGCTTGTCTGTCCCCCTCCC TCGGACCAACAGTGCTCATGCTTCAGGACCTTGTGTTGTCGAAGATGTTGGTTTCCCTTT CTCTGTTATTTATATAAAAAATAATTTATCAAAGGATATTTAAAAAAGCTAGTCTGTCT TGAACTTGTGTTTACCTTAAATTTATCAGAATCTCAGTGTTTGAAAGTACTGAAGCACAAA CATATATCATCTCTGTACCATTCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAAGAAATC AGCACCCCT
SEQ ID NO: 30 编码亚型 e 的人类 STXBP1(转	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCCAGCGCGCCACCTG AGGAGGCGGCGGGGTCCGCAGGCGTCGCGGGACGAGGAGATCGGAGCGGGAGACTCGCG CAGCGCCATGGCCCCCATTGGCCTCAAAGCTGTTGTGCGGAGAGAGAAAGAGGAAGACTAC CTAGACATGTTGCTCCAGAGCAGAATTTCCAGCAGTAGATTGAACCTTCGGAGGCCGAGT CCCAGCCCAGTGTAAGTGGTAAAGAAGATTATGCATGATGTGATAAAGAAGGTCAAGAA GAAGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAGTTAAGCATGAGGATGCTGTCTCTCTG

[0272]

录变体 9)

CTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCATAACGATTGTGGAAGATATCAATAAGCG
 CAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCACTCCATCCGAGAAGTCCGT
 CCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCCGACTGCTAAATACCGGGCTGCACACGT
 CTTCTTCACTGACTCTGTCCAGATGCCCTGTTTAACTGGAATGGAATCCCGAGCAGC
 CAAAGTCATCAAACTCTGACGGAAATCAATATTGCATTTCTCCCGTATGAATCCCAGGT
 CTATTCTTGGACTCTGCTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAGTCCCCACAAGGCTCAGAT
 GAAGAATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGACCCTTTGTGCCACCCTGAA
 GGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGACAATGCCCTGTGGCTCAGCT
 AATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTGATGATCCAACAATGGGGGAGGGCCAGA
 CAAGGCACGCTCCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGACCCAGCTCCCCTGTGCT
 CCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCCTATCGAAAATGATGTATA
 CAAGTATGAGACCAGCGGCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGAGGTGCTCCTGGACGAGGA
 CGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGAGGTGTCCCAGGAAGTCAC
 CCGGTCTCTGAAAGATTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCAT
 GCGGGACCTGTCCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCAGAAAGGACTGCTCAAGTA
 CTCCACCCACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAA
 ACTCTGCCGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGATCAA
 GGACCCTATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAATGTCAGCACTTATGACAA
 AATCCGCATCATCCTTCTCTACATCTTTTTGAAGAATGGCATCACGGAGGAAAACCTGAA
 CAACTGATCCAGCACGCCAGATACCCCCGGAGGATAGTGAGATCATCACCACATGGC
 TCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTCGCGGAGCAAGCCGGAGCG
 GAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACTACCAGCTCTCAGGTGGACTCCGATTATCAAGGA
 CATCATGGAGGACACTATTGAGGACAACTTGACACCAAACTACCCTTATATCTCTAC
 CCGTTCTCTGCCTCCTTCAGCACACCACCGCCGTCAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCATAA
 GAACAAGGCCCCAGCGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCCTCATCATTTTTCATCCTTGGGGG
 TGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCCTACGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAAGTGGGA
 GGTGCTGATAGGATCCACACATCCTCACCCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAA
 ACTGAATAAAACAGATGAAGAATAAAGCAGTTAAAAAATAAGTCGCCCTCCAAAACAC
 GCCCCATCCACAGCGCTCCGCAGCTTCCCACCACCGCCCGCCTCAGTTCTTTTGCCTC
 TGTTGCCTCCCCAGCCCTGCACGCCCTGGCTGGCACTGTTGCCGCTGCATTCTCGTGTTT
 AGTGATGCCCTCTTCTGTTTGAACAAGAAAATAATGCATTGTGTTTTTTAAAAAGA
 GTATCTTATACATGTATCCTAAAAAGAGAAGCTCATGTGCAATTGGTGACAGCAGGAGA
 AATTTCTGGACTGTTAGGATGAATGGACGCCTTCTCCCCGTTATTTAAGATTTGTGACCT
 TGTACATAACCCTGGGTGACGTGCACATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTG
 TTTTAAAAACCTTGTGTTGGGGTTGTTCTGCTGCTTGTGAGAATCATAGAGATGTCTGTG
 TTCTTGAGTATTTCACTGAGGACTAATCTGCTATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTC
 AGTGCTGCTCTCATCCAAATAACCTGGGAGGTGACAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCA
 AGGTGGAACAGACCTCTTTGCCTTTCCAGCGTCTCATACCCCGGTAGTGCAGCTGTGG
 GTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGAAGTCAGGCCAGCGTCTCTCCTCCACAGCCTGTCACTG
 CCCCCTCCCCAGCCTGTGTCCACAGTGTGTGATCCCGAGGGAAGTCTCCAGTCTAAGT
 CACAGTGCCCTGACAGGTGAGAAGCAAACTCCCGCTGGAAGCCTCCATCTCTTTGGAAAA
 ACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCCAGGCCCTTCTGTCCCCAGGCATCATCCCAACAGCT
 CATTTTCCCTAGTCCGCCTTCGTTCAAGGGTCAGGAATGGACCAGAACAGATGGGTTCTG
 GAGGCCCTGAACAGAGGGCTATGGCTGTGGAGAAGGTCTTGGCCCGTTGGACTCACAC
 AGACCCTGTACCCTCTCGGCAAGCATCTTCAGTCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTC
 ATAATACCTTGTGTTGTGTGGGGTCATACATCATCGTGTGTAAGAGAAGATGGTCATT
 TTATTCTCTGTATAAACTTAGCTCTAAAGCAGAACTAAAGCAGCAATGCAGGAAGGC
 TGTCTCGCCATCCTCAAGACTCAGAGCTCTCATTCTCCAGTGGTGAGCACACCATTTGT
 GCTGCTGCTGTTGTGCTGAAATATAATAACAGTGAAGTCACAAAAATGTCCCCTGCCCA
 GCCCCCTCGCCGCCCTTGACCTCCTGCAGGCCATGTGTGATTACTTGTCTAGTGATGTC
 CTCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCTCGGCGCCACCTCCGCCCTCCCTTTCAGAGCCTGCTCC
 CCGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTGTGGTGTCTCTTCTCAAGGCTTTGAAATCTCCCTT
 GCACTGAGATTAGTCGTGATCTCTCCCCGTCTCCCTCCCACTTATACGACCTGATTT
 CCTTAGGACGGAACCGCAGGCACCTGCGCCGGCGTCTTACTCCCGCTGCTTGTCTGTCT
 CCCTCCCTCGGACCAACAGTGCTCATGCTTCAGGACCTTGTGTCGAAGATGTTGGTT
 TCCCTTCTCTGTTATTTATATAAAAAATAATTTATCAAAAGGATATTTAAAAAAGCTAG
 TCTGTCTTGAACCTGTTTACCTTAAATTTATCAGAATCTCAGTGTTTGAAGTACTGAA
 GCACAAACATATATCATCTCTGTACCATTCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAA
 AGAAATCAGCACCCCT

[0273]

SEQ ID NO:
31
编码亚型 f
的人类
STXBP1(转
录变体 10)

AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCCCAGCGCGCCACCTG
AGGAGGCGGCGGGGTCCGCGAGGCGTCGCGGGACGAGGAGATCGGAGCCGGGAGACTCGCG
CAGCGCCATGGCCCCCATTTGGCCTCAAAGCTGTTGTCGGAGAGAAGATTATGCATGATGT
GATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAGTTAAGCAT
GAGGATGCTGTCCTCCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCATAACGATTGT
GGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCAC
TCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCCGACTGCTAA
ATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTCTTGTCCAGATGCCCTGTTTAAATGAACT
GGTAAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAATCAATATTGCATTTCT
CCCGTATGAATCCCAGGTCTATTCTTGGACTCTGCTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAG
TCCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGAC
CCTTTGTGCCACCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGACAA
TGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCTATAAAGCTGATGATCCAAC
AATGGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCAGCTCCTGATCCTGGATCAGGGCTTTGA
CCCCAGCTCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGATTTATGATCTGCTGCC
TATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCGGCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGA
GGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGA
GGTGTCCCAGGAAGTCAACCGGTCTCTGAAAGATTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATAC
TGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGTCCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCA
GAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATT
CCAAGGCACCGTAGACAACTCTGCCGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGC
TGAGGGAGAGAAGATCAAGGACCTTATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAA
TGTCAGCACTTATGACAAAATCCGCATCATCTTCTCTACATCTTTTGAAGAATGGCAT
CACGGAGGAAAACCTGAACAACTGATCCAGCACGCCAGATAACCCCGGAGGATAGTGA
GATCATCACCACATGGCTCAGCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTCG
CCGGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCACGGTG
GACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAACTTGACACCAACA
CTACCCCTTATATCTCTACCCGTTCTGCTTCCCTCAGCACCACCGCCGTCAGCGCCG
CTATGGGCACTGGCATAAGAACAAGGCCCGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCCTCAT
CATTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCCTACGAGGTGACCCA
GGCCAACGGAAAGTGGGAGGTGCTGATAGGGGAATGGCCCTTCAGAACCTTGGCTAGGTG
ACATCAGAAGCTGCTTGTGTATGTAAGGAAAATGGGGCTTCTCCTAAGGATCCACACAC
ATCCTCACCCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAGAA
ATAAGCAGTTAAAAAATAAGTCGCCCCCTCCAAACACGCCCCCATCCACAGCGCTCCG
CAGCTTCCCACCACCGCCCGCTCAGTTCCCTTTCGCTCTGTTGCCTCCCGCCTGACG
GCCCTGGCTGGCACTGTTGCCGCTGCATTCTCGTGTTCAGTGATGCCCTCTTCTGTTTG
AAACAAAAGAAAATAATGCATTGTGTTTTTTAAAAAGAGTATCTTATACATGTATCCTAA
AAAGAGAAGCTCATGTGCAATTGGTGCACAGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTTAGGATGA
ATGGACGCCTTCTCCCCGTATTTAAGATTTGTGACCTTGACATAACCTGGGTGACGT
GCACATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAACCTTGTTTGGGGT
TGTTCTGTCTTGTGAGAATCATAGAGATGTCTGTGTTCTTGGAGTATTTCACTGA
GGACTAATCTGCTATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCCTGCTCTCATCCAAATA
ACCTGGGAGGTGACAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACAGACCTCTTTGCC
TTTCCCAGCGTCTCATACCCCGGTAGTGCAGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCAC
GAAGTCAGGCCAGCGTCTCCTCCACAGCCTGTCACTGCCCCCTCCCAGCCTGTGTCCA
CAGTGCTGTGATCCCGAGGGAAGTCTCAGTCTAAGTCACAGTGCCCTGACAGGTGAGA
AGCAAACTCCGCTGGAAGCCTCCATCTCTTTGGAAAAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGG
CCAGGCCCTTCTGTCCCCAGGCATCATCCCAACAGCTCATTTTCCCTAGTCCGCCCTCG
TTCAAGGGTCAGGAATGGACCAGAACAGATGGGTTCTGGAGGCCCTGAACAGAGGGCTA
TGGCTGTGGAGAAGGTTCTTGGCCCGTTGGACTCACACAGACCCTGTACCCTCTCGGCAA
GCATCTTCAGTCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATACCTTGTGTTGTGTGGG
GTCATACATCATCGTGTGTTGTAAGAGAAGATGGTCATTTTATTCTCTGTATAAACTTAG
CTCTAAAGCAGAACTAAAGCAGCAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCATCCTCAAGACTC
AGCAGCTCTCATTCTCAGTGGTGAGCACACCATTGTGCTGCTGCTGTTGTCGTGAAAT
ATAATAACAGTGGAAGTCACAAAAATGTCCCTGCCAGCCCCCTCGCCGCCCTTGACCT
CCTGCAGGCCATGTGTGATTACTTGTCTAGTGATGTCTCTCAAAGTGCTGTACGCGAG
CTCGGCGCCACCTCCGCTCCCTTTTCAGAGCCTGCTCCCCGCCCTCTCTGCTCGCTGCAT
TGTGGTGTCTCTTCTCAAGGCTTTGAAATCTCCCTTGCACTGAGATTAGTCGTGATGAT
CTCTCCCCGTCTCCCTCCCAACTTATACGACCTGATTTCTTAGGACGGAACCGCAGGCA

[0274]

	CCTGCGCCGGGCGTCTTACTCCCCTGCTTGTCTGTCCCTCCCTCGGACCAACAGTG CTCATGCTTCAGGACCTTGTGTTGTCGAAGATGTTGGTTCCCTTTCTCTGTTATTTATAT AAAAATAATTTATCAAAAGGATATTTTAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAAACTTGTTTACC TTAAATTATCAGAATCTCAGTGTTTGAAAGTACTGAAGCACAAACATATATCATCTCTG TACCATTCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAGAAATCAGCACCCCT
SEQ ID NO: 32 编码亚型 g 的 人 类 STXBP1(转 录变体 11)	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCCAGCGCGCCACCTG AGGAGGCGGCGGGGTCCGCAGGCGTTCGCGGACGAGGAGATCGGAGCCGGGAGACTCGCG CAGCGCCATGGCCCCATTGGCCTCAAAGCTGTTGTCGGAGAGAAGATTATGCATGATGT GATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAGTTAAGCAT GAGGATGCTGTCTCTCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCATAACGATTGT GGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCAC TCCATCCGAGAAGTCCGTCCACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCGACTGCTAA ATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTCTTGTCAGATGCCCTGTTTAATGAACT GGTAAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAAATCAATATTGCATTCT CCCGTATGAATCCAGGTCTATTCTTGGACTCTGCTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAG TCCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGAC CCTTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGACAA TGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCATAAAGCTGATGATCCAAC AATGGGGGAGGGCCAGACAAGGCACGCTCCAGCTCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGA CCCCAGCTCCCCGTGTCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCC TATCGAAAATGATGTATACAAGTATGAGACCAGCGGCATCGGGGAGGCACGGGTGAAGGA GGTGCTCCTGGACGAGGACGACGACCTGTGGATAGCACTGCGCCACAAGCACATCGCAGA GGTGTCCCAGGAAGTCACCCGGTCTCTGAAAGATTTTCTTCTAGCAAGAGAATGAATAC TGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGTCCCAGATGCTGAAGAAGATGCCTCAGTACCA GAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCCACCTGCACCTTGCTGAGGACTGTATGAAGCATTA CCAAGGCACCGTAGACAACTCTGCCGAGTGGAGCAGGACCTGGCCATGGGCACAGATGC TGAGGGAGAGAAGATCAAGGACCCTATGCGAGCCATCGTCCCCATTCTGCTGGATGCCAA TGTCAGCACTTATGACAAAATCCGACATCATCCTTCTCTACATCTTTTGAAGAATGGCAT CACGGAGGAAAACCTGAACAAACTGATCCAGCACGCCCAGATACCCCGGAGGATAGTGA GATCATCACCAACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCCACGCTGCGTCG CCGGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCAGCTCTCACGGTG GACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAAACTTGACACCAACA CTACCCTTATATCTCTACCCGTTCTCTGCCTCCTTCAGCACCAACCGCCGTCAGCGCCCG CTATGGGCACTGGCATAAGAACAAGGCCCCAGGCGAGTACCGCAGTGGCCCCCGCCTCAT CATTTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCCTACGAGGTGACCCA GGCCAACGGAAGTGGGAGGTGCTGATAGTGCCCGTGGAGGCGGGAAGCTGAGCCCGGCT CCCAGGAAGCACAGTGAGGGCTCAGCCATTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT GATGATGATGGTGTGATGATGATGATGCTGCTGCTGTTGACGATGAGTCCAAGCCAAGCCTG GGGAGAAAAGAATAAATAGTCTCATAAATTTAAAAAGCCCAATGCTCATCAAGAAGAGA ACAGATAAACTGTGTATTACCCAATGGTGAGTTTAAAGCAGTTAAAAATGCATGACACA CAGTTGCATATGTCAACATGAATAGATCTCAGACACTTAACAATGAGTGAAAAGAGCACA TTATGGGAGGACACAGACAGGATAGTGCATTTATATAAAGCTTCAATGTTGCAGGCTGAA AGAGTGAGGGTCTGATCAACTCAGTATCCTGGAGGCTACATGGGTAAACAGCAAACCTGT TCTCATAAATGCAGAATGTTGGCAAACCTGACAACTGCATCTGCCGCCAGAAGGAATGC GGAGGGCAGCCACTCCCTAAGCGCAGTTTTCTTGTGATTAGGTACATCTGAAGCCTGTTA GCAATAATGTGAACCTGTGATCAATTAAGCAGCTGACCAATCATTACCTCCTCTCCCTG CTCTTTCTACCCAGTAAATACAAAGGGCTGTAGAAGCTCAGAGCTGCTGCTTTTGCTCAG TAGAAGCAGGGAGTCCCTCTTCTTCTTCCCCGACCCCTTCTTTAAACAGTTTCTTTTA AGTTTTTCATTTCTGCGTTCATCCTCTTTCATTTCAGTCCCGTAGTAACCGTGGCAAACAC GGCACTTCAAACCTCATAAAAGCACCACATATTGCTTATTTGGATACATATGTTGTAA ATGTGTGAAAACATGCATGGGAATGACAAATACCAAAGTCAGGATAGTGACTGGCCATGG GGAAGGGATGGTTATTATTGTCGTCTTATATCTTCAATTCCAAATGAGCCACGGGCTTAA AAGTACTTCATTGAATAAAAAAAACCAACAATGTATTAATGCAA
SEQ ID NO: 33 编码亚型 h 的 人 类 STXBP1(转	AGTCGGTCCCTAGCGCGGCTGCGGGGCGGAGAGCTGCGGCTGGCCCAGCGCGCCACCTG AGGAGGCGGCGGGGTCCGCAGGCGTTCGCGGACGAGGAGATCGGAGCCGGGAGACTCGCG CAGCGCCATGGCCCCATTGGCCTCAAAGCTGTTGTCGGAGAGAAGATTATGCATGATGT GATAAAGAAGGTCAAGAAGAAGGGGGAATGGAAGGTGCTGGTGGTGGATCAGTTAAGCAT GAGGATGCTGTCTCTCTGCTGCAAGATGACAGACATCATGACCGAGGGCATAACGATTGT GGAAGATATCAATAAGCGCAGAGAGCCGCTCCCCAGCCTGGAGGCTGTGTATCTCATCAC

[0275]

录变体 12)	TCCATCCGAGAAGTCCGTCCTACTCTCTCATCAGTGACTTTAAGGACCCGCCGACTGCTAA ATACCGGGCTGCACACGTCTTCTTCACTGACTCTTGCCAGATGCCCTGTTTAATGAACT GGTAAAATCCCGAGCAGCCAAAGTCATCAAACTCTGACGGAAATCAATATTGCATTTCT CCCGTATGAATCCCAGGTCTATTCTTGGACTCTGCTGACTCTTTCCAAAGCTTCTACAG TCCCCACAAGGCTCAGATGAAGAATCCTATACTGGAGCGCCTGGCAGAGCAGATCGCGAC CCTTTGTGCCACCCTGAAGGAGTACCCGGCTGTGCGGTATCGGGGGGAATACAAGGACAA TGCCCTGCTGGCTCAGCTAATCCAGGACAAGCTCGATGCCTATAAAGCTGATGATCCAAC AATGGGGGAGGGCCAGACAAGGCAGCTCCAGCTCCTGATCCTGGATCGAGGCTTTGA CCCCAGCTCCCCTGTGCTCCATGAATTGACTTTTCAGGCTATGAGTTATGATCTGCTGCC TATCGAAAATGATGTATACAAGGAAGTCACCCGGTCTCTGAAAGATTTTTCTTCTAGCAA GAGAATGAATACTGGAGAGAAGACCACCATGCGGGACCTGTCCCAGATGCTGAAGAAGAT GCCTCAGTACCAGAAAGAGCTCAGCAAGTACTCCACCACCTGCACCTTGCTGAGGACTG TATGAAGCATTACCAAGGCACCGTAGACAAACTCTGCCGAGTGGAGCAGGACCTGGCCAT GGGCACAGATGCTGAGGGAGAGAAGATCAAGGACCCTATGCGAGCCATCGTCCCCATTCT GCTGGATGCCAATGTCAGCACTTATGACAAAATCCGCATCATCTCTCATCTCTTTT GAAGAATGGCATCACGGAGGAAAACCTGAACAACTGATCCAGCACGCCAGATACCCCC GGAGGATAGTGAGATCATACCAACATGGCTCACCTCGGCGTGCCCATCGTCACCGATTCT CACGCTGCGTCGCCGAGCAAGCCGGAGCGGAAGGAACGCATCAGCGAGCAGACCTACCA GCTCTCACGGTGGACTCCGATTATCAAGGACATCATGGAGGACACTATTGAGGACAACT TGACACCAAACTACTACCCTTATATCTTACCCGTTCTCTGCCTCCTTCAGACACCACCGC CGTCAGCGCCCGCTATGGGCACTGGCATAAGAACAAGGCCAGCGAGATCCGCACTGG CCCCCGCTCATCATTTTCATCCTTGGGGGTGTGAGCCTGAATGAGATGCGCTGCGCCTA CGAGGTGACCCAGGCCAACGGAAGTGGGAGGTGCTGATAGGTTCTACTCACATTCTTAC TCCCACCAAAATTTCTCATGGACCTGAGACACCCGACTTCAGGGAGTCTCTAGGGTATC TTTTGAGGATCAGGCTCCAACAATGGAGTGAGAGCCAAAGAAACAAAGATCCACACACAT CCTCACCCACAGAACTGCTGGACACACTGAAGAACTGAATAAAACAGATGAAGAAAT AAGCAGTTAAAAAATAAGTCGCCCCCTCCAAACACGCCCCCATCCACAGCGCTCCGCA GCTTCCACACCGCCCGCTCAGTTCCTTTGCGTCTGTTGCCTCCCCAGCCCTGCACGC CCTGGCTGGCACTGTTGCCGCTGCATTCTCGTGTTTCAAGTATGATGCCCTCTTCTGTTTGA ACAAAAGAAAATAATGCATTGTGTTTTTAAAAAGAGTATCTTATACATGTATCCTAAAA AGAGAAGCTCATGTGCAATTGGTGCACAGCAGGAGAAATTTCTGGACTGTTAGGATGAAT GGACGCCTTCTCCCCGTTATTTAAGATTTGTGACCTGTACATAACCTGGGTGACGTGC ACATTGCTTGGGTATGGAACGGTAGAAATTTGGGTGTTTTTAAAACTTGTGTTGGGGTTG TTCCTGTCTTGTGAGAATCATAGAGATGTCTGTGTTCTTGGAGTATTTACACTGAGG ACTAATCTGCTATCTTCATTCCAGTCCCTACCCCTCAGTGCCCTGCTCTCATCCAAATAAC CTGGGAGGTGACAATCAGGATATCTCAGGAGGTCCAAGGTGGAACAGACCTCTTGCCTT TCCCAGCGTCTCATACCCCGGTAGTGCAGCTGTGGGTGGAGGCTGGGGTGTCTGCACGA AGTCAGGCCAGCGTCTCCTCCACAGCCTGTCACTGCCCCCTCCCCAGCCTGTGTCCACA GTGCTGTGATCCCGAGGGAAGTCTCCAGTCTAAGTCACAGTGCCCTGACAGGTGAGAAG CAAATCCCGCTGGAAGCTCCATCTCTTGGAAAAACAGTTAGTCTGGAGCCTGTGGCC CAGGCCCTTCTGTCCCAGGCATCATCCCAACAGCTCATTTCCCTAGTCCGCCTTCGTT CAAGGGTCAGGAATGGACCAGAACAGATGGGTTCTGGAGGCCCTGAACAGAGGGCTATG GCTGTGAGAAGGTTCTTGGCCCGTTGGACTCACACAGACCCTGTACCCTCTCGGCAAGC ATCTTCAGTCAGATTATCCTCAGTTTCAGATACTTCATAATACCTTGTGTTGTGTGGGGT CATACATCATCGTGTGTTGTAAGAGAAGATGGTCATTTTATTCTCTGTATAAACTTAGCT CTAAAGCAGAACTAAAGCAGCAATGCAGGAAGGCTGTCTCGCCATCCTCAAGACTCAG CAGCTCTCATTCTCCAGTGGTGAGCACACCATTTGTGCTGCTGCTGTTGCTGCTGAAATAT AATAACAGTGGAAGTCACAAAAATGTCCCTGCCAGCCCCCTCGCCGCTTGCACCTCC TGCAGGCCATGTGTGATTACTTGTCTAGTGATGTCTCTCAAAGTGCTGTACGCGAGCT CGGCGCCACCTCCGCTCCCTTTAGAGCCTGCTCCCCGCCCTCTCTGCTCGCTGCATTG TGGTGTTCTCTTCTCAAGGCTTTGAAATCTCCCTTGCAGTGTGAGATTAGTCGTGAGATCT CTCCCCGTCTCCCTCCCACTTATACGACCTGATTTCTTAGGACGGAACCGCAGGCACC TGCGCCGGGCTCTTACTCCCGCTGCTTGTCTGTCCCCCTCCCTCGGACCAACAGTGCT CATGCTTCAGGACCTTGTGTCGAAGATGTTGGTTTCCCTTTCTCTGTTATTTATATAA AAATAATTTATCAAAAGGATATTTTAAAAAGCTAGTCTGTCTTGAAACTGTTTACCTT AAAATTATCAGAACTCAGTGTTTGAAGTACTGAAGCACAAACATATATCATCTCTGTA CCATTCTGTACTAAAGCACTTGAGTCTAATAAATAAAGAAATCAGCACCCCT
SEQ ID NO:	TTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAA TGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTGAGTGTACAACCAATTAACCAATTCTGAAC

[0276]

34 AAVtt DNA 序列	ATTATCGCGAGCCCATTATACCTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTGTTGCGTGGCGG CAGTAGCGCGGTGGTCCACCTGACCCCATGCCGAACTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGC CGATGGTAGTGTGGGGACTCCCCATGCGAGAGTAGGGAACTGCCAGGCATCAAATAAAAC GAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTGCGCCGGGCTAATTAGGGGGTGTGCGCCTTC GCTGAAGTCCTGTATTAGAGGTACGTGAGTGTTTTGCGACATTTTGCACACCATGTGG TCACGCTGGGTATTTAAGCCCCGAGTGAGCACGCAGGGTCTCCATTTTGAAGCGGGAGGTT TGAACGCGCAGCCGCCATGCCGGGGTTTTACGAGATTGTGATTAAGGTCCCAGCGACCT TGACGAGCATCTGCCGGCATTTCTGACAGCTTTGTGAAGTGGGTGGCCGAGAAGGAATG GGAGTTGCCGCCAGATTCTGACATGGATCTGAATCTGATTGAGCAGGCACCCCTGACCGT GGCCGAGAAGCTGCAGCGCGACTTTCTGACGGAATGGCGCCGTGTGAGTAAGGCCCCGGA GGCCCTTTTCTTTGTGCAATTTGAGAAGGGAGAGAGCTACTTCCACATGCACGTGCTCGT GGAAACCACCGGGGTGAAATCCATGGTTTTGGGACGTTTCTGAGTCAGATTCGCGAAAA ACTGATTCAAGAAATTTACCGCGGGATCGAGCCGACTTTGCCAACTGGTTCGCGGTAC AAAGACCAGAAATGGCGCCGAGGCGGGAACAAGGTGGTGGATGAGTGCTACATCCCAA TTACTTGCTCCCAAAACCCAGCTGAGCTCCAGTGGGCGTGGAATATGGAACAGTA TTTAAGCGCCTGTTTGAATCTCACGGAGCGTAAACGGTTGGTGGCGCAGCATCTGACGCA CGTGTCGACAGCGCAGGAGCAGAACAAGAGAATCAGAATCCCAATTCTGATGCGCCGGT GATCAGATCAAAAACCTTCAGCCAGGTACATGGAGCTGGTCCGGTGGCTCGTGGACAAGGG GATTACCTCGGAGAAGCAGTGATCCAGGAGGACCAGGCCTCATACATCTCCTTCAATGC GGCCTCCAACCTCGCGGTCCCAATCAAGGCTGCCTTGGAACATCGCGGAAAGATTATGAG CCTGACTAAAACCGCCCCGACTACCTGGTGGGCCAGCAGCCGTGGAGGACATTTCCAG CAATCGGATTTATAAAATTTTGAACATAACGGGTACGATCCCAATATGCGGCTTCCGT CTTTCTGGGATGGGCCACGAAAAAGTTCGGCAAGAGGAACACCATCTGGCTGTTTGGGCC TGCAACTACCGGGAAGACCAACATCGCGGAGGCCATAGCCACACTGTGCCCTTCTACGG GTGCGTAAACTGGACCAATGAGAAGTTTCCCTTCAACGACTGTGTGACAAGATGGTGAT CTGGTGGGAGGAGGGGAAGATGACCGCCAAGGTCGTGGAGTCGGCCAAAGCCATTCTCGG AGGAAGCAAGGTGCGCGTGGACCAGAAATGCAAGTCCTCGGCCAGATAGACCCGACTCC CGTGATCGTCACCTCCAACACCAACATGTGCGCCGTGATTGACGGGAACCTCAACGACTT CGAACACCAGCAGCCGTTGCAAGACCGGATGTTCAAATTTGAACTACCCGCGCTCTGGA TCATGACTTTGGGAAGGTCAACAAGCAGGAAGTCAAAGACTTTTTCCGGTGGGCAAAGGA TCACGTGGTTGAGGTGGAGCATGAATTCTACGTCAAAAAGGGTGGAGCCAAGAAAAGACC CGCCCCAGTGACGCAGATATAAGTGAGCCCAAACGGGTGCGCGAGTCAGTTGCGCAGCC ATCGACGTGACGCGGAAGCTTCGATCAACTACGCAGACAGGTACCAAAACAAATGTTT TCGTACGTGGGCATGAATCTGATGCTGTTTCCCTGCAGACAATGCGAGAGAATGAATCA GAATTCAAATATCTGCTTCACTCACGACAGAAAGACTGTTTAGAGTGCTTTCCGCTGTC AGAATCTCAACCCGTTTCTGTGCTCAAAAAGGCGTATCAGAACTGTGCTACATTCAATCA TATCATGGGAAGGTGCCAGACGCTTGCACTGCCTGCGATCTGGTCAATGTGGATTTGGA TGACTGCATCTTTGAACAATAAATGATTTAAATCAGGTATGGCTGCCGATGGTTATCTTC CAGATTGGCTCGAGGACACTCTCTCTGAAGGAATAAGACAGTGGTGGAAGCTCAAACCTG GCCCACCACCACAAAGCCCGCAGAGCGGCATAAGGACGACAGCAGGGGTCTTGTGCTTC CTGGGTACAAGTACCTCGGACCCCTTCAACGACTCGACAAGGGAGAGCCGCTCAACGAGG CAGACGCCGCGGCCCTCGAGCACGACAAAGCCTACGACCGGCAGCTCGACAGCGGAGACA ACCCGTACCTCAAGTACAACACGCGGACGCGGAGTTTCAGGAGCGCCTTAAAGAAGATA CGTCTTTTGGGGCAACCTCGGACGAGCAGTCTTCCAGGCGAAAAAGAGGATCCTTGAAC CTCTGGGCCTGGTTGAGGAACCTGTTAAGACGGCTCCGGGAAAAAGAGGCCGGTAGAGC ACTCTCCTGCCGAGCCAGACTCCTCCTCGGGAACCGGAAAGAGCGGCCAGCAGCCTGCAA GAAAAAGATTGAATTTTGGTCAGACTGGAGACGCAGACTCAGTACCTGACCCCGACCTC TCGGACAGCCACCAGCAGCCCCCTCTGGTCTGGGAACTAATACGATGGCTAGCGGCAGTG GCGCACCAATGGCAGACAATAACGAGGGCGCCGACGGAGTGGGTAATTCCTCGGGAAATT GGCATTGCGATTCCACATGGATGGGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAACCTGGG CCCTGCCCACCTACAACAACCACTCTACAAACAAATTTCCAGCCAATCAGGAGCCTCGA ACGACAATCACTACTTTGGCTACAGCACCCCTTGGGGGTATTTTGAATTCAACAGATTCC ACTGCCACTTTTACCACGTGACTGGCAAAGACTCATCAACAACAACTGGGGATTCCGAC CCAAGAGACTCAGCTTCAAGCTCTTTAACATTCAAGTCAAAGAGGTACGCAGAATGACG GTACGACGACGATTGCAATAAACCTTACCAGCACGGTTCAGGTGTTTACTGACTCGGAGT ACCAGCTCCCGTACGTCTCCTCGGCTCGGCGCATCAAGGATGCCTCCCGCCGTTCCAGCAG ACGTCTTCATGGTGCCACAGTATGGATACCTCACCTGAACAACGGGAGTCAGGCAGTAG GACGCTCTTCATTTTACTGCCTGGAGTACTTTCCTTCTCAGATGCTGCGTACCGGAAACA ACTTTACCTTCAGCTACACTTTTGGAGACGTTTCCTTCCACAGCAGCTACGCTCACAGCC
--	---

[0277]

	AGAGTCTGGACCGTCTCATGAATCCTCTCATCGACCAGTACCTGTATTACTTGAGCAGAA CAAACACTCCAAGTGGAACCAACACGATGTCAAGGCTTCAGTTTTCTCAGGCCGGAGCGA GTGACATTCGGGACCAGTCTAGGAACTGGCTTCCTGGACCCTGTTACCGCCAGCAGCGAG TATCAAAGACAGCCGCGGATAACAACAACAGTGACTACTCGTGGACTGGAGCTACCAAGT ACCACCTCAATGGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCCCCGGCCATGGCAAGCCACAAGG ACGATGAAGAAAAGTACTTTCTCAGAGCGGGGTTCTCATCTTTGGGAAGCAAGACTCAG GCAAAACAAATGTGGACATTGAAAAGGTCATGATTACAGACGAAGAGGAAATCAGGACAA CCAATCCCGTGGCTACGGAGCAGTATGGTTCTGTATCTACCAACCTCCAGAGCGGCAACA CCCAAGCAGCTACCAGCGATGTCAACACACAAGGCGTTCTTCCAGGCATGGTCTGGCAGG ACAGAGATGTGTACCTTCAGGGGCCCCATCTGGGCAAAGATTCCACACACGGACGGACATT TTCACCCCTCTCCCCTCATGGGTGGATTTCGGACTTAAACACCCTCCTCCACAGATTCTCA TCAAGAACACCCCGGTACCTGCGAATCCTTCGACCCTTCAGTGCGGCAAGTTTTGCTT CCTTCATCACACAGTACTCCACGGGACAGGTCAGCGTGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGA AGGAAAACAGCAAACGCTGGAATCCCGAAATTCAGTACACTCCAACCTACAACAAGTCTG TTAATGTGGACTTTACTGTGGACATTAATGGCGTGTATTACAGAGCTCCCGCCATTCGCA CCAGATACCTGACTCGTAATCTGTAATTGCTTGTTAATCAATAAACCGTTTAATTCGTTT CAGTTGAACTTTGGTCTCTGCGCGTCAAAAGGGCGACACAAAATTTATTCTAAATGCATA ATAAATACTGATAACATCTTATAGTTTTGTATTATATTTTGTATTATCGTTGACATGTATA ATTTTTCTAGAGCGGCCGAGATCTCAGCTGGATATCAAAAAGTATTTTCCCTTTATTA TTTTCGAGATTTATTTCTTAATTCTCTTTAACAACTAGAAATATTGTATATACAAAAA ATCATAAATAATAGATGAATAGTTTAATTATAGGTGTTTCATCAATCGAAAAAGCAACGTA TCTTATTTAAAGTGCCTTGCTTTTTTCTCATTTATAAGGTTAAATAAATCTCATATATCA AGCAAAGTGACAGGCGCCCTTAAATATTCTGACAAATGCTCTTTCCCTAAACTCCCCCA TAAAAAACCCGCCGAAGCGGGTTTTTACGTTATTTGCGGATTAACGATTACTCGTTATC AGAACC GCCCAGGGGCCCCGAGCTTAAGACTGGCCGTCGTTTTACAACACAGAAAGAGTT TGTAAGAACGCAAAAAGGCCATCCGTCAGGGGCTTCTGCTTAGTTTGATGCCTGGCAGT TCCCTACTCTCGCCTTCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTCGGCTG CGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGAT AACGCAGGAAAGAATGTGTAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCC GCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGC TCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGA AGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTT CTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTG TAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTGAGCCGACCGCTGCG GCCTTATCCGGTAATATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTG GCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTC TTGAAGTGGTGGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTG CTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACC GCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCT CAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGACGCGCGCGTA ACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGCTTGCGCCGTCCCGTCAAGTCAGCGTAATGCT CTGCTTTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAACTGCAATTTATTCATATCAGGATT ATCAATACCATATTTTGA AAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCA GTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAAT ACAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGT GACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAAC AGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAACCGTTATTCAATTCG TGATTGCGCTGAGCGAGGCGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGG AATCGAGTGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATC AGGATATTCTCTAATACCTGGAACGCTGTTTTTCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCA TGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGTGGCATAAATTCCGTCAG CCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTT CAGAAACAACCTTGCGCATCGGGCTTCCCATACAAGCGATAGATTGTGCGACCTGATTG CCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAA TCGCGGCTCGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATATTCTTCCTT
SEQ ID NO: 35 myc 标签	gagcagaaactcatctcagaagaggatctg

[illegible]

[0279]

42 探针 6-Fam/Zen /3'IB FQ	
SEQ ID NO: 43 STXBP1 肽	DNALLAQLIQDK
SEQ ID NO: 44 STXBP1 肽	YETSGIGEAR
SEQ ID NO: 45 STXBP1 肽	ISEQTYQLSR
SEQ ID NO: 46 STXBP1 肽 长亚型特异性	WEVLIGSTHILTPTK
SEQ ID NO: 47 STXBP1 肽 短亚型特异性	WEVLIGSTHILTPQK

实施例

[0280] 以下实施例举例说明本发明。

[0281] 实施例1:构建体设计、产生和克隆

[0282] 本研究中使用的质粒通过重组DNA技术构建。AAV顺式主链质粒从头合成并且含有两个AAV反向末端重复序列(ITR)、卡那霉素抗性表达盒、原核复制起点和SV40多腺苷酸化序列。利用便利克隆限制位点从头合成编码人类STXBP1(包含SEQ ID NO:7)的亚型变体X1的DNA序列。利用便利克隆限制位点从头合成个体启动子。人类流感血球凝集素(HA)或Myc标签(分别根据SEQ ID NO:33和32)合成为来自Integrated DNA Technologies™(Coralville, IA, USA)的寡核苷酸并且插入于氨基或羧基端处。测试人类STXBP1基因的七个不同启动子(MECP2-内含子、MECP2、hNSE、CamKII、hSyn、hSTXBP1p、CAG)。

[0283] 设计的构建体的示意图示于图3中。在该图中,“prom”意指启动子;“INT”意指内含子,“h”意指人类,SV40意指多腺苷酸化序列SV40;“标签”意指位于构建体的N端或C端的HA或Myc标签。

[0284] 实施例2:评估不同启动子下的STXBP1表达

[0285] 细胞培养

[0286] 人源性AD-HEK293(Agilent Technologies™, Santa Clara, CA, USA)和小鼠源性Neuro-2A(ATCC™, Manassas, VA)细胞系在DMEM+10% FBS+1%青霉素/链霉素(均来自Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA)中传代。如先前描述通过将生长培养基补充10μM视黄酸(MilliporeSigma™, Burlington, MA, USA),使Neuro-2A细胞分化72小时(Tremblay, R.G.等人2010)。根据制造商方案使用X-tremeGene 360转染试剂(Roche, Mannheim, Germany)转染细胞。还包括用对照质粒进行的对照转染。

[0287] 免疫荧光和显微术

[0288] 成像实验在装备有40×物镜和Hamamatsu Orca 4急速冷却单色相机(Hamamatsu Photonics KKTM, Hamamatsu City, Japan)的Zeiss Axio Observer 7落射荧光显微镜(Carl Zeiss AGTM, Oberkochen, Germany)上执行。经转染的AD-HEK293和Neuro-2A细胞用4%三聚甲醛(Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, 19440)固定,并且用兔多克隆抗STXBP1(MilliporeSigmaTM, Burlington, MA, USA)以1:500染色。细胞随后在成像之前用与Alexa Fluor 488缀合的1:1,000的驴抗兔二抗进行染色。

[0289] 图4: (A) 用抗STXBP1抗体检测的用各种启动子(CAG、MECP2和MECP2-内含子)驱动的hSTXBP1质粒转染的AD-HEK293细胞的免疫荧光成像。(B) 放大部分显示STXBP1定位至细胞膜。AD=粘附, NC=阴性对照。

[0290] 如图4中所示, 经转染的细胞证明在普遍存在的CAG启动子或神经特异性启动子(MECP2和MECP2-内含子)驱动下人类STXBP1转基因的不同表达水平。

[0291] 如图5中所示, 还分析用普遍存在的CAG启动子和神经特异性启动子(MECP2和MECP2-内含子)驱动的STXBP1质粒转染的Neuro-2A转染细胞。

[0292] 图5: (A) 用抗STXBP1抗体检测的用各种启动子(CAG、MECP2和MECP2-内含子)驱动的hSTXBP1质粒转染的Neuro-2A细胞的免疫荧光成像。(B) 放大显示STXBP1定位至细胞膜。NC=阴性对照。

[0293] STXBP1为与一组膜相关蛋白质相互作用的胞质蛋白质。经转染的AD-HEK293和Neuro-2A的放大图像显示, 如所预期, 从这些质粒表达的STXBP1定位至质膜(图4(B))或神经突和质膜两者(图5(B))。

[0294] 蛋白质印迹分析

[0295] 根据制造商说明书, 在含有1X Halt蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物(Thermo Fisher ScientificTM, Waltham, MA, USA)的1X细胞裂解缓冲液(Cell Signaling TechnologyTM, Danvers, MA, USA)中收获经转染的AD-HEK 293细胞。将补充有10%还原剂的十二烷基硫酸锂(LDS)样品缓冲液(均为Thermo Fisher ScientificTM, Waltham, MA, US)添加至蛋白质裂解产物中至最终浓度1X。样品通过1D SDS-PAGE凝胶电泳解析。对于各样品, 每个泳道上样30μg蛋白质。使用半干式转移设备(Bio-Rad LaboratoriesTM, Hercules CA)将蛋白质转移至硝化纤维素膜(Li-Cor BiosciencesTM, Lincoln, NE, USA)。在转移之后, 膜在室温下在封闭溶液(Li-Cor BiosciencesTM, Lincoln, NE, USA)中孵育1小时。膜随后与含有一抗的封闭溶液在4°C下孵育过夜。以下一抗用于此分析: 1:1,000的兔多克隆抗STXBP1(MilliporeSigmaTM, Burlington, MA, USA)、1:1,000的山羊多克隆抗STXBP1(Abnova, Taoyuan, Taiwan, PRC)、1:1,000的兔多克隆抗c-myc(MilliporeSigmaTM, Burlington, MA, USA)、1:1,000的兔单克隆抗HA(Cell Signalling TechnologyTM, Danvers, MA, USA)、1:1,000的小鼠单克隆抗GAPDH(MilliporeSigmaTM, Burlington, MA, USA)。将膜用PBST溶液洗涤三次, 在室温下放置在含有适用于在远红光谱上检测的IRDye680RD驴抗山羊或IRDye 680RD驴抗兔二抗或800CW驴抗小鼠(1:15,000; Li-Cor BiosciencesTM, Lincoln, NE, USA)的封闭溶液中1小时。使用Li-Cor Odyssey CLx远红成像器(Li-Cor BiosciencesTM, Lincoln, NE, USA)可视化蛋白质。

[0296] 还原条件下STXBP1单体的分子质量预测为约70kDa, 并且通过蛋白质印迹检测蛋白质为单体。使用GAPDH的检测作为上样对照。这些结果显示, 通过分化的Neuro-2A中的各

种启动子实现稳健表达(图6)。

[0297] 图6:用各种启动子(CAG、MECP2和MECP2-内含子)驱动的hSTXBP1转染的Neuro-2A细胞的蛋白质印迹分析。显示了各条件的两个技术重复。NC=阴性对照,1=MECP2-内含子-hSTXBP1,2=CAG-hSTXBP1,3=MECP2-hSTXBP1。

[0298] 这些结果还显示,通过由CAG启动子驱动的N端和C端标记的构建体实现稳健表达(图7)。

[0299] 图7:以下的蛋白质印迹分析:(A)用抗Myc抗体检测的AD-HEK293细胞中由CAG启动子驱动并经Myc标记的hSTXBP1;和(B)用抗HA抗体检测的AD-HEK293细胞、SH-SY5Y细胞和Neuro-2a细胞中由hSYN启动子驱动并经HA标记的hSTXBP1。显示了各条件的两个技术重复。(C)还使用抗STXBP1抗体检测AD-HEK293细胞中的经表位标记的蛋白质。NC=阴性对照,1=CAG-hSTXBP1-Myc,2=CAG-Myc-hSTXBP1,3=hSYN-HA-hSTXBP1。(A)中NC泳道中的背景蛋白质条带归因于抗Myc抗体对内源性Myc的检测。

[0300] 实施例3:天然存在的变体和病理性变体鉴别和分析

[0301] ClinVar数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)是一个带有支持性证据的可免费访问的关于人类变异和表型之间的关系的报告的公共档案,其用于使用搜索项“STXBP1”和“病原性”或“可能病原性”来寻找以鉴别STXBP1基因变体。病原性变体的列表由发表在科学同行综述文献中的突变补充,并且由PubMed(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>)搜索使用搜索项“STXBP1、Munc18、变体、突变”进行手动管理并且由作者将其定义为病原性,以鉴别ClinVar中未报道的额外STXBP1病原性变体。

[0302] 接着鉴别导致STXBP1蛋白发生变化的病理性变体和可能病理性变体。(分别为表5和6)。

[0303] 表5:

[0304]

病理性变体(相对于 SEQ ID NO: 9) 蛋白质改变	
R190Q	Y531*
C516*, C549*, C552*, C538*	M294fs, M316fs, M327fs, M330fs
D371fs, D385fs, D382fs, D349fs	N489fs, N511fs, N522fs, N525fs
D76H, D90H	R278P, R289P, R292P
E12fs	R464fs, R428fs, R450fs, R461fs
E221fs, E218fs, E207fs	R388*
E273*	R100fs
E384*, E406*, E417*, E420*	C354Y
E39*, E53*	S533fs
F115fs	P480L
G193V	H245D
K340fs, K307fs, K329fs, K343fs	A297T
P125Q, P136Q, P139Q	C354R
Q203*	C366fs
R551H	D224fs
S155fs, S141fs, S152fs	E299fs, E302fs, E266fs, E288fs
S89fs	E302*
W478*	E337fs, E304fs, E326fs, E340fs

[0305]

Y198*, Y209*, Y212*	F237fs
Y198*, Y209*, Y212*	G222fs, G233fs, G236fs
Y266*	G507E, G540E, G543E, G529E
E27*	I393fs
E418*, E407*, E421*, E385*	I490fs
E527*, E516*, E530*, E494*	I50fs
E67*, E81*	I539del
G508C, G530C, G541C, G544C	K196*
G544D	K328fs, K364fs, K350fs, K361fs
H498fs, H462fs, H495fs, H484fs	K447fs, K458fs, K461fs, K425fs
I232fs	K98fs, K84fs
K111fs, K122fs, K125fs	L130fs
M252fs	L36*
M443R	L87fs, L73fs
Q336*	N134fs
S440*, S462*, S473*, S476*	P433fs
V84D	Q250*
Y330fs, Y344fs, Y308fs, Y341fs	Q338*
Y519*	Q359*
C180Y	Q558*
R122*	Q576fs
R292H	R157fs, R168fs, R171fs
R190W	R500fs, R522fs, R533fs, R536fs
R406C	R522fs, R500fs, R533fs, R536fs
R235Q	R551L

[0306]

R235*	R551P
G544V	S292fs, S328fs, S314fs, S325fs
K461fs	S300fs
R551C	S42fs
R367*, R331*, R353*, R364*	T504fs
E470*	W28*
W522*	W563*
A214fs	Y140*
G319fs	Y344*, Y322*, Y355*, Y358*
G544fs	Y402fs
R292L	Y551*, Y554*, Y518*, Y540*
Y250*, Y261*, Y264*	S476*
K120fs	E283K
I88fs	H523fs
	Q229*

[0307] 表6:

[0308]

可能病理性变体(相对于 SEQ ID NO: 9) 蛋白质改变	
G530R, G541R, G508R, G544R	S28Y, S42Y
H311D, H333D, H347D, H344D	Y75C
T129P	R406H, R370H, R403H, R392H
A102del, A88del	L426P
D248Y, D259Y, D262Y	E171G, E182G, E185G
H89P, H103P	E207fs, E218fs, E221fs

[0309]

K194fs, K205fs, K208fs	L390R, L412R, L423R, L426R
L41Q, L27Q	A517S
P65L, P79L	E487D
Y145H	G236D
W274R, W285R, W288R	H293Y
R406L	I232N
R551S	I390V
P139L	I485N
R403G, R392G, R370G, R406G	L256P
T361I	L291P
K32E, K46E	P335S
E455del, E477del, E488del, E491del	T570A
P444S, P466S, P477S, P480S	N548D
Y358fs	T248I

[0310] STXBP1基因变体可包括错义突变,导致氨基酸取代。举例而言,表5中的R190Q意指相对于SEQ ID NO:9在位置190处的精氨酸被谷氨酰胺置换。

[0311] 还可发生其他突变。所鉴别的一种类型突变为涉及核苷酸插入或缺失的突变,其中改变的碱基对的数目不可被三整除而产生新氨基酸序列,移码,指示为“fs”。如果突变破坏正确阅读框架,则将不正确地读取突变之后的整个DNA序列。举例而言,表5中的E12fs意指相对于SEQ ID NO:9在位置12处的谷氨酸由于核苷酸的移码而改变,从而产生具有不正确氨基酸序列的异常蛋白质。

[0312] 变体中发现的另一类型突变为DNA水平的突变,其移除蛋白质中的一个或多个氨基酸残基。此类型突变在表中指示为缺失(del)。举例而言,表5中的I539del意指移除参考SEQ ID NO:9在位置539处的异亮氨酸。

[0313] 其他突变包括引入终止密码子,由星号(*)指示,这意指蛋白质的翻译在此位置处停止,产生缩短或截短的蛋白质。举例而言,表5中的Y531*意指终止突变发生在参考SEQ ID NO:9通常编码酪氨酸531的密码子中,从而终止蛋白质在此位置处的翻译。

[0314] 使用查询项“STXBP1”,健康群体中天然存在的变体源于gnomAD(基因组聚集数据库-<https://gnomad.broadinstitute.org/v2.1.1>),其为一个公开可得的对照数据集,含有来自无关个体的60,146个样品的遗传信息。从对照数据集提取的变体包括引起氨基酸变化的错义、起始丢失和终止获得变体。引起氨基酸变化的天然存在的变体报道于表7中。

[0315] 表7:

天然存在的变体(相对于 SEQ ID NO: 9)				
Ala113Thr	Asp207Asn	Ile289Val	Pro67Leu	Val84Ile
Ala181Asp	Asp210Asn	Ile450Val	Pro94Leu	Val9Ile
Ala389Ser	Asp436Gly	Ile490Thr	Pro95Leu	Ala514dup
Ala430Thr	Asp49His	Leu169Met	Ser149Phe	Phe595LeufsTer30
Ala444Val	Asp586Asn	Leu414Ser	Ser328Thr	Val593TyrfTer32
[0316] Ala514Thr	Asp597Asn	Lys161Arg	Ser533Thr	
Ala527Thr	Gln154His	Lys25Asn	Ser70Thr	
Arg100Gln	Gln338Arg	Lys277Arg	Thr129Ile	
Arg100Trp	Glu12Asp	Lys314Asn	Thr401Ile	
Arg171His	Gly222Ser	Lys364Arg	Thr419Met	
Arg192Gln	Gly520Val	Met15Val	Thr455Met	
Arg305Gln	Gly529Ser	Met38Thr	Thr588Ile	
[0317]	Arg305Trp	His16Arg	Met602Val	Tyr519Cys
	Arg457Cys	His357Pro	Phe91Leu	Val104Ile
	Arg505Cys	Ile168Val	Pro434Leu	Val448Met
	Arg583Ser	Ile271Val	Pro462Leu	Val451Ile
	Arg64Cys			
	Asn398Ser			
	Asn548Ser			

[0318] 实施例4:病毒颗粒的产生

[0319] AAV产生

[0320] 通过ATUM™(Newark, CA, USA) 从头合成含有AAV2 Rep序列,接着AAV9.hu14(下文为AAV9) 或AAV-真型(下文为AAVtt)衣壳序列(分别根据SEQ ID NO:17和34)的反式质粒。AAV辅助质粒pALD-X80购自Aldevron, LLC™(Fargo, ND, USA)。

[0321] 通过三重转染方法产生非复制AAV载体。在摇瓶中以 3.0×10^5 - 5.5×10^5 个细胞/毫升的接种密度,使用Expi293表达培养基(Thermo Fisher™, Waltham, MA, USA) 每3-4天传代Expi293细胞(Thermo Fisher™, Waltham, MA, USA)。Expi293细胞在设定在37℃与5%CO₂下的Eppendorf培养箱中在定轨震荡器上以125rpm培养。为了设置生产培养瓶,125mL摇瓶在

转染前一天以 1.5×10^5 个细胞/毫升接种,每个病毒制剂总体积为30-66mL。使用Vi-Cell Blu(Beckman Coulter™,Pasadena,CA,USA) 计算活细胞密度。

[0322] 针对具有30mL工作体积的生产培养瓶,各培养瓶如下产生转染复合物:在1.5mL OptiPR0无血清培养基(Thermo Fisher™,Waltham,MA,USA) 中稀释180μL 1mg/mL聚乙烯亚胺(PEI)MAX(Polysciences Inc™,Warrington,PA,USA),在设定8下涡旋四次并且在室温下孵育5分钟。分别地,在1.5mL OptiPR0无血清培养基中稀释20μg顺式质粒(如表10中所指示)、30μg Rep/Cap质粒(AAV9或AAVtt)和40μg辅助质粒(pALD-X80),在设定8下涡旋四次并且在室温下孵育5分钟。接着将此两种混合物合并,在设定8下涡旋四次,并且在室温下孵育15分钟。随后将转染复合物添加至含有细胞的摇瓶中。在37℃下在以125rpm恒定搅动下将细胞与转染混合物一起培养。

[0323] 在96小时之后,培养瓶加标浓缩的AAV裂解缓冲液至最终浓度为1X(150mM NaCl、120mM Tris-HCl[pH=8.0]、2mM MgCl₂、0.1%Triton X-100)和核酸酶(MilliporeSigma™,Burlington,MA,USA)至最终浓度为50U/mL。在37℃下在以125rpm恒定搅动下孵育此混合物1小时。通过在23℃下在 $2,880 \times g$ 下离心10分钟使混合物澄清。将样品储存于-80℃下直至进一步分析。

[0324] AAV效价确定

[0325] 从-80℃取出各样品并且使其在室温下解冻15分钟。一旦将样品解冻,即将其短暂涡旋并且离心一分钟。在此之后,将10μL样品添加至96孔PCR板的个体孔中,与10X DNA酶缓冲液、50U DNA酶和无DNA酶水(均来自Promega™,Madison,WI,USA)组合,各孔中的总体积为100μL。

[0326] 随后将板转移至Bio-Rad™(Hercules,CA,USA)热循环仪并且在37℃下加热30分钟,随后冷却至4℃。随后如表8中所描述连续稀释样品。

[0327] 表8:

稀释步骤	中间稀释因子	中间样品	中间体积(μL)	稀释体积(μL)	总体积(μL)	总稀释因子
D0	10	经 DNA 酶处理的样品	100	NA	100	10
D1	1.5	D0	100	50	150	1.5×10^1
D2	10	D1	10	90	100	1.5×10^2
D3	10	D2	10	90	100	1.5×10^3
D4	10	D3	10	90	100	1.5×10^4
D5	10	D4	10	90	100	1.5×10^5

[0329] 五(5)μL稀释液D2、D3、D4和D5与20μL ddPCR主混合物混合至最终浓度为1X,所述主混合物由Supermix for Probes(无dUTP;Bio-Rad™,Hercules,CA,USA)、正向引物GATCCAGACATGATAAGATACATTG(SEQ ID NO:40)、反向引物GCAATAGCATCACAATTTCAC(SEQ ID NO:41)、探针6-Fam/Zen/3'IB FQ:TGGACAAACCACAACCTAGAATGCA(SEQ ID NO:42)和无DNA酶水组成。此引物集合靶向转基因的SV40多聚A区。各样品在96孔PCR板中一式两份地操作。

[0330] 用箔片覆盖物热密封板,脉冲涡旋,并且以 $1,000 \times g$ 离心5分钟。将板放置在Bio-Rad™ QX-200液滴产生器中并且根据制造商说明书产生液滴。

[0331] 在液滴产生之后,使用箔片覆盖物热密封板并且放置在经程序化以运行表9中所描述的循环的BioRad™热循环仪中。

[0332] 表9:

PCR扩增设定(所有升温均设定为2.5°C/秒)			
循环步骤	温度	持续时间	循环数目
酶活化	95°C	10分钟	1
[0333] 变性	95°C	30秒	39
退火/延伸	56°C	1分钟	
酶失活	98°C	10分钟	1
保持	4°C	无限	1

[0334] 完成后,根据制造商说明书将板放置在Bio-Rad™ QX200液滴中进行液滴读取。载体基因组的浓度(VG/mL)使用下式进行定量:

[0335] $VG/ML: X = [(aY) (1000/b)] D$, 其中:

[0336] X为VG/mL;

[0337] a为ddPCR反应体积(25μl);

[0338] Y为每微升的ddPCR拷贝读数;

[0339] b为ddPCR中的稀释剂载体的体积(5μL);

[0340] D为施加至测试材料的总稀释度。

[0341] 测定接受标准如下定义:

[0342] 重复之间的%CV必须≤15%;如果>15%,则可省略一个离群值。如果省略一个离群值并且%CV仍然>15%,则必须重复测定。稀释内的%CV必须≤20%并且报告的稀释度必须是至少两个连续稀释度。如果%CV>20%,则可省略一个稀释度,只要所报告的稀释度为至少两个连续稀释度。如果平均稀释度仍>20%,则必须重复测定。各反应孔必须具有≥1,000个可接受的液滴。如果<10,000个液滴,则将从分析中排除该孔。

[0343] 通过AAV衣壳ELISA定量病毒颗粒

[0344] 根据制造商说明书,通过ELISA试剂盒(PROGEN™ Biotechnik GmbH, Heidelberg, Germany)确定病毒颗粒效价。对于AAV9,小鼠单克隆ADK9抗体用于捕获和检测步骤两者。对于AAVtt, A20R单克隆抗体用于捕获和检测步骤两者。在各步骤之间使用Molecular Devices™ (San Jose, CA, USA) AquaMax 4000微板洗涤器在所提供的1X分析缓冲液(ASB)中进行洗涤。用Molecular Devices™ SpectraMax M5e读板器检测样品。从标准曲线内推衣壳效价并且报告于表10中。

[0345] 表10:

顺式质粒	衣壳	总病毒颗粒(VP)	衣壳效价(VP/mL)	总病毒基因组(VG)	病毒基因组效价(VG/mL)
MECP2-hSTXBP1	AAV9	2.15E+13	7.17E+11	7.77E+11	2.59E+10
[0346] MECP2- 内含子-hSTXBP1	AAV9	1.94E+13	6.47E+11	6.72E+11	2.24E+10
MECP2-hSTXBP1	AAVTT	6.72E+12	2.24E+11	6.06E+11	2.02E+10
MECP2- 内含子-hSTXBP1	AAVTT	4.38E+12	1.46E+11	5.04E+11	1.68E+10

[0347] 通过ddPCR获得的病毒基因组效价和通过ELISA获得的衣壳效价指示可成功地产生AAV9和AAVtt病毒颗粒,所述病毒颗粒包含病毒载体,所述病毒载体具有包含可操作地连接至人类STXBP1转基因的所指示启动子的核酸。

[0348] 实施例5:NGN2分化的谷氨酸能神经元中STXBP1表达盒的慢病毒表达

[0349] 携带DOX诱导性NGN2表达盒的基因编辑iPSC株系 (EBiSC, Ref: B10Ni010-C-13) 用于产生iPSC来源的谷氨酸能神经元。在此方案中, NGN2转录因子通过多西环素诱导9天以引发神经元分化。在分裂 (DIV) 21, iPSC来源的NGN2神经元在hSyn或MECP2启动子的控制下用表达人类STXBP1 (SEQ ID NO: 9) 的慢病毒载体的连续稀释液转导。慢病毒载体使用第三代系统在HEK 293细胞中产生以提高安全性。在DIV28, 如下进行免疫细胞化学 (ICC) 分析: 将细胞用2%三聚甲醛固定并且用一抗兔多克隆抗STXBP1抗体 (Sigma, Ref: HPA008209) 以1:250的稀释度染色。细胞随后用1:1000稀释的与Alexa Fluor 568缀合的山羊抗兔二抗进行染色。使用经验参数用InCell分析仪6000仪器进行成像。

[0350] 来自用慢病毒载体以2的感染复数 (MOI) 转导的细胞的代表性ICC图像显示于图8中。

[0351] 图8: iPSC来源的谷氨酸能神经元中STXBP1表达盒的慢病毒载体转导。图像显示在对照条件下 (未经转导) 和在hSyn或MECP2启动子的控制下转导表达盒之后STXBP1表达的代表性图像。

[0352] 针对所有条件使用相同获取设置拍摄图像。该信号与未经转导的细胞的比较允许可视化人类iPSC来源的NGN2神经元中STXBP1的过表达。在hSyn启动子控制下的STXBP1引起高于MECP2启动子的表达 (概述于表11中)。

[0353] 表11: 在iPSC来源的谷氨酸能神经元中进行慢病毒转导之后的STXBP1表达水平

[0354]	未经转导	hSYN-STXBP1	MECP2-STXBP1
	未检测到	++	+

[0355] (+) 通过ICC分析观察到的相对表达水平

[0356] 实施例6: 原代小鼠神经元中STXBP1表达盒的AAV-9转导

[0357] AAV9载体如实施例4中所述产生并且衣壳特征列于表12中。转基因表达与HA标签在N端融合的STXBP1蛋白 (SEQ ID NO: 9) 并且表达由以下启动子驱动: hSyn、MECP2或MECP2-内含子。HA标记的蛋白质用于将转基因表达与内源性STXBP1水平区分开来。具有CAG-eGFP-NLS表达盒的AAV9衣壳用作转导效率的对照载体。通过转导小鼠原代皮质神经元体外研究STXBP1表达。未经转导的细胞用作内源性STXBP1表达的对照。

[0358] 表12: AAV9病毒载体特性

	表达盒	衣壳	病毒基因组效价 (vg/mL)	内毒素 (<10 EU/mL)
	hSyn-eGFP	AAV9	1.36E+13	通过
[0359]	MECP2-HA-hSTXBP1	AAV9	1.39E+13	通过
	MECP2-内含子-HA-hSTXBP1	AAV9	1.35E+13	通过
	hSyn-HA-hSTXBP1	AAV9	1.28E+13	通过
	CAG-HA-hSTXBP1	AAV9	1.22E+13	通过
	CAG-eGFP	AAV9	1.30E+13	通过

[0360] 小鼠原代皮质神经元细胞由E17小鼠胚胎的皮质组织制备。皮质组织在37°C下使用木瓜蛋白酶解离30分钟并且在补充有B27补充剂2%、GlutaMAX-I 1mM和青霉素-链霉素

50单位/毫升的Neurobasal™培养基中维持培养。每周更换一半培养基。

[0361] 在分裂(DIV)7,细胞用不同AAV9载体以两种不同MOI (2.5E+6GC/细胞和5.0E+5GC/细胞) 转导。通过包括在两种MOI条件下均高的hSyn-eGFP-NLS构建体来证实转导水平。在DIV13,细胞用2%三聚甲醛固定并且用一抗兔多克隆抗STXBP1抗体(1:250;Sigma,Ref:HPA008209)和抗HA标签染色(1:100;Ref:2367S,Cell Signaling Technology)染色。使用经验参数用InCell分析仪6000仪器进行成像。

[0362] 图9:小鼠原代神经元中STXBP1的AAV9转导。(A) 用AAV9病毒载体以MOI 5.0E+5GC/细胞转导的原代小鼠皮质神经元中STXBP1染色的代表性图像。图像显示对照条件(未经转导)和hSyn、MECP2或MECP2-内含子启动子的控制下的STXBP1表达。(B) 相同原代小鼠皮质神经元中HA染色(右)与STXBP1染色(左)的比较。

[0363] 使用类似获取参数,我们确认所有三种启动子的STXBP1表达水平相较于未经转导的细胞的增加(图9A),这表明AAV9转导能够实现高于基线水平的STXBP1表达。具有内含子启动子的MECP2显示最高表达水平,接着为hSyn和MECP2(表13)。此外,对于所有研究的病毒载体观察到抗HA与STXBP1染色的共定位,代表性影像显示于图9B中(参见箭头)。

[0364] 表13:小鼠原代神经元中STXBP1在不同神经元启动子控制下的AAV9转导

[0365]		未经转导	hSyn	MECP2	MECP2-内含子
	STXBP1	-	++	+	+++

[0366] (+) 通过ICC分析观察到的相对表达水平

[0367] 为证明STXBP1转导对神经元细胞具有特异性,我们用针对泛神经元标记物MAP2的抗体对小鼠原代培养物进行复染(1:5000;Ref:ab5392;Abcam™,Cambridge,MA,USA)。

[0368] 图10:MAP2阳性神经元中STXBP1过表达的共定位。图像为AAV9病毒载体转导后小鼠原代神经元中的抗HA标签染色(左图)和抗MAP2染色(右图)的代表性图像。箭头指示表达STXBP1(HA)和神经元标记物(MAP2)的细胞的实例。

[0369] 图10显示经转导的小鼠原代皮质神经元中神经元标记物(MAP2)与抗HA染色的共定位(参见箭头)。此数据证实不同神经元启动子控制下经HA标记的STXBP1转基因产物的神经元表达。HA标签信号的强度(表14)与STXBP1水平(表13)相关,表明启动子强度可如下排序:MECP2-内含子>hSyn>MECP2。

[0370] 表14:小鼠原代神经元中HA标签的表达和定位

		未经转导	hSyn-HA_STXBP1	MECP2-HA_STXBP1	MECP2-内含子-HA_STXBP
[0371]	HA-标签信号	-	++	+	+++
	共定位		是	是	是

[0372] (+) 通过ICC分析观察到的相对表达水平

[0373] 实施例7:小鼠脑中AAV-9介导的转导之后STXBP1的体内表达

[0374] 在体内研究小鼠脑中STXBP1的AAV9介导的转导。病毒载体通过两侧脑室内(ICV)注射至产后1日龄的新生儿小鼠(PND1)的脑中来施用。先前已描述用于ICV新生儿注射的方法(Bertrand-Mathon等人,2015;Kim等人,2014;Hamodi等人,2020)。对所注射动物进行持续5周的监测并且STXBP1的表达和分布通过脑组织上的生物化学读出进行分析。

[0375] 实验包括5组:对照(注射的媒介物)、对照病毒(AAV9/hSyn_eGFP)、AAV9/hSyn-HA-STXBP1、AAV9/MECP2-HA-STXBP1和AAV9/MECP2-内含子-HA-STXBP1。AAV9载体与表12中所述相同。体内实验条件的概述显示于表15中。

[0376] 表15:体内实验条件的概述

[0377]	处理时的 年龄	递送途径	病毒载体 表达盒	效价	生命评估	终末评估
	产后 1 日 龄 PND1	ICV 两侧注 射 2 μ l/ 半球	AAV9/hSy n-STXBP1	1.28E+13GC/ mL	注射后 5 周 期间的临床 体征、副作 用、体重、 死亡率	注射后 5 周收 集脑和器官 用于生物化 学分析、组织 病理学、免疫 组织化学、转 基因表达。
			AAV9/ MECP2-ST XBP1	1.39E+13GC/ mL		
			AAV9/ MECP2- 内 含 子 STXBP1	1.35E+13GC/ mL		
			AAV9/ hSyn_EGFP	1.36E+13GC/ mL		
			媒介物	(无菌磷酸盐缓 冲生理盐水 1X)		

[0378] 在研究过程中(注射后5周)监测体重差异以评估小鼠的总体健康状况。在最后一次评估时不同表达盒组的体重无显著差异。各组均未显示毒性的任何临床体征。另外,用 AAV9/hSyn-HA-STXBP1、AAV9/MECP2-HA-STXBP1或AAV9/MECP2-内含子-HA-STXBP1处理的成年野生型小鼠中不存在明显的发病或发育延迟迹象。此实验的结果证明,病毒载体表达盒展现长期耐受性和低毒性并且因此可安全地用于临床前背景。

[0379] 在注射后5周,收集脑组织,解剖并且提交用于生物化学分析。DNA/RNA从左额叶皮质和海马回提取,而蛋白质从匹配右额叶皮质提取。使用AllPrep微型试剂盒(Qiagen, 80204)遵循制造商说明书进行DNA/RNA提取,并且包括用于RNA提取的DNA酶处理。使用Precellys 24仪器(Bertin Technologies)使组织在RLT Plus缓冲液(补充有 β -巯基乙醇)中裂解。测量DNA浓度并且针对所有样品将其调整至20ng/ μ l。接着,将40ng用于使用对SV40多聚A信号(存在于所有AAV表达盒中)具有特异性的引物/探针进行qPCR。使用ValidPrime®试剂盒(tataabiocenter, A106P25)对小鼠基因组的量进行分析。ValidPrime®序列对以每单倍体正常基因组恰好一个拷贝存在的gDNA的非转录基因座具有特异性。对于两个qPCR,使用标准曲线方法确定拷贝数。测量RNA浓度,并且将500ng RNA用于使用试剂盒高容量cDNA RT试剂盒+RNA酶抑制剂(Applied Biosystems目录号4374966)进行RT。所得cDNA进行人类STXBP1信号qPCR,以及两种参考基因用于将所得结果进行标准化。测定并且针对所有组的平均值按比例调整相对表达。对于蛋白质提取,使用Precellys 24仪器(Bertin Technologies)和冷却系统在RIPA缓冲液(Pierce, 89900)中裂解组织,所述缓冲液包括2x浓缩蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物(Cell Signaling Technology, #5872)。将样品静置在冰上30分钟,离心并且收集上清液作为最终蛋白质提取物。使用BCA蛋白质分析试剂盒(Pierce, 23227)测定蛋白质浓度,并且将7.5 μ g蛋白质与

Laemli缓冲液和 β -巯基乙醇混合并且在90℃下孵育10分钟,随后进行SDS-Page。将凝胶转移至硝化纤维素膜并且通过蛋白质印迹分析。膜在封闭溶液(Ref:927-50000;Li-Cor)中在4℃下孵育1小时,随后与一抗小鼠单克隆抗HA(1:2000;Ref:2367S,Cell Signaling Technology)和小鼠单克隆抗GAPDH(1:10000;Ref:G8795,Sigma)一起孵育。所用二抗为**IRDye®680RD**驴抗小鼠IgG二抗(1:20000;Ref:926-68072, Li-Cor)和**IRDye®800CW**驴抗兔IgG二抗(1:20000;Ref:926-32213, Li-Cor)。

[0380] 图11:病毒载体DNA拷贝分析。SV40pA(猿猴病毒40的多聚A信号)的qPCR数据通过AAV处理后5周龄小鼠的左海马回和左额叶皮质的二倍体小鼠基因组的数目标标准化。显示媒介物和四个AAV9转导组(对照病毒、hSyn、MECP2、MECP2-内含子)的数据。结果显示为平均值 $\pm$ SD。

[0381] 图12:STXBP1 mRNA表达分析。数据表示为针对两种参考基因标准化的相对表达并且针对所有组的平均表达按比例调整(平均值 $\pm$ SD)。对AAV处理后5周龄小鼠的左海马回和左额叶皮质的组织进行分析。显示媒介物和四个AAV9转导组(对照病毒、hSyn、MECP2、MECP2-内含子)的数据。

[0382] 图13:通过蛋白质印迹的蛋白质分析。(A)显示皮质中不同表达盒的HA-标签表达的蛋白质印迹($n=5-7$ /组)。GAPDH用作上样对照。(B)HA-标签条带强度的定量,相对于GAPDH上样对照标准化各样品。结果显示为平均值 $\pm$ SD。

[0383] 如图11中所示,在DNA提取物中检测到每二倍体小鼠基因组的大量的载体DNA拷贝,并且证明在海马回和皮质中不同病毒载体中的有效AAV9转导($N=5-7$ 只小鼠)。对于全部三个表达盒,均观察到人类STXBP1转基因表达(mRNA),并且与hSyn和MECP2相比,观察到MECP2-内含子表达盒的强得多的表达(图12)。针对所有三个所研究的表达盒,对经HA标记的STXBP1蛋白的蛋白质印迹分析证实在前额叶皮质中的体内特异性转基因产物表达(图13A和B)。所有数据一起允许在病毒载体中对启动子强度进行整体排序。MECP2-内含子显示最高HA-标签STXBP1表达,接着为hSyn和MECP2。此数据符合小鼠原代皮质神经元中的体外数据,其中观察到相似的相对排序。

[0384] 实施例8:小鼠脑中AAV-9介导的转导之后STXBP1的体内分布

[0385] 通过免疫组织化学(IHC)研究PND1注射AAV9载体后小鼠脑中STXBP1表达的分布。从与实施例7中所描述相同的动物收集小鼠脑组织。

[0386] 用恒冷箱切片机(cryostat-microtome)产生固定的冷冻切片(12 μ m厚;矢状切片)并且储存在-80℃下。所有后续孵育步骤均在室温下进行。冷冻切片在PBS1X中冲洗10分钟,并且接着与以下一抗一起孵育:GFP(1:2,000;#1020,Aves)、HA(血球凝集素标签;1:5,000;#3724,Cell Signaling)、NeuN(1:2,000;ab177487,Abcam)、GFAP(1:2,000;#173006,Synaptic Systems)、小白蛋白(1:500;PV235,Swant),单独或组合用于双重免疫荧光,在含有0.3% Triton X-100的PBS中稀释,在潮湿室中过夜。孵育之后,将切片用PBS洗涤3次,接着与适当的Alexa缀合的二抗(抗小鼠、兔、鸡,缀合至Alexa 488或647)孵育1小时。然后,其用DAPI(300nM稀释液)进行复染以标记细胞核,并且用PBS洗涤3次。最终将切片用Prolong Gold抗荧光淬灭封固介质(Life Technologies)进行封固,并且施加盖玻片。使用具有20x物镜(Zeiss)的AxioScan Z1幻灯片扫描器获得染色切片的数位影像并且使用Zen 3软件(Zeiss)进行分析。

[0387] 为研究经转导的细胞在从神经元启动子表达转基因的脑中的分布,在PND1幼鼠icv注射AAV9/hSyn_eGFP。在病毒施用之后1个月处死动物并且解剖脑并且针对免疫组织化学进行加工以标记GFP。

[0388] 图14:使用来自AAV9-hSyn-NLS-eGFP-NLS病毒的GFP报告物测定的感染细胞在小鼠脑中的分布。(A)接受AAV9-hSyn1-NLS-GFP-NLS icv、1个月后处死并且进行免疫染色以标记GFP的小鼠脑的矢状切片。从整个脑的前部至背部观察到表达GFP的细胞的分布。展现GFP+细胞的一些主要脑区域用矩形突出显示。(B-G):显示来自A的GFP+细胞的脑区域的高度放大(箭头指向GFP+细胞)。

[0389] 图15:表达来自AAV9-hSyn-NLS-eGFP-NLS病毒的GFP报告物的细胞的表征。进行双重免疫荧光标记以检测(A-F)GFP和神经元标记物NeuN、(G-L)GFP和星形细胞标记物GFAP。在所有脑区域中观察到对(A-C)GFP和(D-F)NeuN呈阳性的细胞(箭头指向经双重标记的细胞),表明神经元被转导并且表达报告基因。相反,在GFAP阳性细胞(J-L)中未检测到GFP(G-I)信号,表明星形细胞不表达报告基因。

[0390] 图16:在AAV9施用后小鼠脑中来自不同启动子的HA-STXBP1融合蛋白的分布。通过针对HA的免疫组织化学研究小鼠脑中从不同启动子过表达的经HA标记的STXBP1的分布。作为阴性对照条件,在接受(A)仅PBS或(B)AAV9-hSyn-GFP病毒icv的动物中未观察到HA信号。(C)作为抗体选择性的阴性对照(NC),在接受AAV9-MECP2-内含子-HA-STXBP1病毒但在免疫组织化学程序期间省略一抗HA抗体的动物中未观察到HA信号。(D-F)在注射从不同启动子表达HA-STXBP1的不同病毒的所有动物的脑中观察到HA信号。3种启动子引起整个脑中HA分布的共同模式,其中大脑皮质、海马回、纹状体、嗅球、黑质和前脑中的纤维束中观察到主要表达。表16中报告了启动子之间的HA分布的明显差异。

[0391] 图17:在AAV9施用后海马回中来自不同启动子的HA-STXBP1融合蛋白的分布。进行双重免疫荧光标记以检测(A-C)HA和(D-F)神经元标记物NeuN,这用于鉴别海马回的不同部分。所有3种启动子引起整个海马回中的HA表达,主要在神经元突出物(Mo1、LMo1、Or、MF)中并且偶尔在细胞体中。(F)MECP2-内含子启动子相比于其他2种启动子(D、E)产生更好的覆盖度和更高的HA信号强度。LMo1:海马回腔隙分子层;MF:苔状纤维;Mo1:齿状回分子层;Or:起层。

[0392] 图18:从不同启动子表达HA-STXBP1的细胞的表征。进行双重免疫荧光标记以检测(A-C)HA和(D-F)神经元标记物NeuN。对HA呈阳性并且偶尔在脑不同区域中观察到的细胞体还对NeuN呈阳性,证实所有3个启动子均驱动神经元中的转基因表达。箭头指向双重标记的细胞。

[0393] 总体而言,在整个脑中,从嗅球至小脑和脑干,观察到GFP+细胞(图14A-G)。在纹状体(图14D)、大脑皮质(图14B)、海马回(图14C)和嗅球中显著观察到大量感染细胞。双重免疫标记证实,GFP仅由神经元表达,如GFP与神经元标记物NeuN之间的共定位(图15A-F)和GFP与星形细胞标记物GFAP的共定位的不存在所证明的(图15G-L)。

[0394] 通过针对HA进行免疫组织化学,分析从3种不同神经元启动子(hSyn、MECP2或MECP2-内含子)过表达的经HA标记的STXBP1的组织分布(图16)。3种启动子引起整个脑中HA表达的共同模式(图16D-F);观察到HA染色的主要区域为大脑皮质、海马回、纹状体、嗅球、黑质和前脑中的纤维束。仅在注射包括MECP2-内含子启动子的AAV的动物中在小脑中检测

到HA信号(图16F);MECP2-内含子启动子提供与2种其他启动子相比在整个脑中最佳的HA信号覆盖度和信号强度(图16D-F)。来自3种启动子的HA的脑分布的概述提供于表16中。对研发治疗癫痫症的治疗方法的目标具有重要意义,在海马回和皮质中观察到HA表达,这是涉及癫痫形成和癫痫发作产生的关键区域。所有启动子引起整个海马回中的HA表达(图17),其主要在神经元突出物(海马回的苔状纤维、齿状回分子层、腔隙分子层和起层)中。使用MECP2-内含子启动子观察到最高HA信号强度;hSyn启动子产生中间表达水平,而MECP2启动子提供最弱信号强度(图17A-C)。在细胞水平,主要在神经纤维网中观察到HA表达并且偶尔在与神经元标记物NeuN(图18D-F)共定位的细胞体(图18A-C)中观察到HA表达,表明所有3种启动子均驱动神经元中的表达。

[0395] 表16:小鼠脑中不同启动子的HA-STXBP1转基因产物的分布的概述

[0396]	hSyn	MECP2	MECP2-内含子
皮质	x	x	x
海马回	x	x	x
嗅球	x	x	x
纹状体	x	x	x
丘脑	x	x	x
纤维束(前脑)	x	x	x
下丘脑	x		x
中脑	x		x
黑质	x	x	x
小脑核			x
髓质			x

[0397] (x) 经证实的组织表达

[0398] 实施例9:WT和杂合STXBP1(HET)小鼠脑中的STXBP1变体表达的表征

[0399] 为评估STXBP1蛋白变体在正常和疾病条件下的表达,产生再现人类STXBP1单倍剂量不足(haploinsufficiency)介导的癫痫症并且已由Kovacevic等人(2018)描述的转基因小鼠模型。经由University of Amsterdam的许可获得此小鼠模型。用在Stxbp1基因的外显子2的任一侧上具有loxP位点的Stxbp1 flox化(Stxbp1f1/f1)小鼠产生杂合模型。使Stxbp1f1/f1与EIIa-Cre(Jax:003724)杂交以使生殖系中的Stxbp1外显子2缺失,产生Stxbp1f1/-无效突变小鼠。使flox化等位基因与C57BL/6J进行远亲杂交,产生Stxbp1+/-K0 HET小鼠品系。在一个等位基因中外显子2的缺失导致过早终止密码子并且导致截短的和非功能性STXBP1蛋白的表达。所有体内实验均根据比利时法律按照动物实验伦理委员会发布的指南进行。所述实验根据欧洲委员会委员指令(2010/63/EU)进行。尽一切努力使动物痛苦降至最低。

[0400] 为评估内源性STXBP1变体表达,在产后5-7周处死杂合K0(STXBP1+/-)和野生型(WT)同窝小鼠(STXBP1+/+)雄性小鼠,并且收集脑组织,解剖并且通过生物化学读出进行分析。RNA从尾侧皮质(右半球)提取,而蛋白质从匹配右额叶(内侧)皮质提取用于蛋白质印迹(WB)分析,并且从额叶皮质的外侧半部提取用于液相层析质谱分析(LC-MS)分析。

[0401] RNA分析

[0402] 对于RNA提取,将样品转移至含有RLT Plus裂解缓冲液的Precellys管(具有10 μ l/ml β -巯基乙醇)(Precellys裂解试剂盒CK14-2ml(VWR,432-3751))中。对RNA进行DNA酶处理。使用Mag-Bind总RNA 96试剂盒(Omega,M6731)在KingFisher Flex(ThermoFisher)上进行RNA提取。用Nanodrop测量RNA浓度,并且500ng RNA使用试剂盒高容量cDNA RT试剂盒+RNA酶抑制剂(目录号4374966,ThermoFisher)进行反转录。随后,所得cDNA通过qPCR使用市售和定制引物和探针、小鼠STXBP1以及小鼠和人类STXBP1-长以及小鼠和人类STXBP1-短亚型以及两种参考基因一式三份进行分析。通过计算 $2^{-\Delta C_t}$ 值获得mRNA表达水平,其中各基因的表达相对于两种参考基因的平均值标准化。

[0403] 蛋白质印迹分析

[0404] 对于蛋白质提取,使用Precellys 24仪器(Bertin Technologies)和冷却系统在RIPA缓冲液(Sigma R0278)中裂解组织,所述缓冲液包括2x蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物(Cell Signaling Technology#5872)。将样品静置在冰上30分钟,离心并且收集上清液作为最终蛋白质提取物。使用BCA蛋白质测定(Thermo Scientific™)确定蛋白质浓度,并且将10 μ g蛋白质与Laemmli缓冲液和 β -巯基乙醇混合并且在90 $^{\circ}$ C下孵育10分钟,随后进行SDS-Page。将凝胶转移至硝化纤维素膜中并且接着进行标准蛋白质印迹程序。首先,膜在封闭溶液(Ref:927-50000;Li-Cor)中在室温下孵育1小时。以下一抗在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜:山羊多克隆抗STXBP1(1:1000,Ref:PAB6504,Abnova)、兔多克隆抗STXBP1(1:1000,Ref:116002,SySy)、兔多克隆抗STXBP1(1:1000,Ref:HPA008209,Sigma)、小鼠单克隆抗突触融合蛋白-1A(1:2500,Ref:110111,SySy)、小鼠单克隆抗 β -肌动蛋白(1:10000,A2228,Sigma)和兔单克隆抗 β -肌动蛋白(1:10000,8457P,Cell Signaling Technology)。在室温下孵育二抗1小时,并且使用的是以下抗体:IRDye® 680RD驴抗小鼠IgG二抗(1:20000;Ref:926-68072, Li-Cor)、IRDye® 800CW驴抗兔IgG二抗(1:20000;Ref:926-32213, Li-Cor)和IRDye® 800CW驴抗山羊IgG二抗(1:20000;Ref:926-32214, Li-Cor)。

[0405] LC-MS分析

[0406] 对于LC-MS分析,使用Precellys组织均质器(Bertin-Instruments)使组织样品在5% SDS/50mM TEAB/1x蛋白酶抑制剂中均质化。之后,通过BCA(Pierce,A53227)测定蛋白质浓度,将100 μ g的各样品还原并且烷基化。在96孔板S-Trap上按照制造商说明书(Protifi Llc,Huntington,NY)并且使用胰蛋白酶/Lys-C(Promega,V5072)进行样品洗涤和消化。将消化的样品从板洗脱并且在真空下干燥,之后重悬用于LC-MS分析。重悬缓冲液在含0.1%甲酸的水中含有50fmol/ μ l的重标记的AQUA肽(Thermo,Paisley,UK)。对于总裂解产物样品,STXBP1肽使用连接至Waters Xevo TQ-XS的具有IonKey来源的Waters Acquity UPLC M-Class来测量。肽捕集在Waters nanoEase M/Z Sym100 C18管柱(5 μ m,300 μ m $\times$ 25mm)上并且在Waters肽BEH C18 iKey(150 μ m $\times$ 100mm,130 $\text{\AA}$ 1.7 μ m)上分开。用移动相A(0.1%甲酸/100% H₂O)和移动相B(0.1%甲酸/100%乙腈)以3 μ l/分钟的流速施加17分钟梯度。所用梯度为:1.0% B 0至1分钟,1.0-25% B 1至3分钟,25-40% B 3至6分钟,40-99% B 6至9分钟,99-1% B 12至13分钟。管柱温度设定为50 $^{\circ}$ C。使用预先安排的多反应监测(MRM)法,源参数如下:毛细管电压-3.8kV,源温度-150 $^{\circ}$ C,锥气体-150L/hr,喷雾器气体-5.3巴(bar)。NanoFlow气体-0.3巴。对于所有分析,所监测的肽为:DNALLAQLIQDK(SEQ ID NO:

43)、YETSGIGEAR (SEQ ID NO:44)、ISEQTYQLSR (SEQ ID NO:45)、WEVLIGSTHILTPK (SEQ ID NO:46) (长亚型特异性)和WEVLIGSTHILTPQK (SEQ ID NO:47) (短亚型特异性)。监测每种肽的三个转变(transition)。数据分析在Skyline (MacLean等人,2010)中进行。各分析包括8点标准曲线和QC样品(低、中、高,n=2)。这些由空白、汇集的加标由大肠杆菌中重组表达制备的经纯化的经HA标记的STXBP1蛋白的小鼠肝组织匀浆组成。还包括由汇集的小鼠脑膜匀浆(空白和加标额外STXBP1)组成的内源性QC样品。针对此标准曲线对总蛋白质和短亚型进行定量。亚型特异性肽相对于其相应内标进行相对定量。

[0407] 图19:通过qPCR分析小鼠脑中的STXBP1变体mRNA水平。来自WT(野生型)同窝小鼠和HET(杂合)小鼠的尾侧皮质(右半球)的脑组织样品的mRNA分析(n=11-13/组)。(A):对总内源性STXBP1的mRNA表达分析(识别所有STXBP1转录物的常见探针)。(B)和(C):使用两种特异性识别长亚型(B)或短蛋白质亚型(C)的不同探针对STXBP1变体进行mRNA表达分析。通过计算 $2^{-\Delta C_t}$ 值,数据显示为mRNA表达水平,其中表达相对于两种参考基因的平均值标准化。结果显示为平均值 $\pm$ SD。

[0408] 图20:通过蛋白质印迹分析小鼠脑中的STXBP1蛋白水平。已分析来自WT(野生型)同窝小鼠和HET(杂合)小鼠的右额叶(内侧)皮质的组织样品(n=11-13/组)。(A):代表总STXBP1蛋白表达的蛋白质印迹。(B):(A)中各自蛋白质印迹的定量数据。B-肌动蛋白用作上样对照,用于标准化。“WT”组用作按比例调整组。结果显示为平均值 $\pm$ SD。

[0409] 图21:通过LC-MS分析小鼠脑中的STXBP1变体蛋白水平。已分析来自WT(野生型)同窝小鼠和HET(杂合)小鼠的额叶皮质侧半部的组织样品(n=11-13/组)。(A):总STXBP1肽对比STXBP1长亚型对比STXBP1短亚型的定量。结果显示为平均值 $\pm$ SD。(B):代表STXBP1短和长亚型的蛋白质印迹。(C):(B)中各自蛋白质印迹的组合定量数据。B-肌动蛋白用作上样对照。数据显示为各STXBP1亚型的条带强度与各自B-肌动蛋白条带之间的比。结果显示为平均值 $\pm$ SD。

[0410] 图22:通过蛋白质印迹分析小鼠脑中的突触融合蛋白-1A(STX1A)蛋白水平。对小鼠脑组织样品中的STX1A蛋白表达进行定量(n=11-13/组)。B-肌动蛋白用作上样对照,用于标准化。“WT”组用作按比例调整组。结果显示为平均值 $\pm$ SD。

[0411] WT和杂合(+/-)KO小鼠(图中称为HET)中RNA转录物分析结果显示于图19(A-C)中。HET小鼠中总STXBP1的内源性小鼠mRNA转录物水平减少(图19(A))。还观察到与WT同窝小鼠相比,HET小鼠中STXBP1的短亚型和长亚型减少(37-43%)(图19(B,C))。对总STXBP1的蛋白质印迹分析证实,与WT动物相比,HET小鼠中蛋白质减少60-70%(图20)。

[0412] LC-MS对STXBP1蛋白质亚型的定量(图21)指示,WT和HET动物的小鼠脑中,与长亚型的总水平相比,短STXBP1变体最丰富(图21(A))。HET动物中STXBP1肽的定量指示,与WT同窝小鼠相比,STXBP1的总、短和长变体减少约60%。蛋白质印迹数据还证实,与WT动物相比,HET动物中STXBP1短和长亚型的总体减少相同(图21,B图和C图)。

[0413] 已报告STXBP1充当突触融合蛋白-1A蛋白(STX1A)的伴侣蛋白,确保突触囊泡的迁移、对接和释放(Dulubova I.等人2007,Saitsu H.等人2008)。如图22中所示,STXBP1的单倍剂量不足导致HET小鼠中的STX1A蛋白水平与WT同窝小鼠相比减少50%至60%。

[0414] 总而言之,数据首次提供小鼠脑中STXBP1亚型表达水平的充分表征并且验证再现人类STXBP1单倍剂量不足的转基因小鼠模型中内源性STXBP1变体mRNA和蛋白水平减少。

[0415] 实施例10:单倍剂量不足小鼠模型中STXBP1变体的AAV介导的过表达

[0416] 病毒载体如实施例7中所描述的通过两侧脑室内 (ICV) 注射至产后1日龄的新生儿小鼠 (PND1) 的脑中来施用。先前已描述用于ICV新生儿注射的方法 (Bertrand-Mathon等人, 2015; Kim等人, 2014; Hamodi等人, 2020)。对所注射动物进行持续7周的监测并且STXBP1的表达和分布通过脑组织上的生物化学读出进行分析。实验包括以下组:

[0417] ● 杂合K0 (STXBP1+/-) (称为HET)

[0418] ● 野生型同窝小鼠 (STXBP1+/+) 雄性小鼠 (称为WT)

[0419] ● 用表17中描述的两种病毒载体中的一种两侧注射HET小鼠

[0420] 表17: AAV9病毒载体特性

载体 ID	启动子	STXBP1 变体	衣壳	病毒基因组 效价 (vg/mL)	内毒素 (<10 EU/mL)
[0421] AAV9(L)	Mecp2_内含子 (SEQ ID NO:3 +SEQ ID NO:37)	长变体(SEQ ID NO:9)	AAV9	9.43E12	通过
AAV9(S)	Mecp2_内含子 (SEQ ID NO:3 +SEQ ID NO:37)	短变体(SEQ ID NO:10)	AAV9	6.91E12	通过

[0422] WT和HET小鼠的一个额外组注射媒介物-PBS用作对照。体内实验条件的概述显示于表18中。

[0423] 在注射后7周,收集脑组织,解剖并且提交用于生物化学分析。DNA/RNA从尾侧皮质(右半球)提取,而蛋白质从匹配右额叶(内侧)皮质提取。DNA和RNA均用与实施例7中所述相同的裂解缓冲液组合物提取。针对DNA进行蛋白酶K和RNA酶处理。使用Mag-Bind™ HDQ血液DNA和组织96试剂盒 (Omega, M6399) 提取DNA。使用Qubit™ Flex荧光计 (ThermoFisher) 与Qubit™ dsDNA BR分析试剂盒 (ThermoFisher, Q32853) 来测量DNA浓度,并且针对所有样品调整相同总DNA量,使用40ng用于使用对SV40 20多聚A信号 (存在于所有AAV表达盒中) 具有特异性的引物/探针进行qPCR。使用 **ValidPrime®** 试剂盒 (tataabio, A106P25) 对小鼠基因组的量进行分析。**ValidPrime®** 序列对以每单倍体正常基因组恰好一个拷贝存在的gDNA的非转录基因座具有特异性。对于SV40p和 **ValidPrime®** 两者,使用标准曲线方法确定绝对拷贝数。

[0424] RNA提取步骤和转化成cDNA描述于实施例7中。所得cDNA通过qPCR使用市售和定制引物和探针,例如SV40多聚A、人类STXBP1、小鼠STXBP1、小鼠STX1A、小鼠和人类STXBP1-长亚型和小鼠和人类STXBP1-短亚型以及两种参考基因一式三份进行分析。通过计算 $2^{-\Delta Ct}$ 值获得mRNA表达水平,其中各基因的表达相对于两种参考基因的平均值标准化。如实施例7中所述进行蛋白质提取和蛋白质印迹分析。

[0425] 图23:通过qPCR分析小鼠脑中的AAV转导效率(注射后7周)。(A) 通过qPCR对注射媒介物-PBS的WT小鼠 (WT)、注射媒介物-PBS的HET小鼠 (HET)、注射STXBP1长变体的HET小鼠

(HET-AAV9(L))和注射STXBP1短变体的HET小鼠(HET-AAV9(S))中的病毒基因组拷贝进行绝对定量。从尾侧皮质(右半球)收集样品并且使用相对于二倍体小鼠基因组的绝对数目标标准化的SV40pA定量。结果显示为平均值 $\pm$ SD。每组,分析 $n=14-15$ 只动物,并且应用非参数单向ANOVA(Kruskal-Wallis检验),接着应用Dunn事后分析多重比较检验。经转导的组之间未观察到显著差异。(B) SV40多聚A和(C)人类特异性STXBP1的mRNA表达分析。通过计算 $2^{-\Delta Ct}$ 值,数据显示为mRNA表达水平,其中表达相对于两种参考基因的平均值标准化。结果显示为平均值 $\pm$ SD。每组,分析 $n=14-15$ 只动物,并且应用非参数单向ANOVA(Kruskal-Wallis检验),接着应用Dunn事后分析多重比较检验。经转导的组之间未观察到显著差异。

[0426] 图24:通过qPCR分析小鼠脑中AAV处理后的STXBP1变体表达(注射后7周)。使用特异性测量短变体(A)或长变体(B)的总(小鼠和人类)水平的探针进行STXBP1变体mRNA表达的分析。通过计算 $2^{-\Delta Ct}$ 值,数据显示为mRNA表达水平,其中表达相对于两种参考基因的平均值标准化。结果显示为平均值 $\pm$ SD。每组,分析 $n=14-16$ 只动物。

[0427] 图25:通过蛋白质印迹分析小鼠脑中AAV处理后的STXBP1变体表达(注射后7周)。通过蛋白质印迹对注射媒介物-PBS的WT小鼠(WT)、注射媒介物-PBS的HET小鼠(HET)、注射STXBP1长变体的HET小鼠(HET-AAV9(L))和注射STXBP1短变体的HET小鼠(HET-AAV9(S))中来自右额叶(内侧)皮质的样品进行蛋白质分析。

[0428] (A) 总STXBP1(长变体和短变体)蛋白表达的蛋白质印迹数据的定量。

[0429] (B) 对长STXBP1变体蛋白表达的蛋白质印迹数据的定量。

[0430] (C) 对短STXBP1变体蛋白表达的蛋白质印迹数据的定量。

[0431] (D) 对突触融合蛋白-1A蛋白表达的蛋白质印迹数据的定量

[0432] B-肌动蛋白用作上样对照,用于各STXBP1和STX1A条带强度的标准化。媒介物WT组(WT)用作按比例调整组。结果显示为平均值 $\pm$ SD。使用非参数单向ANOVA(Kruskal-Wallis检验),随后进行Dunn事后分析多重比较检验来分析数据(* $<p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$)。

[0433] 图26:通过免疫组织化学分析小鼠脑中AAV处理后经HA标记的STXBP1表达的脑分布(注射后7周)。对注射经HA标记的STXBP1长变体的HET小鼠的矢状切片进行HA标签染色并且与经媒介物(PBS)处理的小鼠进行比较。显示AAV处理组(动物6023)和经媒介物处理的组(动物6009)的代表性脑切片的实例。在动物6023(经AAV处理)中的主要脑区域中观察到强HA染色,而在经PBS处理的组(动物6009)中未观察到HA染色。

[0434] 如图23(A)中所示,在来自AAV处理组的小鼠脑中检测到每二倍体小鼠基因组大量的病毒基因组拷贝,证明编码STXBP1的长变体和短变体的两种表达盒下有效的病毒转导。仅在经病毒载体转导的组中检测到人类STXBP1转基因(图23(B)) and SV40pA表达(mRNA)(图23(C)),显示与注射的病毒DNA量相似的表达趋势。

[0435] HET动物的AAV9转导引起短和长STXBP1变体的稳定和选择性过表达,不影响内源性小鼠变体的表达水平(图24)。

[0436] 蛋白质印迹分析证实与注射媒介物-PBS的HET小鼠相比,两个AAV处理组中的总STXBP1水平的显著过表达,如图25(A)中所示。使用特异性识别STXBP1长亚型的抗体的蛋白质印迹定量仅在利用STXBP1-长表达盒的AAV处理组中用显示长变体的显著和特异性过表达(图25(B))。类似地,使用针对STXBP1短亚型的特异性抗体,仅观察到相较于注射HET-PBS

的动物,经STXBP1-短表达盒转导的组的显著和特异性蛋白质过表达(图25(C))。此外,如图25(D)中所示,利用短或长变体的AAV处理部分地拯救突触融合蛋白-1A(STX1A)蛋白水平,与注射媒介物-PBS的HET小鼠相比显著增加。AAV处理组中STX1A水平的增加进一步证实人类STXBP1转基因产物表达的功能影响。

[0437] 总体而言,用短或长变体处理的HET动物显示人类STXBP1转基因产物的有效过表达并且在此小鼠模型中类似地拯救STXBP1单倍剂量不足。

[0438] 通过免疫组织化学(IHC)研究PND1注射AAV9载体后小鼠大脑中STXBP1转基因产物表达的分布,使用注射编码与STXBP1长变体的经HA标记的融合物的病毒表达盒的另外的动物组(如实施例7中所述)。用恒冷箱切片机产生固定的冷冻切片(12 μ m厚;矢状切片)并且储存在-80 $^{\circ}$ C下。染色程序和检测方法如实施例8中所描述。

[0439] 如图26中所示,在7周之后经由整个脑中(动物6023)、矢状切片(主要在纹状体、海马回、大脑皮质、下丘脑、苍白球和隔膜中)HA-标签标记检测AAV介导的转基因STXBP1蛋白表达。仅接受PBS的HET动物(动物6009)中,在这些脑区域中未观察到主要HA信号。IHC数据证实,Mecp2_内含子_STXBP1(长)表达盒的AAV介导的转导引起STXBP1蛋白的广泛脑表达。

[0440] 实施例11:在STXBP1杂合疾病模型中拯救癫痫发作表型的AAV基因疗法

[0441] 为评估AAV载体在正常和疾病条件下的功效,产生再现人类STXBP1单倍剂量不足介导的癫痫症并且已由Kovacevic等人(2018)描述的转基因小鼠模型。经由University of Amsterdam的许可获得此小鼠模型。用在Stxbp1基因的外显子2的任一侧上具有loxP位点的Stxbp1 flox化(Stxbp1f1/f1)小鼠产生杂合模型。使Stxbp1f1/f1与EIIa-Cre(Jax:003724)杂交以使生殖系中的Stxbp1外显子2缺失,产生Stxbp1f1/-无效突变小鼠。使flox化等位基因与C57BL/6J进行远亲杂交,产生Stxbp1+/-KO HET小鼠品系。在一个等位基因中外显子2的缺失导致过早终止密码子并且导致截短的和非功能性STXBP1蛋白的表达。所有体内实验均根据比利时法律按照动物实验伦理委员会发布的指南进行。所述实验根据欧洲委员会委员指令(2010/63/EU)进行。尽一切努力使动物痛苦降至最低。

[0442] 在产后第1天杂合(HET)KO和野生型同窝小鼠(WT)雄性小鼠在侧脑室中两侧注射编码长或短STXBP1变体(参见表17)的两种病毒载体之一。实验条件概述于表18中。来自各基因型的小鼠的一个额外组注射媒介物-PBS用作对照。在注射后3周的过程内一周一次监测临床体征并且在注射后第3周至第7周每日监测临床体征,以便评估小鼠的整体健康状况。跨组的有限死亡率与方法程序相关并且观察到攻击行为,但其并不与治疗或基因型相关。

[0443] 表18:体内实验条件的概述

基因型	处理时的年龄	递送途径	处理	效价	样品大小	生命评估	癫痫发作监测	终末评估
HET	产后第1天	ICV 双侧 2 μ l/半球	AAV9(L)*	9.43 E12 GC/mL	N=15	注射后 7 周期间的临床体征、副作用、体重增加和死亡率	体内无线 EEG 视频遥测记录 (注射后 6-7 周)	注射后 7 周收集脑、血浆和器官用于生物化学分析、组织病理学、免疫组织化学、转基因表达
			AAV9(S)*	6.91 E12 GC/mL	N=16			
			媒介物-PBS	--	N=19			
WT	产后第1天	ICV 双侧 2 μ l/半球	媒介物-PBS	--	N=10			

[0445] * 表17中描述

[0446] 注射后六周,进行为期1周的体内无线EEG(脑电图)视频遥测记录以评估癫痫发作的发生。在注射后5周以手术方式向STXBP1+/-小鼠植入皮下遥测发射器和皮质EEG电极。手术在无菌(sterile/aseptic)条件下进行。将麻醉小鼠(氧诱导中的异氟醚:2l/min时为5%,1.5l/min时维持在2.5-1.5%)放置在带有加热垫的立体定向框架中,对于记录电极,在前额叶皮质的颅骨表面(在前囟上)钻孔,并且对于参考电极,在小脑的颅骨表面(在顶枕点后面)钻孔。其后,将Open Source Instruments(OSI)A3028S2 ECoG发射器皮下植入背部上,其中所附接的电线经皮下延伸直至颅,其中记录和参考电极经由约0.5mm各孔定位至脑实质中。各电极用螺钉(Plastics One)固定在适当位置。整个组装用氰基丙烯酸酯和牙科用黏固剂保持在适当位置,形成小圆形头盖,并且背部用尼龙可吸收缝合材料封闭。术后用药和疼痛管理包括术前剂量后24小时进行第二次卡洛芬剂量(10mg/kg)。手术后,小鼠在温暖的室内恢复2-3小时。对于体内无线EEG视频遥测记录,将小鼠分组圈养(2-3只小鼠/笼)。将小鼠笼置于Faraday围栏(Faraday enclosure)中以有助于记录。每天一次对植入小鼠进行健康监测,持续2周。每天对小鼠进行称重,持续4天,其后每周一次称重。所有记录均在特意设计的具有温度和湿度控制的记录房间中进行,以减少环境干扰并且改良传输信号的接收。信号从植入的发射器无线电发射至放置在Faraday围栏内的天线。来自一个记录通道的EEG信号在256Hz下数位化(带通滤波器:0.3-80Hz)。棘波放电(SWD)为失神癫痫发作的典型特征,其用内部自动癫痫发作检测软件进行分析。SWD检测算法是基于事件持续时间分析(>2s)、频带频率分析(5-9Hz)和特定基本谐波频率的识别。由算法检测的各SWD由至少一名经验丰富的观察者以盲法进行确认。因而,在此时间段内对不同表达盒载体和媒介物组进行EEG分析。归因于在载体处理组中的EEG信号中技术假像的出现,从分析排除总共4只动物:(AAV9-MECP2+内含子-hSTXBP1(长变体)(17只中的2只)和AAV9-MECP2+内含子-hSTXBP1(短变体)(18只中的2只)。

[0447] 图27:在注射后(6-7周)(A、B)和24周(C、D)通过EEG分析STXBP1 HET小鼠脑中AAV处理后的棘波放电(SWD)。(A)注射媒介物-PBS的WT小鼠(WT,n=10)、注射媒介物-PBS的HET小鼠(HET,n=19)、注射STXBP1长变体的HET小鼠(HET-AAV9(L),n=15)和注射STXBP1短变

体的HET小鼠 (HET-AAV9 (S), $n=16$) 中的SWD平均数目。在连续7日注射24小时的时期之后6-7周分析SWD。(B) 对“无癫痫发作”的动物数目 (在记录期间未检测到任何SWD) 和“有癫痫发作”的动物 (在记录期间检测到SWD) 的分析。(C) 注射媒介物-PBS的WT小鼠 (WT, $n=5$)、注射媒介物-PBS的HET小鼠 (HET, $n=12$)、注射STXBP1长变体的HET小鼠 (HET-AAV9 (L), $n=9$) 和注射STXBP1短变体的HET小鼠 (HET-AAV9 (S), $n=11$) 中的SWD平均数目。在注射后24周在连续7日24小时的时期中分析SWD。(D) 在注射后24周对“无癫痫发作”的动物数目 (在记录期间未检测到任何SWD) 和“有癫痫发作”的动物 (在记录期间检测到SWD) 的分析。通过非参数单向ANOVA (Kruskal-Wallis检验), 接着Dunn事后分析多重比较检验分析组之间的差异 ($****p<0.0001$), ($***p<0.001$), 并且对于无癫痫发作分析, 使用卡方偶发检验。

[0448] 如图27 (A) 中所示, 相较于媒介物组, 在用长变体 (HET-AAV9 (L)) 和短变体 (HET-AAV9 (S)) 处理的HET小鼠中, 连续7日每天记录24小时的SWD平均数目显著减少70%和65%。用长变体处理的HET小鼠显示26%的无癫痫发作动物 (图27 (B), 相比于短变体差异显著)。在记录期间 (1周24/7) 详细EEG分析在经处理动物中未检测到痉挛性癫痫发作的发生。

[0449] 通过非参数单向ANOVA, 接着事后分析多重比较检验分析组之间的SWD频率差异 ($****p<0.0001$), 并且对于无癫痫发作分析, 使用卡方偶发检验。

[0450] 此外, 对来自注射不同组的动物的脑组织和器官组织进行生物化学和组织病理学分析。对于转基因表达评估, 遵循与实施例7中所描述相同的方法, 注射后7周处死小鼠。收集尾侧皮质并且进行DNA/RNA提取, 并且使用与实施例7中所描述相同的方法, 将匹配半内侧额叶皮质用于蛋白质提取。

[0451] 在分开的一组动物中进行纵向6个月研究以使用相同实验设计, 测量STXBP1基因疗法治疗的作用的持久性。注射后二十四周, 进行为期1周的体内无线EEG (脑电图) 视频遥测记录以评估癫痫发作的发生。如图27 (C) 中所示, 相较于媒介物组, 在用长变体 (HET-AAV9 (L)) 和短变体 (HET-AAV9 (S)) 处理的HET小鼠中, 连续7日每天记录24小时的SWD平均数目分别显著减少95%和92%。用长或短变体处理的HET小鼠分别显示78%和64%的无癫痫发作动物 (图27 (D))。在记录期间 (1周24/7) 详细EEG分析在经处理动物中未检测到痉挛性癫痫发作的发生。

[0452] 实施例12: 在STXBP1杂合疾病模型中拯救行为表型的AAV基因疗法

[0453] 为评估AAV介导的基因疗法对杂合STXBP1 KO (HET) 雄性小鼠和其性别和年龄匹配的野生型 (WT) 同窝小鼠中的不同行为疾病表型的功效, 将在Mecp2_内含子启动子控制下编码人类STXBP1的长或短变体的病毒载体 (参见表17) 两侧注射至侧脑室中。这些动物组与实施例11中所使用的动物组分开。

[0454] 经处理的动物在4周至22周龄经受一连串行为测试。来自各基因型小鼠的一个额外组注射媒介物-PBS用作对照。所有行为实验均根据比利时法律按照动物实验伦理委员会发布的指南进行。所述实验根据欧洲委员会委员指令 (2010/63/EU) 进行。尽一切努力使动物痛苦降至最低。

[0455] 图28: 对STXBP1 HET小鼠中AAV处理后的体重的分析 (注射后1-22周)。(A) 注射媒介物-PBS的WT ($n=17$) 和HET小鼠 ($n=16$) 中随年龄而变化的平均体重。通过双向重复量度ANOVA, 接着未校正的费舍尔LSD事后分析多重比较检验分析组之间的差异 ($* < p.0.05$; $** p<0.01$; $*** p<0.001$; $**** p<0.0001$)。(B) 注射媒介物-PBS的WT小

鼠 (WT, $n=17$) 和注射媒介物-PBS的HET小鼠 (HET, $n=16$)、注射STXBP1长变体的HET小鼠 (HET-AAV9(L), $n=10$) 和注射STXBP1短变体的HET小鼠 (HET-AAV9(S), $n=13$) 中22周龄时测量的平均体重。通过参数单向ANOVA,接着未校正的费舍尔LSD事后分析多重比较检验分析组之间的差异 ($**p<0.01$; $****p<0.0001$; ns, 不显著)。条形图为平均值 $\pm$ SEM。

[0456] 图29:对STXBP1 HET小鼠中AAV处理后的后肢抱拢的分析(注射后4-22周)。(A) 注射媒介物-PBS的WT小鼠 (WT, $n=17$) 和注射媒介物-PBS的HET小鼠 (HET, $n=16$)、注射STXBP1长变体的HET小鼠 (HET-AAV9(L), $n=10$) 和注射STXBP1短变体的HET小鼠 (HET-AAV9(S), $n=13$) 中随年龄而变的平均后肢抱拢分数。(B) 注射媒介物-PBS ($n=17$) 的WT小鼠和注射媒介物-PBS ($n=16$)、AAV9/MECP2-int-STXBP1-L ($n=10$) 和AAV9/MECP2-int-STXBP1-S ($n=13$) 的HET小鼠中在22周龄时记录的平均后肢抱拢分数。通过非参数单向ANOVA (Kruskal-Wallis 检验),接着未校正的Dunn事后分析多重比较检验分析组之间的差异 ($* < p.0.05$; $**p<0.01$; $****p<0.0001$; ns, 不显著)。条形图为平均值 $\pm$ SEM。

[0457] 图30:AAV处理后(注射后8周),丝线悬挂测试中STXBP1 HET小鼠的分析。注射媒介物-PBS的WT小鼠 (WT, $n=17$) 和注射媒介物-PBS的HET小鼠 (HET, $n=16$)、注射STXBP1长变体的HET小鼠 (HET-AAV9(L), $n=10$) 和注射STXBP1短变体的HET小鼠 (HET-AAV9(S), $n=13$) 中8周龄时在四肢丝线悬挂测试中测量的掉落潜伏期。通过参数单向ANOVA,接着未校正的费舍尔LSD事后分析多重比较检验分析组之间的差异 ($****p<0.0001$; ns, 不显著)。条形图为平均值 $\pm$ SEM。

[0458] 图31:在恐惧条件测试中对AAV处理后(注射后10周)的STXBP1HET小鼠的分析。(A) 注射媒介物-PBS的WT小鼠 (WT, $n=17$) 和注射媒介物-PBS的HET小鼠 (HET, $n=16$)、注射STXBP1长变体的HET小鼠 (HET-AAV9(L), $n=10$) 和注射STXBP1短变体的HET小鼠 (HET-AAV9(S), $n=13$) 中10周龄时在恐惧条件训练期之后24小时进行的情境恐惧记忆测试期间的平均冻结行为。通过参数单向ANOVA,接着未校正的费舍尔LSD事后分析多重比较检验分析组之间的差异 ($* < p.0.05$; $****p<0.0001$)。(B) 在情境恐惧记忆测试之后1小时,在与(A)中相同的动物中进行的线索恐惧记忆测试期间的平均冻结行为。通过参数单向ANOVA,接着未校正的费舍尔LSD事后分析多重比较检验分析组之间的差异 ($*p<0.05$; $***p<0.001$; $****p<0.0001$)。条形图为平均值 $\pm$ SEM。

[0459] 体重

[0460] 在注射后1至22周每周追踪动物体重。如图28(A)中所指示,注射媒介物-PBS的HET小鼠显示与其注射媒介物-PBS的WT同窝小鼠相比,1至22周龄体重显示出一致且显著的降低。此重量不足可通过用STXBP1长变体(HET-AAV9(L))的AAV处理来拯救,显示22周时与HET媒介物-PBS组的差异显著(图28(B))。STXBP1短变体组显示22周龄时体重增加的趋势。

[0461] 后肢抱拢

[0462] 4至10周龄一周一次记录后肢抱拢(Guyenet等人,2010),并且10至22周龄每3周记录一次。通过小鼠的尾巴悬挂小鼠并且观察后肢位置10秒。如果后肢一致向外张开,远离腹部,则向其分配分数0。如果超过50%悬挂时间一个后肢朝向腹部收缩,则其接受分数1。如果超过50%悬挂时间两个后肢朝向腹部部分收缩,则其接受分数2。如果超过50%悬挂时间其后肢完全收缩并且触碰腹部,则其接受分数3。观察各小鼠三次并且平均分数值用于统得

分析。

[0463] 图29(A)显示四个动物组中第4周至第22周后肢抱拢分数的进展。在5周龄时,与对照WT同窝小鼠小鼠(WT-veh)相比,经媒介物处理的HET小鼠(HET-veh)开始显示后肢抱拢,在7周龄时稳定,这表明STXBP1单倍剂量不足模型中的肌张力障碍的发展。与HET媒介物组相比,在5至22周的时期中HET小鼠中用长或短STXBP1变体进行的AAV处理减弱后肢抱拢的进展。22周龄时,在用STXBP1长变体处理的HET小鼠中记录的后肢抱拢程度类似于WT对照组(无显著差异,ns),这表明拯救肌张力障碍表型(图29(B))。22周龄时,STXBP1短变体显著减少HET小鼠中的后肢抱拢严重程度分数,但未恢复肌张力障碍表型至WT程度(图29(B))。

[0464] 丝线悬挂测试

[0465] AAV处理之后八周,小鼠进行四肢丝线悬挂测试(Klein等人,2012)以评估肌肉强度。将小鼠放置在丝网上,接着将其倒置并且轻缓地摇晃,使得小鼠抓紧丝线。记录掉落潜伏期,截止时间为90秒。如图30中所示,8周龄时,与用媒介物-PBS处理的其WT同窝小鼠小鼠相比,注射媒介物-PBS的HET小鼠显示掉落潜伏期显著增加。在用编码长人类STXBP1变体或短人类STXBP1变体的AAV处理的HET小鼠中消除掉落潜伏期的增加,表明完全拯救单倍剂量不足模型中的表型(图30)。

[0466] 恐惧条件测试

[0467] 在AAV处理之后十周,使用Pavlovian恐惧条件范例(Curzon等人,2009)评估联想学习和记忆,其中小鼠学习将特定环境(即,背景)和声音(即,线索)与足部电击相关联。恐惧记忆通过小鼠冻结体现,然后随后将其暴露于此特定背景或线索,无电击。恐惧条件测试在具有用于递送电击的栅格地板的腔室中进行(Ugo Basile)。腔室上方的摄影机用于监测小鼠。在6分钟训练期期间,将小鼠放置在腔室中(114-116勒克司光强度,一个灰色墙壁,栅格地板可见)度过2分钟适应期以评估基线冻结,并且接着打开声音(78-80dB,4kHz)30秒,紧跟着轻度足部电击(2s,0.5mA)。在第一次之后以1分钟之间隔时间再重复相同的背景-足部电击关联两次。在训练期之后,小鼠返回至其饲养笼。24小时后,测试小鼠的情境恐惧记忆。为此,将小鼠放置在同一训练腔室中,并且在无任何声音或足部电击刺激下监测其冻结行为5分钟。随后小鼠返回至其饲养笼。一小时后,在腔室已改变成3个格纹壁,金属栅格不可见,白色地板和14-16勒克司光强度以建立用于线索恐惧记忆测试的新背景之后,将小鼠转移至所述腔室。在腔室中度过2分钟适应期以测量基线冻结之后,在训练期中使用的相同声音打开四次,历时30秒,无足部电击,同时在7.5分钟试验时间期间监测冻结行为。使用基于视频的自动化系统,使用Ethovision软件(Noldus)测定冻结时间。

[0468] 图31显示四个动物组的情境测试结果(图31(A))和线索测试结果(图31(B))。用媒介物-PBS处理的STXBP1 HET小鼠与其WT同窝小鼠小鼠相比,展现背景和线索诱发的冻结行为的极度减少,这表明STXBP1单倍剂量不足模型中的联想学习和记忆不足(图31(A、B))。用长和短STXBP1变体进行的AAV处理引起情境和线索测试中的冻结行为增加(图31(A、B))。长变体处理的作用与HET媒介物处理组显著不同,这表明背景和线索诱发的冻结行为的拯救。与HET媒介物处理动物(图31(B))相比,短STXBP1变体处理在线索测试中引起显著增加,并且在情境测试中显示冻结增加的趋势(图31(A))。总体而言,用STXBP1变体进行的AAV处理有可能拯救在STXBP1单倍剂量不足小鼠模型中观察到的联想学习和记忆缺陷。

[0469] 表19:STXBP1单倍剂量不足小鼠模型中行为疾病症状的概述。

[0470] 将HET STXBP1小鼠中的观察结果与WT同窝小鼠小鼠比较并且归类为减少(↓)或增加(↑)。包括STXBP1长或短变体过表达的AAV处理的作用标记为“恢复”(相对于HET媒介物处理小鼠统计学上显著的变化)或“趋势”(观察到但非统计学上显著的变化)。

[0471]

			AAV处理组	
症状	测试	HET中的观察结果 (vs WT)	长变体	短变体
生长缺陷	体重	↓	恢复	趋势
癫痫	癫痫发作(SWD)	↑	恢复	恢复
运动功能障碍	后肢抱拢(肌张力障碍)	↑	恢复	恢复
	丝线悬挂 (肌肉强度)	↑	恢复	恢复
精神病症	恐惧条件(联想学习记忆)	↓	恢复	趋势

[0472] 参考文献

[0473] Abramov D,Guiberson NGL,Burre J(2020).STXBP1 encephalopathies: Clinical spectrum,disease mechanisms,and therapeutic strategies.Journal of neurochemistry.

[0474] Bertrand-Mathon等人(2015).Increasing the effectiveness of intracerebral injections in adult and neonatal mice:a neurosurgical point of view.Neuroscience Bulletin,Springer Verlag,2015,31(6),pp.685-696.hal-01196282.

[0475] Chen W,Cai ZL,Chao ES,Chen H,Longley CM,Hao S,等人(2020).Stxbp1/Munc18-1 haploinsufficiency impairs inhibition and mediates key neurological features of STXBP1 encephalopathy.eLife 9.

[0476] Curzon等人(2009)Methods of Behavior Analysis in Neuroscience.2nd edition.Boca Raton(FL):CRC Press/Taylor&Francis,Chapter 2.

[0477] Dulubova I等人(2007)Munc18-1binds directly to the neuronal SNARE complex,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 104:2697-2702.

[0478] Guyenet等人(2010)A simple composite phenotype scoring system for evaluating mouse models of cerebellar ataxia,J Vis Exp.21:1787.

[0479] Hamada N,Iwamoto I,Tabata H,Nagata KI(2017).MUNC18-1 gene abnormalities are involved in neurodevelopmental disorders through defective cortical architecture during brain development.Acta Neuropathol Commun 5:92.

[0480] Hamodi,A.等人(2020).Transverse sinus injections drive robust whole-brain expression of transgenes.eLIFE.DOI:10.7554/eLife.53639.

[0481] Kalidas S,Santosh V,Shareef MM,Shankar SK,Christopher R,Shetty KT(2000).Expression of p67(Munc-18)in adult human brain and neuroectodermal tumors of human central nervous system.Acta Neuropathol 99:191-198.

[0482] Kim,J.Y等人(2014).Intracerebroventricular Viral Injection of the Neonatal Mouse Brain for Persistent and Widespread Neuronal

Transduction.J.Vis.Exp. (91) ,e51863,doi:10.3791/51863(2014) .

[0483] Klein等人(2012)Noninvasive in vivo assessment of muscle impairment in the mdx mouse model-a comparison of two common wire hanging methods with two different results,J Neurosci Methods 203:292-7.

[0484] Kovacevic J,Maroteaux G,Schut D,Loos M,Dubey M,Pitsch J,等人(2018) .Protein instability,haploinsufficiency,and cortical hyper-excitability underlie STXBP1 encephalopathy.Brain:a journal of neurology 141(5):1350-1374.

[0485] MacLean B,等人(2010) .Skyline:an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments.Bioinformatics 26(7) 966-968.

[0486] Meijer M,Cijsouw T,Toonen RF,Verhage M(2015) .Synaptic Effects of Munc18-1 Alternative Splicing in Excitatory Hippocampal Neurons.PloS one 10: e0138950.

[0487] Orock A,Logan S,Deak F(2018) .Munc18-1 haploinsufficiency impairs learning and memory by reduced synaptic vesicular release in a model of Ohtahara syndrome.Molecular and cellular neurosciences 88:33-42.

[0488] Patzke C,Han Y,Covy J,Yi F,Maxeiner S,Wernig M,等人(2015) .Analysis of conditional heterozygous STXBP1 mutations in human neurons.The Journal of clinical investigation 125:3560-3571.

[0489] Ramos-Miguel A,Hercher C,Beasley CL,Barr AM,Bayer TA,Falkai P,等人(2015) .Loss of Munc18-1 long splice variant in GABAergic terminals is associated with cognitive decline and increased risk of dementia in a community sample.Molecular neurodegeneration 10:65.

[0490] Saitsu H,Kato M,Mizuguchi T,Hamada K,Osaka H,Tohyama J,等人(2008) .De novo mutations in the gene encoding STXBP1(MUNC18-1)cause early infantile epileptic encephalopathy.Nature Genetics 40(6):782-788.

[0491] Stamberger H,Nikanorova M,Willemsen MH,Accorsi P,Angriman M,Baier H, 等人(2016) .STXBP1 encephalopathy:A neurodevelopmental disorder including epilepsy.Neurology 86:954-962.

[0492] Swanson DA,Steel JM,Valle D(1998) .Identification and characterization of the human ortholog of rat STXBP1,a protein implicated in vesicle trafficking and neurotransmitter release.Genomics 48:373-376.

[0493] Toonen RF,Wierda K,Sons MS,de Wit H,Cornelisse LN,Brussaard A,等人(2006) .Munc18-1 expression levels control synapse recovery by regulating readily releasable pool size.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103:18332-18337.

[0494] Tremblay,R.G.等人(2010) .Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons.J Neurosci Methods 186,60-67,doi:10.1016/j.jneumeth.2009.11.004.

[0495] Uriguen L, Gil-Pisa I, Munarriz-Cuezva E, Berrocoso E, Pascau J, Soto-Montenegro ML, 等人 (2013). Behavioral, neurochemical and morphological changes induced by the overexpression of munc18-1a in brain of mice: relevance to schizophrenia. Translational psychiatry 3:e221.

[0496] Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, Vermeer H, 等人 (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. Science 287:864-869.

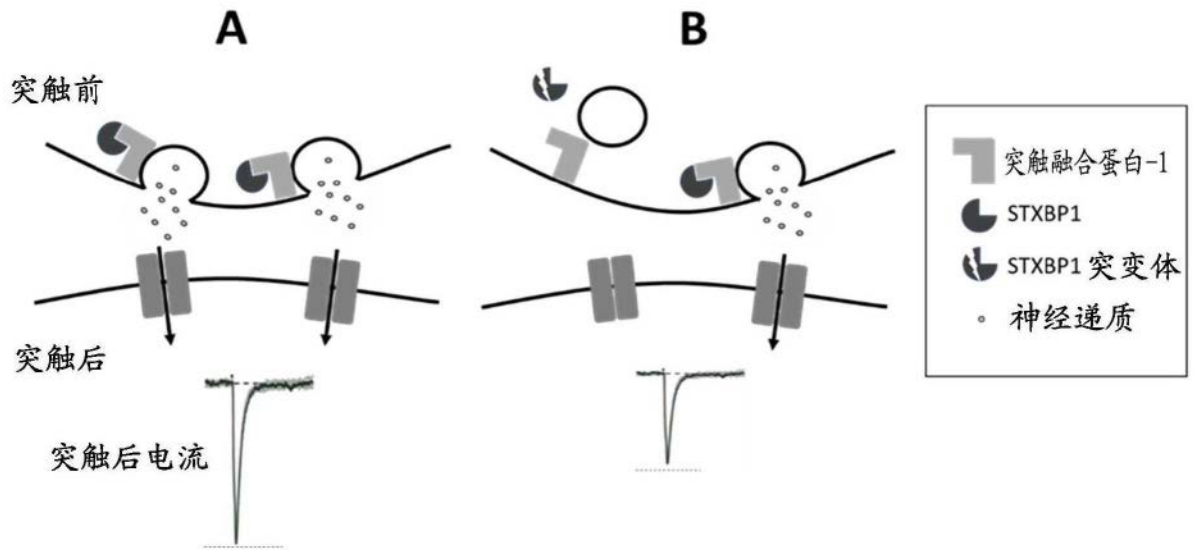


图1

小鼠_STXBP1_IsoA_NP_001107041.1	mapiglkavgekimhdivikkvkkkgewkvlvvdqlsmrmlsscckmtdimtegitived	60
人类_STXBP1_IsoA_NP_003156.1	mapiglkavgekimhdivikkvkkkgewkvlvvdqlsmrmlsscckmtdimtegitived	60
恒河猴_STXBP1_IsoA_XP_014972082.1	mapiglkavgekimhdivikkvkkkgewkvlvvdqlsmrmlsscckmtdimtegitived	60
小鼠_STXBP1_IsoA_NP_001107041.1	inkrrreplpsleavylitpsekshvslisdfkdpptakyrarahvftdscpdalfnelvk	120
人类_STXBP1_IsoA_NP_003156.1	inkrrreplpsleavylitpsekshvslisdfkdpptakyrarahvftdscpdalfnelvk	120
恒河猴_STXBP1_IsoA_XP_014972082.1	inkrrreplpsleavylitpsekshvslisdfkdpptakyrarahvftdscpdalfnelvk	120
小鼠_STXBP1_IsoA_NP_001107041.1	sraakvikltteiniaflpyesqvysldsadsfqsfsphkagmknpielerlaeqiatlc	180
人类_STXBP1_IsoA_NP_003156.1	sraakvikltteiniaflpyesqvysldsadsfqsfsphkagmknpielerlaeqiatlc	180
恒河猴_STXBP1_IsoA_XP_014972082.1	sraakvikltteiniaflpyesqvysldsadsfqsfsphkagmknpielerlaeqiatlc	180
小鼠_STXBP1_IsoA_NP_001107041.1	atlkeypavryrgeykdnalllaqliqdkidaykaddptmggepdksarsqlilldrgfdps	240
人类_STXBP1_IsoA_NP_003156.1	atlkeypavryrgeykdnalllaqliqdkidaykaddptmggepdksarsqlilldrgfdps	240
恒河猴_STXBP1_IsoA_XP_014972082.1	atlkeypavryrgeykdnalllaqliqdkidaykaddptmggepdksarsqlilldrgfdps	240
小鼠_STXBP1_IsoA_NP_001107041.1	spvlheltfamsydlplpiendvvyksetsgigearvkevlldeddlwialrhkhiaevs	300
人类_STXBP1_IsoA_NP_003156.1	spvlheltfamsydlplpiendvvyksetsgigearvkevlldeddlwialrhkhiaevs	300
恒河猴_STXBP1_IsoA_XP_014972082.1	spvlheltfamsydlplpiendvvyksetsgigearvkevlldeddlwialrhkhiaevs	300
小鼠_STXBP1_IsoA_NP_001107041.1	qevtrslkdfsskskrmntgekttmrdlsqmlkmpqyqkelskysthlhlaedcmkhyqg	360
人类_STXBP1_IsoA_NP_003156.1	qevtrslkdfsskskrmntgekttmrdlsqmlkmpqyqkelskysthlhlaedcmkhyqg	360
恒河猴_STXBP1_IsoA_XP_014972082.1	qevtrslkdfsskskrmntgekttmrdlsqmlkmpqyqkelskysthlhlaedcmkhyqg	360
小鼠_STXBP1_IsoA_NP_001107041.1	tvdklcrveqdlamgtdaegekikdpmraivpildanvstydkiriillyiflknkite	420
人类_STXBP1_IsoA_NP_003156.1	tvdklcrveqdlamgtdaegekikdpmraivpildanvstydkiriillyiflknkite	420
恒河猴_STXBP1_IsoA_XP_014972082.1	tvdklcrveqdlamgtdaegekikdpmraivpildanvstydkiriillyiflknkite	420
小鼠_STXBP1_IsoA_NP_001107041.1	enlnkklhaqippedseiitnmahlgvpivtdstlrrrskperkeriseqtyqlsrwtp	480
人类_STXBP1_IsoA_NP_003156.1	enlnkklhaqippedseiitnmahlgvpivtdstlrrrskperkeriseqtyqlsrwtp	480
恒河猴_STXBP1_IsoA_XP_014972082.1	enlnkklhaqippedseiitnmahlgvpivtdstlrrrskperkeriseqtyqlsrwtp	480
小鼠_STXBP1_IsoA_NP_001107041.1	iiikdimediedkldtkhypyistrssasfsttavsaryghwnkapgeyrsgprliif	540
人类_STXBP1_IsoA_NP_003156.1	iiikdimediedkldtkhypyistrssasfsttavsaryghwnkapgeyrsgprliif	540
恒河猴_STXBP1_IsoA_XP_014972082.1	iiikdimediedkldtkhypyistrssasfsttavsaryghwnkapgeyrsgprliif	540
小鼠_STXBP1_IsoA_NP_001107041.1	ilggvslnemrcayevtqangkwevligsthilltptkflmdlrhpdfressrvsfedqap	600
人类_STXBP1_IsoA_NP_003156.1	ilggvslnemrcayevtqangkwevligsthilltptkflmdlrhpdfressrvsfedqap	600
恒河猴_STXBP1_IsoA_XP_014972082.1	ilggvslnemrcayevtqangkwevligsthilltptkflmdlrhpdfressrvsfedqap	600
小鼠_STXBP1_IsoA_NP_001107041.1	tme	603
人类_STXBP1_IsoA_NP_003156.1	tme	603
恒河猴_STXBP1_IsoA_XP_014972082.1	tme	603

图2

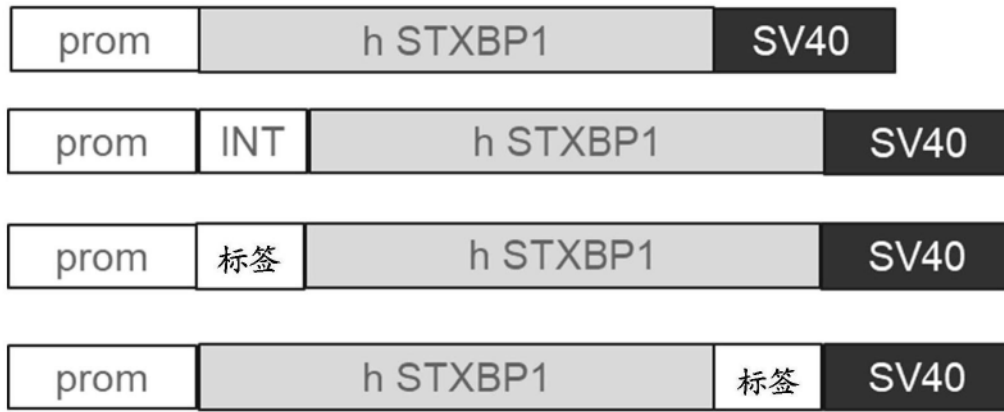


图3

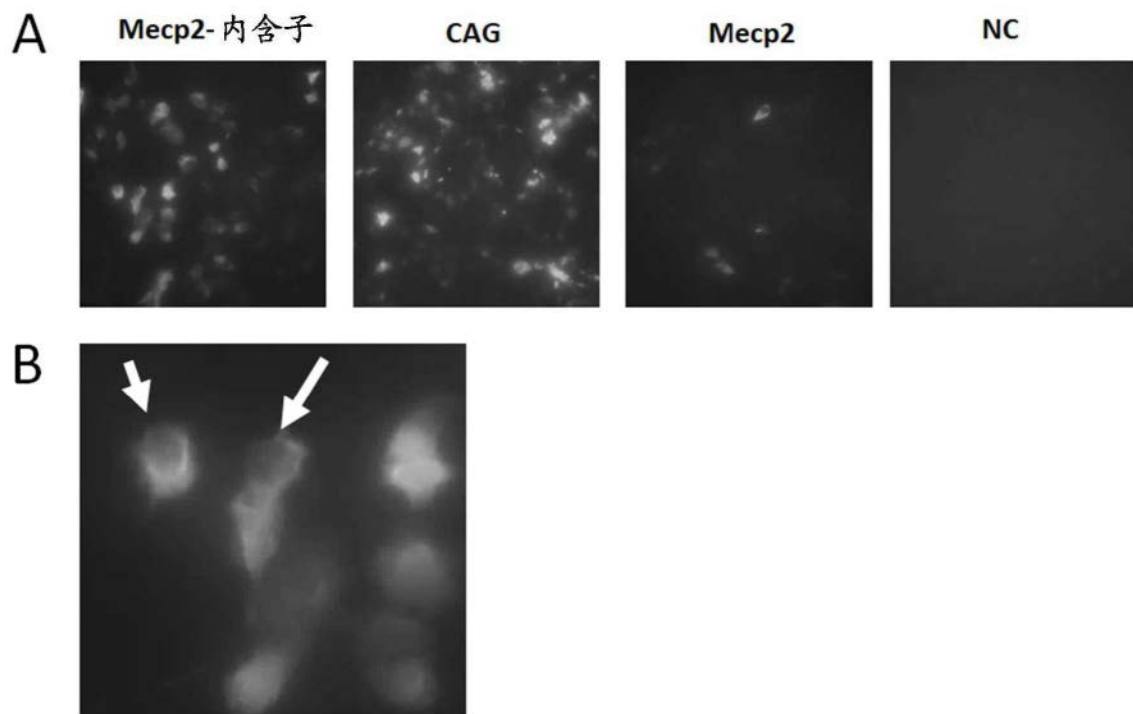


图4

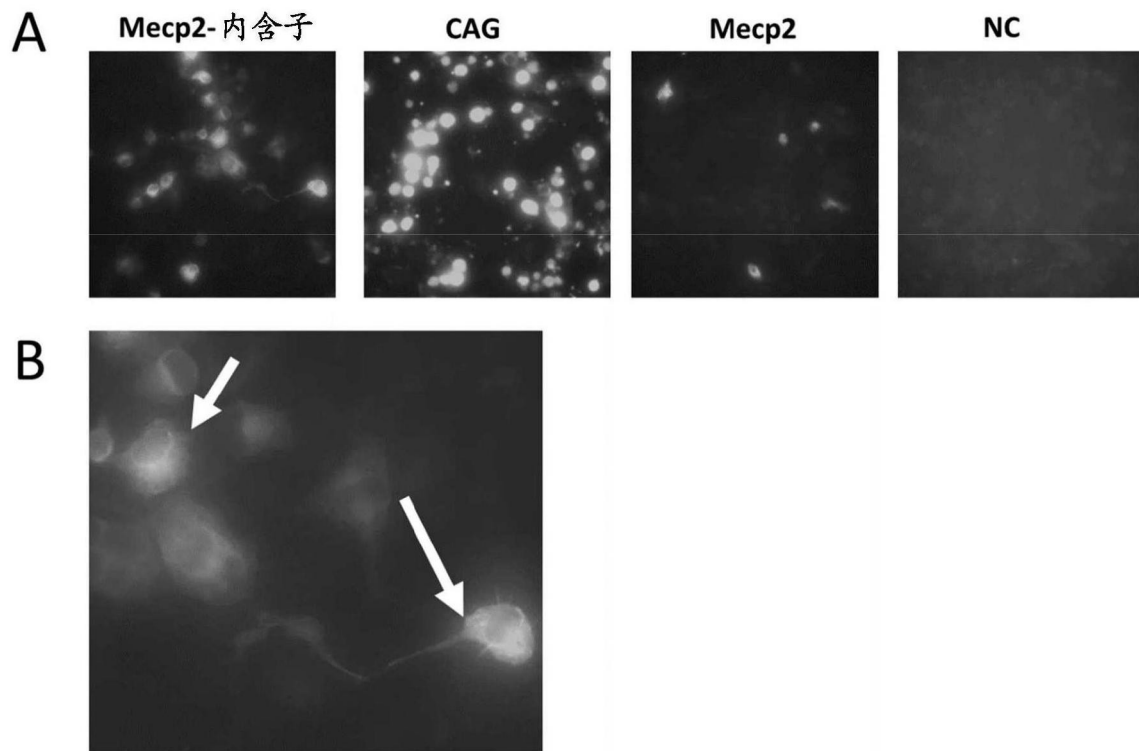


图5

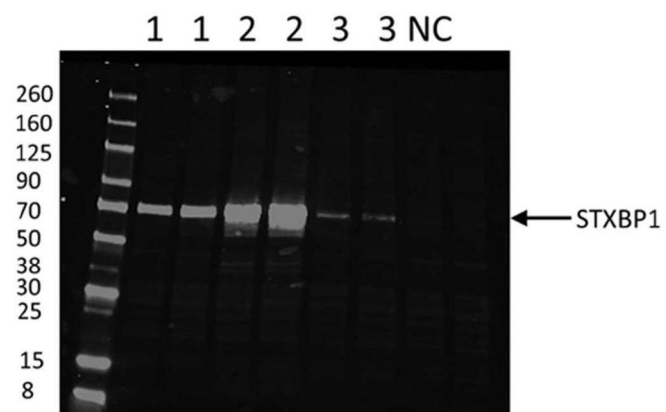


图6

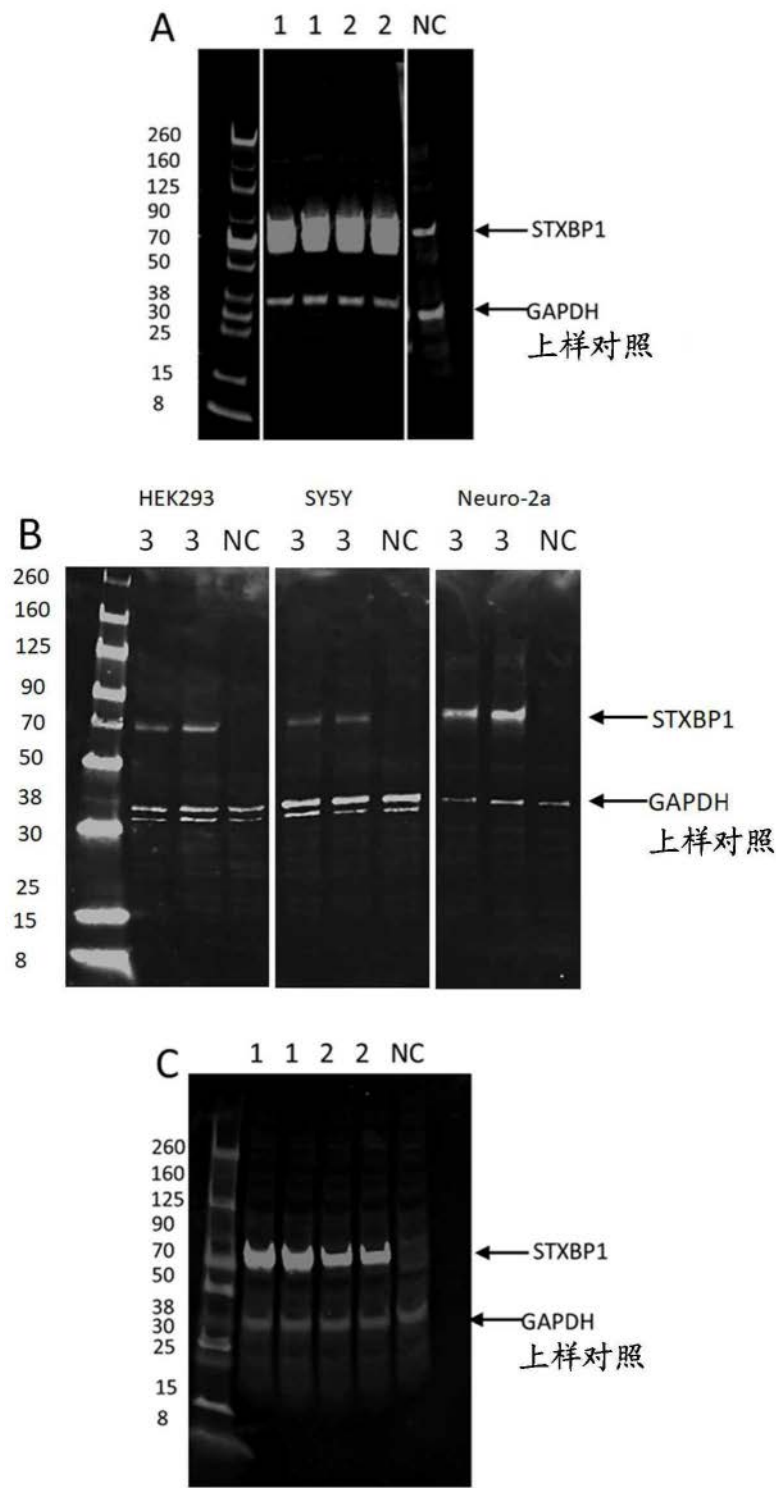


图7

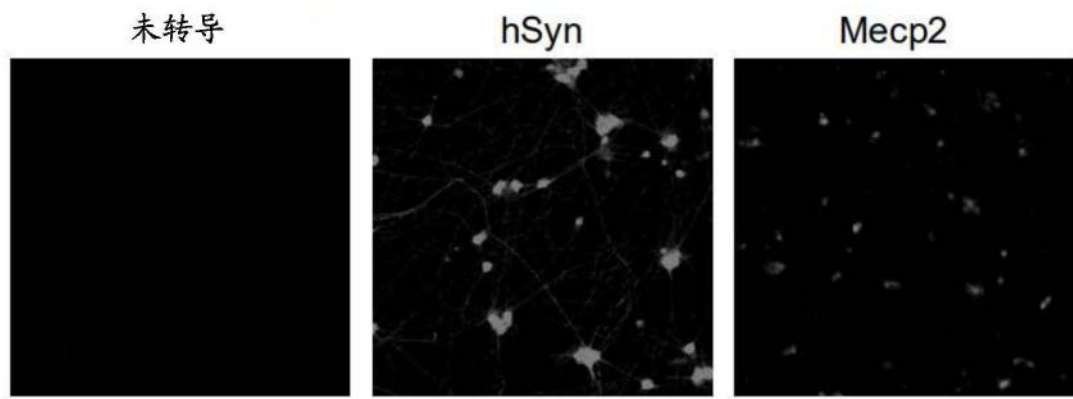


图8

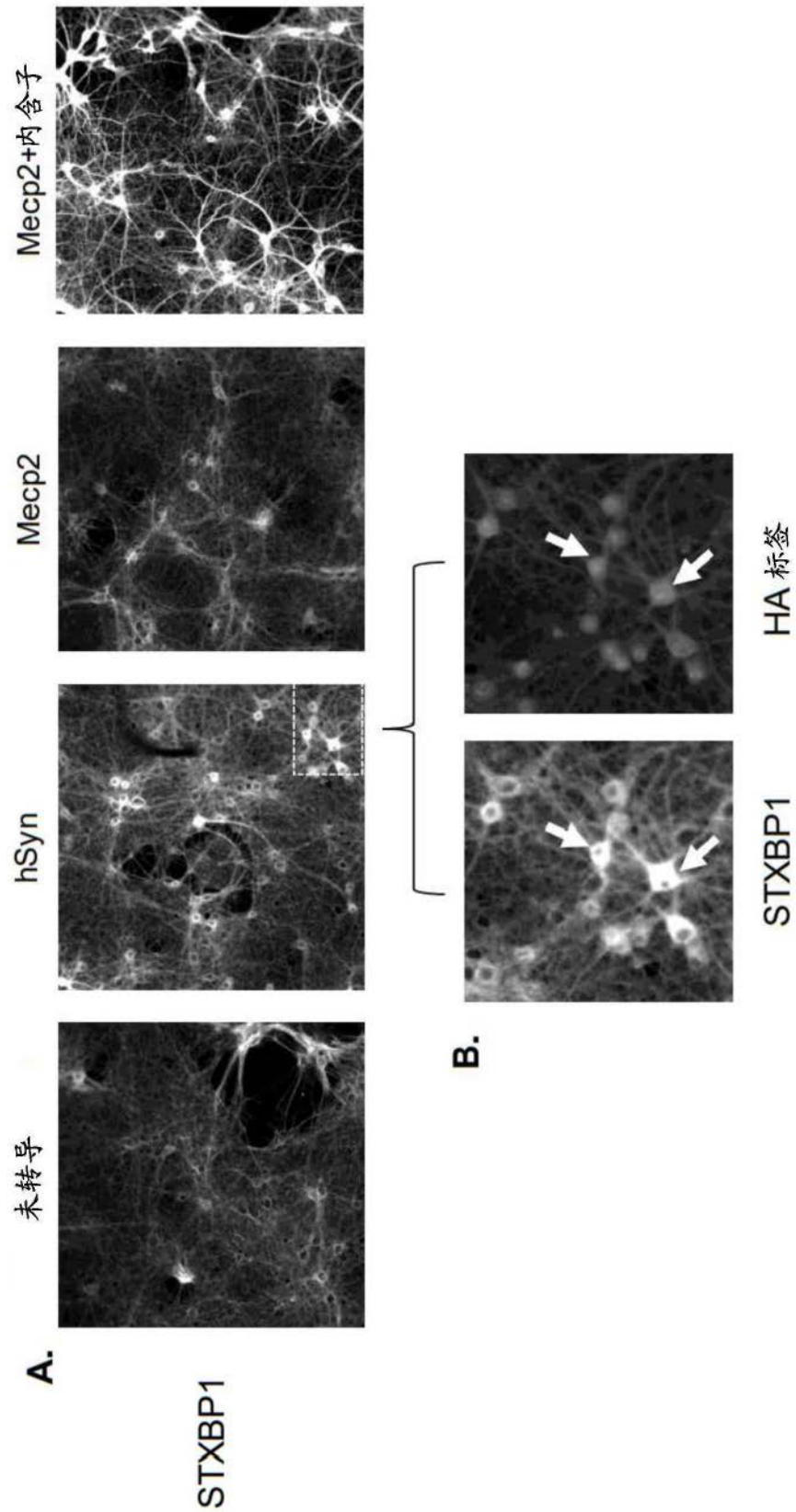


图9

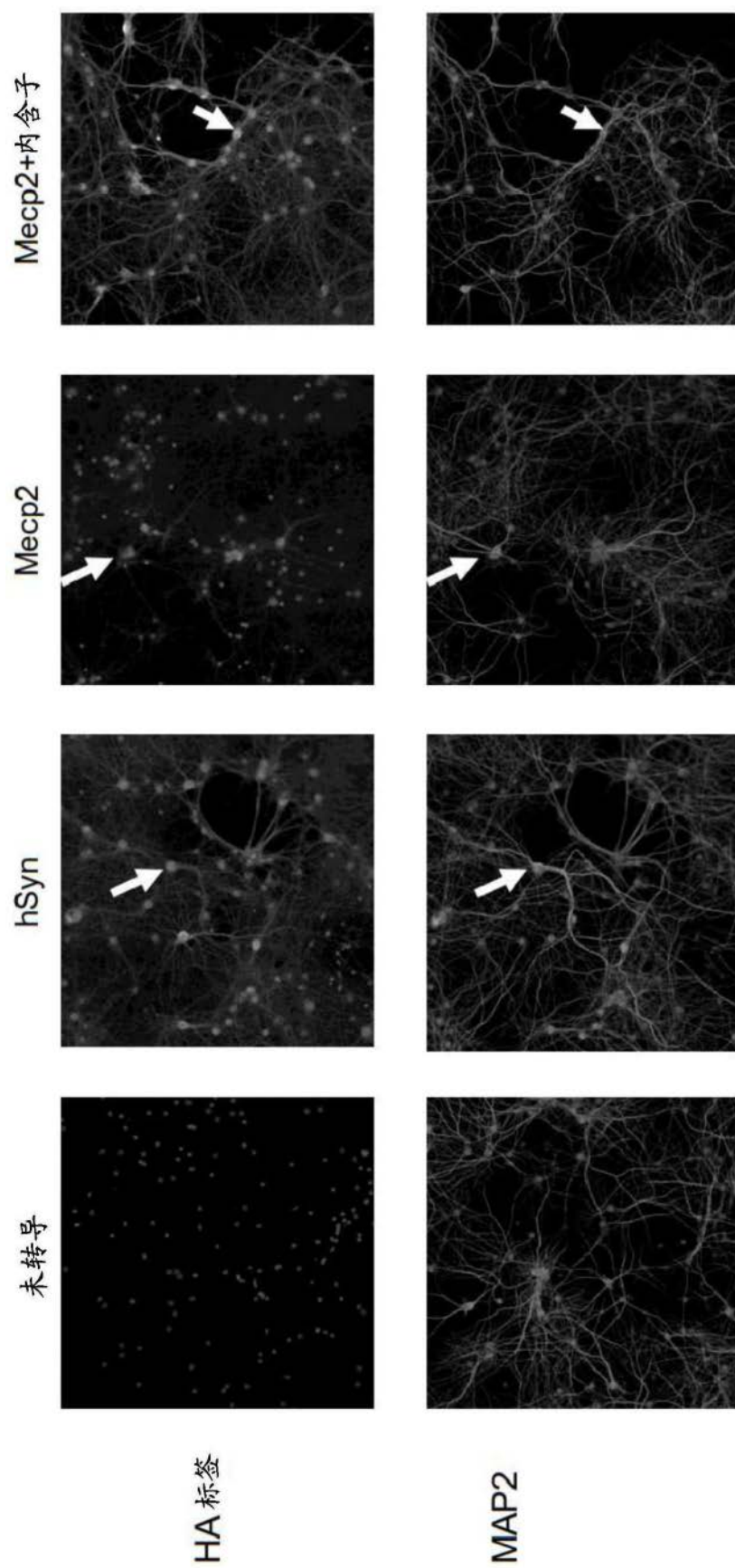


图10

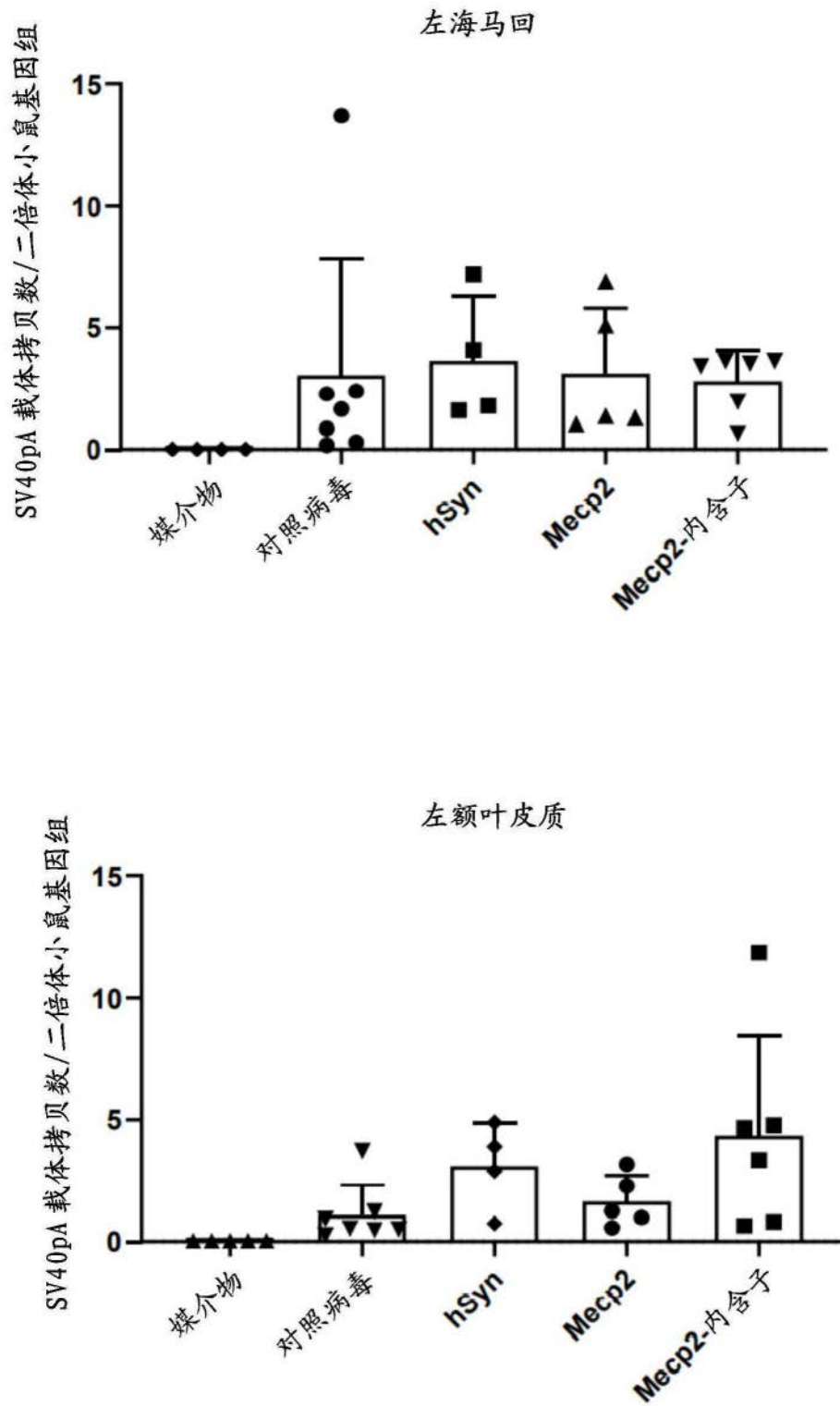


图11

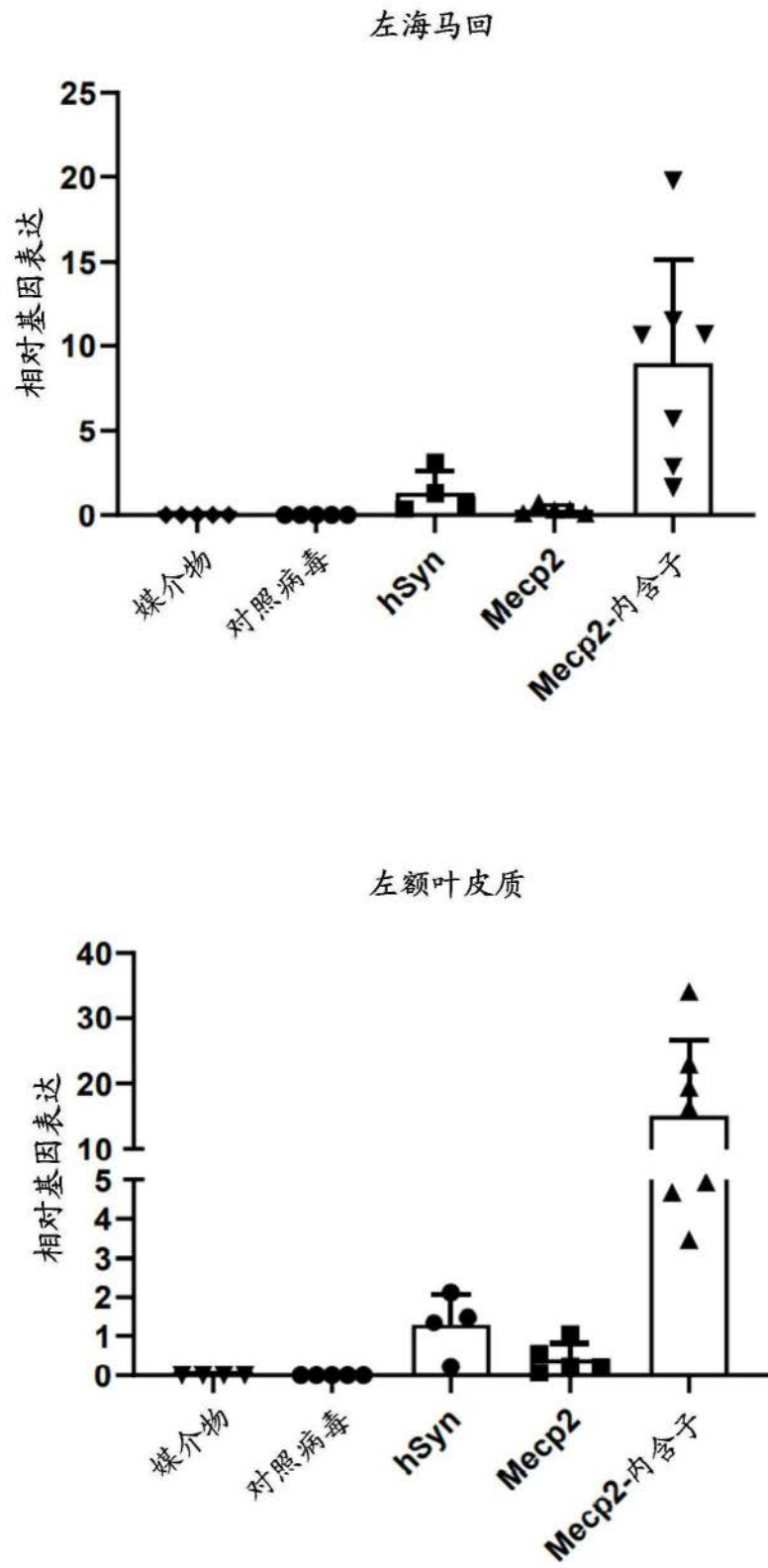


图12

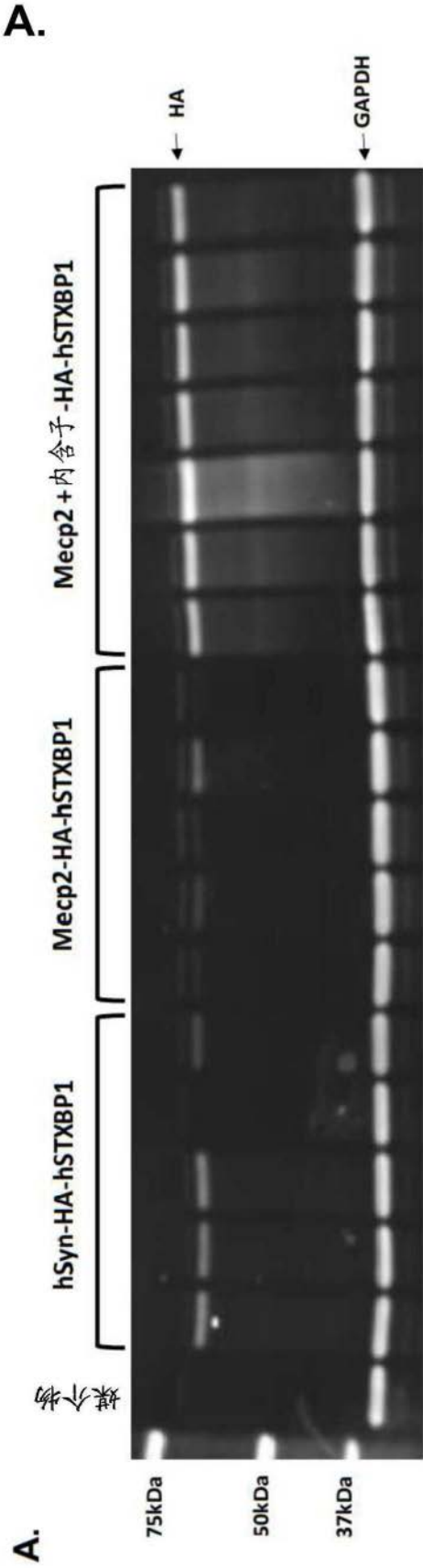


图13

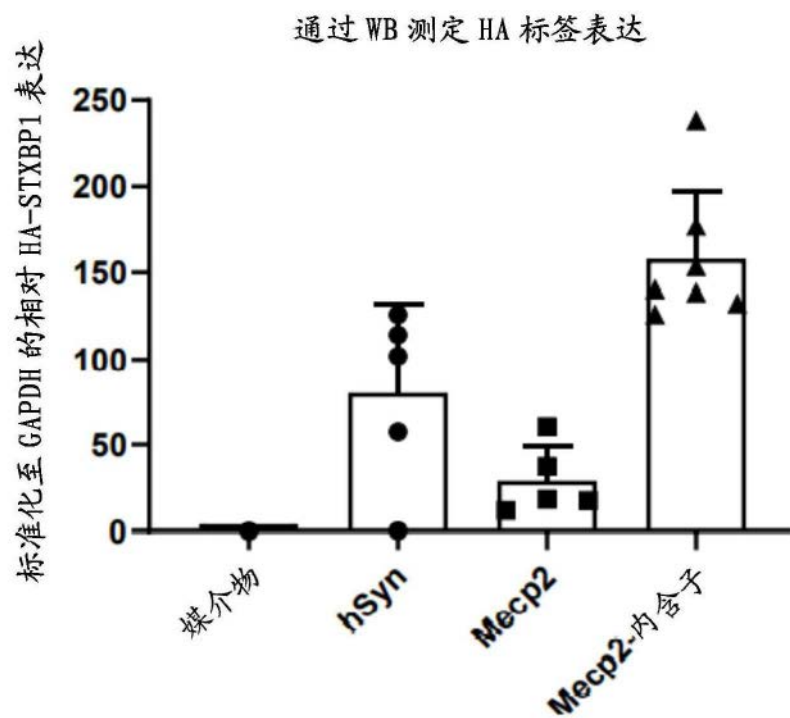
B.

图13续

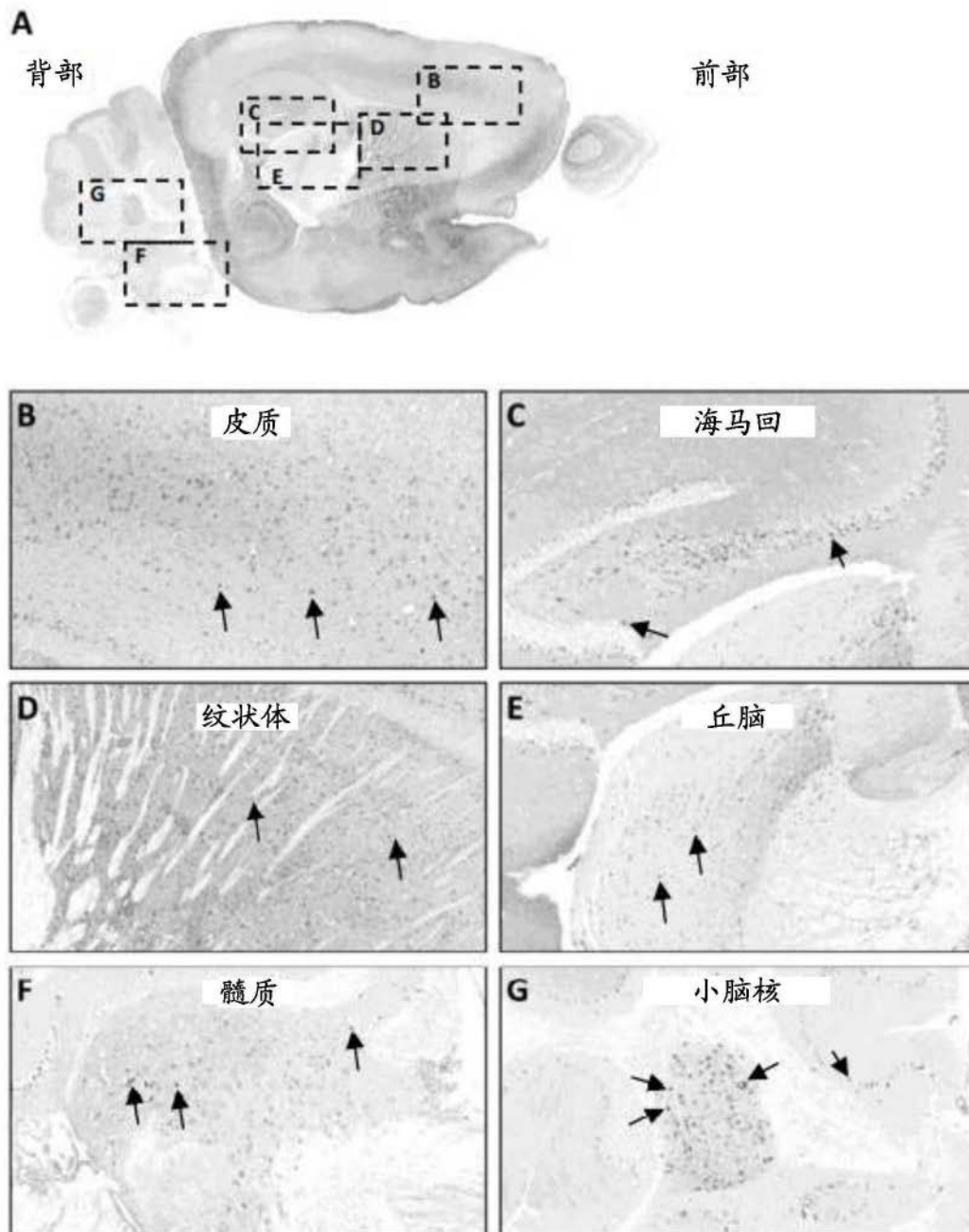


图14

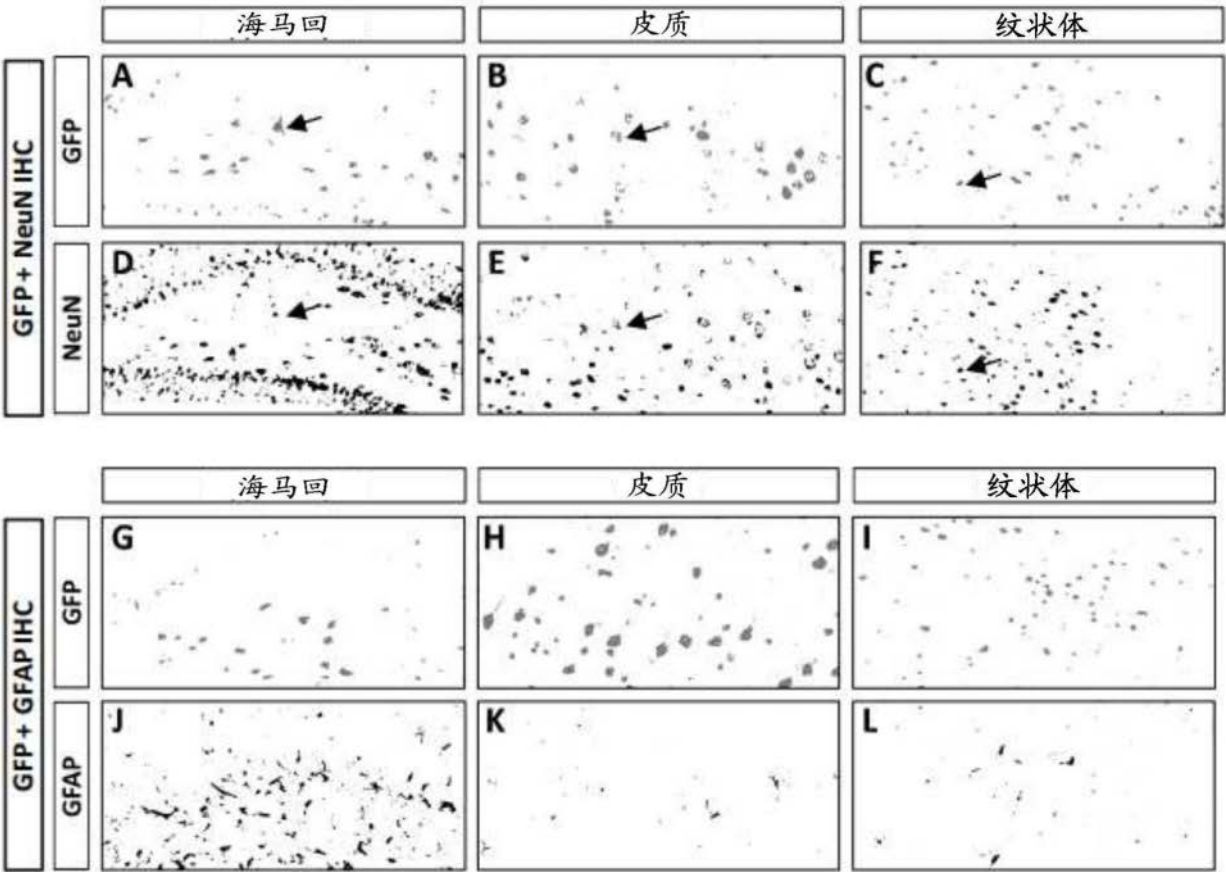


图15

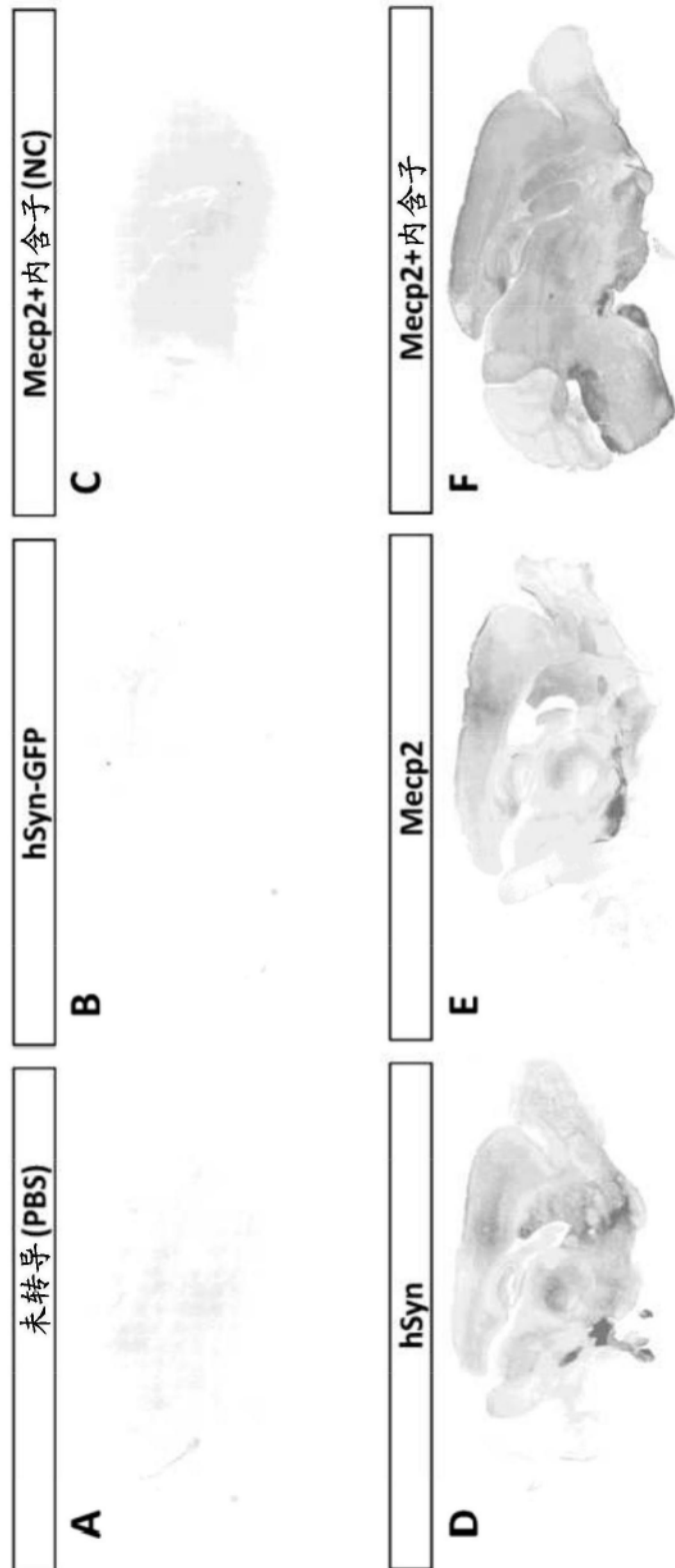


图16

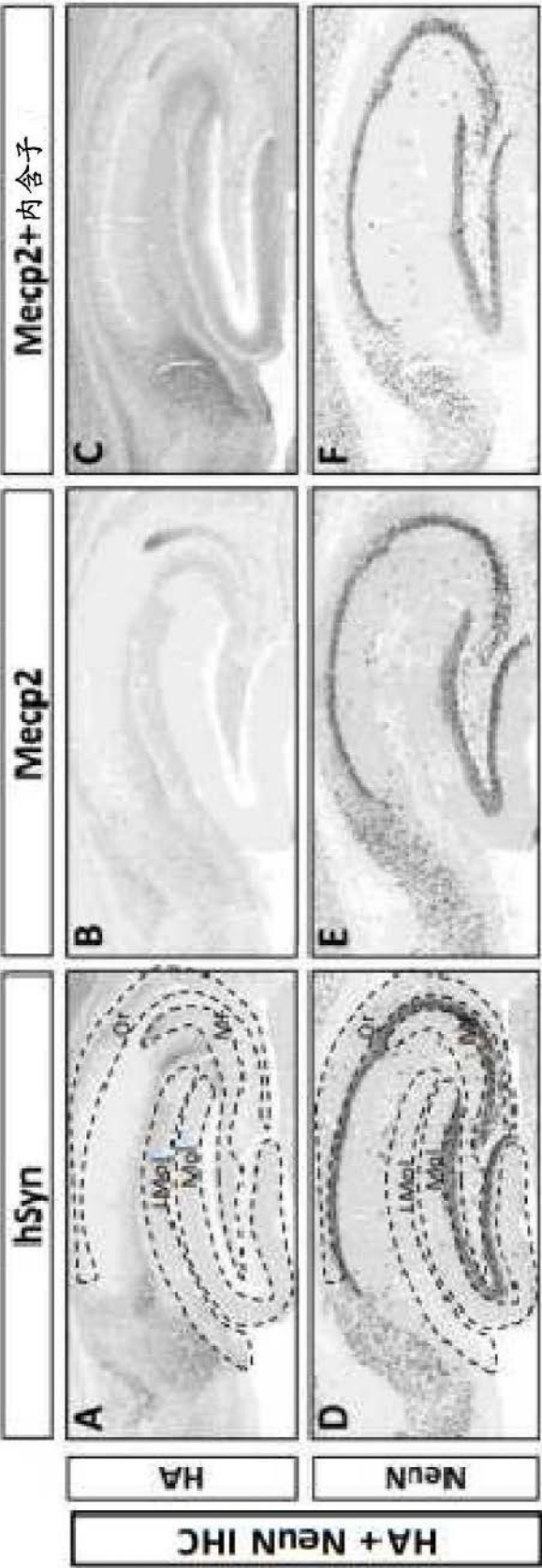


图17

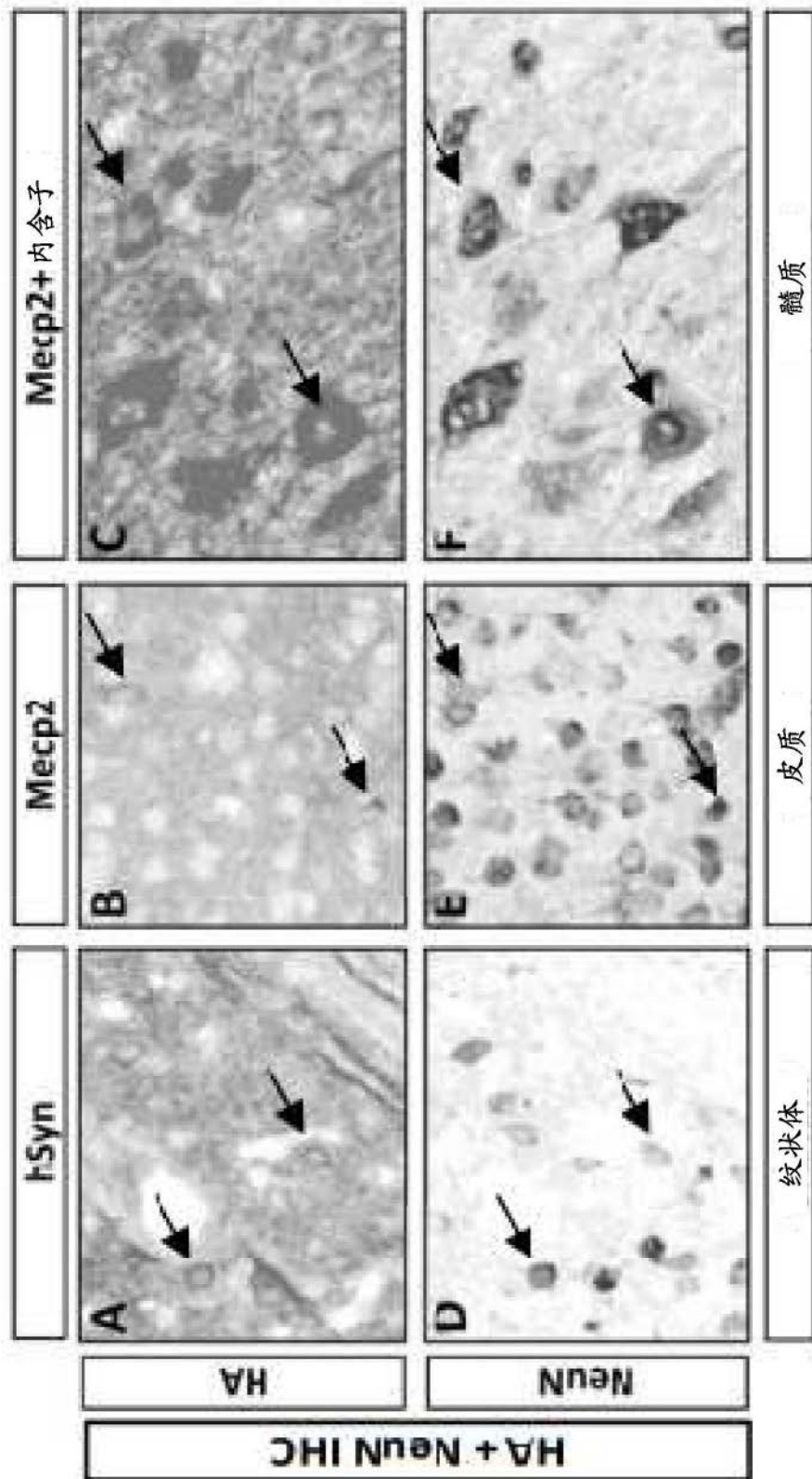
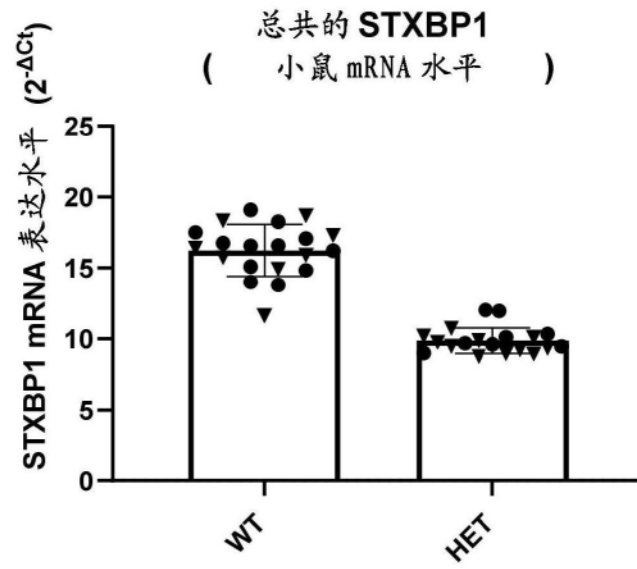


图18

A



B

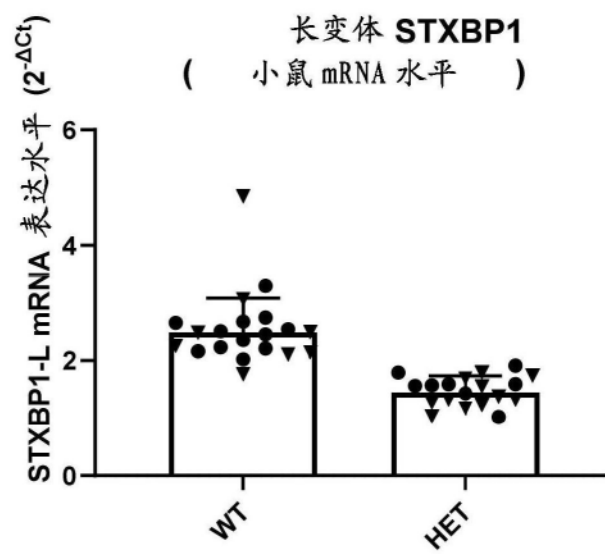


图19

C

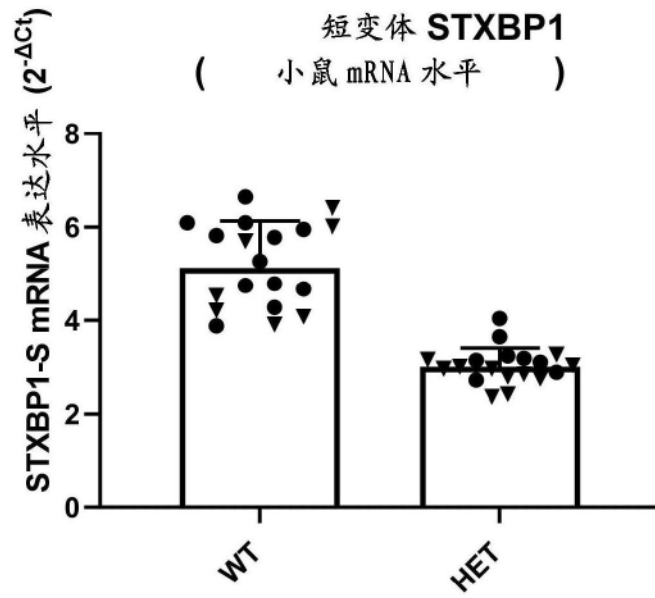


图19续

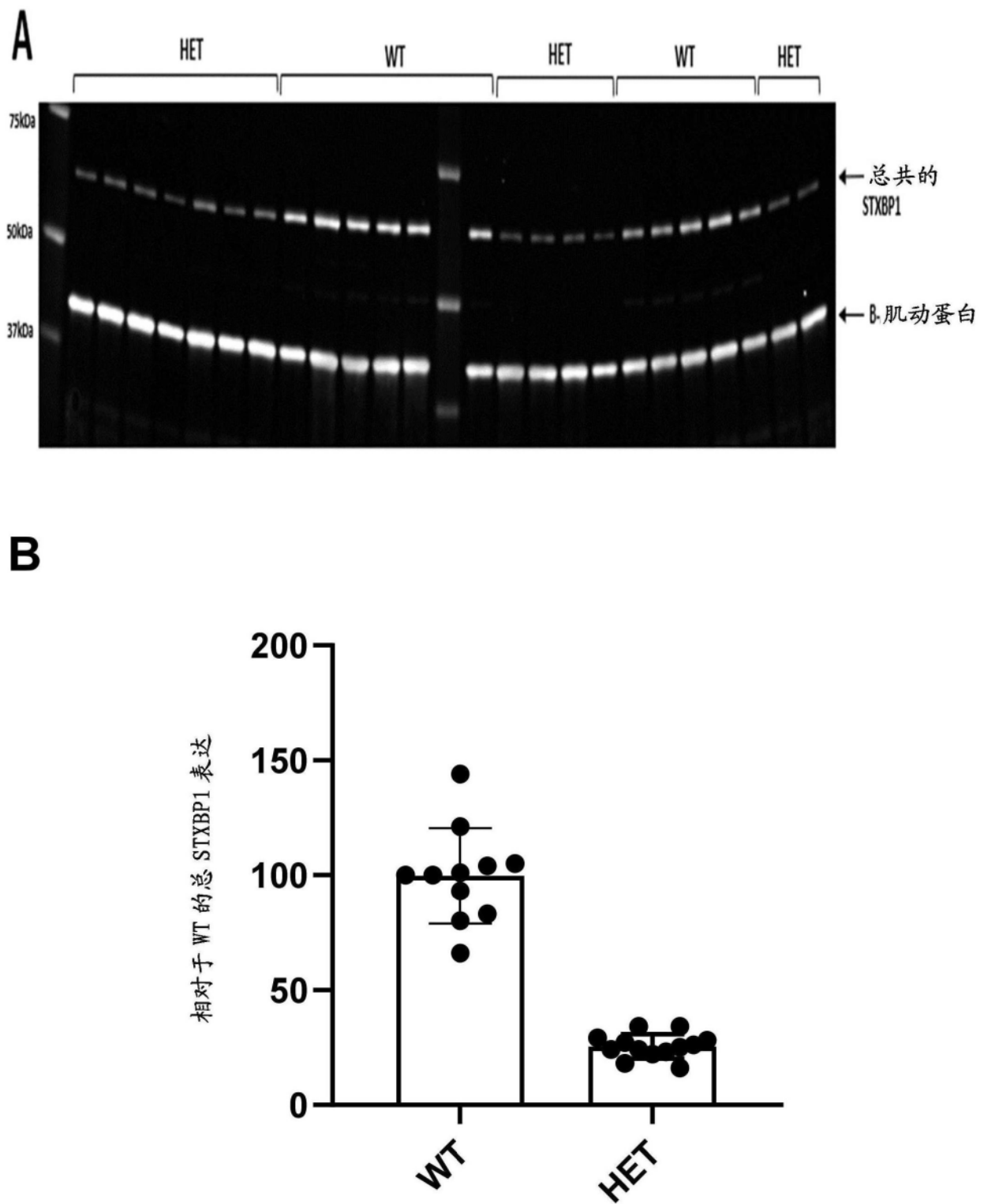


图20

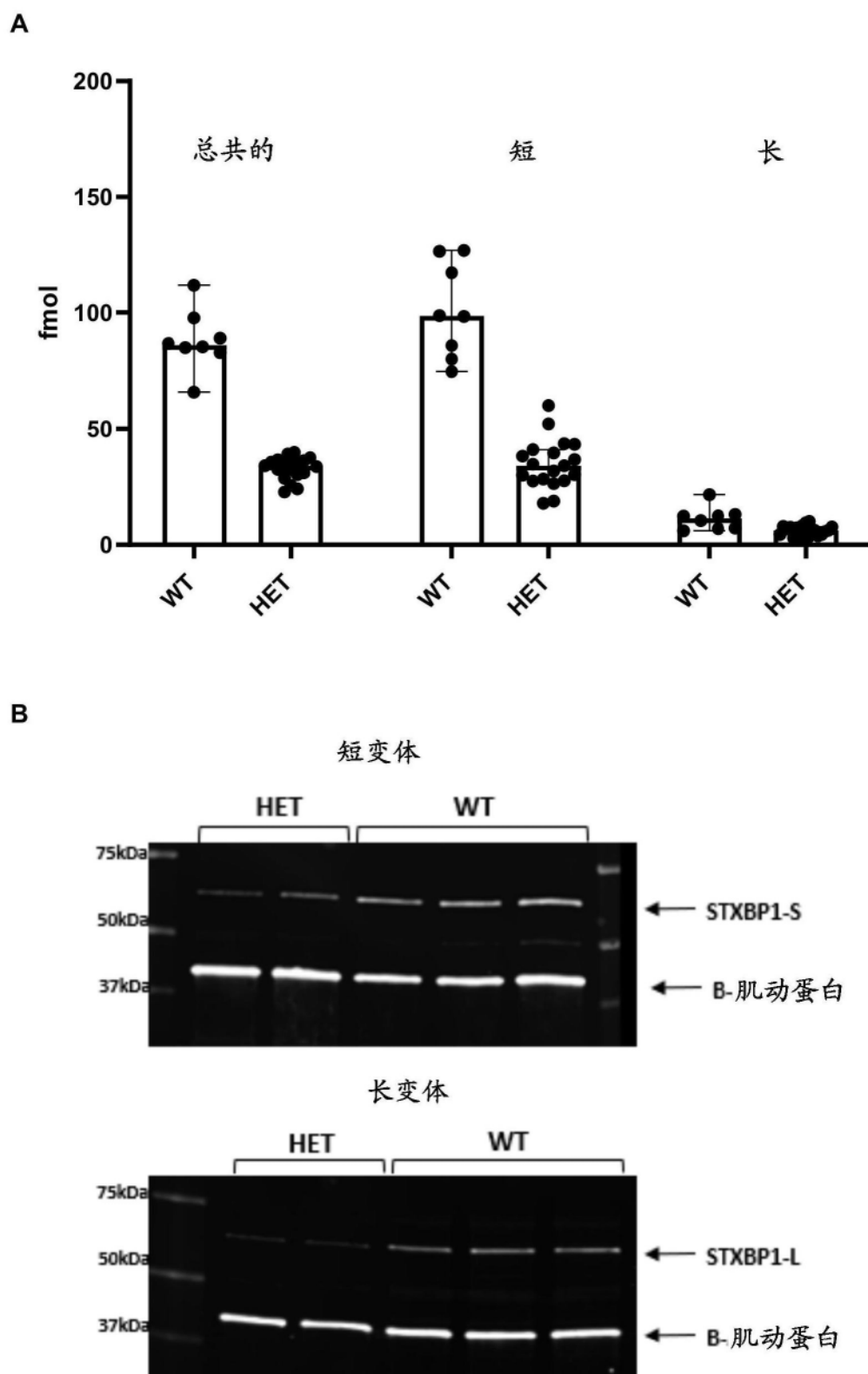


图21

C

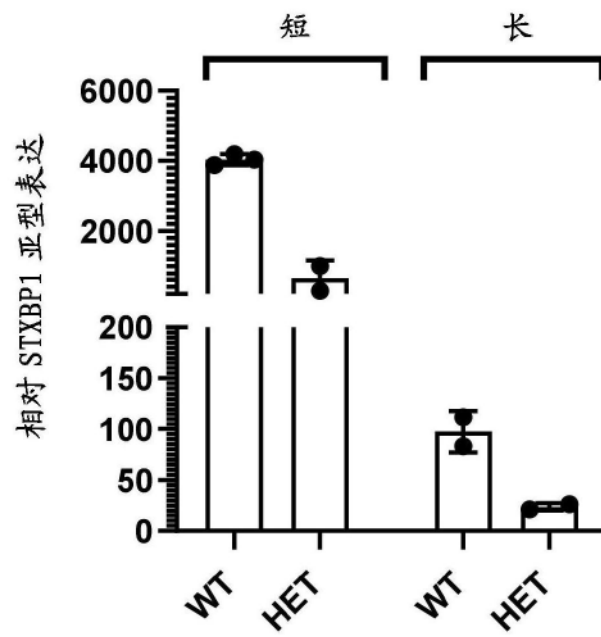


图21续

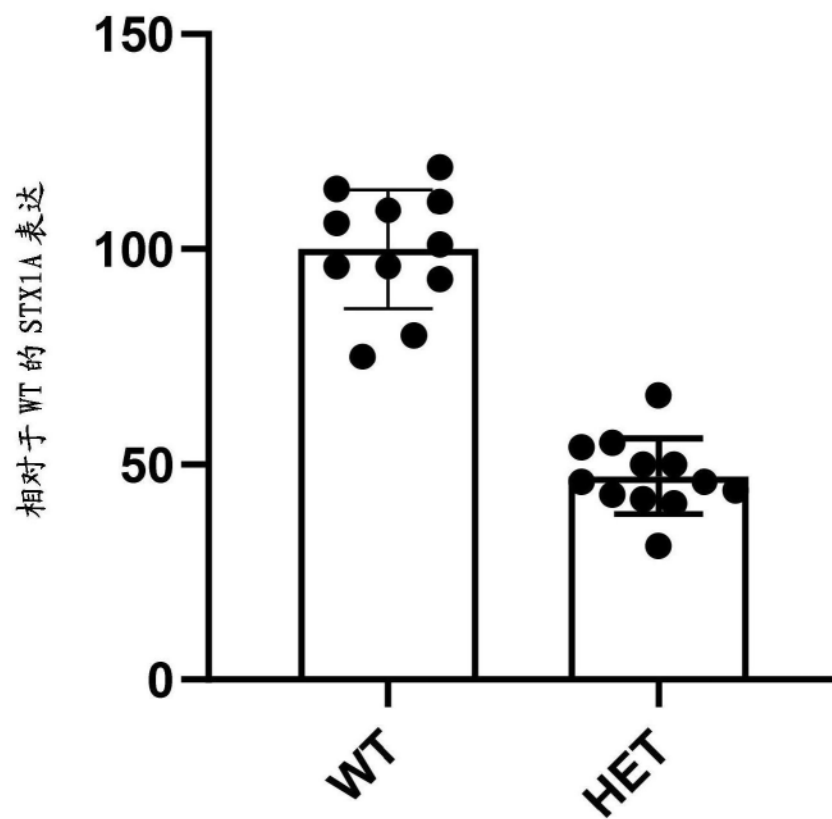


图22

C

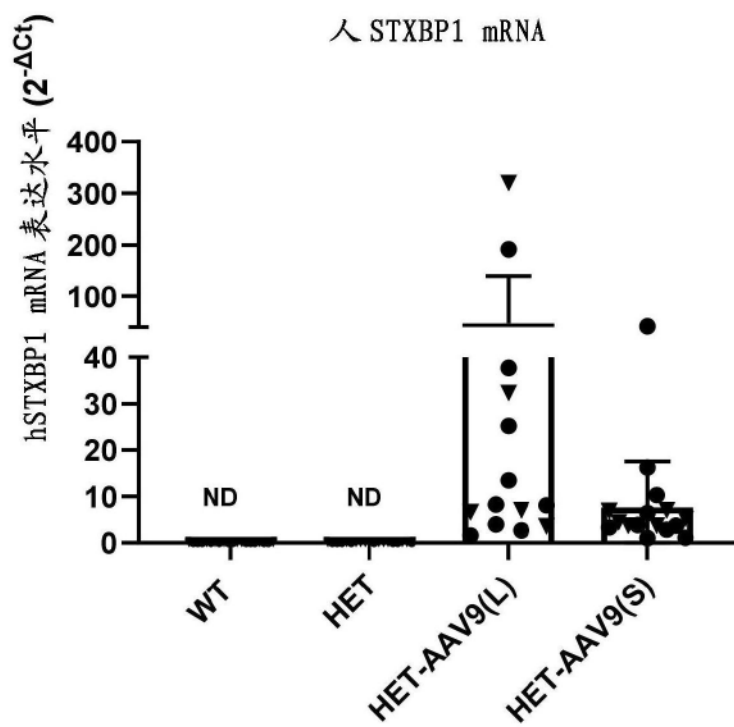
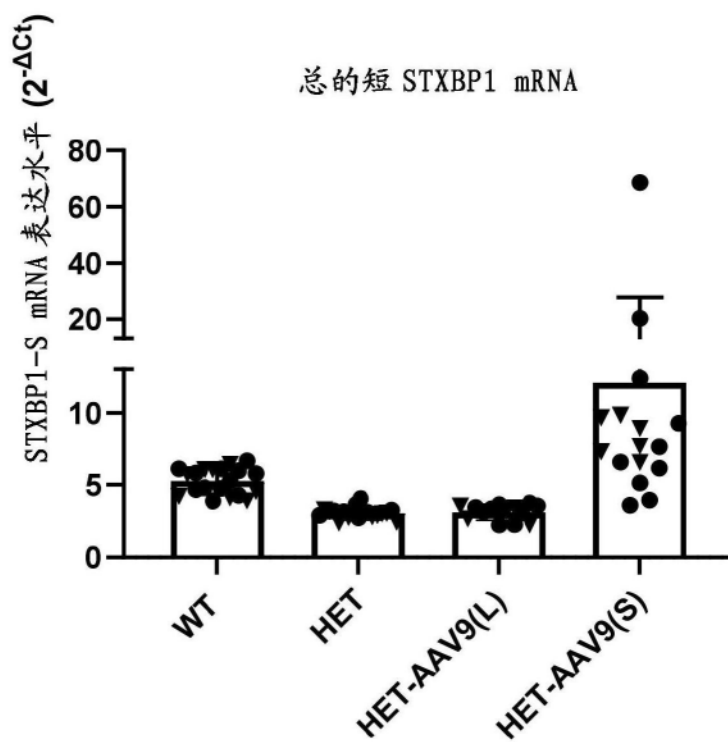


图23续

A



B

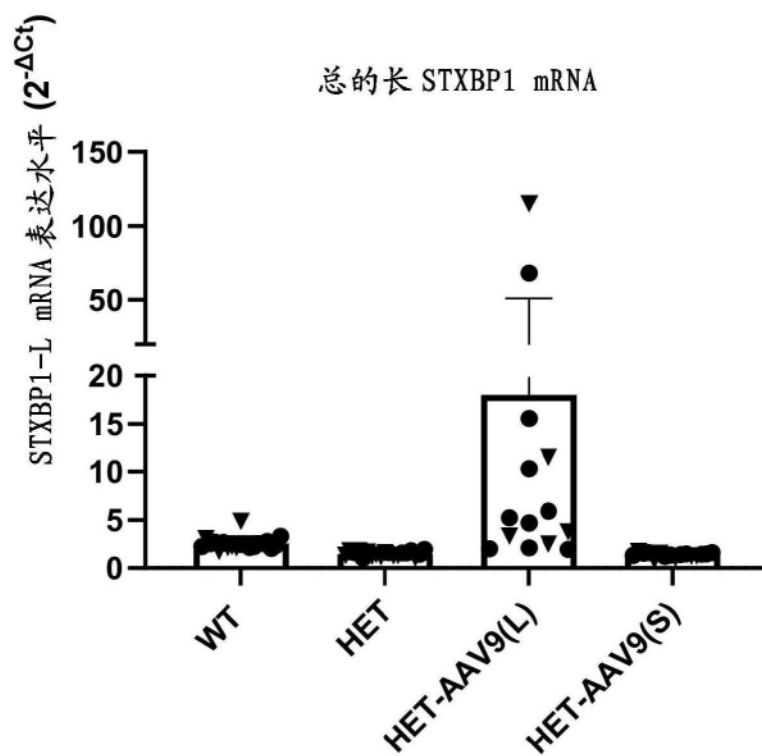
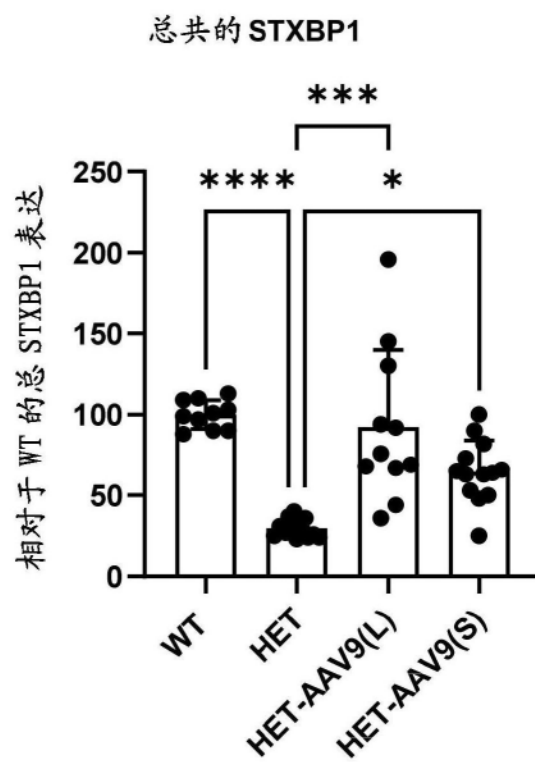


图24

A



B

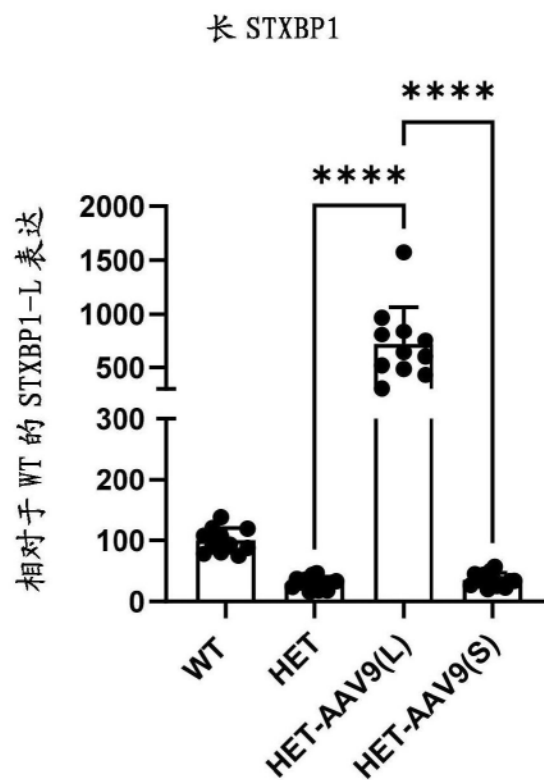
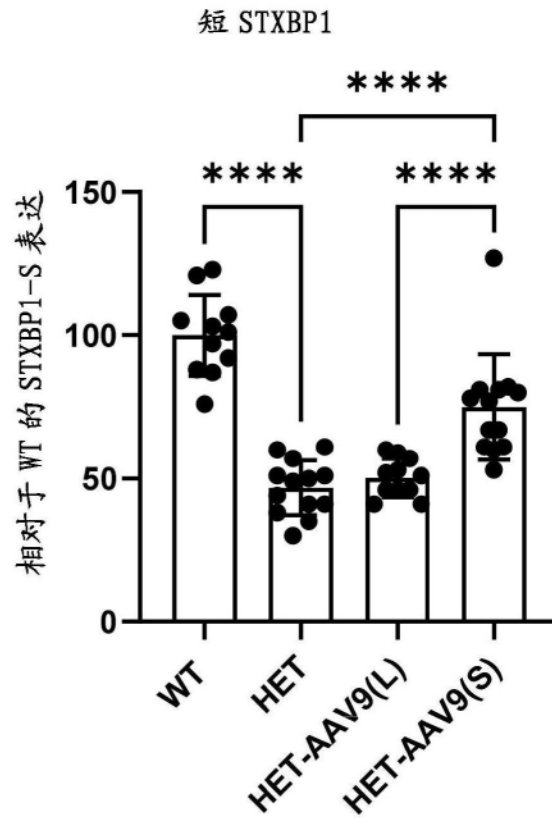


图25

C



D

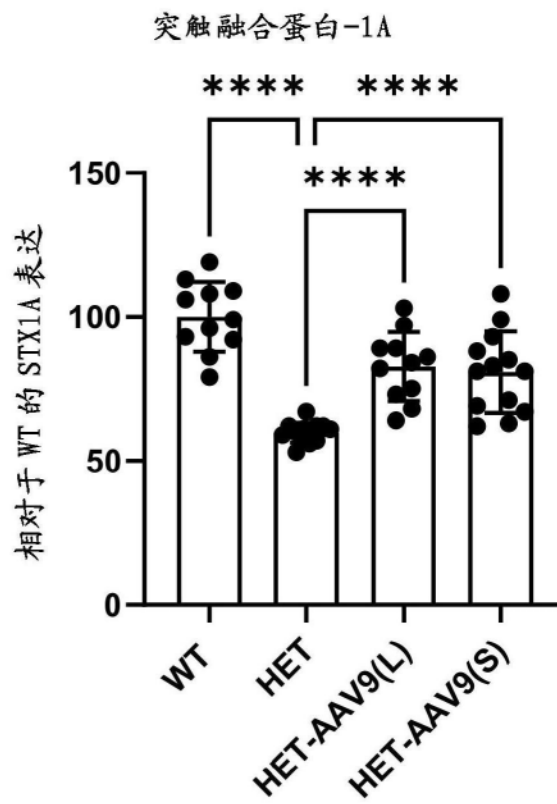


图25续

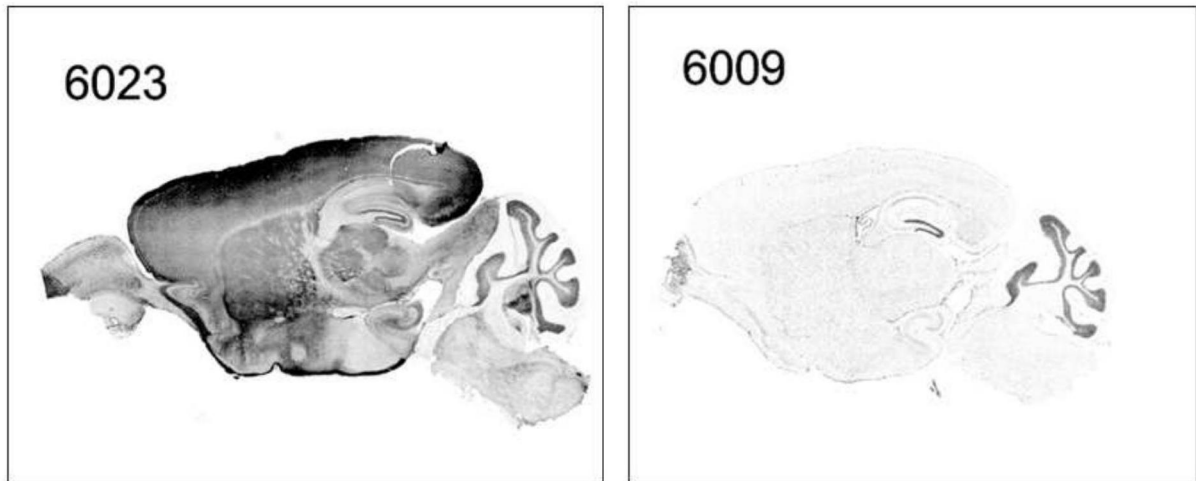
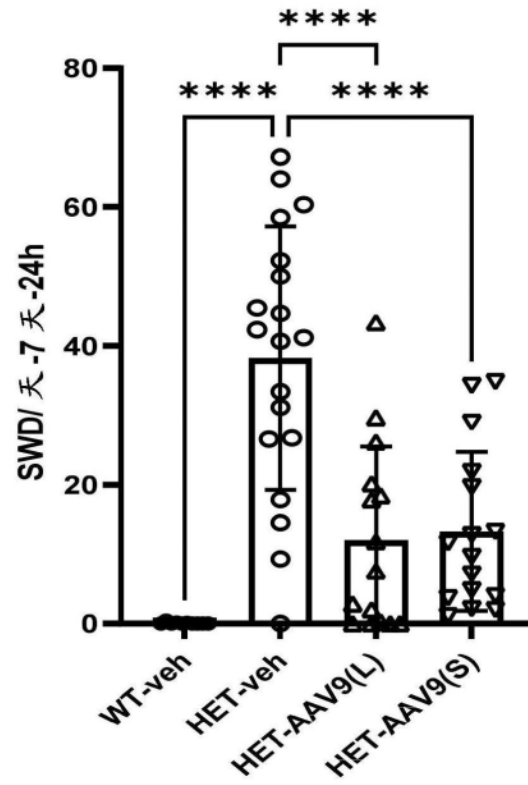
HET + AAV9 STXBP1_长_HA**HET + PBS**

图26

A



B

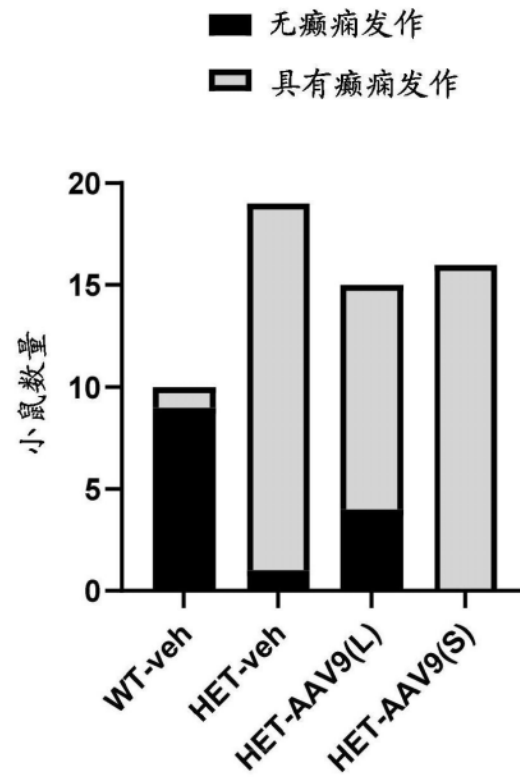
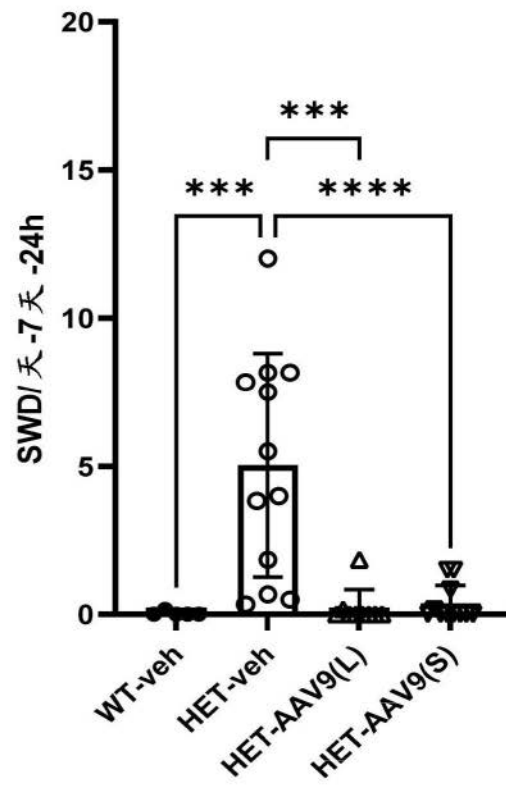


图27

C



D

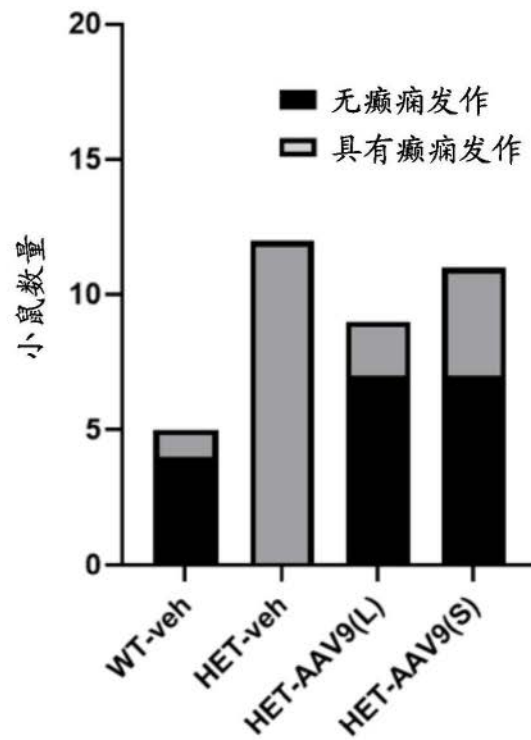
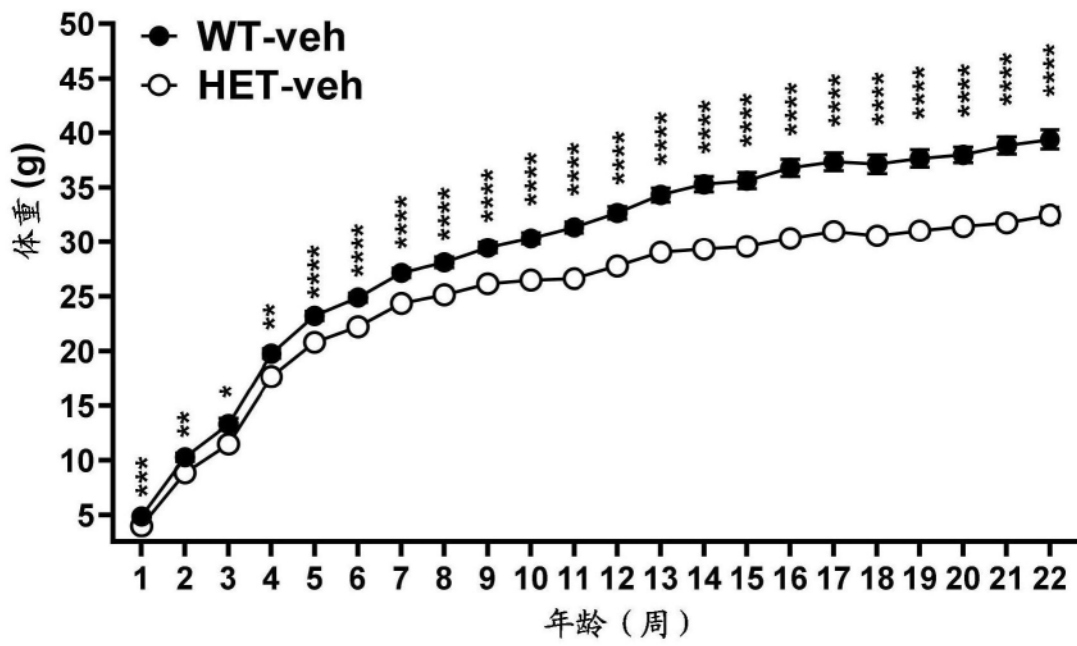


图27续

A



B

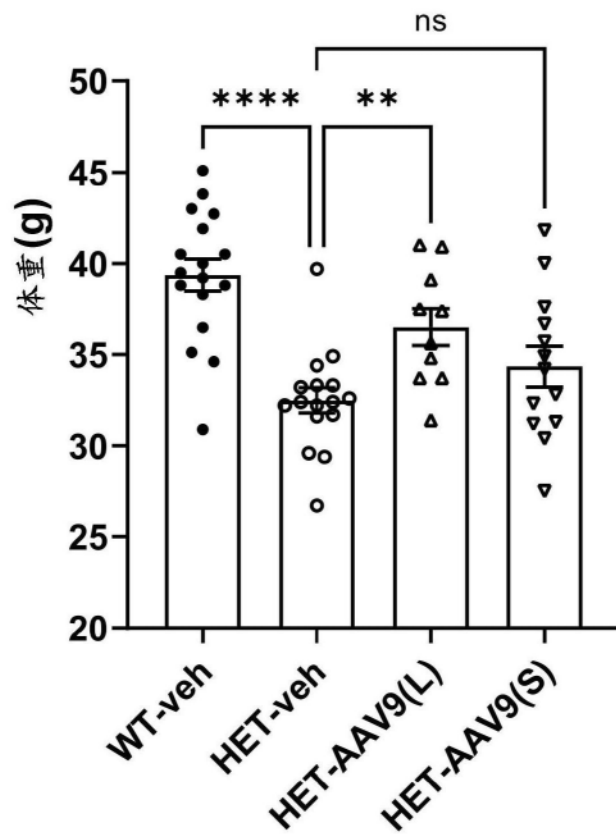
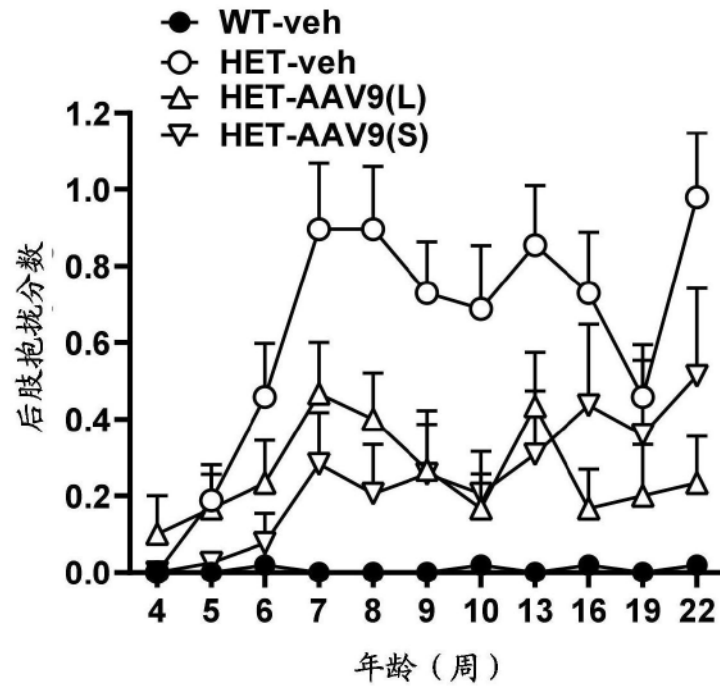


图28

A



B

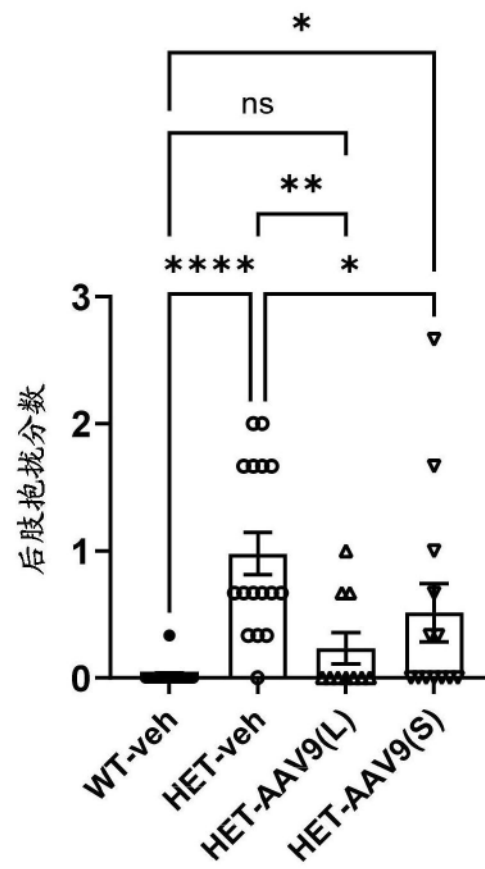


图29

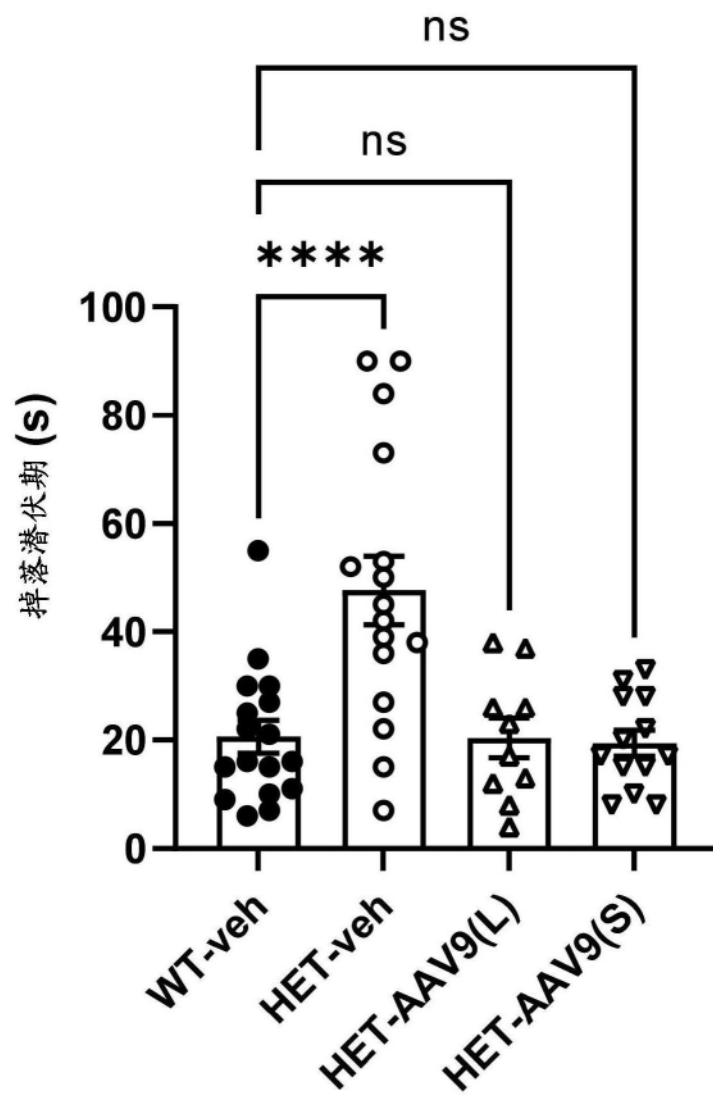
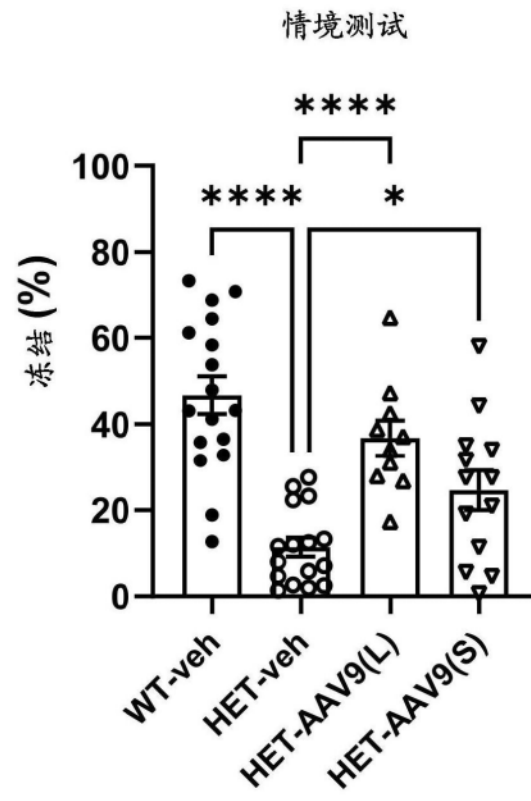


图30

A



B

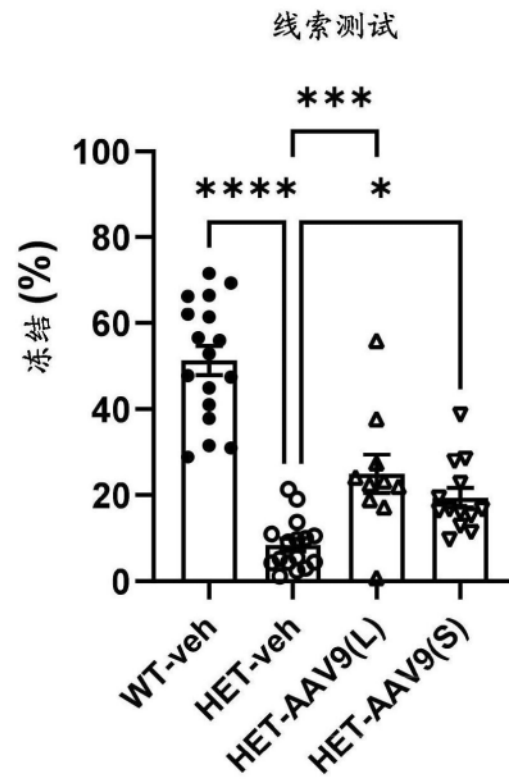


图31