

Supplemental Information

AAV5-miHTT Gene Therapy Demonstrates Broad Distribution and Strong Human Mutant Huntingtin Lowering in a Huntington's Disease Minipig Model

Melvin M. Evers, Jana Miniarikova, Stefan Juhas, Astrid Vallès, Bozena Bohuslavova, Jana Juhasova, Helena Kupcova Skalnikova, Petr Vodicka, Ivona Valekova, Cynthia Brouwers, Bas Blits, Jacek Lubelski, Hana Kovarova, Zdenka Ellederova, Sander J. van Deventer, Harald Petry, Jan Motlik, and Pavlina Konstantinova

Supplementary Materials

Table S1. Overview of used tgHD minipigs

Sex (M/F)	Number	Genotype	Date of birth	Date of sacrifice	Age	treatment
M	L 308	TG	29.12.2012	27.6.2016	42 months	1x10 ¹³ gc AAV5-GFP
M	L 309	TG	29.12.2012	28.6.2016	42 months	1x10 ¹³ gc AAV5-GFP
M	L 378	TG	20.2.2013	28.6.2016	40 months	3x10 ¹³ gc AAV5-miHTT
M	L 457	TG	26.5.2013	29.6.2016	37 months	3x10 ¹³ gc AAV5-miHTT
M	L 484	TG	14.6.2013	29.6.2016	36 months	3x10 ¹³ gc AAV5-miHTT
M	L 491	TG	7.6.2013	7.7.2016	37 months	1x10 ¹³ gc AAV5-miHTT
M	L 616	TG	13.11.2013	7.7.2016	32 months	1x10 ¹³ gc AAV5-miHTT
M	N 71	TG	23.4.2014	16.4.2016	24 months	1x10 ¹³ gc AAV5-miHTT
F	N 72	TG	23.4.2014	27.6.2016	26 months	1x10 ¹³ gc AAV5-GFP
M	N 173	TG	13.8.2014	8.7.2016	23 months	Formulation buffer
M	N 175	TG	13.8.2014	8.7.2016	23 months	Formulation buffer
M	N 176	TG	13.8.2014	11.6.2016	22 months	Formulation buffer

Table S2. Hematology of individual tgHD minipigs

	Parameter	Formulation buffer			1×10 ¹³ gc AAV5-miHTT			3×10 ¹³ gc AAV5-miHTT			metric	Normal
DAY 0	WBC	10,04	7,69	9,1	7,35	5,65	5,74	9,19	10,27	7,04	10 ³ /μl	(7/22.0)
	RBC	5,44	6,57	5,23	6,64	5,05	6,05	5,63	5,7	5,4	10 ⁶ /μl	(5/8)
	HGB	11,9	13,6	11,6	13,4	11,9	13,4	11,4	12,4	10,9	g/dl	(9.0/16.0)
	HCT	33,8	39,2	33,5	39,2	33,4	39,2	34,4	35,3	31,3	%	(26.0/50.0)
	MCV	62	59,7	64,1	59	66,2	64,9	61,1	62	57,9	μm3	(42/68)
	MCH	21,9	20,7	22,3	20,2	23,5	22,1	20,2	21,8	20,1	pg	(14/23)
	MCHC	35,2	34,7	34,7	34,2	35,5	34,1	33	35,1	34,7	g/dl	(30/36)
	PLT	393	449	423	381	173	483	404	337	324	10 ³ /μl	(100/720)
	LYMPH	45,9	42,4	48,2	39,2	40,4	55,5	39,3	42,3	40,3	%	35,5-62
	MONO	4,1	5,1	4,1	5,5	4,7	2,7	2,9	5	2,2	%	1,6-8,8
	EOS	0,2	1,1	0,5	0,5	4,1	0,3	0,2	0,3	0,4	%	0,1-5,6
	BASO	0,9	0,9	0,4	0,6	0,8	0,4	0,2	0,6	0,2	%	0,-2,7
	NEUT	48,4	49,6	45,9	53,5	48,9	40,9	56,4	50,8	56,2	%	26,6-56,7
DAY 7	WBC	9,84	12,22	9,38	6,86	7,36		7,62	13,39	7,35	10 ³ /μl	(7/22.0)
	RBC	5,5	4,85	5,43	5,45	5,74		5	5,42	4,51	10 ⁶ /μl	(5/8)
	HGB	12,1	10	11,9	10,9	14,1		10,5	12	9,2	g/dl	(9.0/16.0)
	HCT	34,9	28,8	35,3	31,8	38,5		30,9	34,1	26,6	%	(26.0/50.0)
	MCV	63,4	59,5	64,9	58,4	67		61,8	62,8	59	μm3	(42/68)
	MCH	21,9	20,6	22	20,1	24,6		20,9	22,2	20,5	pg	(14/23)
	MCHC	34,6	34,6	33,9	34,4	36,8		33,8	35,3	34,7	g/dl	(30/36)
	PLT	482	570	371	530	204		414	459	461	10 ³ /μl	(100/720)
	LYMPH	45,2	39,3	46,8	48	28,6		35,4	28,7	35,8	%	35,5-62
	MONO	3,3	4,2	3,6	5,9	7,3		3,4	4,7	2,7	%	1,6-8,8
	EOS	1,2	1,9	1,6	0,7	0,27		0,3	0,6	1,6	%	0,1-5,6
	BASO	1,1	0,3	0,6	0,5	1,2		0,2	0,6	0,2	%	0,-2,7
	NEUT	48,2	53,7	46,4	44,5	58,3		59,6	64,6	58,9	%	26,6-56,7
DAY 14	WBC	8,87	8,43	8,99	7,93	5,98		7,53	16,59	6,08	10 ³ /μl	(7/22.0)
	RBC	5,53	6,76	5,51	6,19	4,47		5,58	5,48	4,44	10 ⁶ /μl	(5/8)
	HGB	11,8	13,9	12	12,3	10,1		11,4	12	8,9	g/dl	(9.0/16.0)
	HCT	35,1	41	35,6	37,4	30		35,2	34,8	26,1	%	(26.0/50.0)
	MCV	63,5	60,6	64,7	60,4	67,1		63,2	63,6	58,8	μm3	(42/68)
	MCH	21,4	20,5	21,9	19,9	22,7		20,5	21,9	20,1	pg	(14/23)
	MCHC	33,7	33,9	33,8	32,9	33,9		32,5	34,4	34,1	g/dl	(30/36)
	PLT	430	577	309	557	524		366	509	487	10 ³ /μl	(100/720)
	LYMPH	37,4	53,4	52,7	48,3	48,5		44,5	28,3	44,5	%	35,5-62
	MONO	5,6	5,2	4,2	3,8	6		2,4	6,2	2,4	%	1,6-8,8
	EOS	0,4	1,1	0,5	1,1	2,4		0,4	0,1	0,3	%	0,1-5,6
	BASO	1,4	1,1	0,7	0,6	1		0,5	0,8	0,2	%	0,-2,7
	NEUT	54,5	38,6	41	46	41		51,4	63,7	51,8	%	26,6-56,7
DAY 28	WBC	9,3	7,66	9,62	8,91	7,02		9,23	16,06	6,32	10 ³ /μl	(7/22.0)
	RBC	5,56	7,38	4,76	5,96	5,03		5,68	5,4	5,85	10 ⁶ /μl	(5/8)
	HGB	11,8	14,7	10,3	11,7	11,6		11,5	11,8	11,4	g/dl	(9.0/16.0)
	HCT	35,2	45,7	30,2	35,4	33,4		35,6	33,8	34,8	%	(26.0/50.0)
	MCV	63,3	61,9	63,5	59,3	66,4		62,7	62,6	59,5	μm3	(42/68)
	MCH	21,2	19,9	21,6	19,7	23,1		20,2	21,9	19,5	pg	(14/23)
	MCHC	33,5	32,1	34	33,2	34,8		32,1	35	32,8	g/dl	(30/36)
	PLT	436	405	464	483	444		163	433	282	10 ³ /μl	(100/720)
	LYMPH	54,7	61,3	54	41	49,3		32,7	33	45,6	%	35,5-62
	MONO	3,6	4	3,8	4,1	5,7		3,6	5,4	2,2	%	1,6-8,8
	EOS	0,4	1,1	0,8	0,6	0,6		1	0,3	0,3	%	0,1-5,6
	BASO	0,8	1,2	0,6	0,6	0,9		0,5	1	0,1	%	0,-2,7
	NEUT	39,9	32,1	40,3	53,3	42,2		61,6	59,5	51	%	26,6-56,7
DAY 56	WBC	9,85	9,13	10,4	9,05	6		8,97	14,45	5,76	10 ³ /μl	(7/22.0)
	RBC	4,88	6,27	7,28	5,01	4,78		5,14	6,17	5,16	10 ⁶ /μl	(5/8)
	HGB	10,4	12,7	15,7	9,9	10,8		10,5	13	10,3	g/dl	(9.0/16.0)
	HCT	30,8	36,7	48,1	29,5	31,3		32	38,1	30,6	%	(26.0/50.0)
	MCV	63	58,5	66,1	58,9	65,5		62,3	61,7	59,4	μm3	(42/68)
	MCH	21,3	20,3	21,6	19,8	22,5		20,4	21	19,9	pg	(14/23)
	MCHC	33,7	34,7	32,7	33,7	34,4		32,8	34	33,6	g/dl	(30/36)
	PLT	415	443	284	561	27		327	338	233	10 ³ /μl	(100/720)
	LYMPH	48	51,1	79,3	44,8	59,1		45,2	31,8	48,2	%	35,5-62
	MONO	3,2	3,9	2,1	3,9	3,1		3	3,5	3,8	%	1,6-8,8
	EOS	1,6	0,2	0,1	0,6	2,4		1,1	0,2	0,6	%	0,1-5,6
	BASO	0,5	0,4	1,1	0,4	1,1		0,3	0,5	0,3	%	0,-2,7
	NEUT	46,3	44,2	17,2	49,8	32,7		49,8	63,7	46,8	%	26,6-56,7

WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; HGB, hemoglobin; HCT, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin

concentration; PLT, platelets; LYMPH, lymphocytes; MONO, monocytes; EOS, eosinophils; BASO, basophils; NEUT, neutrophils.

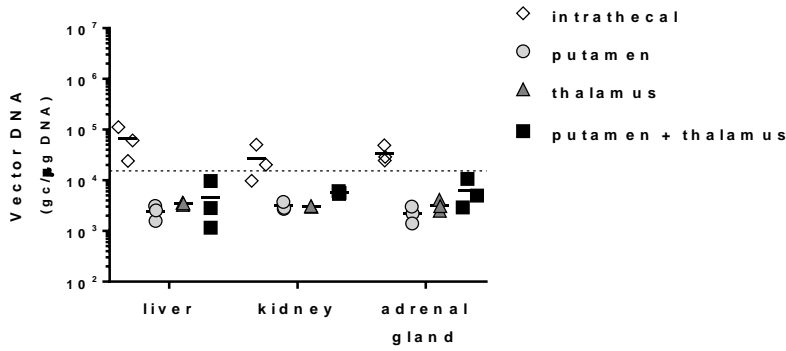


Fig. S1. AAV5-GFP vector DNA copies peripheral tissues after intrathecal and intracranial delivery. Tested organs: liver, kidney, and adrenal glands. Dotted lines represent the lower limit of quantification.

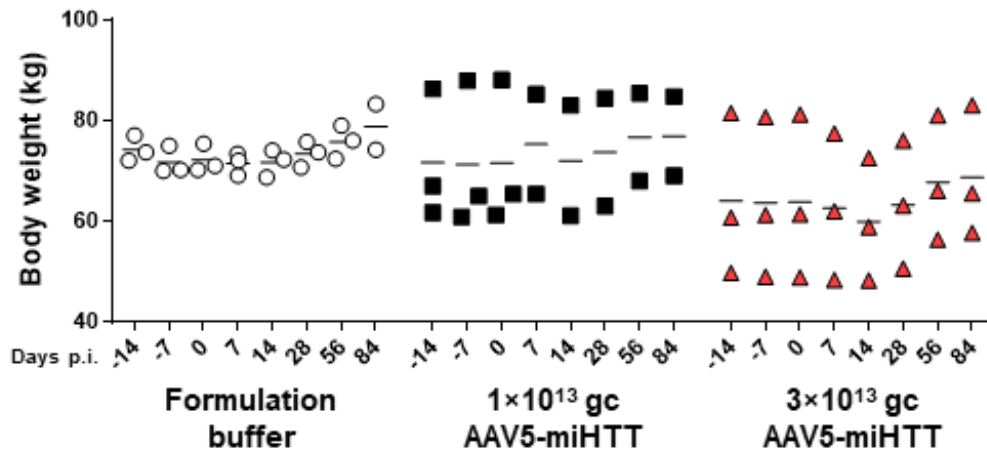


Fig. S2. Longitudinal body weight of tgHD minipigs.

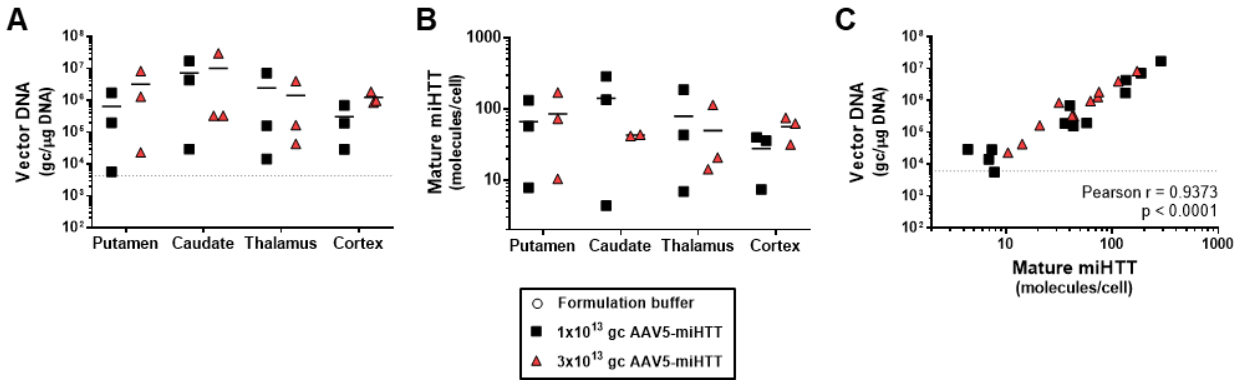


Fig. S3. AAV5-miHTT distribution and miHTT expression three months after putaminal and thalamic injection in healthy minipig brain: putamen, caudate nucleus, thalamus and cortex. One punch was taken per hemisphere per brain structure. **(A)** Vector DNA copies (gc/μg DNA) per brain punch. **(B)** Mature miHTT expression, values are represented as molecules per cell. **(C)** Correlation analysis graph plotting vector DNA and miHTT expression from matching brain region. Data from dissected regions from AAV5-miHTT treated animals were evaluated with non-linear regression log-log line with ordinary fit and Pearson correlation. Formulation buffer samples were excluded from the correlation and fit. Dotted lines represent lower limit of quantification.

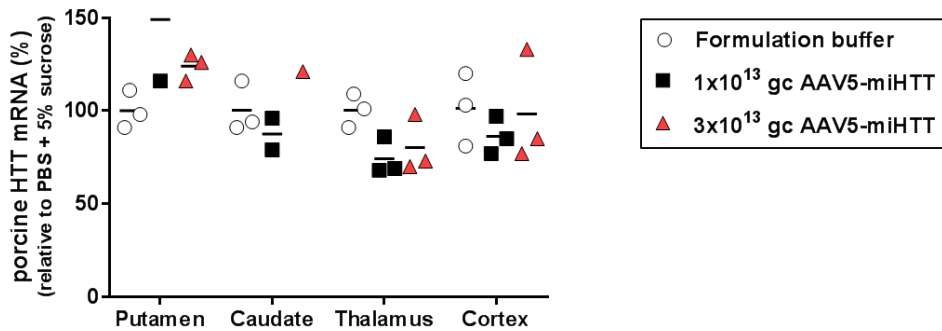


Fig. S4. Porcine HTT mRNA expression in the tgHD minipig brain: putamen, caudate nucleus, thalamus and cortex. Expression levels normalized to porcine GAPDH and relative to average of formulation buffer treated samples. No significant differences were found between the groups in any of the brain regions studied (one-way ANOVA).

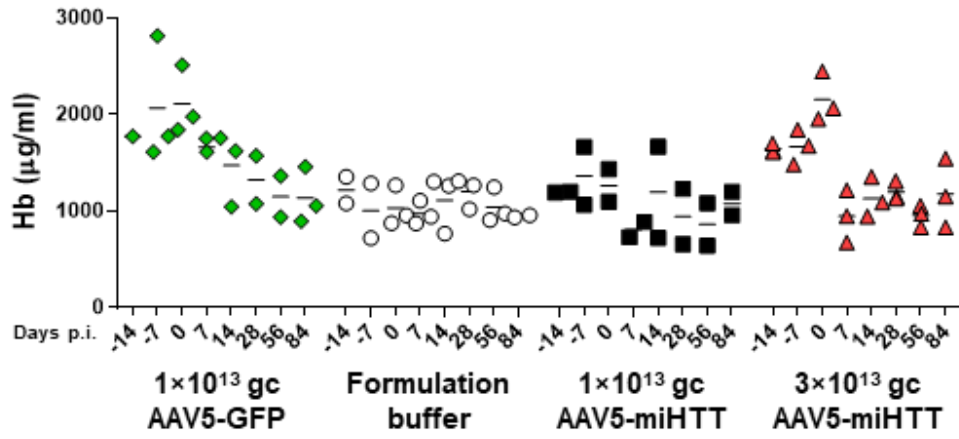


Fig. S5. ELISA of longitudinal hemoglobin (Hb) levels in tgHD minipig CSF samples.