I862584

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I862584 B**

(45)公告日： 中華民國 113 (2024) 年 11 月 21 日

(21)申請案號：109113701 (22)申請日： 中華民國 109 (2020) 年 04 月 23 日

(51)Int. Cl.： *C07K14/47 (2006.01)* *C12N15/86 (2006.01)*
A61K48/00 (2006.01) *A61P25/28 (2006.01)*

(30)優先權：2019/04/23 美國 62/837,523
2020/01/23 美國 62/964,844

(71)申請人：美商聖加莫治療股份有限公司 (美國) SANGAMO THERAPEUTICS, INC. (US)
美國

(72)發明人：納漢 約瑟夫 F NABHAN, JOSEPH F. (CA)；帕嗒瑪嗒 阿姆儒嗒 PATTAMATTA, AMRUTHA (IN)；杉彌 穆罕穆德 SAMIE, MOHAMMAD (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 2005/0235369A1

期刊 Niblock, Michael et al. Retention of hexanucleotide repeat-containing intron in C9orf72 mRNA: implications for the pathogenesis of ALS/FTD. vol. 4 18 Acta neuropathologica communications 2016/02/25 pages 1-12

審查人員：張維纓

申請專利範圍項數：36 項 圖式數：9 共 108 頁

(54)名稱

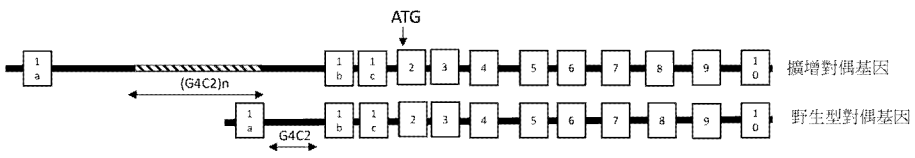
染色體 9 開放讀框 72 基因表現之調節子及其用途

(57)摘要

本發明提供用於調節有需要之患者中突變 C9orf72 基因對偶基因轉錄之組合物及方法，該等有需要之患者包括患有 C9orf72 相關疾病(諸如肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis；ALS)或額顳葉型失智症(frontotemporal dementia；FTD))之患者。

The present disclosure provides compositions and methods for modulating transcription of mutantC9orf72gene alleles in patients in need thereof, including patients having aC9orf72-related disease such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS) or frontotemporal dementia (FTD).

指定代表圖：



【圖1A】

專利案號：109113701

公告本

I862584

【發明摘要】

【中文發明名稱】

染色體9開放讀框72基因表現之調節子及其用途

【英文發明名稱】

MODULATORS OF CHROMOSOME 9 OPEN READING FRAME 72 GENE EXPRESSION AND USES THEREOF

【中文】

本發明提供用於調節有需要之患者中突變*C9orf72*基因對偶基因轉錄之組合物及方法，該等有需要之患者包括患有*C9orf72*相關疾病(諸如肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis；ALS)或額顳葉型失智症(frontotemporal dementia；FTD))之患者。

【英文】

The present disclosure provides compositions and methods for modulating transcription of mutant *C9orf72* gene alleles in patients in need thereof, including patients having a *C9orf72*-related disease such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS) or frontotemporal dementia (FTD).

【指定代表圖】

圖1A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

染色體9開放讀框72基因表現之調節子及其用途

【英文發明名稱】

MODULATORS OF CHROMOSOME 9 OPEN READING FRAME 72 GENE EXPRESSION AND USES THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明提供基於鋅指蛋白之人類*C9orf72*轉錄調節子及此等調節子在治療*C9orf72*相關病症中之用途。

【先前技術】

【0002】 染色體9開放讀框72 (*C9orf72*)基因編碼一種大量地發現在神經元中之蛋白質。C9orf72蛋白被認為在內體運輸中起重要作用。儘管C9orf72蛋白之功能未得到充分理解，但最新資料表明其藉由調控Rab蛋白之功能，在沿內溶酶體路徑之膜運輸中起作用。

【0003】 *C9orf72*基因在內含子1中含有六核苷酸區段(G_4C_2；SEQ ID NO:1)。此區段可以串聯方式重複至多30次，而沒有可辨別的生物效應。然而，重複超過30次(被稱作六核苷酸擴增的現象)會導致*C9orf72*相關病症(Renton等人, *Neuron* (2011) 72:257-68；Douglas, *Non-coding RNA Res.* (2018) 3:178-87)。此擴增產生體染色體顯性表型，且患者通常為擴增對偶基因異型接合的。六核苷酸擴增似乎引起細胞內RNA聚集點(foci)形成，導致RNA-結合蛋白隔離及RNA代謝擾亂。經由非AUG依賴性轉譯，六核苷酸擴增似乎亦引起由正義及反義方向兩者上潛在所有六個框架產生含有二肽重複序列(DPR)的非天然蛋白質(Freibaum及Taylor,

Front Mol Neurosci. (2017) 10:35; Douglas, 前述)。此等蛋白質傾於聚集(Gendron等人, *Acta Neuropathol.* (2013) 126:829)。DPR已報導為*C9orf72*相關疾病患者死後腦物質中之包涵體(Riemslagh等人, *Acta Neuropathol Commun.* (2019) 7:39)。

【0004】 *C9orf72*相關病症包括肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)及C9家族性額顳葉型失智症(C9FTD)。ALS之特徵為漸進性肌無力、肌肉質量損失及移動、說話、吞咽及/或呼吸之能力逐漸下降。ALS之年發病率為1至3例/100,000人，且為最常見的成年發病型運動神經元病症。對於大部分患者而言，此疾病在首發症狀三至五年內致死。*C9orf72*基因突變為造成美國及歐洲約30%至40%之家族性ALS的原因，且為造成5%至10%偶發性ALS的原因。一些*C9orf72*相關ALS患者亦罹患被稱作C9額顳葉型失智症(FTD)或C9FTD之病況，其為影響人格、行為及語言之神經退化性疾病(Benussi等人, *Front Aging Neurosci.* (2015) 7:171)。罹患兩種病況之個體診斷患有ALS-FTD。

【0005】 對於*C9orf72*相關病症不存在有效治療。因此，迫切需要開發用於此等病症之有效療法。

【發明內容】

【0006】 本發明提供基於鋅指蛋白之人類*C9orf72*轉錄調節子及此等調節子在治療*C9orf72*相關病症中之用途。在一個態樣中，本發明提供包含鋅指蛋白(ZFP)域及轉錄抑制子域之融合蛋白，其中ZFP域結合至人類*C9orf72*基因之突變型對偶基因之外顯子1a及1b之間的內含子區段(內含子1a)中的目標區。突變型對偶基因在內含子1a中具有擴增G_4C_2 (SEQ ID NO:1)重複序列區，且融合蛋白靶向此擴增重複序列區。突變型對偶基因

可包含超過30個串聯G_4C_2重複序列(例如，超過100、200、300、400、500、600、700、800、900或1000個重複序列)。野生型對偶基因可包含不超過30個此類重複序列(例如，不超過25、20、15、10或5個重複序列)。

【0007】 在一些實施例中，融合蛋白抑制含來自突變型對偶基因之重複序列之RNA轉錄物(例如，mRNA)轉錄，且不抑制 (例如，mRNA)來自基因野生型RNA轉錄物之轉錄。

【0008】 在一些實施例中，ZFP域結合至目標區中之正義序列，其中該正義序列包含一至三個六核苷酸GGGGCC (SEQ ID NO:1)、GGGCCG (SEQ ID NO:2)、GGCCGG (SEQ ID NO:3)、GCCGGG (SEQ ID NO:4)、CCGGGG (SEQ ID NO:5)或CGGGGC (SEQ ID NO:6)之串聯重複序列。在某些實施例中，融合蛋白抑制人類細胞中來自突變型對偶基因之正義轉錄。在特定實施例中，融合蛋白抑制來自*C9orf72* 1a啟動子之正義轉錄，且不抑制來自*C9orf72* 1b啟動子之正義轉錄。

【0009】 在一些實施例中，ZFP域結合至目標區中之反義序列，其中該反義序列包含一至三個六核苷酸GGCCCC (SEQ ID NO:7)、GCCCCG (SEQ ID NO:8)、CCCCGG (SEQ ID NO:9)、CCCGGC (SEQ ID NO:10)、CCGGCC (SEQ ID NO:11)或CGGCCC (SEQ ID NO:12)之串聯重複序列。在某些實施例中，融合蛋白抑制人類細胞中來自突變型對偶基因反義之轉錄。

【0010】 在一些實施例中，融合蛋白抑制人類細胞中來自突變型*C9orf72*對偶基因之正義轉錄及反義轉錄兩者。在一些實施例中，相比於野生型*C9orf72*對偶基因，融合蛋白優先抑制突變型*C9orf72*對偶基因。

【0011】 在其他實施例中，融合蛋白抑制來自突變型對偶基因正義及/或反義轉錄至少約30%、40%、75%、90%或95%。

【0012】 在一些實施例中，融合蛋白具有一或多個ZFP域，其各自視情況包含六個鋅指；結合至表1中所示之目標序列；及/或包含六個鋅指(排序為F1至F6)，各鋅指包含表1之單列中所示之DNA結合(識別)螺旋序列，視情況包含對如表1中所指示之識別螺旋區外殘基的一或多個突變。在其他實施例中，融合蛋白結合至目標序列且包含對應於如表1中所示之SBS ID的鋅指，該等鋅指包含表1之單列中所示的該SBS ID的DNA結合(識別)螺旋序列，其中該SBS ID係78021、75114、75115、74969、79895、79898、74986、79899、79901、79902、79904、79916、75027或79921。

【0013】 在一些實施例中，融合蛋白具有一或多個轉錄抑制子域，其各自視情況包含來自人類KOX1之KRAB域胺基酸序列，諸如下文進一步描述之彼等。在特定實施例中，ZFP域經由肽連接子連接至轉錄抑制子域。

【0014】 在另一態樣中，本發明提供包含本文所描述之融合蛋白中之一或多者之編碼序列的核酸構築體，其中編碼序列視情況可操作地連接至轉錄調控元件。在一些實施例中，轉錄調控元件包含哺乳動物啟動子，該啟動子在腦細胞係組成型活性的或可誘發的，且其中啟動子視情況為人類突觸蛋白I啟動子。在一些實施例中，構築體為重組腺相關病毒(「AAV」或「rAAV」)構築體。亦提供包含重組AAV構築體及血清型1至10 (例如，AAV2、AAV6或AAV9)或源自其中之假型(例如，AAV2/9、AAV2/6或AAV2/6/9)之蛋白殼的rAAV。

【0015】 在另一態樣中，本發明提供包含如本文所描述之一或多種融合蛋白及/或一或多種核酸構築體的宿主細胞。宿主細胞可為例如人類細胞，諸如神經元或多能幹細胞(例如，胚胎幹細胞或誘導性多能幹細胞)。

【0016】 亦提供醫藥組合物，其包含如本文所描述之一或多種融合蛋白、一或多種核酸構築體(例如，AAV構築體)、包含核酸構築體之重組病毒(例如，rAAV)及/或一或多種宿主細胞，通常與一或多種醫藥學上可接受之賦形劑組合。

【0017】 在又一態樣中，本發明提供抑制人類細胞(例如，神經元、神經膠細胞、室管膜細胞或神經上皮細胞)中突變型*C9orf72*對偶基因之轉錄之方法，其中突變型對偶基因在內含子1a中包含擴增G_4C_2重複序列區，該方法包含向細胞中引入如本文所描述之一或多種融合蛋白、一或多種核酸構築體(例如，AAV)、一或多種重組病毒、一或多種宿主細胞及/或一或多種醫藥組合物。在一些實施例中，細胞係在患有*C9orf72*相關病症(諸如ALS或C9FTD)之患者的腦或脊髓中。

【0018】 在一相關態樣中，本發明提供治療患有視情況選自肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)及C9家族性額顳葉型失智症(C9FTD)之*C9orf72*相關病症之患者的方法，該方法包含向患者引入如本文所描述之一或多種融合蛋白、一或多種核酸構築體(例如，AAV)、一或多種宿主細胞及/或一或多種醫藥組合物。

【0019】 在本發明治療方法中，融合蛋白可使用表現融合蛋白之重組病毒(例如，AAV載體)引入。在一些實施例中，重組病毒經由腦室內、鞘內、顱內、眼眶後(RO)、靜脈內、鼻內及/或腦池內途徑向患者投與。

在一些實施例中，引入本發明之兩種或更多種不同融合蛋白，其中兩種或更多種融合蛋白之編碼序列可攜載在相同或不同重組病毒載體上。

【0020】 本發明亦提供用於本文所描述之治療方法的一或多種融合蛋白及/或一或多種核酸構築體、一或多種重組病毒及一或多種醫藥組合物，及融合蛋白、核酸構築體及重組病毒用於製造用於本文所描述之治療方法之藥劑的用途。

【0021】 本發明之其他特徵、目標及優勢在以下實施方式中顯而易見。然而，應理解，實施方式雖然指示本發明之實施例及態樣，但仍僅以說明而非限制之方式給出。對於熟習此項技術者而言，在本發明之範疇內的各種改變及修改將自實施方式而變得顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0022】 **圖1A至圖1C**描繪*C9orf72*基因及所產生之轉錄物的示意圖。

【0023】 **圖1A**顯示野生型*C9orf72*對偶基因及擴增突變型*C9orf72*對偶基因兩者之結構。擴增突變型對偶基因上G_4C_2擴增之位置經指示(在外顯子1a與1b之間的基因組區，亦即內含子1a中)。外顯子顯示為方框。改編自Douglas, 前述；亦參見Rizzu等人(2016) *Acta Neuropathologica Communications* 4:37。

【0024】 **圖1B**為突變型擴增*C9orf72*對偶基因上靠近G_4C_2擴增之區的放大視圖，且描繪與擴增對偶基因相關之啟動子及轉錄物。顯示正義股轉錄中所涉及之啟動子(實心箭頭)及反義轉錄中所涉及之啟動子的大致位置(空心箭頭)。亦顯示先前已描述之5種不同正義轉錄物，及大致位置及反義方向上之轉錄物。同上。

【0025】 **圖1C**顯示由靶向擴增區之ZFP-TF抑制1a啟動子及反義啟動子的模型，其中ZFP-TF在兩種啟動子下游且對於啟動子調控而言最佳的位置中結合。此模型中之1b啟動子未受抑制，因為ZFP-TF之結合在1b啟動子上游。

【0026】 **圖2A至圖2D**顯示使用指定ZFP-TF對指定細胞類型中*C9orf72*表現(「總C9」)之抑制。另外，圖式顯示對包含內含子1a之較長mRNA同功異型物(擴增)之表現的抑制，該同功異型物主要由擴增突變型對偶基因產生(「含重複序列同功異型物特異性」)。擴增同功異型物主要在C9患者細胞株中表現。

【0027】 **圖2A**示出用於總C9分析及含正義及反義重複序列之同功異型物特異性分析的PCR分析。圖頂部描繪野生型及擴增對偶基因之基因組結構，而圖底部顯示由各對偶基因製得之mRNA產物。mRNA繪圖上之箭頭組描繪總C9分析中所使用之PCR目標。

【0028】 **圖2B至圖2D**為顯示來源於健康個體之野生型細胞株及ALS患者來源之纖維母細胞細胞株「C9」中不同例示性ZFP-TF之*C9orf72*表現分析結果的圖。C9細胞株表徵為「5/850」，其係指G_4C_2重複序列在野生型對偶基因上之數目(5)及在擴增對偶基因上之數目(850)。最左側的圖：第3輪篩選(「第3輪」)中野生型細胞中之總*C9orf72*表現(「總C9」)。自左數第二張圖：第3輪中C9細胞中之總C9。自右數第二張圖：第2輪篩選(「第2輪」)中C9細胞中之總C9。最右側的圖：如藉由同功異型物特異性*C9orf72*分析所測定，自擴增*C9orf72*對偶基因之表現。在C9細胞中進行第2輪篩選，以評估ZFP-TF處理後，相對於總C9轉錄物量之同功異型物(或疾病)特異性*C9orf72*轉錄物量。在第3輪中，在C9細胞及野

生型細胞中測定總C9，以便評估ZFP-TF對C9細胞之野生型(WT)對偶基因的效應。對於各ZFP-TF，自左至右顯示1、3、10、30、100及300 ng mRNA濃度。**圖2B**在頂部圖中顯示ZFP-TF 74949、74951、74954、74955及74964之結果，且在底部圖中顯示74969、74971、74973、74978及74979之結果。**圖2B**按出現之次序分別揭示SEQ ID NO:1、1及3。**圖2C**在頂部圖中顯示ZFP-TF 74983、74984、74986、74987及74988之結果，且在底部圖中顯示74997、74998、75001及75003之結果。**圖2C**按出現之次序分別揭示SEQ ID NO:4及5。**圖2D**在頂部圖中顯示ZFP-TF 75023、75027、75031、75032、75055及75078之結果，且在底部圖中顯示75090、75105、75109、75114及75115之結果。**圖2D**按出現之次序分別揭示SEQ ID NO:8-11。圖底部之序列表示該ZFP-TF之DNA結合基元。各ZFP-TF結合至含有該基元之三個六核苷酸重複序列。轉錄物量相對於由經ZFP-TF mRNA轉染之GFP mRNA表現之綠色螢光蛋白(GFP)的量標準化。圖中之水平點線顯示50%或70%抑制，如所指示。例如對於ZFP-TF 75115，在C9細胞株中存在對總同功異型物轉錄物之大致50%抑制，及對含重複序列同功異型物特異性轉錄物之約70%抑制，而WT細胞株中對總同功異型物之抑制極小。圖指示30%之轉錄物繼續存在，其指示70%受抑制。

【0029】 **圖3**顯示*C9orf72*擴增對偶基因中正義及反義轉錄物之啟動子區的圖解。指示用於特異性偵測正義、總及反義轉錄物之引子對。AS：反義。ddPCR：液滴式數位PCR。圖按出現之次序分別揭示SEQ ID NO:1、1及7。

【0030】 **圖4A**及**圖4B**顯示靶向內含子1b之引子特異性偵測反義前

驅mRNA (pre-mRNA)。使用股特異性PCR以由健康對照(Con)或C9細胞(C9)產生正義(S)或反義(AS) cDNA模板。舉例而言，C9-AS指示在由自C9細胞分離之RNA產生之反義cDNA模板情況下獲得的ddPCR結果。**圖4A**顯示僅cDNA模板C9-AS產生PCR產物，表明引子對偵測反義前驅mRNA之特異性。**圖4B**將**圖4A**中之實驗延伸至具有不同G_4C_2重複序列長度之7種不同*C9orf72*患者來源之細胞株及6種不同健康對照細胞株。

【0031】 **圖5A至圖5C**為顯示使用含重複序列同功異型物特異性分析得到的對C9細胞中轉錄物之抑制的圖。**圖5A**顯示三個實驗，其中ZFP-TF 74949、74978、75003、75027、75109、75114、75115、74960及74967以三種不同劑量(30、100或300 ng)給出，且隨後量測疾病正義轉錄物之量。**圖5B**顯示量測疾病反義轉錄物之三個實驗。**圖5C**顯示量測總*C9orf72*轉錄物之三次運作。

【0032】 **圖6**顯示獲自各自在其擴增對偶基因上含有不同G_4C_2重複序列數目(分別約600、800及850個重複序列)之不同ALS患者的三種不同纖維母細胞株中，對總C9轉錄物以及擴增正義及反義轉錄物(疾病同功異型物)之抑制。在使細胞暴露於100 ng ZFP-TF 75109、75114及75115後，使用同功異型物選擇性分析以評估抑制量。所有三種ZFP-TF在所有三種細胞株中維持選擇性抑制。

【0033】 **圖7**顯示在來自在對偶基因上具有大於典型G_4C_2重複序列數目之健康個體的兩種細胞株中對總C9轉錄物之抑制。健康個體在其*C9orf72*對偶基因中之每一者上通常具有2至5個G_4C_2重複序列。然而，一些健康個體含有更多重複序列。為確保提供足夠的ZFP-TF結合位點，使用含有超過典型重複序列數目(5/8及5/20重複序列)之細胞株。在此等細胞

株中，總C9轉錄物受極小影響。

【0034】 **圖8A至圖8C**顯示ALS患者來源之原代纖維母細胞(C921，亦稱作C9021)、小鼠原代神經元及人類原代神經元中微陣列分析之結果，顯示指定抑制子(75027、75109、75114及75115)之特異性。ZFP-TF 75027靶向重複GCCCCG (SEQ ID NO:8)基元，而ZFP-TF 75109、75114及75115靶向*C9orf72*基因之反義股中的CCGGCC (SEQ ID NO:11)基元。

【0035】 **圖8A**顯示患者來源之原代纖維母細胞(C9021)中使用Thermo Fisher Clariom™ S分析之微陣列分析的結果，Thermo Fisher Clariom™ S分析在其資料庫中含有21,000個良好標註之基因。在向C9021細胞投與300 ng下呈mRNA形式之抑制子後24小時進行分析。圖示出回應於指定ZFP-TF上調或下調之基因。

【0036】 **圖8B**顯示小鼠原代神經元中使用Thermo Fisher Clariom™ D分析之微陣列分析的結果，Thermo Fisher Clariom™ D分析在其資料庫中含有140,000個標註及未標註的編碼及非編碼轉錄物。AAV轉導後7天進行分析。所有細胞在3,000之MOI下轉導。圖示出回應於指定ZFP-TF上調或下調之基因。

【0037】 **圖8C**顯示人類原代神經元中使用Thermo Fisher Clariom™ D分析之微陣列分析的結果。在3,000之MOI下AAV轉導細胞後19天進行分析。圖示出回應於指定ZFP-TF上調或下調之基因。

【0038】 **圖9**顯示*C9orf72* BAC基因轉殖小鼠中ZFP之活體內目標接合。A圖顯示用於注射之AAV構築體。構築體含有突觸蛋白啟動子、ZFP-KRAB編碼序列及Venus標籤。B圖及C圖顯示研究設計，根據該設計新生小鼠用含有ZFP-KRAB表現構築體之AAV腦室內(ICV)注射，且注射後一

個月解剖以供下游分析。D圖顯示經ZFP-KRAB (75027)注射之動物中海馬及皮質中正義、反義及總C9 RNA之量。E圖顯示經ZFP-KRAB (75027)注射之動物中正義及反義RNA聚集點之代表性影像及來自阿蒙氏角(cornu ammonis；CA)及齒狀回(dentate gyrus；DG)區之定量。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

【0039】本申請案主張2019年4月23日申請之美國專利申請案62/837,523及2020年1月23日申請之美國專利申請案62/964,844的優先權。此等優先申請案之揭示內容以全文引用之方式併入本文中。

序列表

【0040】本申請案含有序列表，該序列表已以ASCII格式、以電子方式提交且以全文引用之方式併入本文中。2020年4月21日創建的該ASCII複本命名為025297_TW017_SL.txt且大小為18,362個位元組。

【0041】本發明提供基於鋅指蛋白之轉錄因子(ZFP-TF)，其優先靶向具有擴增G_4C_2重複序列區之人類*C9orf72*基因對偶基因且抑制此等突變型對偶基因轉錄成RNA。此種擴增區可具有超過30個G_4C_2重複序列。本發明ZFP-TF為融合蛋白，其含有(i)至少一個特異性結合至突變型對偶基因之正義股或反義股上重複序列內DNA基元的鋅指蛋白(ZFP)域，及(ii)至少一個減少對偶基因在正義及反義方向中之任一者或兩者上轉錄的轉錄抑制子域。預期藉由將ZFP-TF引入至神經系統(例如，腦及脊髓)中減少神經元中突變型*C9orf72*轉錄物之量，抑制(例如，減少或停止)細胞內致病的細胞毒性物質之形成。本發明ZFP-TF可用於治療(包括預防及緩解)*C9orf72*相關病症，諸如ALS及C9FTD。

【0042】 本文揭示用於診斷、預防及/或治療ALS及FTD之方法及組合物。特定而言，本文提供用於修飾特定基因(例如，調節其表現)以便治療此等疾病之方法及組合物，包括經工程改造轉錄因子抑制子及核酸酶之用途。在一些實施例中，調節表現包含調節正義表現及/或反義表現兩者。

【0043】 因此，本文描述抑制細胞(例如，神經元)中*C9orf72*基因之重複序列擴增突變型對偶基因之正義及/或反義轉錄的方法(活體內、活體外及/或試管內)。方法包含用突變型*C9orf72*基因對偶基因之一或多種抑制子處理細胞，該一或多種抑制子包含轉錄抑制域及結合至突變型*C9orf72*基因對偶基因中之目標位點的DNA結合域。(多種)抑制子可包含一或多種鋅指蛋白轉錄因子(包含ZFP DNA結合域之ZFP-TF)、一或多種TAL效應域轉錄因子(包含TAL效應域DNA結合域之TALE-TF)及/或一或多種CRISPR/Cas轉錄因子系統(包含單引導RNA DNA結合域)。在某些實施例中，使用兩種或更多種不同抑制子(例如，包含該兩種或更多種不同抑制子之一或多種醫藥組合物)。在某些實施例中，*C9orf72*基因包含有包含一或多個(G_4C_2)重複序列之突變型對偶基因，視情況其中抑制子之DNA結合域所結合的目標位點在該一或多個(G_4C_2)重複序列內。因此，本發明提供一或多種結合至包含一或多個(G_4C_2)重複序列之突變型*C9orf72*擴增對偶基因的ZFP-TF、TALE-TF或CRISPR/Cas TF抑制子(例如，調配成包含該一或多種抑制子之一或多種醫藥組合物)的用途，其用於有需要之個體(例如，患有ALS及/或FTD之個體，其中疾病經治療及/或症狀得到改善)之正義及/或反義轉錄的抑制子(例如，相比於未經處理細胞/個體，抑制50%、70%或更高)。在某些實施例中，正義及/或反義轉錄未

抑制至正常(對照)量之超過90%。在某些實施例中，反義及正義轉錄兩者以相同或不同量抑制(例如，反義及正義轉錄類似地受抑制)；反義轉錄相比於正義轉錄受到更大抑制，或正義轉錄相比於反義轉錄受到更大抑制。在某些實施例中，特定正義轉錄物受抑制，而其他未受抑制。在一些實施例中，自1b內含子區段中之啟動子轉錄未受抑制，而自1a內含子中之啟動子轉錄及反義轉錄物受抑制。在某些實施例中，包含擴增重複序列之轉錄物受選擇性抑制(例如，反義轉錄受抑制，自1a啟動子正義轉錄受抑制及/或自1b啟動子正義轉錄未受抑制)。在某些實施例中，在本文所描述之方法及用途中使用一或多種包含如表1中所示之識別螺旋區的ZFP-TF抑制子，視情況與一或多種不同抑制子(例如，另外不同ZFP-TF，例如一或多種包含如表1中所示之ZFP的另外ZFP-TF)組合。在某些實施例中，使用一或多種非病毒載體(例如，呈mRNA形式)及/或病毒載體(例如，AAV，諸如AAV2/9)向細胞投與一或多種抑制子。一或多種調節子(例如，抑制子)之多個複本可使用相同或不同模式(例如，mRNA及/或AAV)投與。在某些實施例中，可使用相同或不同模式來遞送一或多種不同調節子(例如，抑制子)。活個體(例如，人類)中之活體內方法及用途可涉及藉由任何適合手段，包括但不限於腦室內、鞘內、顱內、眼眶後(RO)、靜脈內、鼻內及/或腦池內靜脈內投與(例如，一或多種包含抑制子及/或編碼抑制子之聚核苷酸的醫藥組合物)。腦投與可為單側或雙側的(例如，投與至海馬)。可投與任何量(劑量)，例如1E10至1E13 (例如，6E11) vg/半球。在本文所描述之方法及用途中之任一者中，個體之ALS及/或FTD經治療(及/或此等疾病之一或多種症狀經治療)。

【0044】 本文提供*C9orf72*基因之基因調節子，該調節子包含結合

至*C9orf72*基因中至少12個核苷酸之目標位點的DNA結合域(例如，鋅指蛋白(ZFP)、TAL效應域蛋白(TALE)或單引導RNA)；及轉錄調控域(例如，抑制域)。亦提供編碼本文所描述之基因調節子中之一或多者的一或多種聚核苷酸(例如，病毒或非病毒基因遞送媒劑，例如AAV載體)。在其他態樣中，本文描述包含如本文所提供之一或多種聚核苷酸及/或一或多種基因遞送媒劑的醫藥組合物。在一些實施例中，基因調節子包含調控域，基因調節子(及包含一或多種基因調節子或編碼一或多種基因調節子之聚核苷酸的醫藥組合物)調節(例如，抑制或活化) *C9orf72*基因表現。基因之正義及/或反義股可經結合及/或調節。本文亦提供經分離細胞(包括細胞群)，其包含如本文所描述之一或多種基因調節子；一或多種聚核苷酸；一或多種基因遞送媒劑；及/或一或多種醫藥組合物。亦提供用於在細胞中調節表現(例如，抑制) *C9orf72*基因之方法及用途(試管內、活體內或活體外)，該等方法包含向細胞投與(經由任何方法，包括但不限於腦室內、鞘內、顱內、眼眶後(RO)、靜脈內或腦池內)如本文所描述之一或多種基因調節子；一或多種聚核苷酸；一或多種基因遞送媒劑；及/或一或多種醫藥組合物。方法可用於治療及/或預防個體之肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)或額顳葉型失智症(FTD)。亦提供一或多種基因調節子；一或多種聚核苷酸；一或多種基因遞送媒劑；及/或一或多種醫藥組合物之用途，其用於治療及/或預防個體之ALS或FTD。亦提供套組，其包含如本文所描述之一或多種基因調節子；一或多種聚核苷酸；一或多種基因遞送媒劑；及/或一或多種醫藥組合物，及視情況選用之使用說明書。

【0045】 因此，在一個態樣中，提供一或多種基因之經工程改造(非天然存在之)基因調節子(例如，抑制子)。此等基因調節子可包含調節(例

如，抑制)對偶基因表現之系統(例如，鋅指蛋白、TAL效應(TALE)蛋白或CRISPR/dCas-TF)。野生型及/或突變型對偶基因之表現可在一起或分開地調節。在某些實施例中，相比於野生型對偶基因，突變型對偶基因之調節量更大(例如，相比於未經處理對照，對野生型對偶基因之抑制不超過正常之50%，但突變型對偶基因被抑制至少70%)。在一些實施例中，調節表現可包含調節*C9orf72*基因之正義及反義轉錄物兩者。在一些實施例中，調節表現可主要調節正義轉錄物，而在其他實施例中，調節表現可主要調節反義轉錄物。

【0046】 *C9orf72*對偶基因中之擴增突變導致與ALS及FTD相關之正義及反義RNA產物兩者的表現，因此，在一個實施例中，提供經設計以抑制此等突變型*C9orf72*對偶基因表現之經工程改造轉錄因子，以便治療ALS或FTD。經工程改造鋅指蛋白或TALE為非天然存在之鋅指或TALE蛋白，其DNA結合域(例如，識別螺旋或RVD)已經改變(例如，藉由選擇及/或合理設計)以結合至預先選擇之目標位點。本文所描述之鋅指蛋白中之任一者可包括1、2、3、4、5、6個或更多個鋅指，各鋅指具有結合至所選(多種)序列(例如，(多種)基因)中之目標子位點的識別螺旋。在某些實施例中，ZFP-TF包含具有如表1之單列中所示的識別螺旋區的ZFP。類似地，本文所描述之TALE蛋白中之任一者可包括任何數目的TALE RVD。在一些實施例中，至少一個RVD具有非特異性DNA結合。在一些實施例中，至少一個識別螺旋(或RVD)為非天然存在的。在某些實施例中，TALE-TF包含結合至如表1中所示之目標位點之至少12個鹼基對的TALE。CRISPR/Cas-TF包括結合至目標序列之單引導RNA。在某些實施例中，經工程改造轉錄因子結合至(例如，經由ZFP、TALE或sgRNA

DNA結合域)疾病相關基因中至少9個至12個鹼基對的目標位點，例如包含至少9個至20個鹼基對(例如，9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個或更多)的目標位點，包括此等目標位點(例如，如表1中所示之目標位點)內的連續或非連續序列。在某些實施例中，基因調節子包含如本文所描述之DNA結合分子(ZFP、TALE、單引導RNA)，其可操作地連接至轉錄抑制域(以形成基因抑制子)。

【0047】 因此，如本文所描述之鋅指蛋白(ZFP)、CRISPR/Cas系統之Cas蛋白或TALE蛋白可置放成與調控域(或功能域)操作性鍵聯，作為融合分子之一部分。功能域可為例如轉錄活化域、轉錄抑制域及/或核酸酶(裂解)域。藉由選擇活化域或抑制域用於與DNA結合分子一起使用，此類分子可用於活化或抑制基因表現。在某些實施例中，功能域或調控域可在組蛋白轉譯後修飾中起作用。在一些情況下，域為組蛋白乙醯基轉移酶(HAT)、組蛋白去乙醯基酶(HDAC)、組蛋白甲基化酶或使組蛋白類泛素化(sumolyate)或生物素化之酶，或允許轉譯後組蛋白修飾調控基因抑制之其他酶域(Kousarides, (2007) *Cell* 128:693-705)。在一些實施例中，提供包含融合至可用於下調基因表現之轉錄抑制域的靶向如本文所描述之基因(例如，*C9orf72*)之ZFP、dCas或TALE的分子。在一些實施例中，本發明之方法及組合物適用於處理真核細胞。在某些實施例中，調控域之活性受外源小分子或配位體調控，使得在不存在外源配位體之情況下將不發生與細胞之轉錄機構的相互作用。此類外部配位體控制ZFP-TF、CRISPR/Cas-TF或TALE-TF與轉錄機構之相互作用的程度。(多種)調控域可以操作方式連接至ZFP、dCas或TALE中之一或多者的任何(多種)部分，包括在一或多種ZFP、dCas或TALE之間，在一或多種ZFP、dCas或

TALE外部及其任何組合。在較佳實施例中，調控域引起對靶向基因(例如，*C9orf72*)之基因表現的抑制。本文所描述之融合蛋白中之任一者可調配成醫藥組合物。

【0048】 在一些實施例中，人工調控子結合至基因之轉錄起始位點(TSS)上游(例如，5'端)之啟動子區。在一些實施例中，人工調控子結合至TSS下游之區。在較佳實施例中，人工調控子優先結合至*C9orf72*基因中之擴增重複序列區。在一些實施例中，人工調控子與*C9orf72*基因結合抑制1a內含子中啟動子之表現。在一些實施例中，人工調控子與*C9orf72*基因結合抑制1b內含子中啟動子之表現。在一些實施例中，人工調控子之結合抑制自1a啟動子及反義啟動子表現，但不抑制1b啟動子。亦參見**圖1B**及**圖1C**。

【0049】 在一些實施例中，本發明之方法及組合物包括兩種或更多種如本文所描述之融合分子，例如兩種或更多種*C9orf72*調節子(人工轉錄因子)之用途。兩種或更多種融合分子可結合至不同目標位點且包含相同或不同功能域。替代地，兩種或更多種如本文所描述之融合分子可結合至相同目標位點，但包括不同功能域。在一些情況下，使用三種或更多種融合分子；在其他情況下，使用四種或更多種融合分子；而在其他情況下，使用5種或更多種融合分子。在一些實施例中，兩種或更多種、三種或更多種、四種或更多種或五種或更多種融合分子(或其組分)以核酸形式向細胞遞送。在較佳實施例中，融合分子引起對靶向基因之表現的抑制。在一些實施例中，兩種融合分子以各分子就其自身而言具有活性，但在組合中抑制活性累加的劑量下給出。在一些實施例中，兩種融合分子以就其自身而言兩者均不具有活性，但在組合中抑制活性具有協同性的劑量下給出。

【0050】 在又一態樣中，提供編碼本文所描述之DNA結合域中之任一者的聚核苷酸。

【0051】 在一些實施例中，編碼DNA結合蛋白之聚核苷酸為mRNA。在一些態樣中，mRNA可經化學修飾(例如，Kormann等人，(2011) *Nature Biotechnology* 29(2):154-7)。在其他態樣中，mRNA可包含ARCA帽(參見美國專利第7,074,596號及第8,153,773號)。在其他實施例中，mRNA可包含未經修飾核苷酸及經修飾核苷酸之混合物(參見美國專利公開案第2012/0195936號)。

【0052】 在又一態樣中，提供包含如本文所描述之聚核苷酸(例如，抑制子)中之任一者的基因遞送載體。在某些實施例中，載體為腺病毒載體(例如，Ad5/F35載體)；慢病毒載體(LV)，包括整合勝任型或整合缺陷型慢病毒載體；或腺病毒相關病毒載體(AAV)。在某些實施例中，AAV載體為AAV2、AAV6、AAV8或AAV9載體，或假型AAV載體，諸如AAV2/8、AAV2/5、AAV2/9及AAV2/6。在一些實施例中，AAV載體為能夠穿過血腦障壁之AAV載體(例如美國專利公開案第2015/0079038號)。在其他實施例中，AAV為自補AAV (sc-AAV)或單股(ss-AAV)分子。本文亦提供腺病毒(Ad)載體、LV或腺病毒相關病毒載體(AAV)，其包含編碼至少一種核酸酶(ZFN或TALEN)之序列及/或用於靶向整合至目標基因中之供體序列。在某些實施例中，Ad載體為嵌合Ad載體，例如Ad5/F35載體。在某些實施例中，慢病毒載體為整合酶缺陷型慢病毒載體(IDLV)或整合勝任型慢病毒載體。在某些實施例中，載體經VSV-G套膜或其他套膜假型化。

【0053】 另外，亦提供醫藥組合物，其包含核酸及/或融合體，諸如

人工轉錄因子(例如，ZFP、Cas或TALE或包含ZFP、Cas或TALE之融合分子)。舉例而言，某些組合物包括包含可操作地連接至調控序列之編碼本文所描述之ZFP、Cas或TALE中之一者的序列的核酸與醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑的組合，其中調控序列使得核酸可在細胞中表現。在某些實施例中，所編碼之ZFP、Cas、CRISPR/Cas或TALE調節野生型及/或突變型對偶基因。在一些實施例中，突變型對偶基因比野生型對偶基因更優先經調節，例如抑制。在一些實施例中，醫藥組合物包含優先調節突變型對偶基因之ZFP、CRISPR/Cas或TALE，及調節神經營養因子之ZFP、CRISPR/Cas或TALE。基於蛋白質之組合物包括一或多種如本文所揭示之ZFP、CRISPR/Cas或TALE及醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑。

【0054】 在又一態樣中，亦提供包含如本文所描述之蛋白質、融合分子、聚核苷酸及/或組合物中之任一者的經分離細胞。經分離細胞可用於非治療用途(諸如提供用於診斷及/或篩選方法之細胞或動物模型)，及/或用於治療用途(諸如活體外細胞療法)。

【0055】 在又一態樣中，亦提供包含如本文所描述之一或多種基因調節子、一或多種聚核苷酸(例如，基因遞送媒劑)及/或一或多種(例如，一群)經分離細胞的醫藥組合物。在某些實施例中，醫藥組合物包含兩種或更多種基因調節子。舉例而言，某些組合物包括核酸，該核酸包含編碼如本文所描述之罕見疾病相關之基因中之一者(例如，*C9orf72*)的一或多種基因調節子之序列。在某些實施例中，(多種)基因調節子(例如，包含本文所描述之ZFP、Cas或TALE)可操作地連接至調控序列，與醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑組合，其中調控序列使得核酸可在細胞中表現。在某些實施例中，所編碼之ZFP、CRISPR/Cas或TALE對突變型或野生型對

偶基因(例如，*C9orf72*)具有特異性。在一些實施例中，醫藥組合物包含調節突變型及/或野生型對偶基因(例如，*C9orf72*)之ZFP-TF、CRISPR/Cas-TF或TALE-TF，包括相比於野生型對偶基因，可優先調節(例如，以更大量抑制)突變型對偶基因之TF。基於蛋白質之組合物包括一或多種如本文所揭示之基因調節子及醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑。在某些實施例中，使用包含兩種或更多種基因調節子(載於相同或不同類型之載體上，例如AAV載體上)之組合物，視情況其中基因調節子中之一者包含ZFP-TF抑制子，該抑制子包含命名為74949、74978、75027或75109之ZFP。

【0056】 本發明亦提供用於抑制有需要之個體(例如，患有如本文所描述之罕見疾病之個體)之基因表現的方法及用途，包括藉由向個體提供如本文所描述之一或多種聚核苷酸、一或多種基因遞送媒劑及/或醫藥組合物。在某些實施例中，本文所描述之組合物用於抑制個體之突變型*C9orf72*表現，包括用於治療及/或預防ALS或FTD。本文所描述之組合物在持續時間段(4週、3個月、6個月至一年或更長)內抑制腦(包括但不限於額葉皮質，包括但不限於前額葉皮質；頂葉皮質；枕葉皮質；顳葉皮質，包括但不限於內嗅皮質；海馬；腦幹；紋狀體；丘腦；中腦；小腦)及脊髓(包括但不限於腰椎、胸椎及頸椎區)中基因表現。可藉由任何投與手段，包括但不限於腦室內、鞘內、顱內、靜脈內、眼眶(眼眶後(RO))、鼻內及/或腦池內投與，將本文所描述之組合物提供至個體。亦提供套組，其包含如本文所描述之組合物(例如，基因調節子、聚核苷酸、醫藥組合物及/或細胞)中之一或多者以及此等組合物之使用說明書。

【0057】 在另一態樣中，本文提供用於治療及/或預防CNS (例如，

ALS及/或FTD)之方法，其使用本文所描述之方法及組合物進行。在一些實施例中，方法涉及聚核苷酸及/或蛋白質可使用病毒載體、非病毒載體(例如，質體)及/或其組合遞送之組合物。在一些實施例中，方法涉及包含有包含人工轉錄因子(例如，ZFP-TF、TALE-TF或dCas-TF)之幹細胞群的組合物。投與如本文所描述之組合物(蛋白質、聚核苷酸、細胞及/或包含此等蛋白質、聚核苷酸及/或細胞之醫藥組合物)引起治療(臨床)效果，包括但不限於改善或消除與ALS及/或FTD相關之任何臨床症狀，以及使CNS細胞(例如，神經元、星狀細胞、髓鞘等)功能提高及/或數目增加。在某些實施例中，相比於未接受如本文所描述之人工抑制子之對照，本文中所描述之組合物及方法使目標基因(例如，*C9orf72*)之正義及/或反義轉錄物的表現降低至少30%或40%，例如至少50%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或超過95%。在一些實施例中，實現至少50%降低。在某些實施例中，相比於野生型對偶基因，人工抑制子優先將突變型對偶基因(例如，擴增對偶基因)抑制例如至少20% (例如，抑制野生型對偶基因不超過50%且將突變型對偶基因抑制至少70%)。在一些實施例中，抑制子優先抑制突變型對偶基因上之正義轉錄物，而在其他實施例中，抑制子優先抑制突變型對偶基因上之反義轉錄物。在一些實施例中，抑制子抑制突變型對偶基因上之正義及反義轉錄物。

【0058】 在另一態樣中，本文描述使用病毒或非病毒載體將基因抑制子遞送至個體之腦的方法。在某些實施例中，病毒載體為AAV9載體。遞送可藉由任何適合手段，包括經由使用插管到達任何腦區，例如海馬或內嗅皮質。提供基因調節子(例如，抑制子)向個體之腦的廣泛遞送，包括經由順行及逆行軸突運輸至未直接投與載體之腦區(例如，遞送至殼核引

起遞送至其他結構，諸如皮質、黑質、丘腦等)進行遞送的任何AAV載體。在某些實施例中，個體為人類，且在其他實施例中，個體為非人類靈長類動物。投與可呈以下形式：單次劑量，或同時給與之一系列劑量，或多次投與(投與之間按任何時序)。

【0059】 因此，在其他態樣中，本文描述預防及/或治療個體之疾病(例如，ALS及/或FTD)之方法，該方法包含使用AAV向個體投與基因之抑制子。在某些實施例中，抑制子投與至個體之CNS (例如，海馬及/或內嗅皮質)或PNS (例如，脊髓/脊髓液)。在其他實施例中，抑制子經靜脈內投與。在某些實施例中，本文描述預防及/或治療個體之ALS或FTD之方法，該方法包含使用一或多種AAV載體向個體投與*C9orf72*對偶基因(野生型及/或突變型)之抑制子。在某些實施例中，編碼基因調節子之AAV經由任何遞送方法，包括但不限於腦室內、鞘內、顱內、靜脈內、鼻內、眼眶後或腦池內遞送投與至CNS (腦及/或CSF)。在其他實施例中，編碼抑制子之AAV直接投與至個體之腦實質(例如，海馬及/或內嗅皮質)中。在其他實施例中，編碼抑制子之AAV經靜脈內(IV)投與。在本文所描述之任一方法中，可以每次投與相同或不同劑量進行一次投與(單次投與)或進行多次投與(投與之間間隔任何時間)。當投與多次時，可使用相同或不同劑量及/或投與模式之遞送媒劑(例如，IV及/或ICV投與之不同AAV載體)。該等方法包括在ALS個體中減少肌肉功能損失、身體協調損失、肌肉硬化、肌肉痙攣、語言功能損失、吞咽困難、認知障礙之方法，減少運動功能損失之方法及/或減少一或多種認知功能損失之方法，其均係與未接受方法之個體相比，或與接受方法前個體自身相比。因此，本文所描述之方法引起諸如ALS或FTD之罕見疾病的生物標記物及/或症狀減少，生物標記物及/或症

狀包括一或多種以下：肌肉功能損失、身體協調損失、肌肉硬化、肌肉痙攣、語言功能損失、吞咽困難、認知障礙，與ALS相關之血液及/或腦脊髓液化學物質，包括G-CSF、IL-2、IL-15、IL-17、MCP-1、MIP-1α、TNF-α及VEGF量的變化(參見Chen等人, *Front Immunol.* (2018) 9:2122)及/或此項技術中已知之其他生物標記物。在某些實施例中，該等方法可進一步包含例如在患有FTD之個體中投與一或多種τ (MAPT)之基因抑制子。參見例如美國專利公開案第2018/0153921號。

【0060】 在本文所描述之任一方法中，靶向對偶基因之抑制子可為ZFP-TF，例如包含特異性結合至對偶基因之ZFP及轉錄抑制域(例如，KOX、KRAB等)的融合蛋白。在其他實施例中，靶向對偶基因之抑制子可為TALE-TF，例如包含特異性結合至基因對偶基因之TALE多肽及轉錄抑制域(例如，KOX、KRAB等)的融合蛋白。在一些實施例中，靶向對偶基因抑制子為CRISPR/Cas-TF，其中Cas蛋白中之核酸酶域已失活，使得蛋白質不再裂解DNA。所得Cas RNA引導DNA結合域融合至轉錄抑制子(例如，KOX、KRAB等)以抑制靶向對偶基因。在一些實施例中，經工程改造轉錄因子能夠抑制突變型對偶基因而非野生型對偶基因之表現。在其他實施例中，DNA結合分子優先識別六聚GGGGCC (SEQ ID NO:1)擴增。

【0061】 在一些實施例中，編碼如本文所描述之基因抑制子(例如，ZFP-TF、TALE-TF或CRISPR/Cas-TF)之序列插入(整合)至基因組中，而在其他實施例中，編碼抑制子之序列維持游離。在一些情況下，編碼TF融合體之核酸在包含啟動子之安全攜帶位點處插入(例如，經由核酸酶介導之整合)，使得內源性啟動子驅動表現。在其他實施例中，抑制子(TF)

供體序列插入(經由核酸酶介導之整合)至安全攜帶位點中，且供體序列包含驅動抑制子表現之啟動子。在一些實施例中，啟動子序列廣泛地表現，而在其他實施例中，啟動子為組織或細胞/類型特異性的。在較佳實施例中，啟動子序列對神經元細胞具有特異性。在其他實施例中，啟動子序列對肌肉細胞具有特異性。在一些實施例中，所選擇的啟動子之特徵為其具有低表現。適用啟動子之非限制性實例包括神經特異性啟動子NSE、突觸蛋白、CAMKiia及MECP。廣譜(ubiquitous)啟動子之非限制性實例包括CMV、CAG及Ubc。其他實施例包括如美國專利公開案第2015/0267205號中所描述之自我調控型啟動子之使用。其他實施例包括如美國專利公開案第2015/0267205號中所描述之自我調控型啟動子之使用。

【0062】 在本文所描述之任一方法中，該方法可在個體(例如，患有ALS之個體)之一或多個神經元中產生對目標對偶基因(例如，突變型或野生型*C9orf72*)約50%或更高、55%或更高、60%或更高、65%或更高、約70%或更高、約75%或更高、約85%或更高、約90%或更高、約92%或更高或約95%或更高抑制、98%或更高或99%或更高抑制。在某些實施例中，該個體(相比於未經處理個體)中野生型對偶基因之表現被抑制不超過50%，而該個體(相比於未經處理個體)中突變型對偶基因被抑制至少70%(70%或其上任何值)。在一些實施例中，反義啟動子之表現被抑制至少70%。在某些實施例中，見於*C9orf72*內含子1a、1b及/或1c之區中之反義啟動子表現被抑制至少70%，而*C9orf72*內含子1b之區中正義啟動子表現被抑制不超過50%。

【0063】 在本文所描述之任一方法中，調控子(例如，抑制子或活化子)可以蛋白質、聚核苷酸或蛋白質與聚核苷酸之任何組合形式向個體遞

送。在某些實施例中，一或多種抑制子使用AAV載體遞送。在其他實施例中，調控子之至少一種組分(例如，CRISPR/Cas系統之sgRNA)以RNA形式遞送。在其他實施例中，(多種)調控子使用本文所描述之表現構築體中之任一者的組合遞送，例如一種抑制子(或其部分)在一種表現構築體(AAV9)上，且一種抑制子(或其部分)在獨立表現構築體(AAV或其他病毒或非病毒構築體)上。

【0064】 此外，在本文所描述之任一方法中，調控子(例如，抑制子)可以提供所需效果之任何濃度(劑量)向細胞遞送(活體外或活體內)。在一些實施例中，調控子使用腺相關病毒(AAV)載體以10,000至500,000個載體基因組/細胞(或其間任何值)遞送。在某些實施例中，調控子使用慢病毒載體以250與1,000之間(或其間任何值)的MOI遞送。在其他實施例中，調控子使用質體載體以0.01至1,000奈克/100,000個細胞(或其間任何值)遞送。在其他實施例中，抑制子以mRNA形式以150至1,500奈克/100,000個細胞(或其間任何值)遞送。此外，對於活體內使用，在本文所描述之任一方法中，(多種)基因調節子(例如，抑制子)可以在有需要之個體中提供所需效果之任何濃度(劑量)遞送。在一些實施例中，抑制子使用腺相關病毒(AAV)載體以10,000至500,000個載體基因組/細胞(或其間任何值)遞送。在某些實施例中，抑制子使用慢病毒載體以250與1,000之間(或其間任何值)的MOI遞送。在其他實施例中，抑制子使用質體載體以0.01至1,000奈克/100,000個細胞(或其間任何值)遞送。在其他實施例中，抑制子以mRNA形式以0.01至3000奈克/細胞數目(例如，50,000至200,000 (例如，100,000)個細胞)(或其間任何值)遞送。在其他實施例中，抑制子使用腺相關病毒(AAV)載體在1E11-1E14 Vg/mL下以1至300 μL之固定體積向腦實

質遞送。在其他實施例中，抑制子使用腺相關病毒(AAV)載體在1E11-1E14 Vg/mL下以0.5至10 mL之固定體積向CSF遞送。

【0065】 在本文所描述之任一方法中，該方法可產生對個體之一或多種細胞中(多種)靶向對偶基因約50%或更高、55%或更高、60%或更高、65%或更高、約70%或更高、約75%或更高、約85%或更高、約90%或更高、約92%或更高或約95%或更高的調節(例如，抑制)。在一些實施例中，野生型及突變型對偶基因以不同方式經調節，例如相比於野生型對偶基因，突變型對偶基因優先經修飾(例如，突變型對偶基因被抑制至少70%且野生型對偶基因被抑制不超過50%)。

【0066】 在本文所描述之任一方法中，該方法可產生對個體之一或多種細胞中(多種)靶向對偶基因之反義表現約50%或更高、55%或更高、60%或更高、65%或更高、約70%或更高、約75%或更高、約85%或更高、約90%或更高、約92%或更高或約95%或更高的調節(例如，抑制)。在一些實施例中，突變型對偶基因中之正義表現及反義表現以不同方式經調節，例如在突變型對偶基因中，相比於正義轉錄物之表現，反義轉錄物之表現優先經調節(例如，反義表現被抑制至少70%且正義表現被抑制不超過50%)。

【0067】 在其他態樣中，如本文所描述之轉錄因子，諸如包含以下中之一或多者的轉錄因子：鋅指蛋白(ZFP-TF)、TALE (TALE-TF)及CRISPR/Cas-TF，例如ZFP-TF、TALE-TF或CRISPR/Cas-TF，用於抑制個體之腦(例如，神經元)中突變型及/或野生型對偶基因(例如，*C9orf72*)之表現。抑制可為相比於個體之未經處理(野生型)細胞，對個體之該一或多種細胞中靶向對偶基因約50%或更高、55%或更高、60%或更高、65%

或更高、70%或更高、約75%或更高、約85%或更高、約90%或更高、約92%或更高或約95%或更高的抑制。在某些實施例中，對野生型對偶基因之抑制不超過50% (相比於未經處理細胞或個體)，且對突變型(病變或同功異型物變異體)之抑制為至少70% (相比於未經處理細胞或個體)。在某些實施例中，反義轉錄受完全(全)抑制。在某些實施例中，對正義轉錄物之抑制不超過50% (相比於未經處理細胞或個體)，且對反義轉錄物之抑制為至少70% (相比於未經處理細胞或個體)。在某些實施例中，靶向調節轉錄因子可用於實現本文所描述之方法中之一或多者。

【0068】 因此，本文描述用於調節與本文所揭示之罕見病症相關之基因表現，包括在表現或不表現外源序列(諸如人工TF)之情況下進行抑制的方法及組合物。組合物及方法可供試管內使用(例如，以便提供用於研究目標基因(經由其調節)之細胞；用於藥物發現；及/或製備基因轉殖動物及動物模型)、活體內使用或活體外使用，且包含投與包括靶向至罕見疾病相關基因之DNA結合分子的人工轉錄因子或核酸酶，視情況在核酸酶伴有由核酸酶裂解後整合至基因中之供體的情況下。在一些實施例中，在細胞中，供體基因(轉殖基因)維持在染色體外。在某些實施例中，細胞在疾病患者體內。在其他實施例中，細胞由本文所描述之任一方法修飾，且經修飾細胞向有需要之個體(例如，患有罕見疾病之個體)投與。亦提供包含經基因修飾之基因(例如，外源序列)的經基因修飾之細胞(例如，幹細胞、前驅細胞、T細胞、肌肉細胞等)，包括由本文所描述之方法製得的細胞。此等細胞可用於向患有罕見疾病之個體提供(多種)治療蛋白，例如藉由向有需要之個體投與(多種)細胞，或替代地，藉由分離由細胞產生之蛋白質且向有需要之個體投與該蛋白質(酶替代療法)。

【0069】 亦提供套組，其包含以下中之一或多者：如本文所描述之基因調節子(例如，抑制子)及/或包含目標調節子(或其組分)之組分的聚核苷酸及/或編碼目標調節子(或其組分)之聚核苷酸。套組可進一步包含細胞(例如，神經元或肌肉細胞)、試劑(例如，用於例如在CSF中對蛋白質進行偵測及/或定量)及/或包括如本文所描述之方法的使用說明書。

【0070】 本發明方法及組合物在下文中進一步詳細描述。

I.鋅指蛋白轉錄因子

【0071】 本發明ZFP-TF為含有DNA結合鋅指蛋白(ZFP)域及轉錄抑制域之融合蛋白，其中兩個域可由直接肽基鍵聯或肽連接子彼此締合，或藉由二聚合(例如，經由白胺酸拉鏈、STAT蛋白N端域或FK506結合蛋白)彼此締合。如本文所用，「融合蛋白」係指具有共價連接域之多肽，以及經由非共價鍵彼此締合之多肽的複合物。轉錄抑制域可在任何適合位置，包括ZFP域之C端或N端處與ZFP域締合。

【0072】 在一些實施例中，本發明ZFP-TF將人類突變型*C9orf72*基因之轉錄抑制45%或更高(例如，50%、60%、70%、80%、90%或95%或更高)。在一些實施例中，兩種或更多種本發明ZFP-TF在患者體內同時使用，其中ZFP-TF結合至擴增*C9orf72*區之正義及/或反義股中的不同DNA基元，以便實現對突變型*C9orf72*轉錄之最佳抑制。

A. ZFP域之目標

【0073】 本發明融合蛋白之ZFP域優先結合至突變型人類*C9orf72*基因對偶基因中之擴增區。人類*C9orf72*基因位於染色體9之短(p)臂位置21.2 (9p21.2)處。其在該染色體上跨越鹼基對27,546,546至27,573,866。人類*C9orf72*之基因組結構在**圖1A**中顯示。ZFP-TF之DNA結合ZFP域將

融合蛋白引導至突變型*C9orf72*基因之擴增重複序列區，且將融合蛋白之轉錄抑制域帶到目標區。抑制域隨後抑制由RNA聚合酶進行的*C9orf72*基因轉錄。

【0074】 在一些實施例中，擴增區中之目標序列的長度為至少8個bp。舉例而言，目標序列之長度可為8個bp至40個bp，諸如長度為12、15、16、17、18、19、20、21、24、27、30、33或36個bp。在某些實施例中，本發明ZFP-TF之目標序列的長度為12至20 (例如，12至18、15至19、15、18或19)個bp。在一些實施例中，目標序列包含不連續的子序列。

【0075】 G_4C_2重複序列引起基因之正義股及反義股中的以下六核苷酸DNA基元：

正義*C9orf72*股中之基元：

(i) GGGGCC (SEQ ID NO:1)

(ii) GGGCCG (SEQ ID NO:2)

(iii) GGCCGG (SEQ ID NO:3)

(iv) GCCGGG (SEQ ID NO:4)

(v) CCGGGG (SEQ ID NO:5)

(vi) CGGGGC (SEQ ID NO:6)

反義*C9orf72*股中之基元：

(vii) GGCCCC (SEQ ID NO:7)

(viii) GCCCCG (SEQ ID NO:8)

(ix) CCCCGG (SEQ ID NO:9)

(x) CCCGGC (SEQ ID NO:10)

(xi) CCGGCC (SEQ ID NO:11)

(xii) CGGCCC (SEQ ID NO:12)

在一些實施例中，本發明ZFP-TF之目標序列包含此等DNA基元之一或多個(例如，2、3或4個)串聯重複序列。在一些實施例中，目標序列由基元之一的三個串聯重複序列組成。在一些實施例中，目標序列包含基元之一或多個(例如，2或3個)串聯重複序列，外加來自上游及/或下游相鄰序列的數個(例如，1、2、3、4或5個)核苷酸(例如，$CC(G_4C_2)_2GG$) (SEQ ID NO:75)。

【0076】 目標序列可在基因之正義股或基因之反義股上。在某些實施例中，患者中所使用之ZFP-TF結合突變型對偶基因之正義股及反義股兩者。為確保靶向準確性且為減少ZFP-TF之偏離目標結合，所選*C9orf72*目標區之序列較佳與基因組中其他基因中之序列具有低於75%同源性(例如，低於70%、低於65%、低於60%或低於50%同源性)。

【0077】 用於進一步評估目標區段之其他準則包括與此類區段或相關區段結合之ZFP的先前可獲得性、設計結合給定目標區段之新ZFP的簡易性及偏離目標結合風險。

B.鋅指蛋白域

【0078】 「鋅指蛋白」或「ZFP」係指具有由鋅穩定之DNA結合域的蛋白質。ZFP以序列特異性方式結合至DNA。個別DNA結合域被稱為「指」。ZFP具有至少一個指，各指結合二至四個DNA鹼基對，通常三或四個DNA鹼基對。各鋅指通常包含大致30個胺基酸且螯合鋅。與天然存在之鋅指蛋白相比，經工程改造ZFP可具有新穎結合特異性。工程改造方法包括但不限於合理設計及各種類型之選擇。合理設計包括例如使用包含

三聯體(或四聯體)核苷酸序列及個別鋅指胺基酸序列之資料庫，其中各三聯體或四聯體核苷酸序列與結合特定三聯體或四聯體序列之鋅指的一或多種胺基酸序列相關。參見例如以下中詳細描述的ZFP設計方法：美國專利5,789,538；5,925,523；6,007,988；6,013,453；6,140,081；6,200,759；6,453,242；6,534,261；6,979,539；8,586,526；8,841,260；8,956,828；及9,234,016；及國際專利公開案WO 95/19431；WO 96/06166；WO 98/53057；WO 98/53058；WO 98/53059；WO 98/53060；WO 98/54311；WO 00/27878；WO 01/60970；WO 01/88197；WO 02/016536；WO 02/099084；及WO 03/016496。

【0079】 本發明ZFP-TF之ZFP域可包括至少三個(例如，四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三個或更多個)鋅指。具有三個指之ZFP域通常識別包括9至12個核苷酸之目標位點。具有四個指之ZFP域通常識別包括12至15個核苷酸之目標位點。具有五個指之ZFP域通常識別包括15至18個核苷酸之目標位點。具有六個指之ZFP域可識別包括18至21個核苷酸之目標位點。

【0080】 如例如美國專利公開案2018/0087072中所描述，可藉由對ZFP主鏈之突變提高ZFP域之目標特異性。突變包括對ZFP主鏈中之殘基進行的突變，該等殘基可與DNA主鏈上之磷酸酯非特異性相互作用，但不在核苷酸目標特異性中涉及。在一些實施例中，此等突變包含將陽離子胺基酸殘基突變為中性或陰離子胺基酸殘基。在一些實施例中，此等突變包含將極性胺基酸殘基突變為中性或非極性胺基酸殘基。在其他實施例中，突變在相對於DNA結合螺旋之位置(-5)、(-9)及/或(-14)處進行。在一些實施例中，鋅指可在位置(-5)、(-9)及/或(-14)處包含一或多個突變。在

其他實施例中，多指ZFP域中之一或多個鋅指可在位置(-5)、(-9)及/或(-14)處包含突變。在一些實施例中，位置(-5)、(-9)及/或(-14)處之胺基酸(例如，精胺酸(R)或離胺酸(K))突變為丙胺酸(A)、白胺酸(L)、Ser (S)、Asp (N)、Glu (E)、Tyr (Y)及/或麩醯胺酸(Q)。在一些實施例中，位置(-5)處之R殘基突變為Q。

【0081】 替代地，DNA結合域可來源於核酸酶。舉例而言，諸如I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII及I-TevIII之歸巢核酸內切酶及大範圍核酸酶的識別序列為已知的。亦參見美國專利5,420,032及6,833,252；Belfort等人, *Nucleic Acids Res.* (1997) 25:3379-88；Dujon等人, *Gene* (1989) 82:115-8；Perler等人, *Nucleic Acids Res.* (1994) 22:1125-7；Jasin, *Trends Genet.* (1996) 12:224-8；Gimble等人, *J Mol Biol.* (1996) 263:163-80；Argast等人, *J Mol Biol.* (1998) 280:345-53；及新英格蘭生物實驗室(New England Biolabs)目錄。

【0082】 在一些實施例中，本發明ZFP-TF包含一或多個鋅指域。該等域可經由可延伸可撓性連接子連接在一起，使得例如一個域包含一或多個(例如，4、5或6個)鋅指，且另一域包含另外一或多個(例如，4、5或6個)鋅指。在一些實施例中，連接子為標準指間連接子，使得指陣列包含一個包含8、9、10、11或12個或更多個指的DNA結合域。在其他實施例中，連接子為非典型連接子，諸如可撓性連接子。舉例而言，兩個ZFP域可以以下組態(N端至C端)連接至轉錄抑制子TF：ZFP-ZFP-TF、TF-ZFP-ZFP、ZFP-TF-ZFP或ZFP-TF-ZFP-TF (兩個ZFP-TF融合蛋白經由連接子融合在一起)。

【0083】 在一些實施例中，ZFP-TF為「雙手(two-handed)」的，亦即，其含有由中間胺基酸間隔開的兩個鋅指簇(兩個ZFP域)，使得兩個ZFP域結合至兩個非連續目標位點。雙手型鋅指結合蛋白之實例為SIP1，其中四個鋅指之簇位於蛋白質胺基端處，且三個指之簇位於羧基端處(參見Remacle等人, *EMBO J.* (1999) 18(18):5073-84)。此等蛋白質中之鋅指的各簇能夠結合至獨特目標序列，且兩個目標序列之間的間隔可包含許多核苷酸。

【0084】 在替代性實施例中，可使用在功能上與ZFP-TF類似的蛋白質代替ZFP-TF。舉例而言，轉錄抑制子融合蛋白可包括來源於轉錄活化因子之DNA結合域，如效應子(TALE) DNA結合域，而非ZFP域。參見例如美國專利8,586,526及9,458,205；美國專利公開案2013/0196373及2013/0253040；WO 2010/079430；Schornack等人, *J Plant Physiol* (2006) 163(3):256-72)；Kay等人, *Science* (2007) 318:648-51；Moscou及Bogdanove, *Science* (2009) 326:1501；及Boch等人, *Science* (2009) 326:1509-12。在另一實例中，轉錄抑制子融合蛋白可包括DNA結合域，其為CRISPR/Cas系統之單引導RNA。參見例如美國專利公開案2015/0056705；Jinek等人, *Science* (2012) 337:816；Ramalingam等人, *Genome Biol.* (2013) 14:107；Hwang等人, (2013) *Nature Biotechnology* 31(3):227。

C.轉錄抑制域

【0085】 本發明ZFP-TF包含減弱突變型*C9orf72*對偶基因之轉錄活性的一或多種轉錄抑制域。轉錄抑制域之非限制性實例為KOX1之KRAB域、KAP-1、MAD、FKHR、EGR-1、ERD、SID、TGFβ誘導型早期基

因(TIEG)、v-ERB-A、MBD2、MBD3、DNMT家族成員(例如，DNMT1、DNMT3A、DNMT3B)、Rb及MeCP2。參見例如Bird等人，*Cell* (1999) 99:451-54；Tyler等人，*Cell* (1999) 99:443-46；Knoepfler等人，*Cell* (1999) 99:447-50；Robertson等人，*Nature Genet.* (2000) 25:338-42。另外例示性抑制域包括但不限於ROM2及AtHD2A。參見例如Chem等人，*Plant Cell* (1996) 8:305-21；及Wu等人，*Plant J.* (2000) 22:19-27。

【0086】在一些實施例中，轉錄抑制域包含來自人類鋅指蛋白10/KOX1 (ZNF10/KOX1) (例如，GenBank第NM_015394.4號)之克魯佩爾相關匣(Kruppel-associated box；KRAB)域之序列。例示性KRAB域序列為：

DAKSLTAWSR TLVTFKDVFV DFTREEWKLL DTAQQIVYRN VMLENYKNLV SLGYQLTKPD VILRLEKGEE PWLVEREIHQ ETHPDSETAF EIKSSV

(SEQ ID NO:13)。

【0087】亦可使用此KRAB序列之變異體，只要其具有相同或相似轉錄抑制功能即可。

D.肽連接子

【0088】本發明ZFP-TF之ZFP域及轉錄抑制域及/或ZFP域內之鋅指可經由肽連接子連接，肽連接子例如約5至200個胺基酸(例如，5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個或更多個胺基酸)之不可裂解肽連接子。一些較佳連接子為合成為重組融合蛋白之可撓性胺基酸序列。參見例如以上描述；及美國專利6,479,626；6,903,185；

7,153,949；8,772,453；及9,163,245；及WO 2011/139349。本文所描述之蛋白質可包括適合連接子之任何組合。連接子之非限制性實例為DGGGS (SEQ ID NO:14)、TGEKP (SEQ ID NO:15)、LRQKDGERP (SEQ ID NO:16)、GGRR (SEQ ID NO:17)、GGRRGGGS (SEQ ID NO:18)、LRQRDGERP (SEQ ID NO:19)、LRQKDGGGSERP (SEQ ID NO:20)、LRQKD$(G_3S)_2$ERP (SEQ ID NO:21)、TGSQKP (SEQ ID NO:22)、LRQKDAARGS (SEQ ID NO:26)及LRQKDAARGSGG (SEQ ID NO:76)。

【0089】在一些實施例中，肽連接子之長度為3至20個胺基酸殘基，且富含G及/或S。此類連接子之非限制性實例為G_4S型連接子(「G_4S」揭示為SEQ ID NO:23)，亦即，含有一或多個(例如，2、3或4個) GGGGS (SEQ ID NO:23)基元或基元之變化形式(諸如在基元中具有一個、兩個或三個胺基酸插入、缺失及取代者)的連接子。

【0090】在一些實施例中，ZFP-TF包含核定位信號(例如，來自SV40中等T抗原之核定位信號)及/或抗原決定基標籤(例如，FLAG及血球凝集素)。

II. ZFP-TF之表現

【0091】本發明之ZFP-TF可經由編碼其之核酸分子引入患者中。舉例而言，核酸分子為RNA分子，且該RNA分子經由包含脂質:核酸複合物(例如，脂質體)之組合物的注射引入至患者腦中。替代地，ZFP-TF可經由包含ZFP-TF之編碼序列的核酸表現載體引入患者中。表現載體可包括使得ZFP-TF之編碼序列可在神經系統(例如，中樞神經系統)之細胞中表現的表現控制序列(諸如啟動子、增強子)、轉錄信號序列及轉錄終止序

列。在一些實施例中，表現載體以穩定游離基因體(episome)形式在細胞中繼續存在。在其他實施例中，表現載體整合至細胞之基因組中。

【0092】 在一些實施例中，載體上用於引導腦中ZFP-TF表現之啟動子為組成型活性啟動子或誘導型啟動子。適合啟動子包括但不限於勞氏肉瘤病毒(Rous sarcoma virus；RSV)長末端重複序列(LTR)啟動子(視情況伴有RSV增強子)、巨細胞病毒(CMV)啟動子(視情況伴有CMV增強子)、CMV即刻早期啟動子、猴病毒40 (SV40)啟動子、二氫葉酸還原酶(DHFR)啟動子、β-肌動蛋白啟動子、磷酸甘油酯激酶(PGK)啟動子、EFlα啟動子、莫洛尼鼠類白血病病毒(Moloney murine leukemia virus；MoMLV) LTR、基於肌酸激酶(CK6)之啟動子、甲狀腺素轉運蛋白啟動子(TTR)、胸苷激酶(TK)啟動子、四環素反應性啟動子(TRE)、B型肝炎病毒(HBV)啟動子、人類α1-抗胰蛋白酶(hAAT)啟動子、嵌合肝臟特異性啟動子(LSP)、E2因子(E2F)啟動子、人類端粒酶反轉錄酶(hTERT)啟動子、CMV增強子/雞β-肌動蛋白/兔β-血球蛋白啟動子(CAG啟動子；Niwa等人, *Gene* (1991) 108(2):193-9)及RU-486反應性啟動子。亦可使用神經元特異性啟動子，諸如突觸蛋白I啟動子、鈣/調鈣素依賴性蛋白激酶II (CamKII)啟動子、甲基CpG結合蛋白2 (MeCP2)啟動子、膽鹼乙醯基轉移酶(ChAT)啟動子及鈣結合蛋白(Calb)啟動子。亦可使用星狀細胞特異性啟動子，諸如神經膠纖維酸性蛋白(GFAP)啟動子或醛去氫酶1家族成員L1 (Aldh1L1)啟動子。亦可使用寡樹突神經膠細胞特異性啟動子，諸如Olig2啟動子。另外，啟動子可包括一或多種自我調控元件，藉此ZFP-TF可結合且將自身表現量抑制至預設臨限。參見美國專利9,624,498。

【0093】 可採用將核苷酸序列引入至細胞中之任何方法，包括但不

限於電穿孔、磷酸鈣沈澱、顯微注射、陽離子或陰離子脂質體、脂質體與核定位信號組合、天然存在之脂質體(例如，外泌體)或病毒轉導。

【0094】 對於表現載體之活體內遞送，可使用病毒轉導。此項技術中已知之多種病毒載體可適用於本發明，例如牛痘載體、腺病毒載體、慢病毒載體、痘病毒載體、疱疹病毒載體、腺相關病毒(AAV)載體、反轉錄病毒載體及雜交病毒載體。在一些實施例中，本文所用之病毒載體為重組AAV (rAAV)載體。AAV載體尤其適用於中樞神經系統(CNS)基因遞送，因為AAV感染分裂細胞及非分裂細胞兩者且具有極低免疫原性，且病毒基因組以用於長期表現之穩定游離型結構之形式存在(Hadaczek等人, *Mol Ther.* (2010) 18:1458-61；Zaiss等人, *Gene Ther.* (2008) 15:808-16)。可使用任何適合之AAV血清型。舉例而言，AAV可為AAV1、AAV2、AAV3、AAV3b、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV8.2、AAV9或AAVrh10，或具有假型(例如，AAV2/8、AAV2/5、AAV2/6、AAV2/9或AAV2/6/9)。參見例如美國專利7,198,951及9,585,971。

【0095】 在一些實施例中，表現載體為AAV載體且藉由重組AAV病毒粒子引入目標人類細胞中，重組AAV病毒粒子之基因組包含構築體，包括在兩端具有AAV反向末端重複(ITR)序列，使得可在諸如昆蟲細胞/桿狀病毒產生系統或哺乳動物細胞產生系統之產生系統中產生AAV病毒粒子。AAV可經工程改造，使得其蛋白殼蛋白在人體內的免疫原性降低且轉導能力增強。在一些實施例中，使用AAV9。可使用此項技術中已知之方法產生本文所描述之病毒載體。可採用任何適合之容許或包裝細胞類型來產生病毒顆粒。舉例而言，哺乳動物(例如，293)昆蟲(例如，Sf9)細胞可用作包裝細胞株。

【0096】關於在有需要之患者之神經系統中表現治療蛋白，包括ZFP的方法，亦參見美國專利6,309,634；6,453,242；6,503,717；6,534,261；6,599,692；6,607,882；6,689,558；6,824,978；6,933,113；6,953,575；6,979,539；7,013,219；7,163,824；7,182,944；8,309,355；8,337,458；8,586,526；9,050,299；及9,089,667。

III.醫藥應用

【0097】本發明ZFP-TF可用於治療需要下調*C9orf72*表現，尤其下調突變型*C9orf72*對偶基因表現的患者。患者患有*C9orf72*相關之神經退化性疾病(諸如ALS及C9FTD)或具有罹患該等疾病之風險。具有風險之患者包括在基因上傾向於患病之患者、遭受反覆腦損傷(諸如腦震盪)之患者及已暴露於環境神經毒素之患者。本發明提供治療個體(諸如有需要之人類患者)之*C9orf72*相關神經疾病(例如，ALS及C9FTD)之方法，其包含向個體之神經系統(例如，CNS)中引入治療有效量(例如，使得可對突變型*C9orf72*對偶基因表現進行充分抑制之量)的ZFP-TF (例如，表現其之rAAV載體)。術語「治療」涵蓋緩解症狀、預防症狀發作、減緩疾病進展、提高生活品質及提高存活率。

【0098】本發明提供醫藥組合物，其包含病毒載體，諸如重組基因組包含ZFP-TF之表現卡匣之rAAV。醫藥組合物可進一步包含醫藥學上可接受之載劑，諸如水、生理食鹽水(例如，磷酸鹽緩衝生理食鹽水)、右旋糖、甘油、蔗糖、乳糖、明膠、葡聚糖、白蛋白或果膠。另外，組合物可含有輔助物質，諸如潤濕或乳化劑、pH緩衝劑、穩定劑或增強醫藥組合物有效性之其他試劑。醫藥組合物可含有遞送媒劑，諸如脂質體、奈米膠囊、微粒子、微球體、脂質粒子及囊泡。

【0099】 本發明治療劑所靶向之細胞為腦及/或脊髓中之細胞，包括但不限於神經元細胞(例如，運動神經元、感覺神經元、多巴胺激導性神經元、膽鹼激導性神經元、麩胺酸激導性神經元、GABA激導性神經元或血清素激導性神經元)；神經膠細胞(例如，寡樹突神經膠細胞、星狀細胞、外被細胞、許旺氏細胞(Schwann cell)或微神經膠細胞)；室管膜細胞；或神經上皮細胞。所靶向之腦區可為皮質區、額顳葉區、內嗅皮質、海馬、小腦、腦橋及髓質。此等區可直接經由海馬內注射、腦內注射、大池內(ICM)注射到達，或更一般而言經由腦實質內注射、腦室內(ICV)注射、鞘內注射或靜脈內注射到達。其他投與途徑包括但不限於腦內、室內、鼻內或眼內投與。在一些實施例中，在例如經由鞘內及/或腦內注射或大池內注射或腦室內注射直接投與至腦脊髓液(CSF)後，病毒載體在整個CNS組織中傳播。在其他實施例中，在靜脈內投與後，病毒載體穿過血腦障壁且在個體之整個CNS組織中實現廣泛分佈。在其他實施例中，病毒載體經由腦實質內注射直接遞送至目標區。在一些情況下，在腦實質內遞送後，病毒載體可經歷逆行或順行運輸到達其他腦區。在一些態樣中，病毒載體具有獨特CNS組織靶向能力(例如，CNS組織向性)，其以高效率實現穩定且無毒性基因轉移。

【0100】 舉實例而言，可經由室內投與，例如投與至患者前腦之腦室區，諸如右側腦室、左側腦室、第三腦室或第四腦室，向患者提供醫藥組合物。可經由腦內投與，例如向腦之大腦、髓質、腦橋、小腦、顱內腔、腦膜、硬腦膜、蜘蛛膜或軟腦膜中或附近注射組合物，向患者提供醫藥組合物。在一些情況下，腦內投與可包括將藥劑投與至圍繞腦之蜘蛛膜下腔的腦脊髓液(CSF)中。

【0101】 在一些情況下，腦內投與涉及使用立體定位手術注射。立體定位手術為此項技術中所熟知，且通常涉及電腦及三維掃描裝置之使用，電腦及三維掃描裝置一起用於引導向特定腦內區，例如腦室區注射。亦可使用顯微注射泵(例如，來自World Precision Instruments)。在一些情況下，顯微注射泵用於遞送包含病毒載體之組合物。在一些情況下，組合物之輸注速率在1微升/分鐘至100微升/分鐘範圍內。如熟習此項技術者應瞭解，輸注速率將視多種因素而定，包括例如個體之年齡、個體之體重/大小、AAV之血清型、所需劑量及所靶向之腦內區。因此，熟習此項技術者可認為其他輸注速率在某些環境中適當。

【0102】 可例如藉由靜脈內投與實現向個體遞送rAAV。在某些情況下，可能需要將rAAV局部遞送至腦組織、脊髓、腦脊髓液(CSF)、神經元細胞、神經膠細胞、腦膜、星狀細胞、寡樹突神經膠細胞、間隙空間及其類似者。在一些情況下，可藉由注射至腦室區中及/或注射至海馬、皮質、小腦小葉或其他腦區，將重組AAV(例如，10^7-10^{15} Vg/劑量)直接遞送至CNS。可利用針、導管或相關裝置，使用此項技術中已知之神經外科技術，諸如藉由立體定位注射遞送AAV。參見例如Stein等人, *J Vir.* (1999) 73:3424-9；Davidson等人, *PNAS.* (2000) 97:3428-32；Davidson等人, *Nat Genet.* (1993) 3:219-223；及Alisky及Davidson, *Hum. Gene Ther.* (2000) 11:2315-29；美國專利7,837,668及8,092,429。

【0103】 除非本文另外定義，否則結合本發明使用之科學與技術術語將具有由一般熟習此項技術者通常理解的含義。下文描述例示性方法及物質，但類似或等效於本文所描述之方法及物質之方法及物質亦可用於實施或測試本發明。在有衝突之情況下，將以本說明書(包括定義)為準。一

般而言，本文所描述之結合神經學、醫學、醫學及醫藥化學及細胞生物學使用之命名法及該等學科之技術為此項技術中所熟知且常用的。酶促反應及純化技術係根據製造商之說明書如此項技術中通常所實現或如本文所描述來進行。此外，除非上下文另外需要，否則單數術語應包括複數且複數術語應包括單數。在本說明書及實施例通篇，詞語「具有(have)」及「包含(comprise)」或諸如「具有(has/having)」、「包含(comprises/comprising)」之變化形式應理解為暗示包含陳述的整數或整數群，但不排除任何其他整數或整數群。本文所提及之所有公開案及其他參考文獻均以全文引用之方式併入。儘管本文中引用多個文件，但此引用不構成此等文件中之任一者形成此項技術中公共常識之部分的許可。如本文所用，如應用於所關注之一或多個值之術語「大致」或「約」係指類似於所陳述參考值之值。在某些實施例中，除非另外陳述或以其他方式根據上下文顯而易見，該術語係指在所陳述參考值任一方向上(大於或小於)10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小內的一系列值。

【0104】 為了使本發明可被更好地理解，列舉以下實施例及實例。此等實施例及實例僅為達成說明之目的，且並不應視為以任何方式限制本發明之範疇。

IV.例示性實施例

【0105】 本發明之非限制性例示性實施例在下文描述。

1. 一種抑制細胞中*C9orf72*基因之正義及/或反義轉錄之方法，該方法包含用一或多種*C9orf72*基因抑制子處理該細胞，該一或多種抑制子包含轉錄抑制域及結合至*C9orf72*基因中之目標位點的DNA結合域，視情

況其中該一或多種抑制子包含一或多種鋅指蛋白轉錄因子(ZFP-TF)、一或多種TAL效應域轉錄因子(TALE-TF)及/或一或多種CRISPR/Cas轉錄因子。

2. 如實施例1之方法，其中*C9orf72*基因包含有包含一或多個擴增(G_4C_2)重複序列之突變型對偶基因，視情況其中目標位點在一或多個擴增(G_4C_2)重複序列內。

3. 結合至包含一或多個(G_4C_2)重複序列之突變型*C9orf72*擴增對偶基因的一或多種ZFP-TF、TALE-TF及/或CRISPR/Cas TF抑制子之用途，其用於在有需要之個體中抑制正義及/或反義轉錄。

4. 如前述實施例中任一項之方法或用途，其中相比於未經處理細胞，反義轉錄被抑制至少50%。

5. 如前述實施例中任一項之方法或用途，其中相比於未經處理細胞，反義轉錄被抑制至少70%。

6. 如前述實施例中任一項之方法或用途，其中包含擴增重複序列之轉錄物受選擇性抑制，視情況其中反義轉錄受抑制，自1a啟動子之正義轉錄受抑制及/或自1b啟動子之正義轉錄不受抑制。

7. 如前述實施例中任一項之方法或用途，其中一或多種ZFP-TF抑制子包含按表1中所示之次序具有識別螺旋區之ZFP。

8. 如前述實施例中任一項之方法或用途，其中一或多種ZFP-TF抑制子以mRNA形式或使用病毒載體向細胞投與。

9. 如實施例8之方法或用途，其中病毒載體係Ad或AAV載體。

10. 如實施例9之方法或用途，其中AAV載體係AAV2/9載體。

11. 如前述實施例中任一項之方法或用途，其中細胞在活個體中且

一或多種ZFP-TF抑制子向個體投與。

12. 如實施例11之方法或用途，其中一或多種ZFP-TF抑制子向個體腦室內、鞘內、顱內、眼眶後(RO)、靜脈內、鼻內及/或腦池內靜脈內投與。

13. 如實施例12之方法或用途，其中ZFP-TF抑制子向個體之海馬單側或兩側投與，視情況以1E10至1E13 (例如，6E11) vg/半球之劑量使用AAV載體投與。

14. 如前述實施例中任一項之方法或用途，其中細胞係神經元。

15. 如先前實施例中任一項之方法或用途，其中再投與兩種ZFP-TF抑制子。

16. 如實施例15之方法或用途，其中兩種或更多種ZFP-TF抑制子載於相同或不同非病毒或病毒載體上。

17. 如前述實施例中任一項之方法或用途，其中個體之ALS及/或FTD經治療。

18. 如前述實施例中任一項之方法或用途，其中個體中ALS及/或FTD之一或多種症狀得到改善。

19. 一種ZFP-TF融合蛋白，其結合至目標序列且包含對應於如表1中所示之SBS ID的鋅指，該等鋅指包含表1之單列中所示的該SBS ID的DNA結合(識別)螺旋序列，其中該SBS ID係78021。

20. 一種ZFP-TF融合蛋白，其結合至目標序列且包含對應於如表1中所示之SBS ID的鋅指，該等鋅指包含表1之單列中所示的該SBS ID的DNA結合(識別)螺旋序列，其中該SBS ID係75114。

21. 一種ZFP-TF融合蛋白，其結合至目標序列且包含對應於如表1

中所示之SBS ID的鋅指，該等鋅指包含表1之單列中所示的該SBS ID的DNA結合(識別)螺旋序列，其中該SBS ID係75115。

22. 一種ZFP-TF融合蛋白，其結合至目標序列且包含對應於如表1中所示之SBS ID的鋅指，該等鋅指包含表1之單列中所示的該SBS ID的DNA結合(識別)螺旋序列，其中該SBS ID係74969。

23. 一種ZFP-TF融合蛋白，其結合至目標序列且包含對應於如表1中所示之SBS ID的鋅指，該等鋅指包含表1之單列中所示的該SBS ID的DNA結合(識別)螺旋序列，其中該SBS ID係79895。

24. 一種ZFP-TF融合蛋白，其結合至目標序列且包含對應於如表1中所示之SBS ID的鋅指，該等鋅指包含表1之單列中所示的該SBS ID的DNA結合(識別)螺旋序列，其中該SBS ID係79898。

25. 一種ZFP-TF融合蛋白，其結合至目標序列且包含對應於如表1中所示之SBS ID的鋅指，該等鋅指包含表1之單列中所示的該SBS ID的DNA結合(識別)螺旋序列，其中該SBS ID係74986。

26. 一種ZFP-TF融合蛋白，其結合至目標序列且包含對應於如表1中所示之SBS ID的鋅指，該等鋅指包含表1之單列中所示的該SBS ID的DNA結合(識別)螺旋序列，其中該SBS ID係79899。

27. 一種ZFP-TF融合蛋白，其結合至目標序列且包含對應於如表1中所示之SBS ID的鋅指，該等鋅指包含表1之單列中所示的該SBS ID的DNA結合(識別)螺旋序列，其中該SBS ID係79901。

28. 一種ZFP-TF融合蛋白，其結合至目標序列且包含對應於如表1中所示之SBS ID的鋅指，該等鋅指包含表1之單列中所示的該SBS ID的DNA結合(識別)螺旋序列，其中該SBS ID係79902。

29. 一種ZFP-TF融合蛋白，其結合至目標序列且包含對應於如表1中所示之SBS ID的鋅指，該等鋅指包含表1之單列中所示的該SBS ID的DNA結合(識別)螺旋序列，其中該SBS ID係79904。

30. 一種ZFP-TF融合蛋白，其結合至目標序列且包含對應於如表1中所示之SBS ID的鋅指，該等鋅指包含表1之單列中所示的該SBS ID的DNA結合(識別)螺旋序列，其中該SBS ID係79916。

31. 一種ZFP-TF融合蛋白，其結合至目標序列且包含對應於如表1中所示之SBS ID的鋅指，該等鋅指包含表1之單列中所示的該SBS ID的DNA結合(識別)螺旋序列，其中該SBS ID係75027。

32. 一種ZFP-TF融合蛋白，其結合至目標序列且包含對應於如表1中所示之SBS ID的鋅指，該等鋅指包含表1之單列中所示的該SBS ID的DNA結合(識別)螺旋序列，其中該SBS ID係79921。

33. 如實施例19至32中任一項之ZFP-TF融合蛋白，其中ZFP-TF融合蛋白包含有包含SEQ ID NO:13之轉錄抑制域。

34. 如實施例19至33中任一項之ZFP-TF融合蛋白，其中鋅指域及轉錄抑制域由包含SEQ ID NO:26之肽連接子連接。

實例

實例1：人工轉錄抑制子

【0106】 產生一組ZFP-TF以靶向擴增人類*C9orf72*對偶基因。例示性ZFP-TF顯示於以下**表1**中。此等ZFP-TF各自含有具有六個指之ZFP域及如上文所描述之KRAB域(SEQ ID NO:13)。肽連接子用於將ZFP域連接至KRAB域。連接子具有以下胺基酸序列：LRQKDAARGS (SEQ ID NO:26)。

【0107】 **表1**顯示各ZFP-TF中目標位點之DNA序列及各鋅指(F1至F6)之DNA結合螺旋的胺基酸序列。SEQ ID NO顯示於括號中。目標位點中由ZFP域結合之目標序列以大寫字母顯示，而側接序列以小寫字母顯示。SEQ ID NO:24為基因對偶基因之正義股上的目標位點，而SEQ ID NO:25為基因對偶基因之反義股上的目標位點。

【0108】 DNA結合螺旋為鋅指之可變部分，且通常含有六或七個胺基酸殘基。如例如美國專利公開案2018/0087072中所描述，可藉由對ZFP主鏈之突變提高ZFP域之目標特異性。表中符號「^」指示指定螺旋中第1胺基酸上游之第4位處的精胺酸(R)殘基改變為麩醯胺酸(Q)。在各鋅指螺旋序列中，七個DNA結合胺基酸之位置編號為-1、+1、+2、+3、+4、+5及+6。因此，R至Q取代之位置編號為(-5)。

表1　例示性*C9orf72* ZFP-TF

SBS ID	目標位點 (SEQ ID NO)	鋅指DNA結合螺旋胺基酸序列 (SEQ ID NO)					
		F1	F2	F3	F4	F5	F6
74949	taGGGGCCGGGGCCGGGGCCggggcgtg (24)	DRSDLSR (27)	RSTHLVR (28)	DRSDLSR (27)	RSTHLVR (28)	DRSDLSR (27)	RSTHLVR (28)
74951	taGGGGCCGGGGCCGGGGCCggggcgtg (24)	DRSDLSR (27)	RSAHLSR (29)	DRSDLSR (27)	RSAHLSR (29)	DRSDLSR (27)	RSAHLSR (29)
74954	taGGGGCCGGGGCCGGGGCCggggcgtg (24)	ERGDLKR (30)	RSAHLSR (29)	ERGDLKR (30)	RSAHLSR (29)	ERGDLKR (30)	RSAHLSR (29)
74955	taGGGGCCGGGGCCGGGGCCggggcgtg (24)	ERGTLAR (31)	RSAHLSR(29)	ERGTLAR (31)	RSAHLSR (29)	ERGTLAR(31)	RSAHLSR (29)
74964	tagGGGCCGGGGCCGGGGCCGgggcgtg (24)	RSADLSE (32)	RSAHLSR (29)	RSADLSE (32)	RSAHLSR (29)	RSADLSE (32)	RSAHLSR (29)
74969	taggGGCCGGGGCCGGGGCCGGggcgtg (24)	RSDHLSE (33)	DRSHLAR (34)	RSDHLSE (33)	DRSHLAR(34)	RSDHLSE (33)	DRSHLAR(34)

SBS ID	目標位點 (SEQ ID NO)	鋅指DNA結合螺旋胺基酸序列 (SEQ ID NO)					
		F1	F2	F3	F4	F5	F6
74971	taggGGCCG GGGCCGG GGCCGGgg cgtg (24)	RSDHLSQ (35)	DNSHRTR (36)	RSDHLSQ (35)	DNSHRTR (36)	RSDHLSQ (35)	DNSHRTR (36)
74973	taggGGCCG GGGCCGG GGCCGGgg cgtg (24)	RNGHLLD (37)	DRSHLAR (34)	RNGHLLD (37)	DRSHLA R(34)	RNGHLLD (37)	DRSHLA R(34)
74978	taggGGCCG GGGCCGG GGCCGGgg cgtg (24)	RNGHLLD (37)	DNSHRTR (36)	RNGHLLD (37)	DNSHRTR (36)	RNGHLLD (37)	DNSHRTR (36)
74979	taggGGCCG GGGCCGG GGCCGGgg cgtg (24)	RSAHLSE (38)	DNSHRTR (36)	RSAHLSE (38)	DNSHRTR (36)	RSAHLSE (38)	DNSHRTR (36)
74983	tagggGCCG GGGCCGG GGCCGGG gcgtg (24)	RSAHLSR (29)	DRSDLSR (27)	RSAHLSR(29)	DRSDLSR (27)	RSAHLSR (29)	DRSDLSR (27)
74984	tagggGCCG GGGCCGG GGCCGGG gcgtg (24)	RSDHLSR (39)	DWTTRRR (40)	RSDHLSR (39)	DWTTRR R(40)	RSDHLSR (39)	DWTTRR R(40)
74986	tagggGCCG GGGCCGG GGCCGGG gcgtg (24)	RSAHLSR (29)	HRKSLSR (41)	RSAHLSR (29)	HRKSLSR (41)	RSAHLSR (29)	HRKSLSR (41)
74987	tagggGCCG GGGCCGG GGCCGGG gcgtg (24)	RSAHLSR (29)	DSSDRKK (42)	RSAHLSR (29)	DSSDRK K(42)	RSAHLSR (29)	DSSDRK K(42)
74988	tagggGCCG GGGCCGG GGCCGGG gcgtg (24)	RSAHLSR (29)	DSSTRRR (43)	RSAHLSR (29)	DSSTRRR (43)	RSAHLSR (29)	DSSTRRR (43)
74997	taggggCCG GGGCCGG GGCCGGG Gcgtg (24)	RSAHLSR (29)	RSDDRKT (44)	RSAHLSR (29)	RSDDRK T(44)	RSAHLSR (29)	RSDDRK T(44)
74998	taggggCCG GGGCCGG GGCCGGG Gcgtg (24)	RSAHLSR (29)	RSADRKT (45)	RSAHLSR (29)	RSADRK T(45)	RSAHLSR (29)	RSADRK T(45)
75001	taggggCCG GGGCCGG GGCCGGG Gcgtg (24)	RSAHLSR (29)	RNADRIT (46)	RSAHLSR (29)	RNADRIT (46)	RSAHLSR (29)	RNADRIT (46)
75003	taggggCCG GGGCCGG GGCCGGG Gcgtg (24)	RSAHLSR (29)	RRATLLD (47)	RSAHLSR (29)	RRATLLD (47)	RSAHLSR (29)	RRATLLD (47)

SBS ID	目標位點 (SEQ ID NO)	鋅指DNA結合螺旋胺基酸序列 (SEQ ID NO)					
		F1	F2	F3	F4	F5	F6
75023	cacGCCCC GGCCCCG GCCCCGgc ccta (25)	RSDTLSV (48)	DTSTRTK (49)	RSDTLSV (48)	DTSTRTK (49)	RSDTLSV(48)	DTSTRTK (49)
75027	cacGCCCC GGCCCCG GCCCCGgc ccta (25)	RNADRIT (46)	HRKSLSR (41)	RNADRIT (46)	HRKSLSR (41)	RNADRIT(46)	RNADRIT (46)
75031	cacGCCCC GGCCCCG GCCCCGgc ccta (25)	RSADRKT (45)	HRKSLSR (41)	RSADRKT (45)	HRKSLSR (41)	RSADRKT(45)	HRKSLSR (41)
75032	cacGCCCC GGCCCCG GCCCCGgc ccta (25)	RSATLSE (50)	HRKSLSR (41)	RSATLSE (50)	HRKSLSR (41)	RSATLSE(50)	HRKSLSR (41)
75055	cacGCCCC GGCCCCG GCCCCGgc ccta (25)	RSADRKT (45)	DSSTRRR (43)	RSADRKT (45)	DSSTRRR (43)	RSADRKT(45)	DSSTRRR (43)
75078	cacGCCCC GGCCCCG GCCCCGgc ccta (25)	RSADLSE (32)	HHRSLHR (51)	RSADLSE (32)	HHRSLH R(51)	RSADLSE (32)	HHRSLH R(51)
75090	cacgCCCCG GCCCCGG CCCCGGcc ccta (25)	RSDHLSE (33)	TSSDRTK (52)	RSDHLSE (33)	TSSDRTK (52)	RSDHLSE (33)	TSSDRTK (52)
75105	cacgcCCCG GCCCCGG CCCCGGCc ccta (25)	DRSHLTR (53)	DSSTRKT (54)	DRSHLTR (53)	DSSTRKT (54)	DRSHLTR (53)	DSSTRKT (54)
75109	cacgccCCG GCCCCGG CCCCGGC Cccta (25)	DKRDLAR (55)	RSADRKT (45)	DKRDLAR (55)	RSADRK T(45)	DKRDLAR (55)	RSADRK T(45)
75114	cacgccCCG GCCCCGG CCCCGGC Cccta (25)	ERGTLAR (31)	RSADRKT (45)	ERGTLAR (31)	RSADRK T(45)	ERGTLAR (31)	RSADRK T(45)
75115	cacgccCCG GCCCCGG CCCCGGC Cccta (25)	ERRDLRR (77)	RSADRKT (45)	ERRDLRR (77)	RSADRK T(45)	ERRDLRR(77)	RSADRK T(45)
74967	taggGGCCG GGGCCGG GGCCGGgg cgtg (24)	RSDHLSE (33)	SSRYRTK (56)	RSDHLSE (33)	SSRYRTK (56)	RSDHLSE (33)	SSRYRTK (56)
78021	cacgcCCCG GCCCCGG CCCCGGCc ccta (25)	DRSHLTR ^(53)	DSSTRKT (54)	DRSHLTR (53)	DSSTRKT (54)	DRSHLTR (53)	DSSTRKT (54)

SBS ID	目標位點 (SEQ ID NO)	鋅指DNA結合螺旋胺基酸序列 (SEQ ID NO)					
		F1	F2	F3	F4	F5	F6
78025	cacgccCCG GCCCCGG CCCCGGC Cccta (25)	DKRDLAR ^(55)	RSADRKT (45)	DKRDLAR (55)	RSADRK T (45)	DKRDLAR (55)	RSADRKT (45)
78029	cacgccCCG GCCCCGG CCCCGGC Cccta (25)	ERRDLRR ^(77)	RSADRKT (45)	ERRDLRR (77)	RSADRK T (45)	ERRDLRR (77)	RSADRKT (45)
78033	cacgccCCG GCCCCGG CCCCGGC Cccta (25)	ERRDLRR^ (77)	RSADRKT (45)	ERRDLRR (77)	RSADRK T (45)	ERRDLRR (77)	RSADRKT (45)
79895	taggGGCCG GGGCCGG GGCCGGgg cgtg (24)	RSDHLSE (33)	DRSHLAR ^(34)	RSDHLSE ^(33)	DRSHLA R (34)	RSDHLSE ^(33)	DRSHLA R (34)
79897	taggGGCCG GGGCCGG GGCCGGgg cgtg (24)	RSDHLSE ^(33)	DRSHLAR ^(34)	RSDHLSE ^(33)	DRSHLA R (34)	RSDHLSE ^(33)	DRSHLA R (34)
79898	taggGGCCG GGGCCGG GGCCGGgg cgtg (24)	RSDHLSE ^(33)	DRSHLAR (34)	RSDHLSE ^(33)	DRSHLA R ^(34)	RSDHLSE (33)	DRSHLA R ^(34)
79899	tagggGCCG GGGCCGG GGCCGGG gcgtg (24)	RSAHLSR ^(29)	HRKSLSR (41)	RSAHLSR ^(29)	HRKSLSR (41)	RSAHLSR (29)	HRKSLSR (41)
79901	tagggGCCG GGGCCGG GGCCGGG gcgtg (24)	RSAHLSR (29)	HRKSLSR (41)	RSAHLSR ^(29)	HRKSLSR (41)	RSAHLSR ^(29)	HRKSLSR (41)
79902	tagggGCCG GGGCCGG GGCCGGG gcgtg (24)	RSAHLSR (29)	HRKSLSR (41)	RSAHLSR ^(29)	HRKSLSR (41)	RSAHLSR (29)	HRKSLSR ^(41)
79903	tagggGCCG GGGCCGG GGCCGGG gcgtg (24)	RSAHLSR (29)	HRKSLSR ^(41)	RSAHLSR ^(29)	HRKSLSR (41)	RSAHLSR ^(29)	HRKSLSR (41)
79904	tagggGCCG GGGCCGG GGCCGGG gcgtg (24)	RSAHLSR (29)	HRKSLSR ^(41)	RSAHLSR (29)	HRKSLSR ^(41)	RSAHLSR (29)	HRKSLSR ^(41)
75025	cacGCCCC GGCCCCG GCCCCGgc cccta (25)	REQDLKQ (57)	HRKSLSR (41)	REQDLKQ (57)	HRKSLSR (41)	REQDLKQ (57)	HRKSLSR (41)
79915	cacGCCCC GGCCCCG GCCCCGgc cccta (25)	REQDLKQ^ (57)	HRKSLSR ^(41)	REQDLKQ ^(57)	HRKSLSR ^(41)	REQDLKQ (57)	HRKSLSR (41)

SBS ID	目標位點 (SEQ ID NO)	鋅指DNA結合螺旋胺基酸序列 (SEQ ID NO)					
		F1	F2	F3	F4	F5	F6
79916	cacGCCCC GGCCCCG GCCCCGgc ccta (25)	REQDLKQ (57)	HRKSLSR ^(41)	REQDLKQ (57)	HRKSLSR ^(41)	REQDLKQ (57)	HRKSLSR (41)
79921	cacGCCCC GGCCCCG GCCCCGgc ccta (25)	RNADRIT ^(46)	HRKSLSR ^(41)	RNADRIT ^(46)	HRKSLSR (41)	RNADRIT ^(46)	HRKSLSR (41)

【0109】 ZFP-TF藉由標準SELEX分析(參見例如Miller等人，*Nat Biotech.* (2010) doi:10.1038/nbt.1755 ； Wilen 等 人 ， *PLoS* (2011) 7(4):e1002020)評估。顯示所有ZFP-TF均結合至其目標位點。

【0110】 研究中使用五種類型之人類細胞株及一種小鼠細胞株。C9021纖維母細胞細胞株係獲自哥倫比亞大學ALS研究所(The ALS Institute at Columbia University)且來源於ALS-FTD患者。該細胞株在其正常對偶基因上含有5個G_4C_2重複序列且在其擴增對偶基因上含有大致850個重複序列。野生型纖維母細胞細胞株(NDS00035)、353TRAD及204TDP纖維母細胞細胞株係獲自國立神經病症及中風研究所(National Institute of Neurological Disorders and Stroke)。野生型細胞株在各對偶基因上含有兩個G_4C_2重複序列。353TRAD細胞株在一個對偶基因上含有5個重複序列且在另一對偶基因上含有8個重複序列。204TDP在一個對偶基因上具有2個重複序列且在另一對偶基因上具有20個重複序列。對於所有纖維母細胞實驗，人類神經元係獲自Cell Dynamics International (iCell GABANeurons套組，01434；目錄號R1013；細胞批號104901)。小鼠皮質神經元係獲自GIBCO (目錄號A15586)。結合至其目標區但不具有可觀測抑制效應之ZFP 74960用作陰性對照。

【0111】 對於在患者來源之纖維母細胞中進行的所有實驗，使用來

自Lonza之96孔Shuttle Nucleofector系統進行ZFP-TF mRNA向細胞中的轉染。使用Amaxa P2 Primary Cells Nucleofector套組用CA-137程式轉染每40,000個細胞1、3、10、30、100及300 ng ZFP-TF mRNA。隔夜培育後，使用Cells-to-Ct套組(Thermo Fisher Scientific)以自經轉染細胞產生cDNA，接著使用qRT-PCR進行基因表現分析。

【0112】 對於神經元轉導，將ZFP製造至AAV6質體中。將神經元用AAV6-ZFP轉導。所有轉導均在3,000 MOI下進行。小鼠神經元在轉導後7天收集，而人類神經元在轉導後19天收集。收集細胞後，對其進行加工以供微陣列分析。

【0113】 篩選分析在多輪中進行。在各輪中，在多個濃度下測試ZFP以鑑別具有適合目標命中(選擇性抑制)模式之ZFP-TF。在C9 (C9021)細胞中進行第2輪篩選，以評估ZFP-TF處理後相對於總*C9orf72* (「總C9」)成熟mRNA的擴增正義轉錄物(疾病) *C9orf72*之量。RT-PCR分析使用靶向內含子區1a之引子/探針組。

擴增正義*C9orf72*轉錄物：

正向：5' CCCTCTCTCCCCACTACTTG 3' (SEQ ID NO:61)

反向：5' CTACAGGCTGCGGTTGTTTCC 3' (SEQ ID NO:62)

探針：5' TCTCACAGTACTCGCTGAGGGTGA 3' (SEQ ID NO:63)。

【0114】 G_4C_2擴增導致低效剪接及含擴增之前驅mRNA的累積(**圖2A**)。相比之下，高效剪接之野生型(WT)前驅mRNA以極低量存在。藉由在C9021細胞中使用此分析，吾人顯示所測試之ZFP-TF顯示對擴增正義(疾病) *C9orf72*轉錄物之廣泛範圍抑制。(**圖2B至圖2D**)。

【0115】 為了評估對總*C9orf72* mRNA之抑制，使用不同引子/探針組，其表示為「總C9」(**圖2A**)：

總*C9orf72* mRNA：

正向：5' CTATGTGTGTGGTGGGATATGG 3' (SEQ ID NO:58)

反向：5' CTCCAGGTTATGTGAAGCAGAA 3' (SEQ ID NO:59)

探針：5' AGGCCTGCTAAAGGATTCAACTGGAA 3' (SEQ ID NO:60)。

【0116】 此引子/探針組可偵測包含跨越外顯子8及9之區的mRNA。此區在所有*C9orf72* mRNA同功異型物中存在。如圖2b中所示，許多ZFP-TF顯示對總C9orf72轉錄物之適度抑制。舉例而言，ZFP-TF 75114及75115抑制擴增正義(疾病)轉錄物超過70%，同時保持總*C9orf72* mRNA表現超過50% (**圖2D**，第2輪資料)。

【0117】 在第3輪中，評估總*C9orf72* mRNA且將其在C9021細胞與野生型(WT)細胞之間比較，以便進一步評估所測試之ZFP-TF對總*C9orf72* mRNA量的影響。資料顯示與WT細胞中相比，突變型細胞中總*C9orf72* mRNA量的減少顯著得多(**圖2B至圖2D**)，且該等量在由相同ZFP-TF處理的野生型細胞中受到的影響小得多。整體資料說明對於一些ZFP，諸如75109、75114及75115，擴增同功異型物受顯著抑制(約70%)，同時維持C9患者纖維母細胞細胞株之總C9轉錄物的約50%。

【0118】 在三種不同患者來源之纖維母細胞中評估ZFP-TF 75109、75114及75115之同功異型物選擇性抑制，該等纖維母細胞在其擴增對偶基因上含有不同G_4C_2擴增重複序列(600、800及850個) (**圖6**)。所有三種ZFP展現不依賴於重複序列擴增長度之類似行為，說明ZFP-TF之選擇性

抑制不依賴於G4C2重複序列長度。

【0119】 評估來自健康個體之兩種細胞株中對總C9轉錄物之抑制，該等細胞株在其對偶基因上的G_4C_2重複序列數目大於正常值(**圖7**)。在健康細胞株中，總C9轉錄物受極小影響。患者來源之細胞株(C9021)中總C9 mRNA轉錄物之ZFP介導抑制並不真正代表WT同功異型物量，因為使用PCR分析以偵測總C9 mRNA轉錄物目標外顯子8及9，其在擴增及非擴增(WT)同功異型物兩者中均離開(**圖2A**)。在對偶基因上具有不同G_4C_2重複序列長度之兩種不同健康細胞株中評估回應於同功異型物選擇性ZFP-TF(75109、75114及75115)的總C9 mRNA轉錄物抑制(**圖7**)。細胞株353TREAD在一個對偶基因上具有5個重複序列且在另一對偶基因上具有8個重複序列，而細胞株204TDP一個對偶基因具有2重複序列且在另一對偶基因上具有20個重複序列。儘管總C9 mRNA轉錄物在C9細胞株C921 (在非擴增對偶基因上有5個重複序列且在擴增對偶基因上有850個重複序列)中以劑量依賴型方式受抑制，但其在不具有擴增對偶基因之其他兩種細胞株中受極小影響，表明疾病細胞株(5/850)中對總C9同功異型物之抑制係對擴增同功異型物之抑制的結果，且非擴增同功異型物之表現不受選擇性ZFP-TF影響(**圖7**)。

【0120】 在不受理論束縛的情況下，有可能本發明ZFP-TF能夠以合作方式起作用，以便選擇性抑制具有大量重複序列之對偶基因。其可由高階(higher-order)複合物介導，例如經由募集與ZFP連接的KRAB域締合之KAP1共抑制子。在此假設下，跨越多個ZFP-TF之KAP1/KRAB「支架」提高轉錄抑制機構之穩定性，且使得能夠相比於野生型對偶基因，優先抑制擴增*C9orf72*對偶基因。

實例2：*C9orf72*抑制之特異性

【0121】 藉由以下3種細胞株中之微陣列分析評估表1中所示之ZFP-TF的全局特異性：C9021纖維母細胞、原代小鼠皮質神經元及人類神經元。簡言之，對於C9021細胞，將100 ng ZFP-TF編碼mRNA一式四份轉染至150,000個C9021細胞中。24小時後，經由製造商之方案(Affymetrix Genechip MTA1.0)提取且加工總RNA。使用穩健多陣列平均(RMA)來使來自各探針組的原始信號標準化。使用Transcriptome Analysis Console 3.0 (Affymetrix)用「基因層級差異性表現分析(Gene Level Differential Expression Analysis)」選項進行分析。將經ZFP-TF轉染之樣品與已經不相關ZFP-TF (不結合至*C9orf72*目標位點之ZFP-TF)處理的樣品進行比較。對於相對於對照，均值信號>2倍差異，且P值< 0.05 (單因子變異數分析，對於各探針組進行非成對T檢定)的轉錄物(探針組)報告變化召喚。對神經元進行類似程序，其例外之處在於其在3000 MOI下經AAV6轉導，且對於小鼠神經元培養7天且對於人類神經元培養19天，隨後收集。

【0122】 例示性資料顯示於**圖8A至圖8C**中。資料顯示ZFP-TF 75027展現除*C9orf72* (顯示為帶圓圈)外數次偏離目標，而ZFP-TF 75109、75114及75115僅抑制*C9orf72*，在人類及小鼠兩者中之纖維母細胞及神經元兩者中極少偏離目標。此等結果證明代表性ZFP-TF對*C9orf72*具有高度特異性。

實例3：反義特異性抑制之偵測

【0123】 因為正義及反義轉錄物由DNA之重疊區編碼，所以吾人開發基於轉錄物之差異性加工的偵測策略。對於來自擴增對偶基因之正義mRNA，含有擴增區之內含子(內含子1a)經錯剪接且保留，而所有其他內

含子經移除，包括內含子1b。相比之下，內含子1b區為反義mRNA轉錄物之預測外顯子且應保留。因此，吾人設計且測試位於內含子1b內之引子且展現對反義轉錄物之特異性偵測，如下文進一步描述。

【0124】為偵測*C9orf72*轉錄物，吾人使用液滴式數位PCR (ddPCR)。簡言之，為建立正義或反義cDNA模板，自C9orf72患者及健康對照細胞(C9orf72細胞株：C9-3、C9-6、C9-7、C9-5、C9-10、C9-11、C9-2、C9-4；對照細胞株：KinALS6、Con3、Kin1ALS17、Con8、Con10、Con1；參見Lagier-Tourenne等人, *PNAS* (2013) 110(47):E4530-9)純化RNA，且如下使用Superscript III (Thermo Fischer Scientific)第一股合成系統使用該RNA來合成cDNA：

1)將0.5 μg RNA、0.5 μL 10 mM股特異性引子及dNTP混合物混合且用水製得至10 μL。為產生正義模板，使用引子5' CTCTAGCGACTGGTGGAATTG 3' (SEQ ID NO:64)。為產生反義模板，使用引子5' GTGCATGGCAACTGTTTGAATA 3' (SEQ ID NO:65)。

2)將此反應物在65℃下培育5分鐘以便變性，且置放於冰上至少1分鐘。

3)使用此等試劑製備cDNA合成混合物：10×RT緩衝液(2 μL)；25 mM MgCl2 (4 μL)；0.1 M DTT (2 μL)；核糖核酸酶OUT (1 μL)；Superscript III (1 μL)。

4)將10 μL此反應物添加至RNA混合物中且在50℃下培育50分鐘。隨後藉由在85℃下培育5分鐘使反應物失活。

【0125】隨後使用經標記探針根據製造商之方案使模板經歷ddPCR。簡言之，在ABI PCR 96孔培養盤中使用探針用無dUTP ddPCR

超混合液(Bio-Rad)進行PCR反應。根據製造商之說明製備PCR主混合物。以下顯示位於內含子1b區上之反義引子-探針組(**圖3**)。

正向：5' CAAAGCCTGGTGGTGTTCAA 3' (SEQ ID NO:66)

反向：5' GGACATGACCTGGTTGCTTC 3' (SEQ ID NO:67)

探針：5' CGCGGCCAGATAGACCCAATGAGCA 3' (SEQ ID NO:68)。

【0126】 反應如下設置：

1)將全部主混合物均勻分配在ABI PCR培養盤之8個孔中。

2)將10 μL 1:10稀釋之RT反應物或水添加至樣品孔中。

3)將15 μL主混合物轉移至含RT之孔中。

4)將培養盤密封，渦旋且短暫離心。

為製備液滴，如下使用筒：

1)在筒上將70 μL探針油置於標記為油之孔中，且將20 μL ddPCR反應物置於標記為樣品之孔中。

2)將橡膠墊置於筒頂部上。

3)將40 μL液滴轉移至新鮮Eppendorf 96孔培養盤中。用鋁箔密封培養盤且根據製造商之方案進行PCR。

【0127】 資料顯示在C9orf72纖維母細胞細胞株中，此等引子在反義擴增前驅mRNA (C9-AS)中擴增外顯子，且互補區在正義區(C9-S)中不存在(**圖4A**)。因此，本文中ddPCR反義引子特異性偵測反義前驅mRNA，相比於6種不同對照纖維母細胞，反義前驅mRNA在7種不同C9患者來源之纖維母細胞中明顯升高(**圖4B**)。

實例4：擴增對偶基因正義及反義前驅mRNA抑制

【0128】 為測試ZFP-TF抑制子對擴增對偶基因之活性，將細胞用ZFP-TF 74949、74978、75003、75027、75109、75114、75115、74967(表1)或74960 (陰性對照)處理，如上文所描述。由對樣品順序不知情的研究人員使用兩個獨立PCR分析來評定ZFP-TF介導之抑制。各分析使用不同引子/探針(**圖5A至圖5C**)。

【0129】 對於1號及2號運作，如上文所描述進行量測正義擴增、反義擴增及總C9之分析，其例外之處在於根據此項技術中之標準方案用隨機六聚體且用以下顯示之引子進行擴增：

反義擴增C9orf72前驅mRNA (**圖5B**)：如以上實例3中所示。

正義擴增C9orf72前驅mRNA (**圖5A**)：此引子/探針組可偵測包含跨越外顯子1a及內含子1a之區的mRNA。

正向：5' ACTACTTGCTCTCACAGTACTCG 3' (SEQ ID NO:69)

反向：5' TAGCGCGCGACTCCTGAGTTCC 3' (SEQ ID NO:70)

探針：5' AGGGAAACAACCGCAGCCTGTAGCAAGCTC 3' (SEQ ID NO:71)。

總C9orf72 mRNA (**圖5C**)：此引子/探針組可偵測包含外顯子2內之區的mRNA。

正向：5' TGTGACAGTTGGAATGCAGTGA 3' (SEQ ID NO:72)

反向：5' GCCACTTAAAGCAATCTCTGTCTTG 3' (SEQ ID NO:73)

探針：5' TCGACTCTTTGCCCACCGCCA 3' (SEQ ID NO:74)。

【0130】 3號運作(**圖5A**及**圖5C**)使用以上實例1中所示之引子(**圖2B至圖2D**)。對於反義疾病轉錄物，使用以下引子/探針以便偵測內含子區1b

(**圖5B**)。

正向：5' CAGCTTCGGTCAGAGAAATGAG 3' (SEQ ID NO:78)

反向：5' AAGAGGCGCGGGTAGAA 3' (SEQ ID NO:79)

探針：5' CTCTCCTCAGAGCTCGACGCATTT 3' (SEQ ID NO:80)。

【0131】 儘管使用不同引子/探針組及不同PCR分析(1號運作及2號運作藉由類似分析進行，但不同於3號運作)，但資料一致且抑制量可比。

【0132】 綜合而言，所有運作一致地展現一些ZFP-TF能夠強有力地抑制所有三種轉錄物(正義、反義及總) (例如，ZFP-TF 74978、75003及75027)，而一些ZFP-TF (例如，ZFP-TF 75109、75114及75115)選擇性抑制正義及反義疾病轉錄物同時保持總C9轉錄物(選擇性抑制)。

實例5：BAC *C9orf72*基因轉殖小鼠神經元中對人類*C9orf72*之調節

【0133】 使用驅動表現之CMV啟動子將靶向BAC小鼠*C9orf72*之所有抑制子選殖至rAAV6載體中。在HEK293T細胞中產生重組AAV，使用CsCl密度-梯度純化，且藉由即時qPCR根據此項技術中已知之方法滴定。使用純化病毒以3E5、1E5、3E4及1E4 Vg/細胞感染經培養原代小鼠皮質神經元。7天後，提取總RNA且使用RT-qPCR監測*C9orf72*正義及反義轉錄物以及兩種參考基因(例如*Atp5b*及*Eif4a2*)的表現。

【0134】 所有ZFP-TF編碼AAV載體將在寬感染劑量範圍內在小鼠細胞中有效抑制其目標，一些ZFP在多次劑量下減少目標超過95%。相比之下，對於在等效劑量下測試的CMV-GFP rAAV6病毒，或經假擬處理之神經元，未觀測到基因抑制。

實例6：由AAV遞送之ZFP-TF驅動的活體內基因抑制

【0135】 用於目標接合研究之*C9orf72* BAC基因轉殖小鼠含有98 kb人類轉殖基因，其含有具有約500個G_4C_2重複序列以及實質性側接序列之全長*C9orf72*基因對偶基因(Liu等人, *Neuron* (2016) 90(3):521-34)。選擇兩種ZFP-TF ZFP-TF 75027或ZFP-TF 75114用於此研究，其效力不同(ZFP-TF 75027效率更強；**圖2D**)。將兩種融合蛋白之表現卡匣均選殖至rAAV載體中，該rAAV載體含有驅動表現之突觸蛋白啟動子及可自裂解肽(例如，2A肽，諸如T2A或P2A)之編碼序列，後接量測生物分佈之Venus標籤(**圖9，A圖**)。rAAV在HEK293T細胞中產生且藉由ddPCR在ITR上使用引子進行滴定。

【0136】 為評估ZFP-TF表現在活體內對含擴增正義及反義轉錄物之抑制的影響，藉由腦室內(ICV)注射將ZFP-TF rAAV遞送至P0 C9-BAC或WT小鼠中。簡言之，媒劑(PBS)或ZFP-TF 75027 rAAV或ZFP-TF 75114 rAAV (總劑量2E10 Vg/腦室)兩側投與(2 µl/腦室)至新生C9-BAC小鼠(針對重複序列長度匹配)或WT小鼠中(**圖9，C圖**)。注射後四週處死動物且將一個半球包埋以供RNA聚集點分析，且將另一半球顯微解剖成皮質、海馬及小腦以供進一步分析(**圖9，B圖**)。對病毒基因組及Venus mRNA及蛋白質之定量顯示廣泛生物分佈，ZFP-TF 75027及ZFP-TF 75114兩者之轉導及表現等效。

【0137】 自皮質及海馬組織提取總RNA且使用iScript cDNA合成套組(BioRad)製備cDNA。進行ddPCR以量測含正義及反義擴增之轉錄物的表現，及相對於小鼠TBP量標準化之總C9 mRNA量。用於此分析之引子為：

總C9 mRNA：

正向：5'TGTGACAGTTGGAATGCAGTGA3' (SEQ ID NO:72)

反向：5'GCCACTTAAAGCAATCTCTGTCTTG3' (SEQ ID NO:73)

探針：5'TCGACTCTTTGCCCACCGCCA3' (SEQ ID NO:74)。

正義擴增前驅mRNA：

正向：5' ACTACTTGCTCTCACAGTACTCG 3' (SEQ ID NO:69)

反向：5' TAGCGCGCGACTCCTGAGTTCC 3' (SEQ ID NO:70)

探針：5' AGGGAAACAACCGCAGCCTGTAGCAAGCTC 3' (SEQ ID NO:71)。

反義擴增前驅mRNA：

正向：5'AGTCGCTAGAGGCGAAAGC3' (SEQ ID NO:81)

反向：5'CGAGTGGGTGAGTGAGGAG3' (SEQ ID NO:82)

探針：5'AAGAGGCGCGGGTAGAAGCGGGGGC3' (SEQ ID NO:83)。

【0138】 資料顯示相對於經PBS注射之對照，ZFP-TF 75027抑制C9-BAC動物之海馬及皮質中總C9 mRNA、含正義及反義擴增轉錄物的量(**圖9，D圖**)。(在此動物模型之情況下無法觀測到選擇性抑制，因為基因轉殖小鼠不含有WT人類*C9orf72*對偶基因且小鼠*C9orf72*基因不含有G_4C_2重複序列)。在ZFP-TF 75114之情況下未觀測到抑制。

【0139】 另外，使用螢光原位雜交以量測ZFP-TF注射後見於海馬中之正義及反義RNA聚集體(聚集點)的量(**圖9，E圖**)。簡言之，10 μm切片與經螢光團標記之探針雜交：5'GGCCCCGGCCCCGGCCCC-Cy3 (SEQ ID NO:84)用於量測正義RNA聚集點且5'GGGGCCGGGGCCGGGGCC-Cy3 (SEQ ID NO:85)用於量測反義RNA聚集點。在共焦顯微鏡(LSM880)上以40×放大獲得堆疊影像。相對於細胞總數目標準化之正義及反義RNA

聚集點之數目自海馬之阿蒙氏角(CA)區定量。在經ZFP-TF 75027注射之動物中觀測到較低百分比之反義RNA聚集點。

【0140】 此等結果顯示靶向*C9orf72*之ZFP-TF可在活體內有效抑制致病*C9orf72*對偶基因之表現，且可觀測到ZFP-TF效力中的差異。

【序列表】

<110> 美商聖加莫治療股份有限公司(SANGAMO THERAPEUTICS, INC.)

<120> 染色體9開放讀框72基因表現之調節子及其用途

<130> 025297.TW017

<140>
<141>

<150> 62/964,844
<151> 2020-01-23

<150> 62/837,523
<151> 2019-04-23

<160> 85

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1
<211> 6
<212> DNA
<213> 智人

<400> 1
ggggcc 6

<210> 2
<211> 6
<212> DNA
<213> 智人

<400> 2
gggccg 6

<210> 3
<211> 6
<212> DNA
<213> 智人

<400> 3
ggccgg 6

<210> 4

<211> 6
<212> DNA
<213> 智人

<400> 4
gccggg 6

<210> 5
<211> 6
<212> DNA
<213> 智人

<400> 5
ccgggg 6

<210> 6
<211> 6
<212> DNA
<213> 智人

<400> 6
cggggc 6

<210> 7
<211> 6
<212> DNA
<213> 智人

<400> 7
ggcccc 6

<210> 8
<211> 6
<212> DNA
<213> 智人

<400> 8
gccccg 6

<210> 9
<211> 6
<212> DNA
<213> 智人

<400> 9

ccccgg 6

<210> 10
<211> 6
<212> DNA
<213> 智人

<400> 10
cccggc 6

<210> 11
<211> 6
<212> DNA
<213> 智人

<400> 11
ccggcc 6

<210> 12
<211> 6
<212> DNA
<213> 智人

<400> 12
cggccc 6

<210> 13
<211> 96
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13

Asp	Ala	Lys	Ser	Leu	Thr	Ala	Trp	Ser	Arg	Thr	Leu	Val	Thr	Phe	Lys
1				5				10					15		

Asp	Val	Phe	Val	Asp	Phe	Thr	Arg	Glu	Glu	Trp	Lys	Leu	Leu	Asp	Thr
			20					25					30		

Ala	Gln	Gln	Ile	Val	Tyr	Arg	Asn	Val	Met	Leu	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asn
		35					40					45			

Leu	Val	Ser	Leu	Gly	Tyr	Gln	Leu	Thr	Lys	Pro	Asp	Val	Ile	Leu	Arg
	50					55					60				

Leu Glu Lys Gly Glu Glu Pro Trp Leu Val Glu Arg Glu Ile His Gln
65 70 75 80

Glu Thr His Pro Asp Ser Glu Thr Ala Phe Glu Ile Lys Ser Ser Val
85 90 95

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 14
Asp Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 15
Thr Gly Glu Lys Pro
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 16
Leu Arg Gln Lys Asp Gly Glu Arg Pro
1 5

<210> 17

<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 17
Gly Gly Arg Arg
1

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 18
Gly Gly Arg Arg Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 19
Leu Arg Gln Arg Asp Gly Glu Arg Pro
1 5

<210> 20
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 20
Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro
1 5 10

<210> 21
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 21
Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro
1 5 10 15

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 22
Thr Gly Ser Gln Lys Pro
1 5

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 23
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 24
<211> 28
<212> DNA
<213> 智人

<400> 24
taggggccgg ggccggggcc ggggcgtg 28

<210> 25

<211> 28
<212> DNA
<213> 智人

<400> 25
cacgccccgg ccccggcccc ggccccta 28

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 26
Leu Arg Gln Lys Asp Ala Ala Arg Gly Ser
1 5 10

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 27
Asp Arg Ser Asp Leu Ser Arg
1 5

<210> 28
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 28
Arg Ser Thr His Leu Val Arg
1 5

<210> 29
<211> 7
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 29
Arg Ser Ala His Leu Ser Arg
1 5

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 30
Glu Arg Gly Asp Leu Lys Arg
1 5

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 31
Glu Arg Gly Thr Leu Ala Arg
1 5

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 32
Arg Ser Ala Asp Leu Ser Glu
1 5

<210> 33

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 33
Arg Ser Asp His Leu Ser Glu
1 5

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 34
Asp Arg Ser His Leu Ala Arg
1 5

<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 35
Arg Ser Asp His Leu Ser Gln
1 5

<210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 36
Asp Asn Ser His Arg Thr Arg
1 5

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 37
Arg Asn Gly His Leu Leu Asp
1 5

<210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 38
Arg Ser Ala His Leu Ser Glu
1 5

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 39
Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1 5

<210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 40
Asp Trp Thr Thr Arg Arg Arg

1 5

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 41
His Arg Lys Ser Leu Ser Arg
1 5

<210> 42
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 42
Asp Ser Ser Asp Arg Lys Lys
1 5

<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 43
Asp Ser Ser Thr Arg Arg Arg
1 5

<210> 44
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 44
Arg Ser Asp Asp Arg Lys Thr
1 5

<210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 45
Arg Ser Ala Asp Arg Lys Thr
1 5

<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 46
Arg Asn Ala Asp Arg Ile Thr
1 5

<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 47
Arg Arg Ala Thr Leu Leu Asp
1 5

<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 48
Arg Ser Asp Thr Leu Ser Val
1 5

<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 49
Asp Thr Ser Thr Arg Thr Lys
1 5

<210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 50
Arg Ser Ala Thr Leu Ser Glu
1 5

<210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 51
His His Arg Ser Leu His Arg
1 5

<210> 52
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 52
Thr Ser Ser Asp Arg Thr Lys
1 5

<210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 53
Asp Arg Ser His Leu Thr Arg
1 5

<210> 54
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 54
Asp Ser Ser Thr Arg Lys Thr
1 5

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 55
Asp Lys Arg Asp Leu Ala Arg
1 5

<210> 56
<211> 7

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 56
Ser Ser Arg Tyr Arg Thr Lys
1 5

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 57
Arg Glu Gln Asp Leu Lys Gln
1 5

<210> 58
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成引子

<400> 58
ctatgtgtgt ggtgggatat gg 22

<210> 59
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成引子

<400> 59
ctccaggtta tgtgaagcag aa 22

<210> 60
<211> 26

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成探針

<400> 60
aggcctgcta aaggattcaa ctggaa 26

<210> 61
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成引子

<400> 61
ccctctctcc ccactacttg 20

<210> 62
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成引子

<400> 62
ctacaggctg cggttgtttc c 21

<210> 63
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成探針

<400> 63
tctcacagta ctcgctgagg gtga 24

<210> 64
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成引子

<400> 64
ctctagcgac tggtggaatt g 21

<210> 65
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成引子

<400> 65
gtgcatggca actgtttgaa ta 22

<210> 66
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成引子

<400> 66
caaagcctgg tggtgttcaa 20

<210> 67
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成引子

<400> 67
ggacatgacc tggttgcttc 20

<210> 68
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成探針

<400> 68
cgcggccaga tagacccaat gagca 25

<210> 69
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成引子

<400> 69
actacttgct ctcacagtac tcg 23

<210> 70
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成引子

<400> 70
tagcgcgcga ctcctgagtt cc 22

<210> 71
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成探針

<400> 71
agggaaacaa ccgcagcctg tagcaagctc 30

<210> 72
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成引子

<400> 72
tgtgacagtt ggaatgcagt ga 22

<210> 73
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成引子

<400> 73
gccacttaaa gcaatctctg tcttg 25

<210> 74
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成探針

<400> 74
tcgactcttt gcccaccgcc a 21

<210> 75
<211> 16
<212> DNA
<213> 智人

<400> 75
ccggggccgg ggccgg 16

<210> 76
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 76
Leu Arg Gln Lys Asp Ala Ala Arg Gly Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 77
Glu Arg Arg Asp Leu Arg Arg
1 5

<210> 78
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成引子

<400> 78
cagcttcggt cagagaaatg ag 22

<210> 79
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成引子

<400> 79
aagaggcgcg ggtagaa 17

<210> 80
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成探針

<400> 80
ctctcctcag agctcgacgc attt 24

<210> 81

<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成引子

<400> 81
agtcgctaga ggcgaaagc 19

<210> 82
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成引子

<400> 82
cgagtgggtg agtgaggag 19

<210> 83
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成探針

<400> 83
aagaggcgcg ggtagaagcg ggggc 25

<210> 84
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成探針

<400> 84
ggccccggcc ccggcccc 18

<210> 85
<211> 18
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成探針

<400> 85
ggggccgggg ccgggggcc 18

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種包含鋅指蛋白(zinc finger protein；ZFP)域及轉錄抑制域之融合蛋白，其中該ZFP域結合至人類*C9orf72*基因之突變型對偶基因上外顯子1a與外顯子1b之間內含子區段中的目標區，其中該目標區包含超過30個G_4C_2 (SEQ ID NO:1)之串聯重複序列，其中該ZFP域包含下表單一列中所示之六個識別螺旋區，其中各個序列之SEQ ID NO指示於括號中，且其中符號「^」表示所指定序列中第1胺基酸上游之第4位處的精胺酸(R)殘基改變為麩醯胺酸(Q)：

RSDHLSE (33)	SSRYRTK (56)	RSDHLSE (33)	SSRYRTK (56)	RSDHLSE (33)	SSRYRTK (56)
REQDLKQ (57)	HRKSLSR (41)	REQDLKQ (57)	HRKSLSR (41)	REQDLKQ (57)	HRKSLSR (41)
DRSHLTR ^(53)	DSSTRKT (54)	DRSHLTR (53)	DSSTRKT (54)	DRSHLTR (53)	DSSTRKT (54)
DKRDLAR ^(55)	RSADRKT (45)	DKRDLAR (55)	RSADRKT (45)	DKRDLAR (55)	RSADRKT (45)
ERRDLRR ^(77)	RSADRKT (45)	ERRDLRR (77)	RSADRKT (45)	ERRDLRR (77)	RSADRKT (45)
RSDHLSE (33)	DRSHLAR ^(34)	RSDHLSE ^(33)	DRSHLAR (34)	RSDHLSE ^(33)	DRSHLAR (34)
RSDHLSE ^(33)	DRSHLAR ^(34)	RSDHLSE ^(33)	DRSHLAR (34)	RSDHLSE ^(33)	DRSHLAR (34)
RSDHLSE ^(33)	DRSHLAR (34)	RSDHLSE ^(33)	DRSHLAR ^(34)	RSDHLSE (33)	DRSHLAR ^(34)
RSAHLSR ^(29)	HRKSLSR (41)	RSAHLSR ^(29)	HRKSLSR (41)	RSAHLSR (29)	HRKSLSR (41)
RSAHLSR (29)	HRKSLSR (41)	RSAHLSR ^(29)	HRKSLSR (41)	RSAHLSR ^(29)	HRKSLSR (41)
RSAHLSR (29)	HRKSLSR (41)	RSAHLSR ^(29)	HRKSLSR (41)	RSAHLSR (29)	HRKSLSR ^(41)
RSAHLSR (29)	HRKSLSR ^(41)	RSAHLSR ^(29)	HRKSLSR (41)	RSAHLSR ^(29)	HRKSLSR (41)
RSAHLSR (29)	HRKSLSR ^(41)	RSAHLSR (29)	HRKSLSR ^(41)	RSAHLSR (29)	HRKSLSR ^(41)
REQDLKQ	HRKSLSR	REQDLKQ	HRKSLSR	REQDLKQ	HRKSLSR

^(57)	^(41)	^(57)	^(41)	(57)	(41)
REQDLKQ (57)	HRKSLSR ^(41)	REQDLKQ (57)	HRKSLSR ^(41)	REQDLKQ (57)	HRKSLSR (41)
RNADRIT ^(46)	HRKSLSR ^(41)	RNADRIT ^(46)	HRKSLSR (41)	RNADRIT ^(46)	HRKSLSR (41)

。

【請求項2】

如請求項1之融合蛋白，其中該融合蛋白抑制來自該突變型對偶基因之含重複序列mRNA之轉錄，且不抑制來自該基因之野生型mRNA之轉錄。

【請求項3】

如請求項1或2之融合蛋白，其中該ZFP域結合至該目標區中之正義序列，其中該正義序列包含以下一至三個六核苷酸之串聯重複序列：GGGGCC (SEQ ID NO:1)、GGGCCG (SEQ ID NO:2)、GGCCGG (SEQ ID NO:3)、GCCGGG (SEQ ID NO:4)、CCGGGG (SEQ ID NO:5)或CGGGGC (SEQ ID NO:6)。

【請求項4】

如請求項1或2之融合蛋白，其中該融合蛋白抑制人類細胞中來自該突變型*C9orf72*對偶基因之正義轉錄。

【請求項5】

如請求項4之融合蛋白，其中該融合蛋白抑制來自*C9orf72* 1a啟動子正義轉錄，且不抑制來自*C9orf72* 1b啟動子正義轉錄。

【請求項6】

如請求項1或2之融合蛋白，其中該ZFP域結合至該目標區中之反義序列，其中該反義序列包含以下一至三個六核苷酸之串聯重複序列：GGCCCC (SEQ ID NO:7)、GCCCCG (SEQ ID NO:8)、CCCCGG (SEQ ID NO:9)、CCCGGC (SEQ ID NO:10)、CCGGCC (SEQ ID NO:11)或

CGGCCC (SEQ ID NO:12)。

【請求項7】

如請求項1或2之融合蛋白，其中該融合蛋白抑制人類細胞中來自該突變型*C9orf72*對偶基因之反義轉錄。

【請求項8】

如請求項1或2之融合蛋白，其中該融合蛋白抑制人類細胞中來自該突變型*C9orf72*對偶基因之正義轉錄及反義轉錄兩者。

【請求項9】

如請求項1或2之融合蛋白，其中該融合蛋白抑制來自該突變型*C9orf72*對偶基因之正義及/或反義轉錄至少約30%。

【請求項10】

如請求項1或2之融合蛋白，其中該轉錄抑制域包含來自人類KOX1之KRAB域胺基酸序列。

【請求項11】

如請求項1或2之融合蛋白，其中該ZFP域經由肽連接子連接至該轉錄抑制域。

【請求項12】

一種核酸構築體，其包含如請求項1至11中任一項之融合蛋白的編碼序列，其中該編碼序列可操作地連接至轉錄調控元件。

【請求項13】

如請求項12之核酸構築體，其中該轉錄調控元件係人類突觸蛋白I啟動子。

【請求項14】

如請求項12或13之核酸構築體，其中該構築體係病毒構築體。

【請求項15】

一種宿主細胞，其包含如請求項12至14中任一項之核酸構築體。

【請求項16】

如請求項15之宿主細胞，其中該宿主細胞係人類細胞。

【請求項17】

如請求項16之宿主細胞，其中該人類細胞係神經元或多能幹細胞。

【請求項18】

一種重組腺相關病毒(rAAV)，其包含如請求項14之核酸構築體。

【請求項19】

一種醫藥組合物，其包含如請求項12至14中任一項之核酸構築體，或如請求項18之rAAV，及醫藥學上可接受之載劑。

【請求項20】

一種如請求項1至11中任一項之融合蛋白、如請求項12至14中任一項之核酸構築體、如請求項18之rAAV或如請求項19之醫藥組合物之用途，其係用於製造抑制人類細胞中*C9orf72*基因之突變型對偶基因之轉錄的藥劑，其中該突變型對偶基因在外顯子1a與外顯子1b之間的內含子區段中包含經擴增G_4C_2 (SEQ ID NO:1)重複序列區。

【請求項21】

如請求項20之用途，其中該人類細胞係神經元、神經膠細胞、室管膜細胞或神經上皮細胞。

【請求項22】

如請求項20之用途，其中該細胞係在患有*C9orf72*相關病症之患者的

腦或脊髓中。

【請求項23】

一種如請求項1至11中任一項之融合蛋白、如請求項12至14中任一項之核酸構築體、如請求項18之rAAV或如請求項19之醫藥組合物之用途，其係用於製造治療患有*C9orf72*相關病症之患者之藥劑。

【請求項24】

如請求項22或23之用途，其中該*C9orf72*相關病症係選自肌肉萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)及C9家族性額顳葉型失智症(C9FTD)。

【請求項25】

如請求項20至23中任一項之用途，其中該融合蛋白係經由表現該融合蛋白之rAAV引入。

【請求項26】

如請求項25之用途，其中該rAAV具有血清型9或假型AAV2/9或AAV2/6/9。

【請求項27】

如請求項25之用途，其中該重組病毒經由腦室內、鞘內、顱內、眼眶後(RO)、靜脈內、鼻內及/或腦池內途徑向該患者投與。

【請求項28】

如請求項20至23中任一項之用途，其中兩種或更多種如請求項1至11中任一項之融合蛋白係經引入。

【請求項29】

如請求項1之融合蛋白，其中該ZFP域包含六個鋅指，該些鋅指分別包含以下之序列：SEQ ID NO：33、34、33、34、33及34。

【請求項30】

如請求項1之融合蛋白，其中該ZFP域包含六個鋅指，該些鋅指分別包含以下之序列：SEQ ID NO：29、41、29、41、29及41。

【請求項31】

如請求項1之融合蛋白，其中該ZFP域包含六個鋅指，該些鋅指分別包含以下之序列：SEQ ID NO：53、54、53、54、53及54。

【請求項32】

如請求項1之融合蛋白，其中該ZFP域包含六個鋅指，該些鋅指分別包含以下之序列：SEQ ID NO：55、45、55、45、55及45。

【請求項33】

如請求項1之融合蛋白，其中該ZFP域包含六個鋅指，該些鋅指分別包含以下之序列：SEQ ID NO：77、45、77、45、77及45。

【請求項34】

如請求項1之融合蛋白，其中該ZFP域包含六個鋅指，該些鋅指分別包含以下之序列：SEQ ID NO：33、56、33、56、33及56。

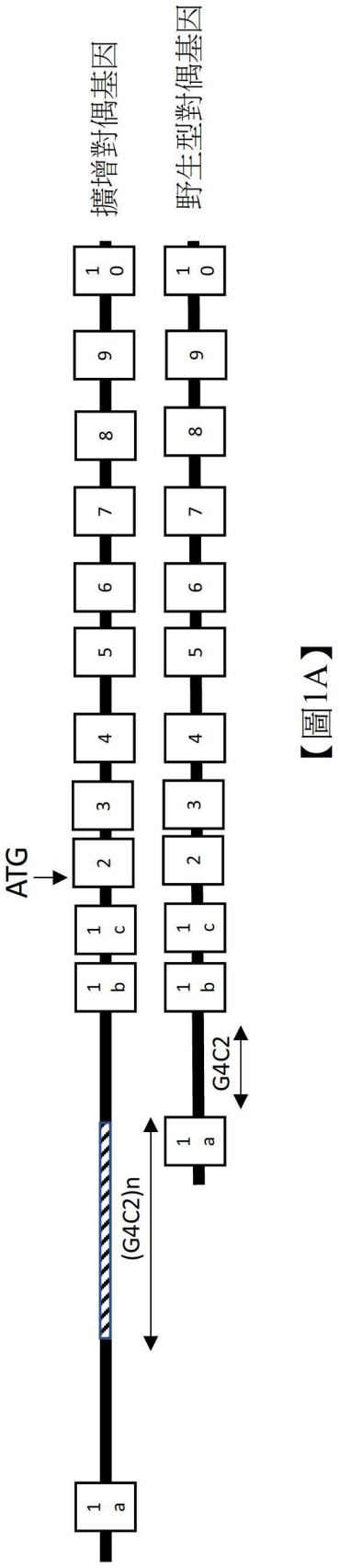
【請求項35】

如請求項1之融合蛋白，其中該ZFP域包含六個鋅指，該些鋅指分別包含以下之序列：SEQ ID NO：57、41、57、41、57及41。

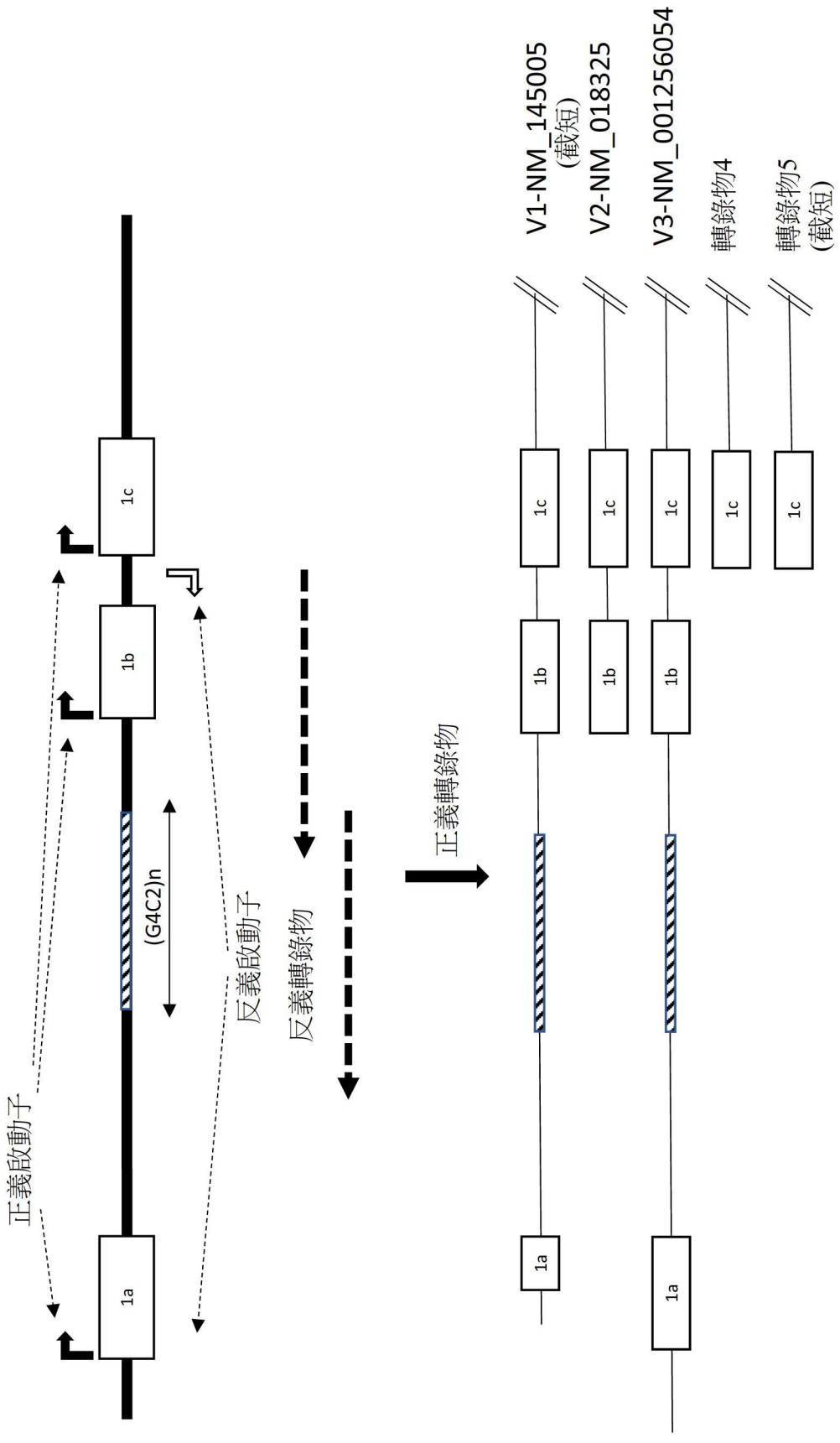
【請求項36】

如請求項1之融合蛋白，其中該ZFP域包含六個鋅指，該些鋅指分別包含以下之序列：SEQ ID NO：46、41、46、41、46及41。

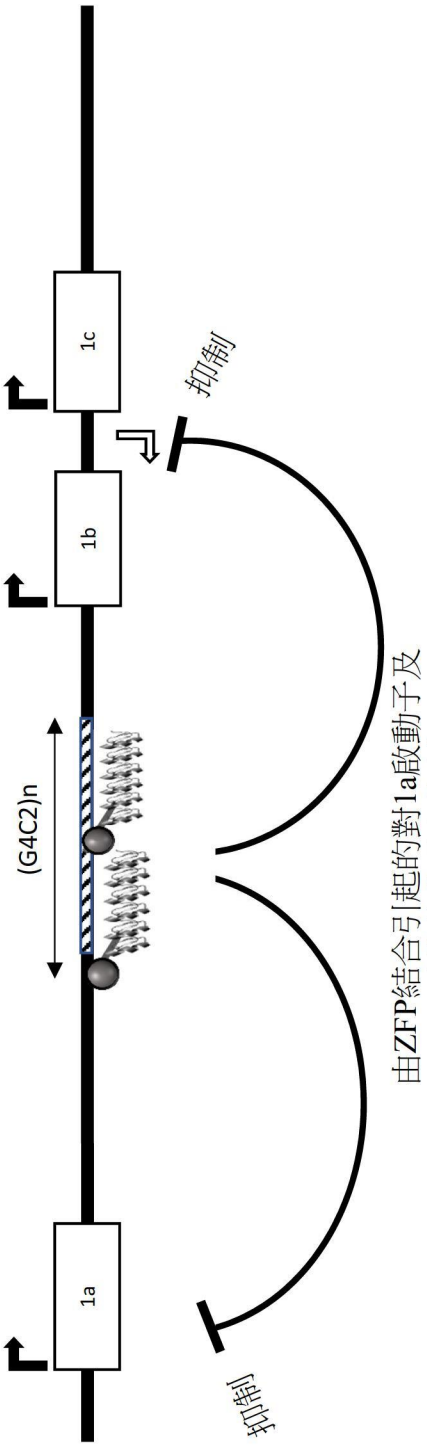
【發明圖式】



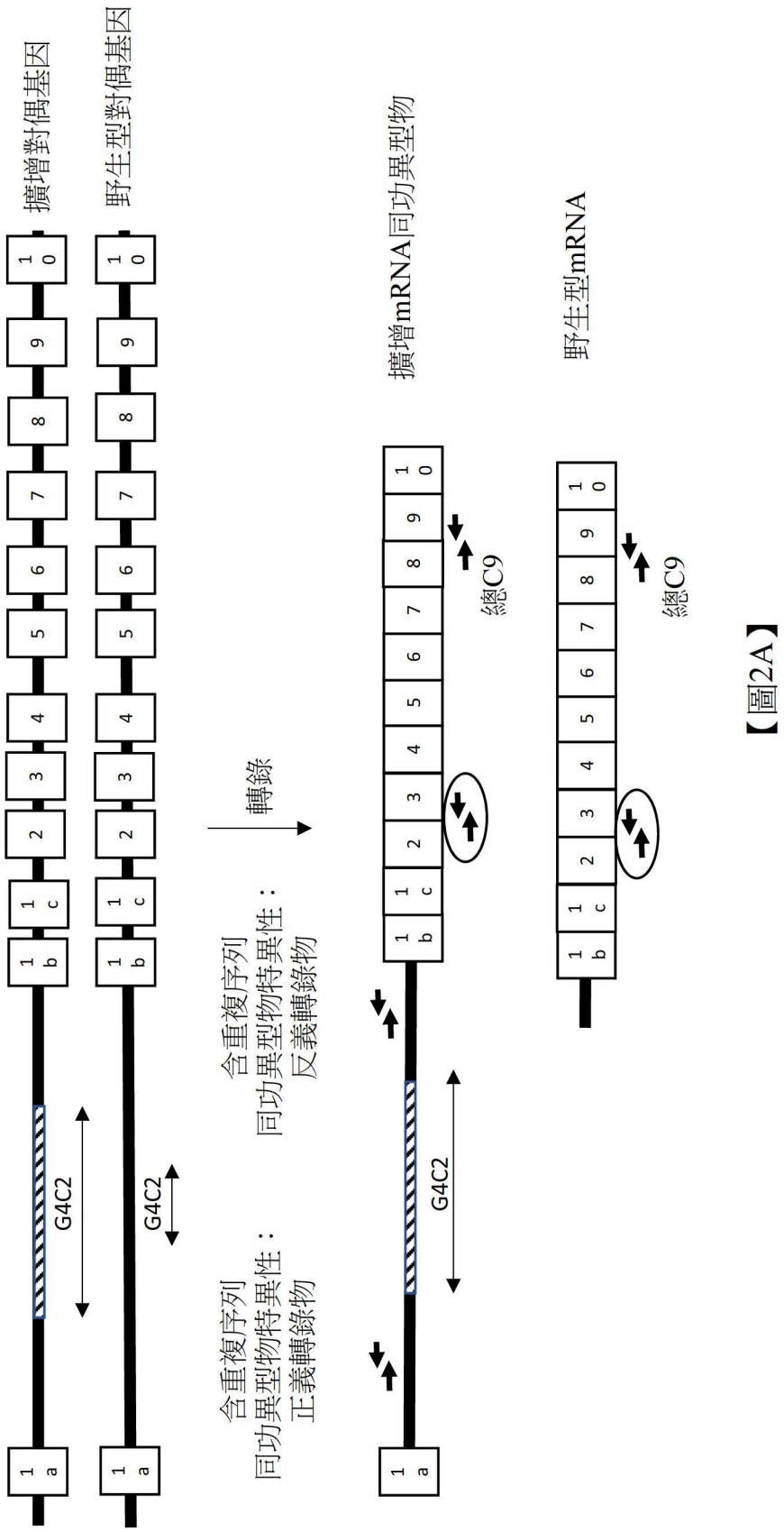
【圖1A】


1c
1b
1a
(G4C2)n
正義啟動子
反義啟動子
反義轉錄物
正義轉錄物
V1-NM_145005
(截短)
V2-NM_018325
V3-NM_001256054
轉錄物4
轉錄物5
(截短)

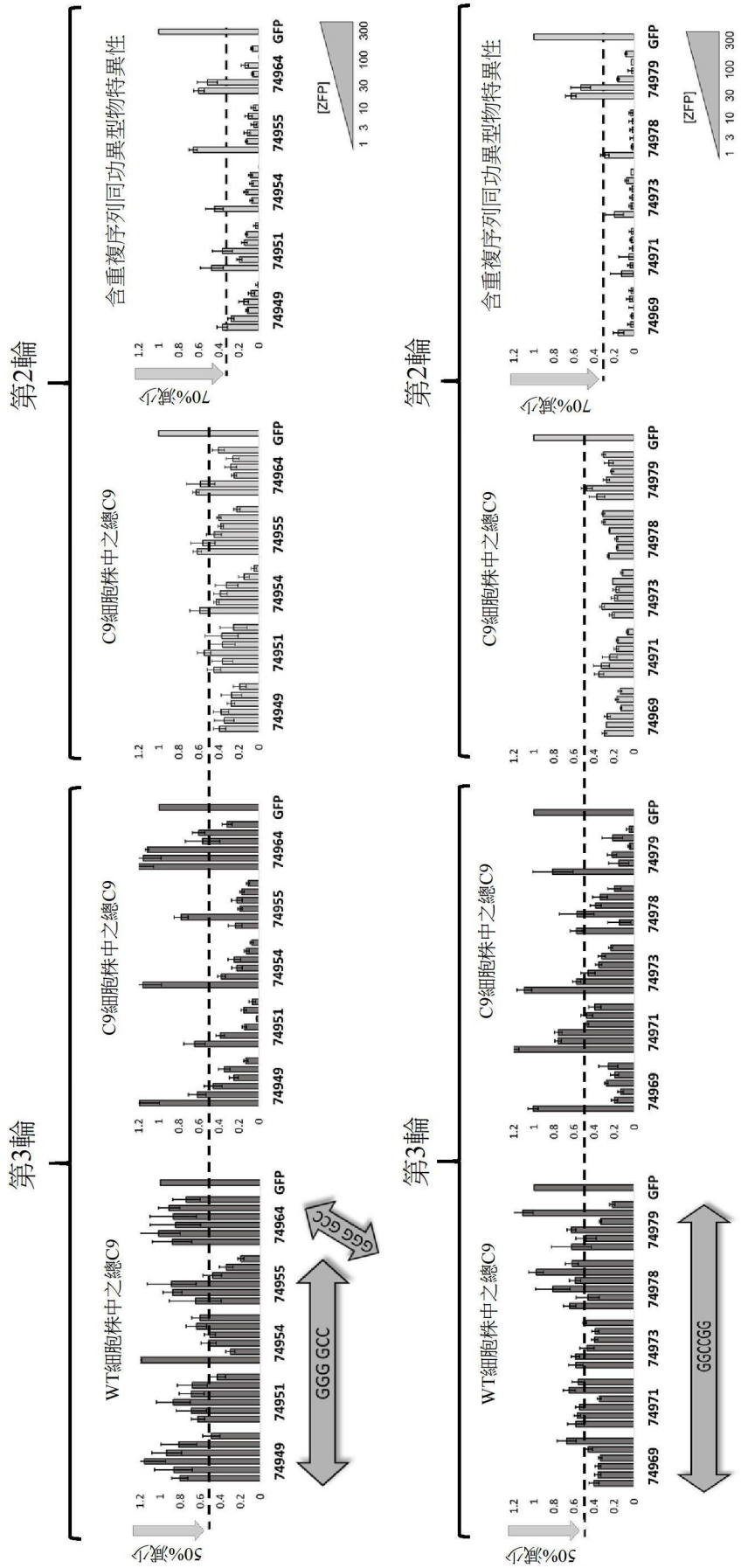
【圖1B】



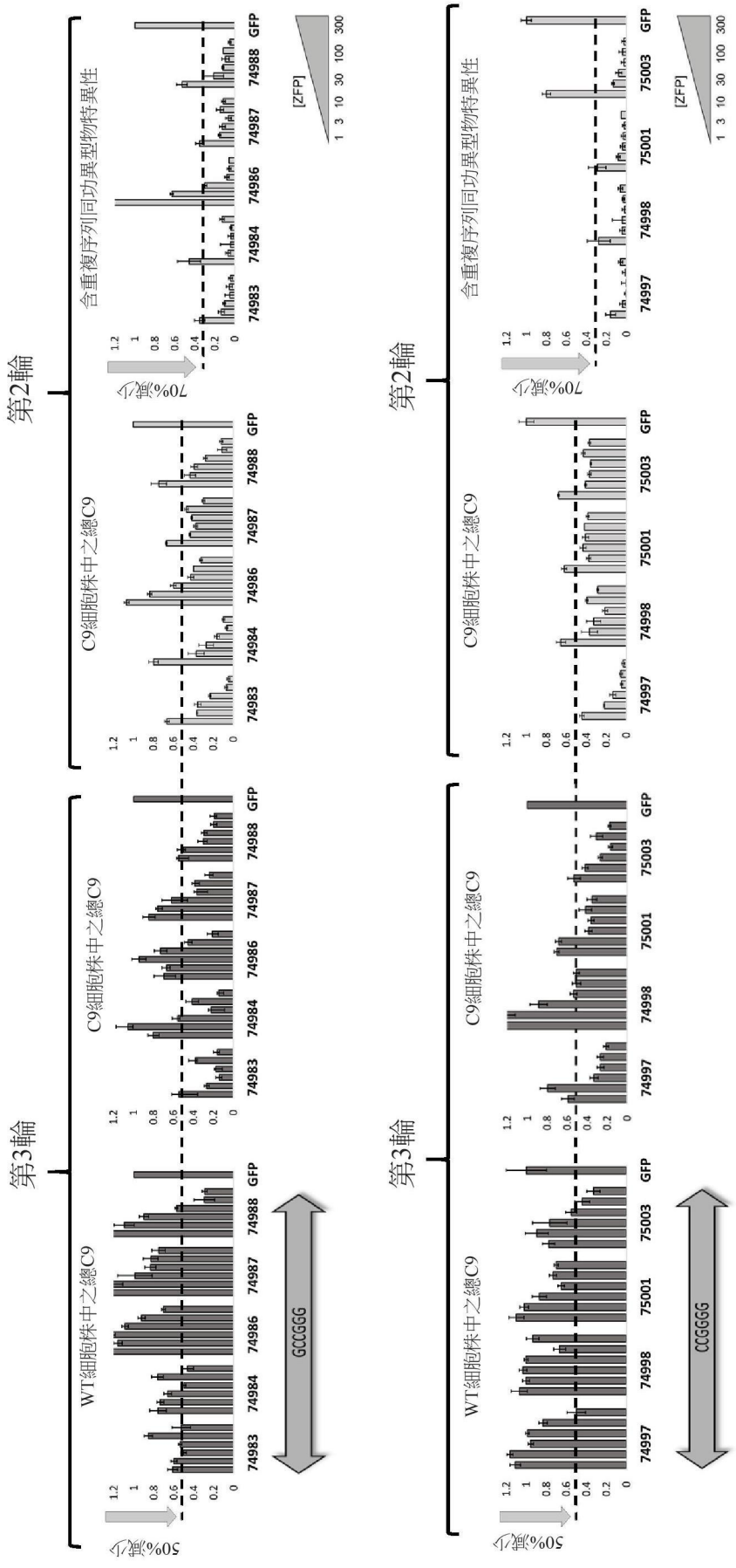
【圖1C】


擴增對偶基因
野生型對偶基因
G4C2
G4C2
含重複序列
同功異型物特異性：
正義轉錄物
含重複序列
同功異型物特異性：
反義轉錄物
轉錄
擴增mRNA同功異型物
野生型mRNA
總C9
總C9

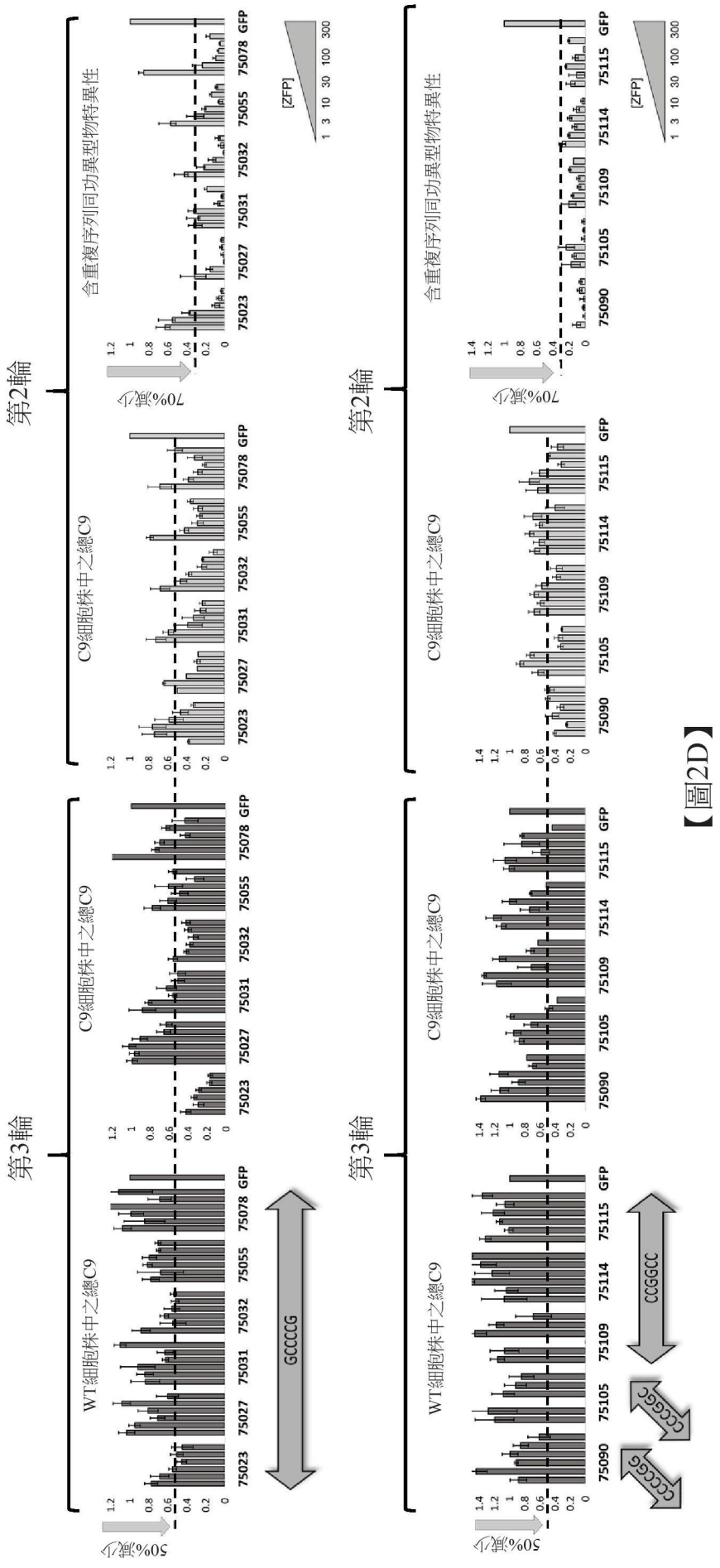
【圖2A】


第2輪
第3輪
含重複序列同功異型物特異性
C9細胞株中之總C9
WT細胞株中之總C9
70%減少
50%減少
[ZFP]
1 3 10 30 100 300
74949 74951 74954 74955 74964 GFP
74969 74971 74973 74978 74979 GFP
GGG GCC
GGCCGG

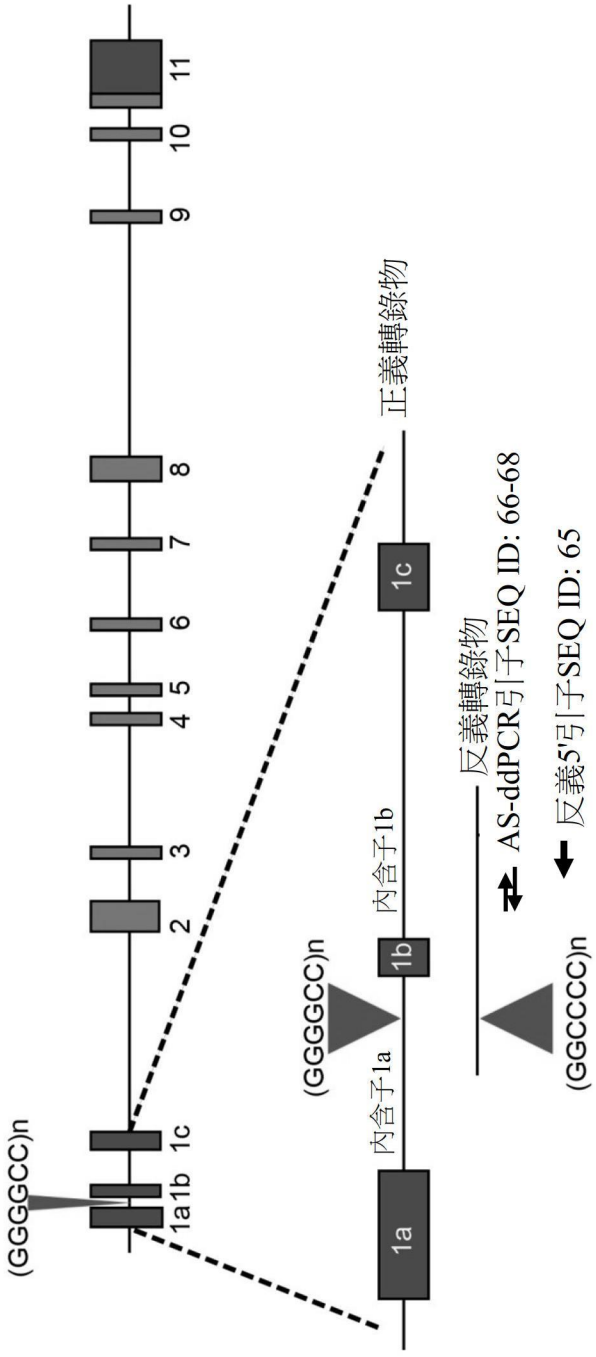
【圖2B】


第2輪
第3輪
含重複序列同功異型物特異性
C9細胞株中之總C9
WT細胞株中之總C9
70%減少
50%減少
[ZFP]
1 3 10 30 100 300
74983 74984 74986 74987 74988 GFP
74997 74998 75001 75003 GFP
GCCGGG
CCGGGG

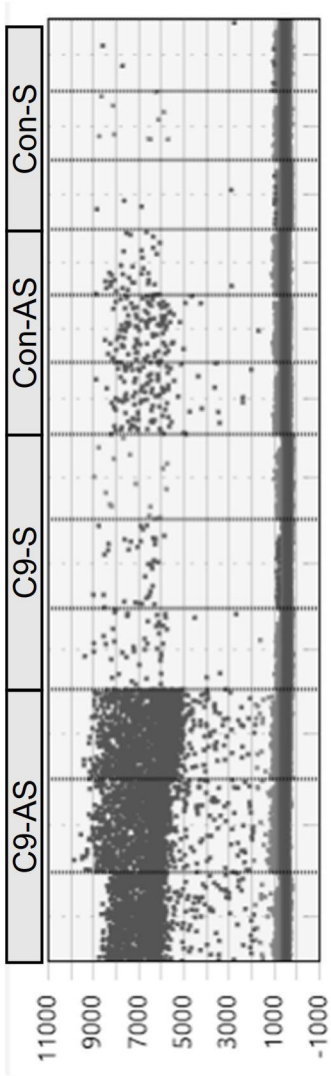
【圖2C】


第2輪
第3輪
C9細胞株中之總C9
WT細胞株中之總C9
含重複序列同功異型物特異性
70%減少
50%減少
[ZFP]
1 3 10 30 100 300
GFP
75023 75027 75031 75032 75055 75078
75090 75105 75109 75114 75115
GCCCCG
CCGGCC
CCCGGG
CCCGGG

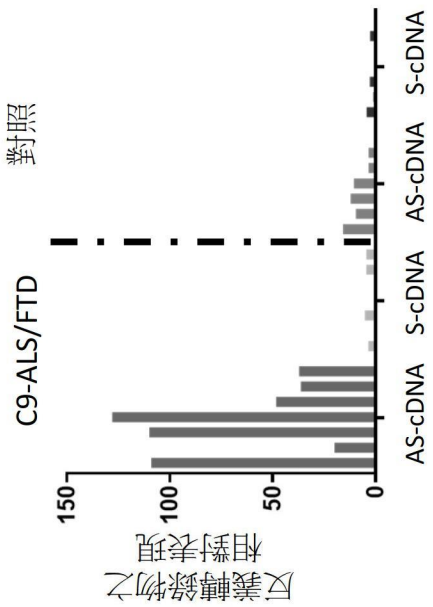
【圖2D】


1a1b 1c
2
3
4 5
6
7
8
9
10
11
(GGGGCC)n
1a
內含子1a
(GGGGCC)n
1b
內含子1b
1c
正義轉錄物
反義轉錄物
AS-ddPCR引子SEQ ID: 66-68
反義5'引子SEQ ID: 65
(GGCCCC)n

【圖3】


C9-AS
C9-S
Con-AS
Con-S
11000
9000
7000
5000
3000
1000
-1000

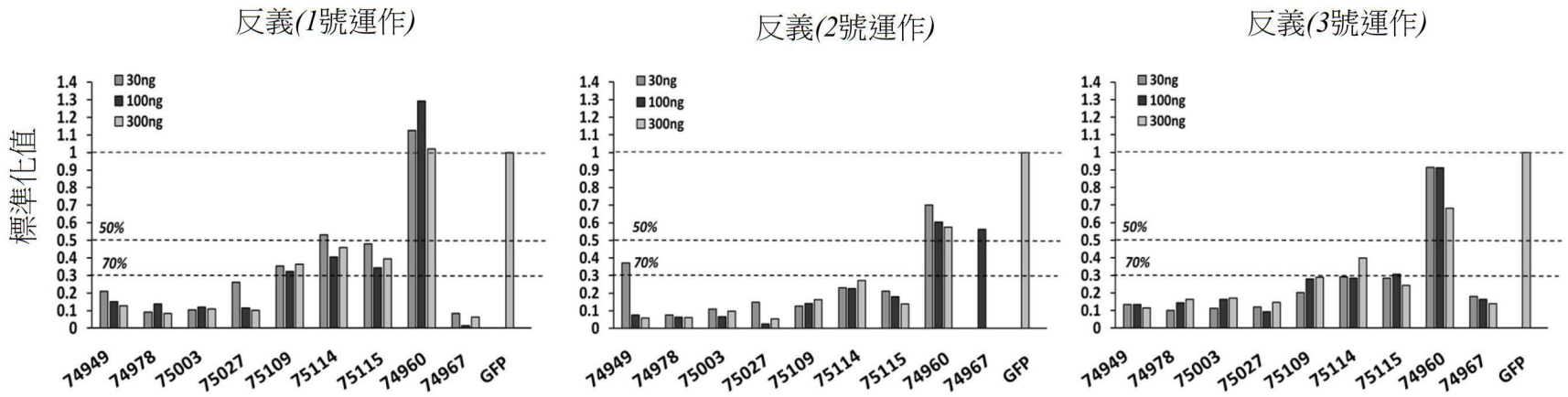
【圖4A】


反義轉錄物之
相對表現
150
100
50
0
C9-ALS/FTD
對照
AS-cDNA
S-cDNA
AS-cDNA
S-cDNA

【圖4B】

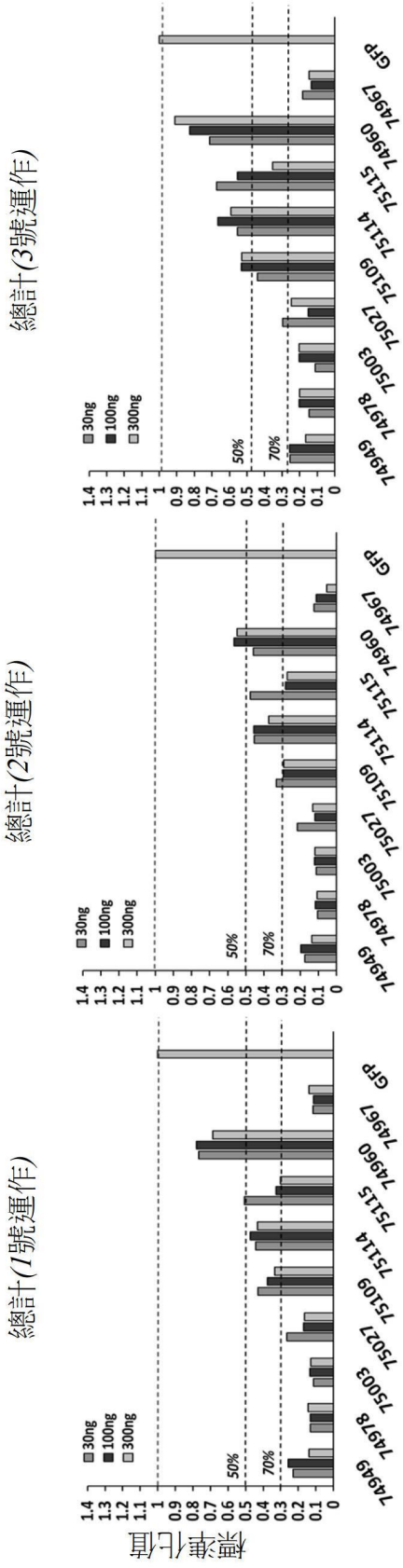
74960：陰性對照-極小抑制
74967：陽性對照-完全抑制
GFP：轉染對照

【圖5A】



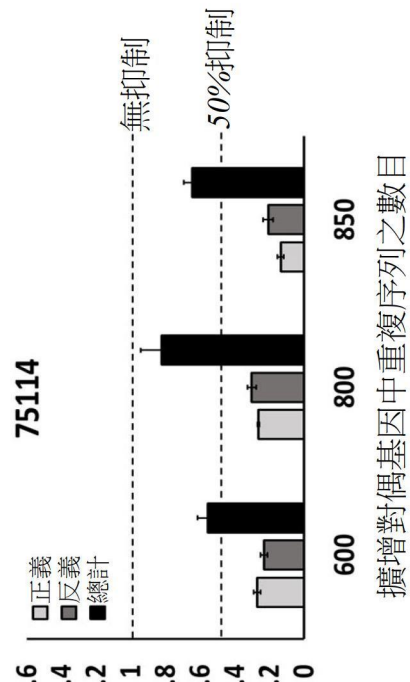
74960：陰性對照-極小抑制
74967：陽性對照-完全抑制
GFP：轉染對照

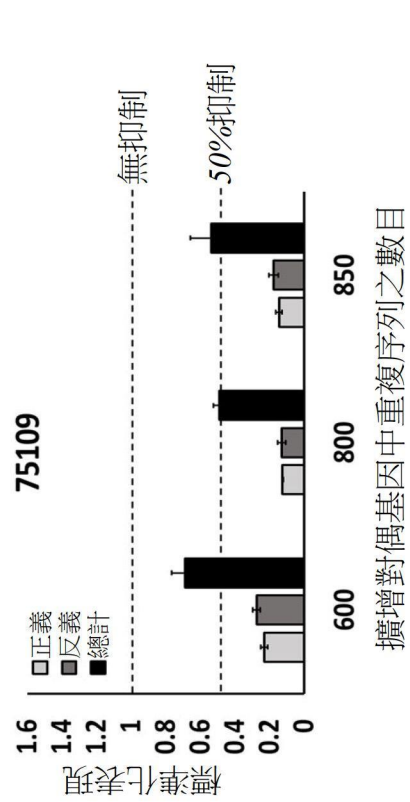
【圖5B】

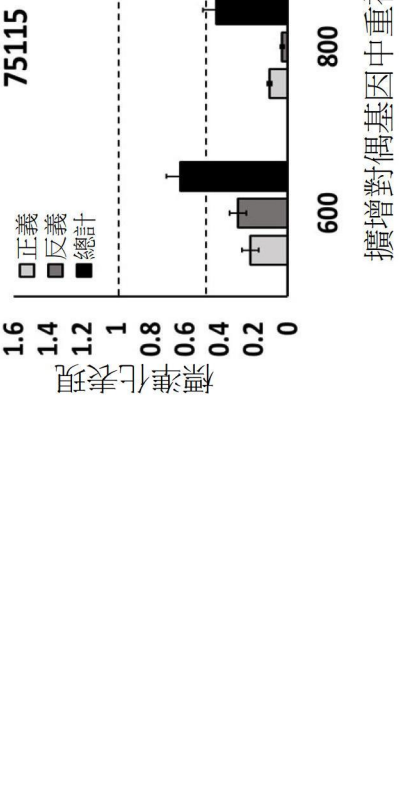


【圖5C】

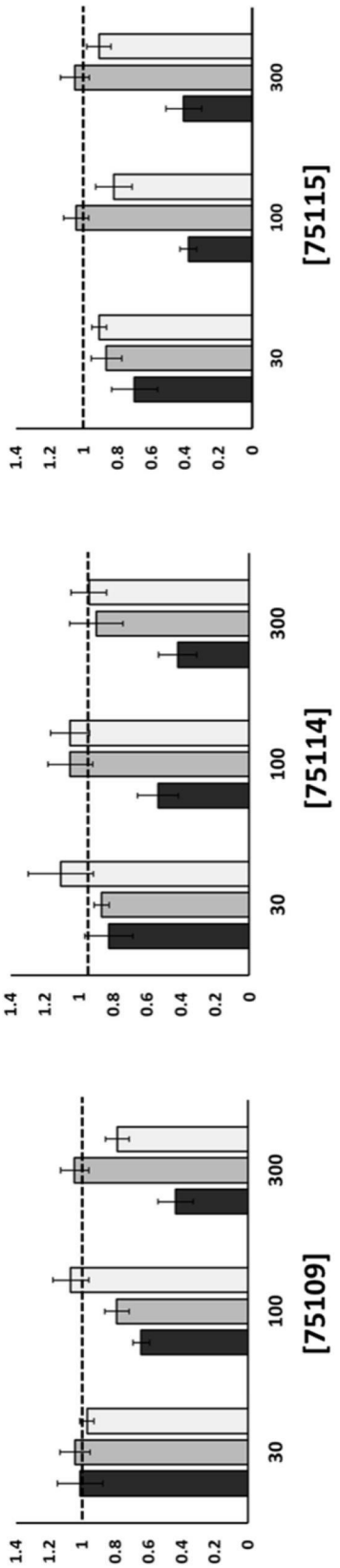
74960：陰性對照-極小抑制
74967：陽性對照-完全抑制
GFP：轉染對照


75114
正義
反義
總計
標準化表現
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
無抑制
50%抑制
600
800
850
擴增對偶基因中重複序列之數目

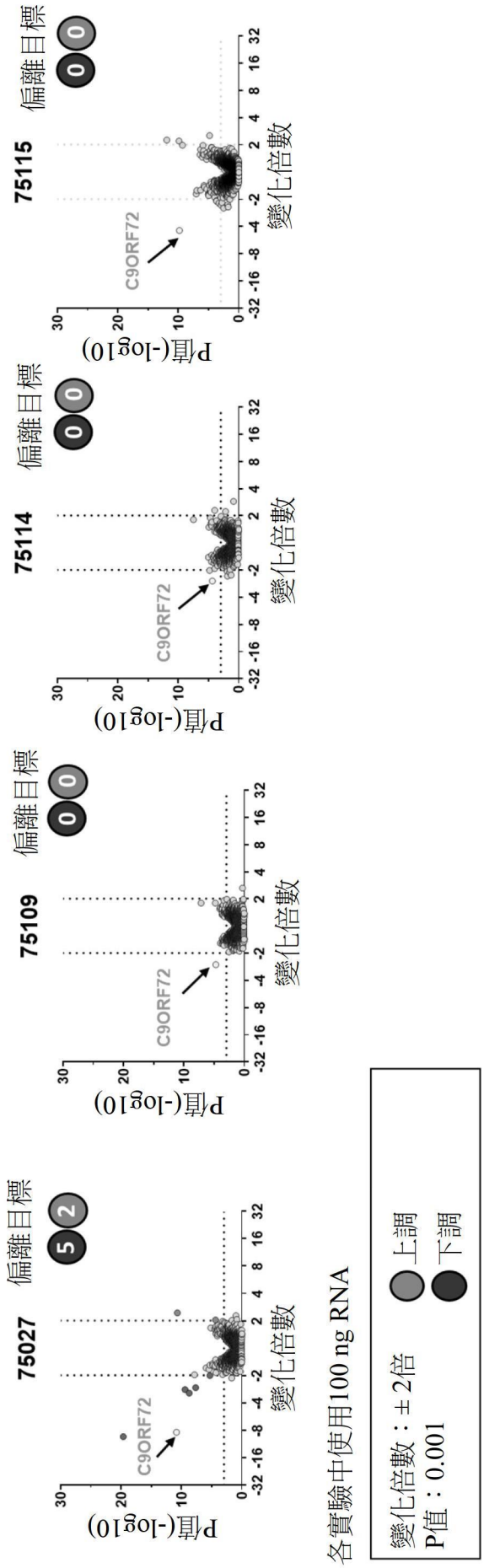

75109
正義
反義
總計
標準化表現
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
無抑制
50%抑制
600
800
850
擴增對偶基因中重複序列之數目


75115
正義
反義
總計
標準化表現
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
無抑制
50%抑制
600
800
850
擴增對偶基因中重複序列之數目

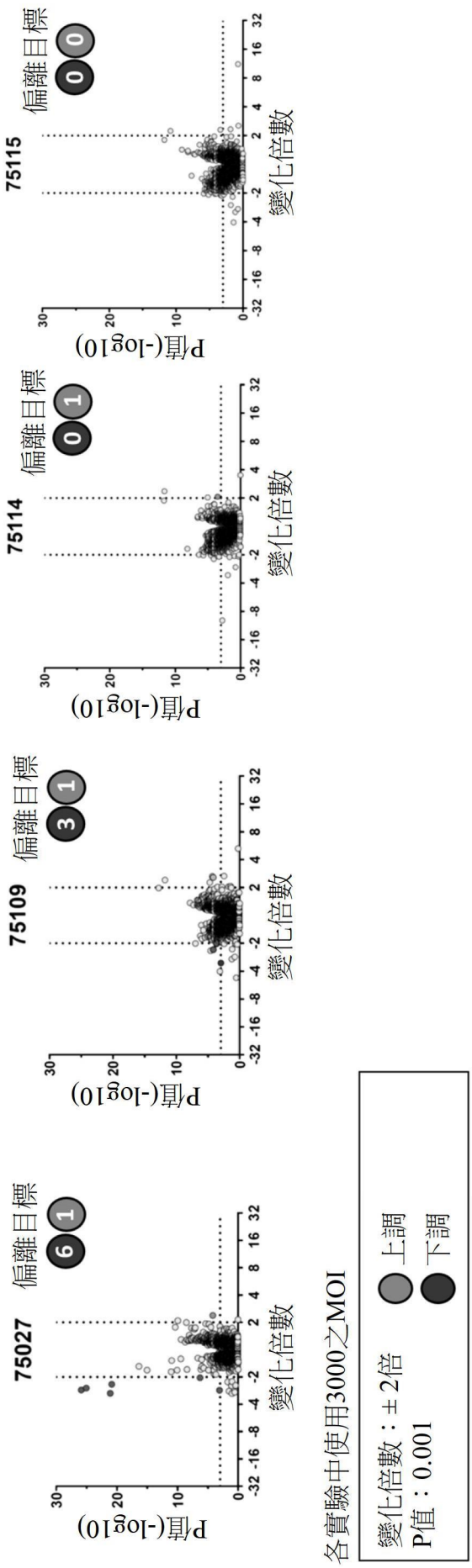
【圖6】


[75109]
[75114]
[75115]
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
30
100
300
細胞株C9021 (5/850個重複序列)
細胞株353TRAD (5/8個重複序列)
細胞株204TDP (2/20個重複序列)

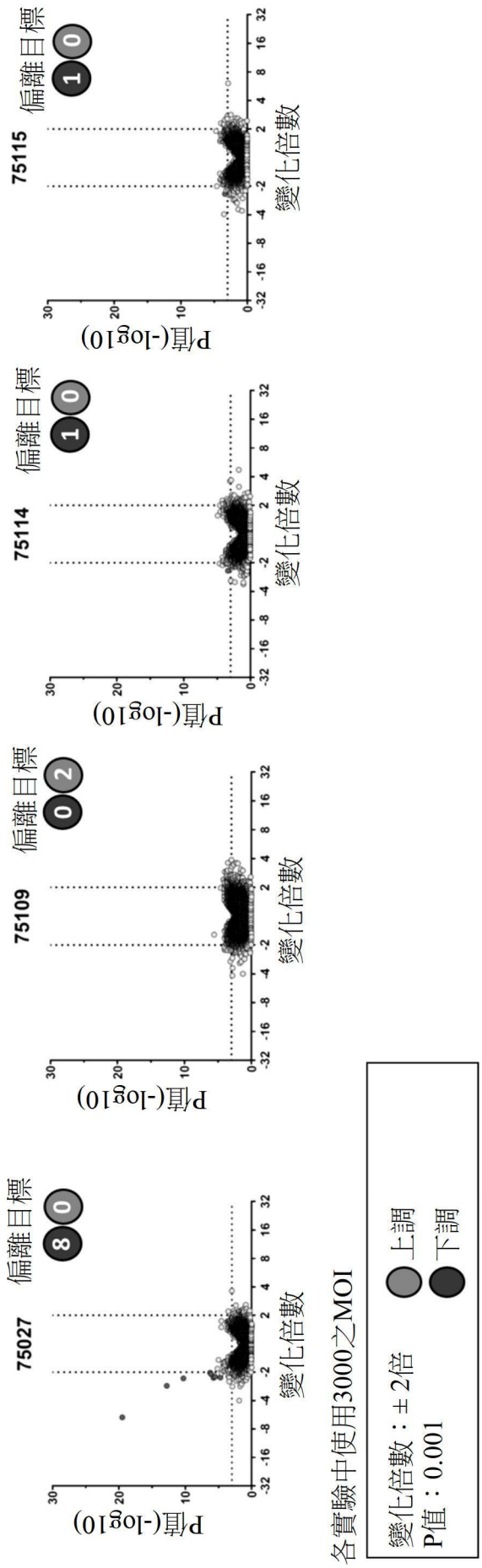
【圖7】


75027
偏離目標
5 2
C9ORF72
P值(-log10)
變化倍數
75109
偏離目標
0 0
C9ORF72
P值(-log10)
變化倍數
75114
偏離目標
0 0
C9ORF72
P值(-log10)
變化倍數
75115
偏離目標
0 0
C9ORF72
P值(-log10)
變化倍數
各實驗中使用100 ng RNA
變化倍數：± 2倍
P值：0.001
上調
下調

【圖8A】


75027
偏離目標
6 1
P值(-log10)
變化倍數
75109
偏離目標
3 1
P值(-log10)
變化倍數
75114
偏離目標
0 1
P值(-log10)
變化倍數
75115
偏離目標
0 0
P值(-log10)
變化倍數
各實驗中使用3000之MOI
變化倍數：±2倍
P值：0.001
上調
下調

【圖8B】


75027
偏離目標
80
P值(-log10)
變化倍數
75109
偏離目標
02
P值(-log10)
變化倍數
75114
偏離目標
10
P值(-log10)
變化倍數
75115
偏離目標
10
P值(-log10)
變化倍數
各實驗中使用3000之MOI
變化倍數：±2倍
P值：0.001
上調
下調

【圖8C】

A)
用於目標接合研究之構築體設計-AAV
ITR
突觸蛋白
ZFP-KRAB
Venus
ITR
B)
P0 ICV注射
1個月
½腦-生物化學
½腦-RNA聚集點
C)
注射
動物數目
PBS
6
75027
3
75114
3
E)
CA區
GFP
75027
40×
陽性面積比率
正義RNA聚集點
反義RNA聚集點
CA
DG
GFP
75027
75114
WT
動物
D)
海馬
皮質
相對於對照標準化的總C9 mRNA表現%
相對於對照標準化的總正義表現%
相對於對照標準化的總反義表現%
對照
75027
75114

【圖9】