(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116034161 A
(43)申请公布日 2023.04.28

(21)申请号 202180040347.7

(22)申请日 2021.03.25

(30)优先权数据
62/994,797 2020.03.25 US
63/063,174 2020.08.07 US
63/133,749 2021.01.04 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.11.24

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/024254 2021.03.25

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/195446 EN 2021.09.30

(71)申请人 哈佛学院校长同事会
地址 美国马萨诸塞州
申请人 麻省大学

(72)发明人 凯文·C·埃根
约瑟夫·罗伯特·克里姆
小罗伯特·H·布朗
乔纳森·K·瓦特斯

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司 11219
专利代理师 金海霞 刘慧

(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2006.01)
C12N 5/079(2006.01)
C07K 14/47(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)

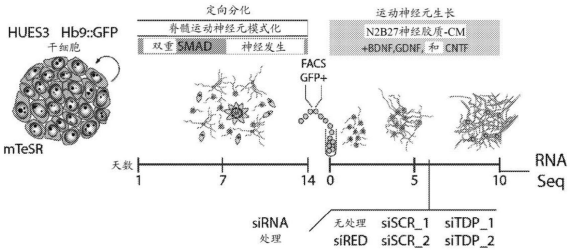
权利要求书6页 说明书56页 附图192页

(54)发明名称

用于恢复STMN2水平的方法和组合物

(57)摘要

本公开涉及用于治疗受试者的与神经元细胞中的TDP病理或TDP-43功能下降相关的疾病或疾患、以及用于鉴别阻抑或防止纳入无效或改变的STMN2RNA序列的候选剂的组合物和方法。



CN 116034161 A

1.一种特异性结合STMN2 mRNA、前mRNA或初生RNA序列的反义寡核苷酸，其中所述反义寡核苷酸增加STMN2蛋白表达。

2.一种反义寡核苷酸，所述反义寡核苷酸特异性结合STMN2mRNA、前mRNA或初生RNA序列，由此阻抑或防止纳入无效或改变的STMN2 RNA序列，其中所述反义寡核苷酸不与所述STMN2 RNA序列的多腺苷酸化位点结合。

3.如权利要求1所述的反义寡核苷酸，其中当TDP-43功能下降或TDP病理发生时，出现所述无效或改变的STMN2 RNA序列且丰度增加。

4.一种反义寡核苷酸，所述反义寡核苷酸特异性结合编码隐性外显子的STMN2 mRNA、前mRNA或初生RNA序列，由此阻抑或防止在STMN2 RNA中纳入隐性外显子，其中所述反义寡核苷酸不与所述STMN2 mRNA、前mRNA或初生RNA序列的多腺苷酸化位点结合。

5.如权利要求1至4中任一项所述的反义寡核苷酸，其中所述反义寡核苷酸经设计以靶向5'剪接位点、3'剪接位点或正常TDP-43结合位点。

6.如权利要求1至4中任一项所述的反义寡核苷酸，其中所述反义寡核苷酸经设计以靶向单股区域。

7.如权利要求6所述的反义寡核苷酸，其中所述反义寡核苷酸经设计以靶向位于所述TDP-43结合位点与所述多腺苷酸化位点之间的单股区域。

8.如权利要求1至7中任一项所述的反义寡核苷酸，其中所述反义寡核苷酸靶向一个或多个剪接位点。

9.一种反义寡核苷酸，所述反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-85组成的组的序列。

10.如权利要求9所述的反义寡核苷酸，其中所述反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-74组成的组的序列。

11.如权利要求9所述的反义寡核苷酸，其中所述反义寡核苷酸包含选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ IDNO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:78。

12.如权利要求9所述的反义寡核苷酸，其中所述反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:52。

13.如权利要求9所述的反义寡核苷酸，其中所述反义寡核苷酸包含选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:73。

14.如权利要求9所述的反义寡核苷酸，其中所述反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:73。

15.如权利要求9所述的反义寡核苷酸，其中所述反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:53。

16.如权利要求9所述的反义寡核苷酸，其中所述反义寡核苷酸阻抑或防止在STMN2 RNA中纳入隐性外显子。

17.如权利要求9所述的反义寡核苷酸，其中所述反义寡核苷酸特异性结合编码隐性外显子的STMN2 RNA、前mRNA或初生RNA序列。

18.如权利要求9所述的反义寡核苷酸，其中所述反义寡核苷酸增加STMN2蛋白。

19.如权利要求9所述的反义寡核苷酸，其中所述反义寡核苷酸经设计以靶向5'剪接位点、3'剪接位点或正常TDP-43结合位点。

20.如权利要求9所述的反义寡核苷酸，其中所述反义寡核苷酸经设计以靶向靠近隐性剪接位点的位点、靠近早熟多腺苷酸化位点的位点、或位于隐性剪接位点与早熟多腺苷酸

化位点之间的位点。

21.如权利要求9所述的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸经设计以靶向单股区域。

22.如权利要求9所述的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸经设计以靶向位于所述TDP-43结合位点与所述多腺苷酸化位点之间的单股区域。

23.如权利要求9所述的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸结合到所述隐性外显子内未结构化的靶区域。

24.如权利要求9所述的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸接近或邻近由TDP-43调控的所述5'剪接位点结合。

25.如权利要求9所述的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸靶向靠近预测的TDP-43结合位点的区域。

26.如权利要求9所述的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸靶向所述TDP-43正常结合位点。

27.一种药物组合物,所述药物组合物包含一种或多种反义寡核苷酸,所述一种或多种反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-85组成的组的序列。

28.如权利要求27所述的药物组合物,其中所述一种或多种反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-74组成的组的序列。

29.如权利要求27所述的药物组合物,其中所述一种或多种反义寡核苷酸包含选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:78。

30.如权利要求27所述的药物组合物,其中所述一种或多种反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:52。

31.如权利要求27所述的药物组合物,其中所述一种或多种反义寡核苷酸包含选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:73。

32.如权利要求27所述的药物组合物,其中所述一种或多种反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:73。

33.如权利要求27所述的药物组合物,其中所述一种或多种反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:53。

34.如权利要求27所述的药物组合物,其中所述组合物包含两种或多种反义寡核苷酸。

35.如权利要求27所述的药物组合物,其中所述两种或多种反义寡核苷酸是共价连接的。

36.如权利要求27所述的药物组合物,其中所述组合物包含三种或多种反义寡核苷酸。

37.如权利要求27所述的药物组合物,其中所述一种或多种反义寡核苷酸增加STMN2蛋白表达。

38.如权利要求27所述的药物组合物,其中所述一种或多种反义寡核苷酸经设计以靶向5'剪接位点、3'剪接位点或正常TDP-43结合位点。

39.如权利要求27所述的药物组合物,其中所述一种或多种反义寡核苷酸经设计以靶向靠近隐性剪接位点的位点、靠近早熟多腺苷酸化位点的位点、或位于隐性剪接位点与早熟多腺苷酸化位点之间的位点。

40.如权利要求27所述的药物组合物,其中所述一种或多种反义寡核苷酸经设计以靶向单股区域。

41.如权利要求27所述的药物组合物,其中所述一种或多种反义寡核苷酸经设计以靶向位于所述TDP-43结合位点与所述多腺苷酸化位点之间的单股区域。

42.如权利要求27所述的药物组合物,其中所述一种或多种反义寡核苷酸结合到所述隐性外显子内未结构化的靶区域。

43.如权利要求27所述的药物组合物,其中所述一种或多种反义寡核苷酸接近或邻近由TDP-43调控的所述5'剪接位点结合。

44.如权利要求27所述的药物组合物,其中所述一种或多种反义寡核苷酸靶向靠近预测的TDP-43结合位点的区域。

45.如权利要求27所述的药物组合物,其中所述反义寡核苷酸靶向所述TDP-43正常结合位点。

46.如权利要求27所述的药物组合物,其中所述一种或多种反义寡核苷酸靶向一个或多个剪接位点。

47.如权利要求27所述的药物组合物,其中所述一种或多种反义寡核苷酸特异性结合STMN2 mRNA、前mRNA或初生RNA序列,由此阻抑或防止纳入无效或改变的STMN2 RNA序列。

48.如权利要求27所述的药物组合物,其中所述一种或多种反义寡核苷酸特异性结合编码隐性外显子的STMN2 mRNA、前mRNA或初生RNA序列。

49.如权利要求27所述的药物组合物,其中所述一种或多种反义寡核苷酸阻抑或防止在STMN2 RNA中纳入隐性外显子。

50.如权利要求27所述的药物组合物,其中所述一种或多种反义寡核苷酸阻抑隐性剪接。

51.如权利要求27所述的药物组合物,所述药物组合物还包含用于治疗神经变性疾病的剂。

52.如权利要求27所述的药物组合物,所述药物组合物还包含用于治疗创伤性脑损伤的剂。

53.如权利要求27所述的药物组合物,所述药物组合物还包含用于治疗蛋白酶体抑制剂诱发的神经病的剂。

54.如权利要求27所述的药物组合物,所述药物组合物还包含STMN2作为基因疗法。

55.如权利要求27所述的药物组合物,所述药物组合物还包含JNK抑制剂。

56.一种包含多聚体寡核苷酸的药物组合物,其中所述多聚体寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-85组成的组的一条或多条序列。

57.如权利要求56所述的药物组合物,其中所述多聚体寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-85组成的组的两条或多条序列。

58.一种治疗有需要的受试者的与神经元细胞中的TAR DNA结合蛋白43(TDP-43)功能下降相关的疾病或疾患或降低所述疾病或疾患的可能性的方法,所述方法包括使所述神经元细胞与校正降低的STMN2蛋白水平的反义寡核苷酸接触,其中所述剂不靶向靶转录物的多腺苷酸化位点。

59.一种治疗有需要的受试者的与神经元细胞中的TAR DNA结合蛋白43(TDP-43)功能

下降相关的疾病或疾患或降低所述疾病或疾患的可能性的方法，所述方法包括使所述神经元细胞与增加STMN2蛋白表达的反义寡核苷酸接触。

60.如权利要求59所述的方法，其中所述反义寡核苷酸特异性结合编码隐性外显子的STMN2 RNA、前RNA或初生RNA序列。

61.如权利要求59所述的方法，其中所述反义寡核苷酸经设计以靶向5'剪接位点、3'剪接位点或正常TDP-43结合位点。

62.如权利要求59所述的方法，其中所述反义寡核苷酸经设计以靶向靠近隐性剪接位点的位点、靠近早熟多腺苷酸化位点的位点、或位于隐性剪接位点与早熟多腺苷酸化位点之间的位点。

63.如权利要求59所述的方法，其中所述反义寡核苷酸经设计以靶向单股区域。

64.如权利要求59所述的方法，其中所述反义寡核苷酸经设计以靶向位于所述TDP-43结合位点与所述多腺苷酸化位点之间的单股区域。

65.如权利要求59所述的方法，其中所述反义寡核苷酸结合到所述隐性外显子内未结构化的靶区域。

66.如权利要求59所述的方法，其中所述反义寡核苷酸接近或邻近由TDP-43调控的所述5'剪接位点结合。

67.如权利要求59所述的方法，其中所述反义寡核苷酸靶向靠近预测的TDP-43结合位点的区域。

68.如权利要求59所述的方法，其中所述反义寡核苷酸经设计以靶向一个或多个剪接位点。

69.如权利要求59所述的方法，其中所述反义寡核苷酸恢复正常长度或蛋白质编码STMN2前mRNA或mRNA。

70.如权利要求59所述的方法，其中所述受试者展现改善的神经元生长和修复。

71.如权利要求59所述的方法，其中所述疾病或疾患是神经变性疾病。

72.如权利要求59所述的方法，其中所述疾病或疾患选自由以下组成的组：肌萎缩侧索硬化(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、包涵体肌炎(IBM)、帕金森氏病和阿尔茨海默氏病。

73.如权利要求59所述的方法，其中所述疾病或疾患是创伤性脑损伤。

74.如权利要求59所述的方法，其中所述疾病或疾患是蛋白酶体抑制剂诱发的神经病。

75.如权利要求59所述的方法，其中所述疾病或疾患与神经元细胞中TDP-43的突变或降低的水平相关。

76.如权利要求59所述的方法，所述方法还包括向所述受试者施用有效量的第二剂。

77.如权利要求76所述的方法，其中施用所述第二剂来治疗神经变性疾病。

78.如权利要求76所述的方法，其中施用所述第二剂来治疗创伤性脑损伤。

79.如权利要求76所述的方法，其中所述第二剂是作为基因疗法施用的STMN2。

80.一种治疗有需要的受试者的与神经元细胞中的TAR DNA结合蛋白43(TDP-43)功能下降相关的疾病或疾患或降低所述疾病或疾患的可能性的方法，所述方法包括使所述神经元细胞与校正降低的STMN2蛋白水平的一种或多种反义寡核苷酸接触，其中所述一种或多种反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-85组成的组的序列。

81.如权利要求80所述的方法，其中所述一种或多种反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID

NO:37-74组成的组的序列。

82.如权利要求80所述的方法,其中所述一种或多种反义寡核苷酸包含选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:78。

83.如权利要求80所述的方法,其中所述一种或多种反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:52。

84.如权利要求80所述的方法,其中所述一种或多种反义寡核苷酸包含选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:73。

85.如权利要求80所述的方法,其中所述一种或多种反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:73。

86.如权利要求80所述的方法,其中所述一种或多种反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:53。

87.一种治疗有需要的受试者的与神经元细胞中的TAR DNA结合蛋白43(TDP-43)功能下降相关的疾病或疾患或降低所述疾病或疾患的可能性的方法,所述方法包括使所述神经元细胞与阻抑或防止在STMN2 RNA中纳入隐性外显子的一种或多种反义寡核苷酸接触,其中所述一种或多种反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-85组成的组的序列。

88.如权利要求87所述的方法,其中所述一种或多种反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-74组成的组的序列。

89.如权利要求87所述的方法,其中所述一种或多种反义寡核苷酸包含选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:78。

90.如权利要求87所述的方法,其中所述一种或多种反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:52。

91.如权利要求87所述的方法,其中所述一种或多种反义寡核苷酸包含选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:73。

92.如权利要求87所述的方法,其中所述一种或多种反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:73。

93.如权利要求87所述的方法,其中所述一种或多种反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:53。

94.如权利要求87所述的方法,其中所述一种或多种反义寡核苷酸特异性结合编码隐性外显子的STMN2 RNA、前RNA或初生RNA序列。

95.如权利要求87所述的方法,其中所述一种或多种反义寡核苷酸经设计以靶向5'剪接位点、3'剪接位点或正常TDP-43结合位点。

96.如权利要求87所述的方法,其中所述一种或多种反义寡核苷酸经设计以靶向靠近隐性剪接位点的位点、靠近早熟多腺苷酸化位点的位点、或位于隐性剪接位点与早熟多腺苷酸化位点之间的位点。

97.如权利要求87所述的方法,其中所述一种或多种反义寡核苷酸经设计以靶向单股区域。

98.如权利要求87所述的方法,其中所述一种或多种反义寡核苷酸经设计以靶向位于所述TDP-43结合位点与所述多腺苷酸化位点之间的单股区域。

99.如权利要求87所述的方法,其中所述一种或多种反义寡核苷酸结合到所述隐性外显子内未结构化的靶区域。

100.如权利要求87所述的方法,其中所述一种或多种反义寡核苷酸接近或邻近由TDP-43调控的所述5'剪接位点结合。

101.如权利要求87所述的方法,其中所述一种或多种反义寡核苷酸靶向靠近预测的

TDP-43结合位点的区域。

102.如权利要求87所述的方法,其中所述一种或多种反义寡核苷酸靶向所述TDP-43正常结合位点。

103.如权利要求87所述的方法,其中所述疾病或疾患选自由以下组成的组:肌萎缩侧索硬化(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、包涵体肌炎(IBM)、帕金森氏病和阿尔茨海默氏病。

104.如权利要求87所述的方法,其中所述疾病或疾患是创伤性脑损伤。

105.如权利要求87所述的方法,其中所述疾病或疾患是蛋白酶体抑制剂诱发的神经病。

106.如权利要求87所述的方法,其中所述反义寡核苷酸阻抑隐性剪接。

107.如权利要求87所述的方法,其中所述反义寡核苷酸增加STMN2蛋白表达。

108.如权利要求87所述的方法,其中所述受试者展现改善的神经元生长和修复。

109.如权利要求87所述的方法,所述方法还包括向所述受试者施用有效量的第二剂。

110.如权利要求109所述的方法,其中施用所述第二剂来治疗神经变性疾病。

111.如权利要求109所述的方法,其中施用所述第二剂来治疗创伤性脑损伤。

112.一种治疗有需要的受试者的与神经元细胞中的TAR DNA结合蛋白43(TDP-43)功能下降相关的疾病或疾患或降低所述疾病或疾患的可能性的方法,所述方法包括使所述神经元细胞与校正降低的STMN2蛋白水平的多聚体寡核苷酸接触,其中所述多聚体寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-85组成的组的两种或多种反义寡核苷酸。

113.如权利要求112所述的方法,其中所述多聚体寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-74组成的组的两种或多种反义寡核苷酸。

114.一种校正降低的STMN2蛋白水平的反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸经设计以靶向隐性外显子内的未结构化区域。

115.如权利要求114所述的反义寡核苷酸,其中所述隐性外显子内的所述未结构化区域位于隐性剪接位点与早熟多腺苷酸化位点之间。

116.一种检测受试者中改变的STMN2或ELAVL3蛋白水平的方法,所述方法包括从所述受试者获得样品;和检测所述STMN2或ELAVL3蛋白水平是否改变。

117.如权利要求116所述的方法,其中所述受试者患有肌萎缩侧索硬化。

118.如权利要求116所述的方法,其中所述受试者患有创伤性脑损伤。

119.如权利要求116至118中任一项所述的方法,其中所述检测所述STMN2或ELAVL3水平是否改变包括确定所述STMN2或ELAVL3水平与参考样品相比是否降低。

120.如权利要求113至119中任一项所述的方法,其中所述检测所述STMN2或ELAVL3水平是否改变包括使用ELISA。

121.如权利要求113至120中任一项所述的方法,其中所述样品是生物流体样品。

用于恢复STMN2水平的方法和组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2021年1月4日提交的美国临时申请号63/133,749、2020年8月7日提交的美国临时申请号63/063,174和2020年3月25日提交的美国临时申请号62/994,797的优先权。上述申请的全部教示内容均以引用方式并入本文中。

背景技术

[0003] 肌萎缩侧索硬化(ALS)是特征在于上运动神经元和下运动神经元的选择性损失(1)的致命性神经变性疾病。ALS患者经历进行性麻痹并出现说话、吞咽和最终呼吸困难(2,3),并且通常在距诊断时间1-5年后死于该疾病。除了适度改变疾病进展的两种FDA批准的药物(4),ALS的治疗限于支持性护理。ALS现在被认为与额颞叶痴呆(FTD,早老性痴呆的最常见病因)具有相同的临床和病理谱。FTD的特征在于行为改变、语言障碍和执行功能损失(5),对其尚无有效治疗。尽管大多数ALS和FTD病例的病因仍然未知,但病理学发现和基于家族的连锁研究已证明,两种疾病中涉及的分子路径存在重叠(1,6)。

发明内容

[0004] TDP-43是主要的核DNA/RNA结合蛋白,它在转录调控、剪接、前微小RNA加工、应激颗粒形成和信使RNA转运和稳定性方面起功能性作用。已发现TDP-43是ALS和FTD的许多散发性病例中包涵体的主要成分。作为对TDP-43异常表达的反应,可见STMN2水平降低。STMN2(也称为SCG10)是微管稳定性的调控剂,并且已显示编码正常人运动神经元生长和修复所需的蛋白质。本文描述用于恢复或增加STMN2水平的方法和组合物。

[0005] 本文公开反义寡核苷酸,所述反义寡核苷酸特异性结合STMN2 mRNA、前mRNA或初生RNA序列,由此阻抑或防止纳入无效(abortive)或改变的STMN2 RNA序列。在一些实施方案中,反义寡核苷酸不与STMN2 RNA序列的多腺苷酸化位点结合。在一些实施方案中,当TDP-43功能下降或TDP病理发生时,出现无效或改变的STMN2 RNA序列且丰度增加。

[0006] 本文还公开反义寡核苷酸,所述反义寡核苷酸特异性结合编码隐性外显子的STMN2 mRNA、前mRNA或初生RNA序列,由此阻抑或防止在STMN2 RNA中纳入隐性外显子,其中反义寡核苷酸不与STMN2 mRNA、前mRNA或初生RNA序列的多腺苷酸化位点结合。

[0007] 本文还公开特异性结合STMN2 mRNA、前mRNA或初生RNA序列的反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸增加STMN2蛋白表达。

[0008] 在一些实施方案中,反义寡核苷酸经设计以靶向5'剪接位点、3'剪接位点或正常TDP-43结合位点。在一些实施方案中,反义寡核苷酸靶向一个或多个剪接位点。在一些实施方案中,反义寡核苷酸经设计以靶向位于TDP-43结合位点与多腺苷酸化位点之间的单股区域。

[0009] 在一些实施方案中,反义寡核苷酸不展现血小板毒性。

[0010] 本文还公开反义寡核苷酸,所述反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-85组成的组的序列。在一些方面中,反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-74组成的组的序列。

在一些实施方案中,反义寡核苷酸包含选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:78,或更具体来说,反义寡核苷酸可包含SEQ ID NO:52。在某些实施方案中,反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:73组成的组的序列,或更具体来说,反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:53。

[0011] 本文还公开药物组合物,所述药物组合物包含一种或多种反义寡核苷酸,所述一种或多种反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-85组成的组的序列。在一些实施方案中,一种或多种反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-74组成的组的序列。在一些实施方案中,一种或多种反义寡核苷酸包含选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:78,或更具体来说,一种或多种反义寡核苷酸可包含SEQ ID NO:52。在某些实施方案中,反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:73组成的组的序列,或更具体来说,反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:53。

[0012] 本文公开包含多聚体寡核苷酸的药物组合物。多聚体寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-85组成的组的一条或多条序列。在一些实施方案中,多聚体寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-85组成的组的两条或多条序列。多聚体寡核苷酸可包含序列的多个拷贝,或替代地可包含多条序列的单一拷贝。

[0013] 在一些实施方案中,反义寡核苷酸阻抑或防止在STMN2 RNA中纳入隐性外显子。在一些实施方案中,反义寡核苷酸特异性结合例如编码隐性外显子的STMN2 RNA、前mRNA或初生RNA序列。在一些实施方案中,反义寡核苷酸防止或延迟STMN2蛋白降解。在一些实施方案中,反义寡核苷酸增加STMN2蛋白。在一些实施方案中,反义寡核苷酸经设计以靶向5'剪接位点、3'剪接位点或正常TDP-43结合位点。在一些实施方案中,反义寡核苷酸经设计以靶向单股区域,例如位于TDP-43结合位点与多腺苷酸化位点之间的单股区域。在一些实施方案中,反义寡核苷酸经设计以靶向靠近隐性剪接位点的位点、靠近早熟多腺苷酸化位点的位点、或位于隐性剪接位点与早熟多腺苷酸化位点之间的位点。在一些实施方案中,反义寡核苷酸结合到隐性外显子内未结构化的靶区域。在一些实施方案中,反义寡核苷酸接近或邻近由TDP-43调控的5'剪接位点结合。在一些实施方案中,反义寡核苷酸靶向靠近预测的TDP-43结合位点的区域。在一些实施方案中,反义寡核苷酸靶向TDP-43正常结合位点。在一些实施方案中,反义寡核苷酸靶向一个或多个剪接位点。在一些实施方案中,反义寡核苷酸阻抑隐性剪接。

[0014] 在一些实施方案中,药物组合物包含两种或多种反义寡核苷酸,并且在一些方面中包含三种或多种反义寡核苷酸。在一些实施方案中,两种或多种反义寡核苷酸是共价连接的。在一些实施方案中,一种或多种反义寡核苷酸增加STMN2蛋白表达。

[0015] 在一些实施方案中,药物组合物还包含用于治疗神经变性疾病的剂、用于治疗创伤性脑损伤的剂或用于治疗蛋白酶体抑制剂诱发的神经病的剂。在一些实施方案中,药物组合物还包含STMN2作为基因疗法。在一些实施方案中,药物组合物还包含JNK抑制剂。

[0016] 本文还公开治疗有需要的受试者的与神经元细胞中的TAR DNA结合蛋白43(TDP-43)功能下降相关的疾病或疾患或降低所述疾病或疾患的可能性的方法。所述方法可包括

使神经元细胞与校正降低的STMN2蛋白水平的反义寡核苷酸接触,其中所述剂不靶向靶转录物的多腺苷酸化位点。

[0017] 本文还公开治疗有需要的受试者的与神经元细胞中的TAR DNA结合蛋白43(TDP-43)功能下降相关的疾病或疾患或降低所述疾病或疾患的可能性的方法。所述方法可包括使神经元细胞与增加STMN2蛋白表达的反义寡核苷酸接触。

[0018] 在一些实施方案中,反义寡核苷酸特异性结合编码隐性外显子的STMN2 RNA、前RNA或初生RNA序列。在一些实施方案中,反义寡核苷酸经设计以靶向5'剪接位点、3'剪接位点或正常TDP-43结合位点。在一些实施方案中,反义寡核苷酸经设计以靶向单股区域,例如位于TDP-43结合位点与多腺苷酸化位点之间的单股区域。在一些实施方案中,反义寡核苷酸经设计以靶向靠近隐性剪接位点的位点、靠近早熟多腺苷酸化位点的位点、或位于隐性剪接位点与早熟多腺苷酸化位点之间的位点。在一些实施方案中,反义寡核苷酸结合到隐性外显子内未结构化的靶区域。在一些实施方案中,反义寡核苷酸接近或邻近由TDP-43调控的5'剪接位点结合。在一些实施方案中,反义寡核苷酸靶向靠近预测的TDP-43结合位点的区域。在一些实施方案中,反义寡核苷酸经设计以靶向一个或多个剪接位点。在一些实施方案中,反义寡核苷酸恢复正常长度或蛋白质编码STMN2前mRNA或mRNA。

[0019] 在一些实施方案中,受试者展现改善的神经元生长和修复。在一些实施方案中,疾病或疾患是神经变性疾病,例如肌萎缩侧索硬化(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、包涵体肌炎(IBM)、帕金森氏病(Parkinson's disease)或阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)。在一些实施方案中,疾病或疾患是创伤性脑损伤。在一些实施方案中,疾病或疾患是蛋白酶体抑制剂诱发的神经病。在一些实施方案中,疾病或疾患与神经元细胞中TDP-43的突变或降低的水平相关。

[0020] 在一些实施方案中,所述方法还包括向受试者施用有效量的第二剂。在一些实施方案中,施用第二剂来治疗神经变性疾病或创伤性脑损伤。在一些实施方案中,第二剂是STMN2,例如作为基因疗法施用。

[0021] 本文还公开治疗有需要的受试者的与神经元细胞中的TAR DNA结合蛋白43(TDP-43)功能下降相关的疾病或疾患或降低所述疾病或疾患的可能性的方法。所述方法可包括使神经元细胞与校正降低的STMN2蛋白水平的反义寡核苷酸接触,其中反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-85组成的组的序列。

[0022] 在一些实施方案中,反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-74组成的组的序列。在一些实施方案中,反义寡核苷酸包含选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:78,或更具体来说,反义寡核苷酸可包含SEQ ID NO:52。在某些实施方案中,反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:73组成的组的序列,或更具体来说,反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:53。

[0023] 本文还公开降低有需要的受试者的与神经元细胞中的TAR DNA结合蛋白43(TDP-43)功能下降相关的疾病或疾患的可能性的方法。所述方法可包括使神经元细胞与阻抑或防止在STMN2 RNA中纳入隐性外显子的一种或多种反义寡核苷酸接触。在一些实施方案中,一种或多种反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-85组成的组的序列。

[0024] 在一些实施方案中,反义寡核苷酸包含选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:

40、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:78,或更具体来说包含SEQ ID NO:52。在某些实施方案中,反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:73组成的组的序列,或更具体来说,反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:53。

[0025] 在一些实施方案中,反义寡核苷酸特异性结合编码隐性外显子的STMN2 RNA、前RNA或初生RNA序列。在一些实施方案中,反义寡核苷酸经设计以靶向5'剪接位点、3'剪接位点或正常TDP-43结合位点。在一些实施方案中,反义寡核苷酸经设计以靶向单股区域,例如位于TDP-43结合位点与多腺苷酸化位点之间的单股区域。在一些实施方案中,反义寡核苷酸经设计以靶向靠近隐性剪接位点的位点、靠近早熟多腺苷酸化位点的位点、或位于隐性剪接位点与早熟多腺苷酸化位点之间的位点。在一些实施方案中,反义寡核苷酸结合到隐性外显子内未结构化的靶区域。在一些实施方案中,反义寡核苷酸接近或邻近由TDP-43调控的5'剪接位点结合。在一些实施方案中,反义寡核苷酸靶向靠近预测的TDP-43结合位点的区域。在一些实施方案中,反义寡核苷酸靶向TDP-43正常结合位点。

[0026] 在一些实施方案中,疾病或疾患选自由以下组成的组:肌萎缩侧索硬化(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、包涵体肌炎(IBM)、帕金森氏病和阿尔茨海默氏病。在一些实施方案中,疾病或疾患是创伤性脑损伤。在一些实施方案中,疾病或疾患是蛋白酶体抑制剂诱发的神经病。

[0027] 在一些实施方案中,反义寡核苷酸阻抑隐性剪接。在一些实施方案中,反义寡核苷酸防止或延迟STMN2蛋白降解。在一些实施方案中,受试者展现改善的神经元生长和修复。

[0028] 在一些实施方案中,所述方法还包括向受试者施用有效量的第二剂。在一些实施方案中,施用第二剂来治疗神经变性疾病或创伤性脑损伤。

[0029] 本文还公开治疗有需要的受试者的与神经元细胞中的TAR DNA结合蛋白43(TDP-43)功能下降相关的疾病或疾患或降低所述疾病或疾患的可能性的方法,所述方法包括使神经元细胞与校正降低的STMN2蛋白水平的多聚体寡核苷酸接触,其中多聚体寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-85组成的组的两种或多种反义寡核苷酸。在一些实施方案中,多聚体寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-74组成的组的两种或多种反义寡核苷酸。

[0030] 本文还公开校正降低的STMN2蛋白水平的反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸经设计以靶向隐性外显子内的未结构化区域。在一些实施方案中,隐性外显子内的未结构化区域位于隐性剪接位点与早熟多腺苷酸化位点之间。

[0031] 本文还公开检测受试者中改变的STMN2或ELAVL3蛋白水平的方法。所述方法包括从受试者获得样品;和检测STMN2或ELAVL3蛋白水平是否改变。在一些实施方案中,受试者患有肌萎缩侧索硬化。在一些实施方案中,检测STMN2或ELAVL3水平是否改变包括确定STMN2或ELAVL3水平是否降低(例如使用ELISA)。在一些实施方案中,样品是生物流体样品(例如CSF样品)。

附图说明

[0032] 本专利或申请文件含有至少一张以彩色制作的附图。具有彩色附图的本专利或专利申请公布的拷贝将由专利局在请求并支付必要的费用后提供。

[0033] 图1A-1F展示hMN中TDP-43基因敲低的RNA测序。图1A提供显示所培养MN中hMN分

化、纯化和TDP-43基因敲低的RNAi策略的示意图。图1B提供基于500个最大差异表达的基因从两个生物学上独立的MN分化和siRNA转染实验获得的RNA-Seq数据集的多维标度分析。图1C提供显示与用加扰对照处理的hMN相比，用siTDP-43处理的hMN中统计学上错调的基因的火山图。在差异表达分析后鉴别为显著的基因(本杰明-霍贝格(Benjamini-Hochberg)调整的P值截止值为0.05且log倍数变化率截止值为0)以黄色(对于上调/丰度增加的基因)和蓝色(对于下调/丰度降低的基因)突出显示。图1D提供比较在用对照siRNA处理的MN中表达的所有基因的TPM值与用siTDP-43处理的细胞中的那些基因表达的倍数变化的散点图。图1E和图1F显示，选择在TDP43基因敲低实验中最初鉴别为‘命中’(显著上调(图1E)或下调(图1F))的11个基因的子集进行qRT-PCR验证。当通过qRT-PCR(不成对t测试，P值<0.05)分析这些基因的表达时，11个这些基因中总共有9个(包括TDP-43)展现对TDP-43清除的预测反应。

[0034] 图2A至图2J展示家族性ALS模型。图2A提供用于评价表达突变体TDP-43的iPS细胞源性hMN中的基因表达的策略的示意图。图2B提供显示培养10天的神经元的形态学的显微照片，所述神经元衍生自健康对照的iPS细胞(11a、18a、20b、17a)和具有TARDP突变(+/Q343R、+/G298S、+/A315T和+/M337V)的患者的iPS细胞。图2C至图2H提供在从对照或TDP-43患者分化的神经元中在TDP-43基因敲低后一致地下调(图2D-2F)或上调(图2C)的基因的qRT-PCR分析。(不成对t测试，P值<0.05)。图2I提供针对TDP-43(红色)、β-III微管蛋白(绿色)进行免疫染色且用DAPI(蓝色)复染的对照和患者神经元的代表性显微照片。比例尺，100μm。图2J提供比较对照神经元与具有TDP-43突变的神经元的TDP-43免疫染色和DAPI荧光的皮尔森相关(Pearson's correlation)分析。圆点代表单个细胞。(不成对t测试，P值<0.05)。

[0035] 图3A至图3I展示STMN2调控和定位。图3A提供在独立实验中使用两组不同的引物对，对STMN2转录物的qRT-PCR分析。(不成对t测试，P值<0.05)。图3B提供在通过siRNA基因敲低部分清除TDP-43后，TDP-43和STMN2蛋白水平的免疫印迹分析。将蛋白质水平标准化到GAPDH，并且相对于用siRED对照处理的MN中的水平来表示。图3C提供用靶向三个ALS连锁基因(TDP-43、FUS和C9ORF72)的siRNA处理的Hb9::GFP+MN中STMN2转录物分析的qRT-PCR分析。(邓妮特多重比较测试(Dunnett's multiple comparison test)，α值<0.05)。图3D至图3F显示，使用甲醛RNA免疫沉淀来鉴别结合到TDP-43的转录物。在TDP-43免疫沉淀(图3D)后，使用qRT-PCR分析来测试相对于样品输入TDP-43转录物(图3E)和STMN2转录物(图3F)的富集。图3G提供针对TDP-43(红色)、β-III微管蛋白(绿色)进行免疫染色且用DAPI(蓝色)复染的Hb9::GFP+MN的显微照片。图3H提供针对STMN2(红色)和MAP2绿色和GOLGIN97(绿色)进行免疫染色的在神经胶质上共培养的Hb9::GFP+MN的显微照片。图3I提供在分选后第3天针对STMN2(红色)、MAP2(绿色)进行免疫染色且用F-肌动蛋白结合蛋白鬼笔环肽(白色)复染的Hb9::GFP+MN的显微照片。比例尺，5μm。

[0036] 图4A至图4K展示STMN2敲除。图4A提供使用靶向人STMN2基因的两种组成型外显子、即外显子2和4的引导RNA(gRNA)的敲除策略的示意图。由于通过Cas9/gRNA核酸酶复合物引入的两个双股断裂(DSB)的NHEJ(非同源末端连接)修复，靶向且缺失插入的DNA区段(约18Kb)。图4B至图4D显示，在HUES3 Hb9::GFP细胞系中通过基因组DNA的RT-PCR分析(图4B)、通过免疫印迹分析(图4C)和通过免疫荧光(图4D)确认STMN2敲除。图4E提供用于评价在hMN中缺乏STMN2的细胞效应的实验策略。图4F至图4H显示在具和不具STMN2下以及在刺

激神经突生长的ROCK抑制剂(Y-27632,10μM)不存在(图4G)或存在(图4H)下,hMN的Sholl分析。(不成对t测试,P值<0.05)。图4I提供用于评价在轴突损伤后在hMN中缺乏STMN2的细胞效应的实验策略。图4J至图4K显示损伤后的轴突再生长。在轴突切断术之前和之后,微流体装置中hMN的代表性显微照片(图4J)。轴突切断术后轴突再生的测量。(不成对t测试,P值<0.05)。

[0037] 图5A至图5G展示散发性ALS模型。图5A提供用于评价蛋白酶体抑制对人运动神经元中的TDP-43定位的效应的实验策略。图5B显示用MG-132(1μM)处理的细胞的TDP-43免疫染色和DAPI荧光的皮尔森相关分析。(邓妮特多重比较测试,α值<0.05)。图5C提供未经处理或用MG-132处理并针对TDP-43(红色)、β-III微管蛋白(绿色)进行免疫染色且用DAPI(蓝色)复染的HUES3运动神经元的显微照片。比例尺,100μm。图5D提供在用MG-132处理的神经元中,去污剂可溶性部分(RIPA)和去污剂不溶性部分(UREA)中TDP-43的免疫印迹分析(不成对t测试,P值<0.05)。图5E提供相对于DMSO对照,用所指示浓度和持续时间的MG-132处理的运动神经元的STMN2表达的qRT-PCR分析(不成对t测试,P值<0.05)。图5F提供STMN2隐性外显子的RT-PCR检测策略的图。图5G提供用MG-132(1μM)处理的hMN对照细胞中STMN2隐性外显子的tapestation分析。

[0038] 图6A至图6H展示ALS患者数据。图6A至图6C提供从不具脊髓疾病证据的受试者(对照)(图6A)或经诊断患有散发性ALS的两名患者(图6B至图6C)收集的死后样品的人成年腰脊髓的组织学分析。在脊髓运动神经元的核周区(由箭头指示)中、但未在周围神经胶质细胞中检测到对STMN2的免疫反应性。来自对照和ALS病例的腰椎运动神经元中的STMN2免疫反应性评分为'强'[如对照(图6A)和散发性ALS(图6B)中的箭头所指示]或'不存在'[如散发性ALS(图6C)中的箭头所指示]。比例尺,50μm。图6D显示,在ALS组织样品中,具有强STMN2免疫反应性的腰椎运动神经元的百分比显著较低(n=3个对照和3个ALS病例;对每一受试者的大约40个MN进行评分;双尾t-测试,P值<0.05)。图6E至图6G显示来自先前公开的数据集(Rabin等人,2009(图6E)、Highley等人,2014(图6F)和D'Erchia等人,2017)的STMN2的基因表达分析(双尾t-测试,P值<0.05)。图6H提供ALS发病机制的分子模型。

[0039] 图7A至图7I展示分化的人运动神经元的产生。图7A显示hMN分化、纯化和培养策略。图7B提供分化的HUES3 Hb9:GFP细胞的流式细胞术分析。使用未用RA和SHH路径激动剂处理的细胞作为GFP表达的门控的阴性对照。图7C至图7F提供纯化的Hb9::GFP+细胞的显微照片和量化,所述纯化的Hb9::GFP+细胞针对HB9进行免疫染色且用DAPI复染(图7C)(比例尺=10μm)或针对ISL1以及神经元标记物β-III微管蛋白和MAP2进行免疫染色(图7E)(比例尺=20μm)。图7G至图7J显示,分化的MN在电生理学上有活性,如通过全细胞膜片钳记录所确定。图7G显示在电压钳模式中去极化时,细胞展现快速内向电流,随后是缓慢外向电流,此分别指示电压激活的钠和钾通道的表达和开放。图7H显示在电流钳模式中,去极化引起重复动作电位发放。图7I显示,对红藻氨酸的反应与兴奋性谷氨酸能递质的功能受体的表达一致。

[0040] 图8A至图8E展示所培养hMN中的TDP-43基因敲低。图8A提供所培养MN中的TDP-43基因敲低的RNAi策略。图8B显示在用缀合到Alexa Fluor 555的不同siRNA(包括加扰siRNA)处理后4天,所培养hMN的相位和红色荧光显微照片。图8C提供在用不同siRNA处理后,hMN的流式细胞术分析。图8D显示暴露于不同siRNA达2天、4天或6天的MN中TDP-43mRNA

的相对水平。将每一样品的水平标准化到GAPDH且相对于非转染对照来表示。图8E提供在用所指示siRNA处理的RNAi后，hMN的免疫印迹分析。使用GAPDH将每一样品标准化，并且相对于siSCR_555处理的对照样品来计算TDP-43蛋白水平。

[0041] 图9A至图9C展示运动神经元RNA-Seq。图9A显示如热图所指示处理的运动神经元的全局转录分析。表达谱的无监督聚簇揭露，样品是基于运动神经元产生和分析的批次来分离。图9B提供在RNA测序验证基因敲低(本杰明-霍贝格调整的P值截止值为0.05)后，TDP-43转录物丰度的分析。图9C显示，由于TDP-43基因敲低而检测到POLDIP3基因的剪接模式的变化，其中siTDP43处理的细胞显示亚型1的显著减少和增加的剪接变体2(它缺乏外显子3)水平(错误发现率'FDR'>0.05)。

[0042] 图10展示所指示iPS细胞系中TARDBP的外显子6的多能干细胞基因分型测序色谱图，以确认患者细胞系中的杂合突变。

[0043] 图11A至图11F展示神经元细胞分选。图11A显示，使用细胞表面标记物筛选，鉴别出在GFP+运动神经元(象限1)和GFP-细胞(象限3)上富集的抗体。图11B显示在分选NCAM+和EpCAM-细胞后，使用高含量成像来确定分选方法是否可清除有丝分裂细胞的培养物(EdU+)且显著富集运动神经元(Isl1+)和神经元(MAP2+)。N＝6个不同的iPS细胞系。使用双尾司徒顿t测试(Student's t test)进行统计学分析。图11C至图11D提供在分选运动神经元标记物ISL1(图11C)和神经元标记物βIII-微管蛋白(图11D)后培养物的qRT-PCR分析，与未分选的培养物相比，揭露富集和更均质的培养物。图11E提供从所指示健康对照(灰色)和TDP-43突变细胞系(红色)分化的培养物的流式细胞术分析，所述流式细胞术分析使用针对EpCAM的藻红蛋白(PE)缀合抗体(抗epCAM-PE)和针对NCAM的Alexa Fluor 700缀合抗体(抗NCAM-AF700)。图11F显示来自4-6个独立分化的所指示细胞系的NCAM+细胞的百分比。就生成NCAM+细胞的能力来说，在突变细胞系与对照细胞系之间未观察到显著差异。使用双尾司徒顿t测试进行统计学分析，P值<0.05。

[0044] 图12A至图12G展示TDP-43和STMN2连接。图12A至图12C提供在siRNA处理后，ALS基因下调的qRT-PCR验证。对所用的所有对照和每一siRNA评价TDP-43(图12A)、FUS(图12B)和C9ORF72(图12C)的表达(不成对t测试，P值<0.05)。图12D提供沿着运动神经元分化的不同细胞类型中STMN2蛋白的蛋白质印迹(western blot)分析。图12E显示用siSCR(-)或siTDP-43(+)寡核苷酸处理的运动神经元中微管解聚蛋白(Stathmin)家族的RNA-Seq表达水平。仅STMN2水平在TDP-43基因敲低后发生变化。图12F至图12G显示标准化到基因长度(图12G)的微管解聚蛋白基因家族(图12F)内的TDP-43结合位点。STMN2具有最大数量的结合基序。

[0045] 图13A至图13H展示STMN2调控神经元生长。通过基因组DNA的RT-PCR分析(图13A)、通过免疫印迹分析(图13B)和通过免疫荧光(图13C)确认WA01细胞系中CRISPR介导的STMN2敲除。图13D至图13F提供在具和不具STMN2下以及在ROCK抑制剂Y-27632(10μM)存在下，hMN的Sholl分析(图13F)(不成对t测试，P值<0.05)。图13G至图13H显示损伤后的轴突再生长。在轴突切断术之前和之后，微流体装置中hMN的代表性显微照片(图13G)。在轴突切断术后轴突再生长的分析(不成对t测试，P值<0.05)(图13H)。

[0046] 图14A至图14E展示细胞存活和蛋白酶体活性测定。图14A至图14C显示，Cell Titer Glo使用来自代谢活性细胞的ATP来生成光。(图14A)显示，在几个数量级上，发光与培养物中的细胞数之间存在直接关系。图14B显示，测定可检测在生长因子不存在下神经元

存活的差异。N＝6个单独的神经元孔。(不成对t测试,P值<0.05)。图14C显示MG-132神经元存活实验概述。图14D显示与所指示浓度的MG-132一起培养所指示时间的运动神经元的剂量反应曲线。N＝一式三份孔。细胞在所测试的所有浓度下处理1天后是活的,并且对较低浓度耐受更长的时间段。图14E显示在被蛋白酶体裂解后,荧光素酶的底物被释放,此允许定量测量蛋白酶体活性。用MG-132处理的神经元显示显著降低的蛋白酶体活性。N＝4个单独的神经元孔(不成对t测试,P值<0.05)。

[0047] 图15A至图15E展示TDP-43调控hMN中的隐性外显子剪接(图15A-15C)。用加扰siRNA或靶向TDP-43转录物的siRNA处理的细胞的PFKP(图15A)、ELAVL3(图15B)和STMN2(图15C)的隐性外显子的可视化。显示读段覆盖和剪接接头用于与人HG19基因组比对。图15D至图15E提供STMN2隐性外显子的RT-PCR检测策略的图(图15D),以及PCR产物的桑格测序(Sanger sequencing)确认STMN2外显子1与隐性外显子的剪接(图15E)。

[0048] 图16A至图16P提供患者脑脊髓液(CSF)样品的隐性STMN2转录物qPCR数据。图16A至图16D提供汇总相对于健康对照标准化隐性STMN2的患者样品数据的图。图16E至图16M提供,提供关于单个患者样品的细节的图。图16N提供展示诊断后的存活持续时间的图。图16O提供展示死亡年龄的图。图16P提供展示生活力(vital capacity)的图。

[0049] 图17A至图17C展示STMN2多重qPCR测定。图17A显示流体中STMN2的Q-RT PCT测定。提供实验方案且显示STMN2多重TaqMan测定同时检测隐性STMN2、正常STMN2转录物和管家基因RNA18S5。可从CSF源性胞外体收集RNA且然后转化成cDNA,以测定完全和隐性STMN2转录物以及用于标准化的对照RNA。图17B显示使用ASO或使用siRNA降低TDP-43水平的细胞中多重测定的体外验证。图17C显示,使用STMN2多重qPCR测定来探测从MGH CSF样品生成的cDNA样品中的隐性STMN2转录物水平。STMN2隐性剪接在ALS患者中被显著诱导。

[0050] 图18A至图18D展示用于检测STMN2蛋白的夹心ELISA。图18A提供STMN2夹心ELISA的示意图。图18B展示STMN2 ELISA对皮克量的敏感性。图18C显示,夹心ELISA是使用重组STMN2蛋白来验证且能够检测皮克水平的STMN2。图18D显示,当使用STMN2ELISA评价时,患者脑脊髓液(CSF)中的STMN2水平降低。

[0051] 图19提供展示ALS遗传学的图表,其中每一基因是针对发现它的年份来绘图。参见Alsultan等人,Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease.2016,6,49-64。

[0052] 图20展示,TDP-43是多功能核酸结合蛋白。已显示TDP-43在多种功能中起作用,包括RNA剪接、miRNA加工、它的自身转录物的自调控、RNA转运和稳定性以及应激颗粒形成。TDP-43调控的转录物具有高度物种和细胞类型依赖性。参见Buratti和Baralle Trends in Biochem.Sci..2012,6,237-247。

[0053] 图21提供用于测量TDP-43清除的转录效应的策略。所述示意图展示hMN分化、纯化和培养策略。所述策略使用模拟早期发育的小分子在2周内将干细胞转化成有丝分裂后神经元。开发出多种方法来分选和研究神经元。使用与RNA测序组合的siRNA技术来鉴别由TDP-43调控的转录物。

[0054] 图22展示TDP-43结合到STMN2。针对STMN2对ALS患者脊髓进行染色,并且基于相对于PGK1(fRIP)的倍数富集在ALS患者中观察到STMN2蛋白减少。参见Klim等人,Nature Neuroscience,第22卷,第167-179页(2019)。

[0055] 图23显示TDP-43清除后的剪接变化。对来自用siTDP处理的运动神经元的RNA-seq样品进行差异外显子使用分析。在STMN2中观察到剪接变化。

[0056] 图24展示TDP-43阻抑STMN2中的隐性外显子。使用整合的基因组观察器来观察RNA seq读段映射到人基因组之处(顶图读段数)和读段在外显子之间重新连接(剪接轨迹)的方式。所述图显示映射到基因区域的读段数。

[0057] 图25提供STMN2剪接缺陷汇总。在正常条件下,STMN2与所有5种外显子一起转录,产生翻译成20kDa STMN2蛋白的mRNA。在TDP-43扰动后,隐性外显子截断转录物,以使得仅可翻译17个氨基酸的多肽。

[0058] 图26显示STMN2一致地减少。比较3个人RNA seq数据集(ALS患者数据集和siTDP43干细胞运动神经元数据集)中减少的转录物下调的重叠,并且STMN2是所有三个数据集中唯一的转录物下调。

[0059] 图27显示,STMN2隐性外显子存在于ALS患者脊髓中。显示读段覆盖和剪接接头用于与人HG19基因组比对。在ALS患者中观察到映射到人基因组的读段,并且对于6名患者中的5名,映射和剪接的读段进入隐性外显子中,并且对照不出现这种情况。

[0060] 图28显示,TDP-43清除导致神经突生长和轴突再生长缺陷。提供hMN的代表性显微照片,所述hMN用所指示siRNA处理且针对β-III微管蛋白进行免疫染色以进行Sholl分析。提供siRNA处理后hMN的Sholl分析。各线代表样品平均值且阴影代表siTDP43与siSCR之间的使用不成对t-测试的s.e.m.,双侧,$P<0.05$。

[0061] 图29显示用于研究轴突再生的微流体装置。微流体装置包括细胞体区室(左图)和轴突区室(右图)。

[0062] 图30A至图30B展示,TDP-43清除导致神经突生长和轴突再生长缺陷。图30A提供在轴突切断术后微流体装置中hMN的代表性显微照片。比例尺,150μM。图30B提供轴突切断术后轴突再生长和再生的测量(不成对t测试,双侧,P值<0.05,18h≤0.0001,24h≤0.0001,48h≤0.0001和72h≤0.0001)。

[0063] 图31展示,STMN2是轴突变性路径中的c-Jun N末端激酶(JNK)靶。显示JNK1结合并磷酸化STMN2,并且磷酸化的STMN2快速降解。参见J.Eun Shin等人,PNAS 2012,109,E3696-3705。

[0064] 图32提供确定JNKi是否可挽救siTDP43表型的策略。参见Klim等人,Nature Neuroscience,第22卷,第167-179页(2019)。

[0065] 图33显示JNK抑制剂(SP600125)强化STMN2水平。在用JNKi处理的神经元中STMN2蛋白水平增加,并且可挽救在用siTDP43处理的细胞中观察到的较低水平。

[0066] 图34显示JNKi(SP600125)增加神经突生长。用JNKi处理的细胞展现增加的神经突分枝。

[0067] 图35显示JNKi(SP600125)增加神经突生长。Sholl分析确认,在所有条件下,JNKi增加损伤后的神经突分枝和再生长。

[0068] 图36显示JNKi增加轴突再生。微流体装置确认,在所有条件下,JNKi增加损伤后的神经突分枝和再生长。

[0069] 图37提供蛋白酶体抑制的模型。蛋白质稳态的破坏导致TDP-43错误定位和改变的STMN2水平,此会破坏轴突生物学。

[0070] 图38A至图38B显示TDP-43定位。TDP-43通常是有核的(图38A),但在化合物冲洗后,观察到明显的核TDP-43染色丧失(图38B)。未观察到细胞质聚集,仅观察到核TDP-43丧失。

[0071] 图39显示TDP-43错误定位是可逆的。

[0072] 图40显示STMN2转录物在TDP-43错误定位后减少。STMN2的减少甚至比在表达突变体TDP-43的细胞中更明显。

[0073] 图41提供汇总不同ALS和FTD队列和相关路径中的最近ALS基因以及它们的相对突变频率的表。WGS和WES的进步已使得鉴别出携带罕见的致病变体的基因:TBK1、CHCHD10、TUBA4A、MATR3、CCNF、NEK1、C21orf2、ANXA11和TIA1。TBK1显示为在不同队列中具有最高的ALS-FTD突变频率(3%-4%)。参见Nguyen等人,Trends in Genetics,2018。

[0074] 图42显示Atg7和TBK1在自噬的不同时间起作用。参见Hansen等人,Nature Reviews Molecular Cell Biology.2018。

[0075] 图43显示消除TBK1与阻断自噬起始具有相似性,但有所不同。

[0076] 图44显示,TBK1敲除会降低功能性TDP-43和STMN2水平,而消除ATG7不具效应。TBK1的丧失通过自噬非依赖性机制诱导运动神经元的TDP-43病理。

[0077] 图45显示,TBK1的丧失在轴突损伤后显示受损的轴突再生。

[0078] 图46显示在TBK1突变体运动神经元中蛋白酶体抑制诱导TDP-43错误定位。

[0079] 图47A至图47C展示使用CRISPR靶向STMN2内含子。提供用于靶向STMN2的CRISPR策略以及STMN2的基因分型(图47A至图47B)。图47C提供汇总STMN2的CRISPR靶向策略和基因分型的表。

[0080] 图48展示,STMN2小鼠显著小于Rosa26对照小鼠并在运动表现任务中显示缺陷,并且无这些缺陷随时间进展的迹象。

[0081] 图49展示,STMN2小鼠显著小于Rosa26对照小鼠并在运动表现任务中显示缺陷,并且无这些缺陷随时间进展的迹象。

[0082] 图50展示,行为结果以及在旷野测定中行进的总距离在两个小鼠队列之间似乎是相似的。

[0083] 图51展示,在突变体队列的脑组织中,STMN2转录物水平显著降低或不存在转录物。

[0084] 图52提供脑组织的蛋白质印迹,验证突变体小鼠队列中STMN2蛋白的丧失或显著减少。

[0085] 图53展示,STMN2主要定位于成年小鼠脊髓腹角中的ChAT+运动神经元。

[0086] 图54展示,STMN2队列展现脊髓腹角上的STMN2+/ChAT+运动神经元数显著减少。

[0087] 图55提供显示对照与STMN2小鼠之间的器官或肌肉重量的差异的图。它展示,STMN2小鼠的下肢肌肉较轻(参见两个方框图)。

[0088] 图56提供STMN2腓肠肌(GA)和Rosa26对照腓肠肌(GA)的突触前和突触后染色。所述染色表明STMN2-/-动物中的去神经支配(de-innervation)。

[0089] 图57展示,STMN2腓肠肌(GA)和Rosa26对照腓肠肌(GA)的突触前和突触后染色表明STMN2-/-动物中的去神经支配。

[0090] 图58展示,神经肌肉接头(NMJ)形态学支持STMN2突变体的腓肠肌中的主动去神经

支配。

[0091] 图59展示,突变体TDP-43未显示病理性错误定位。针对TDP-43的对照和ALS患者神经元染色显示,对于对照和ALS患者,神经元TDP-43主要是有核的。

[0092] 图60鉴别出不同类别的蛋白酶体抑制剂且提供它们的化学结构。

[0093] 图61显示在用结构不同的蛋白酶体抑制剂处理后,hMN中全长STMN2的表达减少。

[0094] 图62显示用MG-132或硼替佐米(Bortezomib)处理的hMN的PCR测定。在所有样品中检测到全长STMN2作为对照。含有STMN2隐性外显子的转录物的存在对于用蛋白酶体抑制剂处理的那些细胞是特异的。

[0095] 图63A至图63B展示TDP-43与STMN2 RNA结合的体外测定。使用基因组DNA,含有来自STMN2的隐性外显子区域的TDP-43结合位点的RNA被体外转录(图63A)。使用RNA来评价它是否可从人神经元蛋白裂解物拉下IP TDP-43蛋白。体外测定显示,含有隐性外显子区域的转录物拉下TDP-43(图63B)。

[0096] 图64显示TDP-43与STMN2 RNA结合的体外测定。含有5'和3'TDP-43结合区域的RNA被体外转录,与图63中所述相似。尽管5'和3'转录物可拉下一些TDP-43,但富集不如完整的隐性外显子强。

[0097] 图65显示用于生成不具隐性外显子的靶向突变体细胞系的gRNA的设计。制备策略以在外显子1与2之间的STMN2内含子内的隐性外显子内缺失105个核苷酸。所述缺失将消除TDP-43结合基序,但不影响预测的多腺苷酸化位点。

[0098] 图66提供突变状态的确认。使用TIDE分析来分析克隆的突变状态且检查与对照细胞的序列比对,以获得缺失的大小和位置的更精确视图。一种细胞系含有纯合的105nt缺失,此与凝胶电泳一致。所述缺失消除TDP-43结合基序,但不影响预测的多腺苷酸化位点。

[0099] 图67显示,TDP-43结合位点是STMN2表达的潜在负调控剂。用正常培养基或培养基+1uM MG132将三种细胞系HUES3、IG2(Stmn2KO)和CN7(隐性外显子缺失)处理24小时以使细胞应激。在HUES3细胞中,与非应激条件相比,应激条件具有52% STMN2 mRNA表达。在IG2(Stmn2 KO)条件下,非应激细胞具有13%表达,并且在应激时,表达增加到42%。CN7(隐性外显子缺失)细胞系中的表达水平显著高于其他两种细胞系,其中非应激具有729%表达且应激具有473%表达。显示,如果敲除几个外显子,表达会下降,但如果去除TDP-43结合位点,表达会上升。

[0100] 图68A至图68B展示,缺失推定的TDP-43结合位点导致STMN2蛋白水平增加。与基因表达数据一致,缺失STMN2隐性外显子内的TDP-43结合区域导致蛋白表达增加。

[0101] 图69A至图69B展示STMN2基因座的保守。图69A显示,人STMN2位于染色体8的长臂上且被转录为通常包括5个规范外显子的几个亚型。隐性外显子的位置以橙色突出显示。沿着基因座的100种脊椎动物的保守性揭露外显子处以及一些内含子区域的强保守性。图69B显示12种灵长类动物和2种啮齿类动物的STMN2隐性外显子(橙色)处的更高分辨率的基因组视图,其中核苷酸分辨率与多条序列比对组合。人基因的显著特征和它们在物种列表中的保守程度加下划线,包括剪接受体位点(水鸭色)、推定的编码区(黄色)、终止密码子(红色)、TDP-43结合基序(蓝色)和聚A信号(紫色)。

[0102] 图70展示用于检测隐性STMN2的多重测定。

[0103] 图71A至图71C展示,siTDP-43和TDP-43ASO诱导STMN2减少和隐性外显子诱导。显

示用SCR ASO、TDP ASO或siTDP处理时TARDBP(图71A)、STMN2外显子3-4(图71B)和隐性STMN2(图71C)的相对表达水平。

[0104] 图72A至图72C显示在用加扰ASO、TDP-43ASO或SOD1 ASO处理后，在6天的时程内，TARDP(图72A)、STMN2(图72B)和隐性STMN2(图72C)的相对mRNA水平。

[0105] 图73展示隐性STMN2表达。显示在用加扰ASO、TDP-43ASO、SOD1 ASO、siTDP-43和siRED处理后，隐性STMN2表达的mRNA水平。使用NeuroPorter5、NeuroPorter1、RNAiMAX或LipoFecamine施加每次处理，其中RNAimax是最有效的。

[0106] 图74提供显示用于测试STMN2剪接切换ASO的策略的示意图。

[0107] 图75A至图75D提供ASO筛选设置板1(图75A)、板2(图75B)、板3(图75C)和板4(图75D)的示意图。

[0108] 图76提供用所有孔的可比cDNA进行ASO筛选的结果。筛选的ASO是靶向STMN2内含子的ASO。

[0109] 图77提供ASO筛选的结果，显示剪接接头附近的ASO阻抑隐性外显子包涵体。

[0110] 图78提供ASO筛选的最佳命中，显示对最低浓度的剂量依赖性或阻抑。

[0111] 图79A至图79B展示TDP-43蛋白结构、致病性突变和功能。图79A显示TDP-43包含六个结构域：具有核定位信号(NLS,aa 82-98)的N末端区域(aa 1-102)；两个RNA识别基序：RRM1(aa 104-176)和RRM2(aa 192-262)；核输出信号(NES,aa 239-250)；C末端区域(aa 274-414)，涵盖富含谷氨酰胺/天冬酰胺(Q/N)的普里昂蛋白(prion)样结构域(aa345-366)；和富含甘氨酸的区域(aa 366-414)。在散发性和家族性ALS患者以及罕见FTLD患者中的TDP-43中已鉴别出46种显性突变，主要位于C末端富含甘氨酸的区域。图79B显示，显著TDP-43功能与疾病发病机制强烈相关。对TDP-43鉴别出的最常见基序是(TG)n，它对应于(UG)n RNA结合基序。与RNA的相互作用允许TDP-43调控前mRNA剪接来抑制隐性外显子的纳入以及影响多腺苷酸化位点选择。TDP-43的胞质作用包括RNA沿着神经元过程的转运和对应激的反应，包括影响可触发TDP-43核流出和定位于应激颗粒的蛋白质稳态的那些反应。许多这些基本分子的功能有助于TDP-43自调控，包括剪接和多腺苷酸化。

[0112] 图80A至图80B展示STMN2蛋白结构和功能。图80A显示STMN2包含两个结构域，所述结构域可进一步细分：1)N末端结构域，它含有保守高尔基体(Golgi)特异性序列和实现膜插入的两个棕榈酰化位点，和2)微管解聚蛋白样结构域，它含有各自结合微管蛋白的两个微管蛋白结合重复(TBR1和TBR2)；具有两个磷酸化位点的富含脯氨酸的结构域(PRD)，它可由JNK调节以潜在地调节STMN2与微管蛋白相互作用的能力并促进STMN2降解；和微管解聚蛋白N末端结构域(SLDN)，它含有抑制微管蛋白聚合的肽。根据PhosphositePlus鉴别的翻译后修饰(PTM)沿着蛋白质结构来标记。图80B显示报道的STMN2蛋白的亚细胞定位。STMN2定位于高尔基体并发现于在整个树突和轴突中运输的小泡中，并且集中在发育中的神经元的生长锥以及损伤后的再生轴突尖端中。

[0113] 图81提供STMN2的TDP-43调控的所提出模型。ALS的病理性标志是TDP-43的核丧失和它的聚集。我们提出STMN2的TDP-43调控的模型，其中它结合到STMN2前mRNA外显子1与2之间的内含子上。TDP-43水平的降低或核外出导致早期多腺苷酸化和隐性外显子的剪接，从而产生截短的STMN2 mRNA转录物。钝化转录物编码推定的17个氨基酸的多肽，因此导致STMN2蛋白的水平降低。STMN2的丧失导致损伤后的神经突生长和轴突修复减少。

[0114] 图82显示反义寡核苷酸和它们相对于STMN2序列的位置。指示ASO与STMN2基因座的序列、化学和比对。突出显示人基因的显著特征，包括剪接受体位点(水鸭色)、推定的编码区(黄色)、终止密码子(红色)、TDP-43结合基序(橙色)和聚A信号(紫色)。以黄色突出显示的ASO具有锁定核酸化学。

[0115] 图83A至图83C检查STMN2前mRNA的含隐性外显子区域。图83A提供STMN2前mRNA的含隐性外显子区域的序列，其中突出显示各个显著特征。图83B至图83C提供STMN2前mRNA的含隐性外显子区域的预测的RNA结构，显示以绿色突出显示的区域部分未结构化且可采用具有相似能量的不同结合相互作用。

[0116] 图84A至图84D展示患者特异性诱导的多能干细胞表征。图84A提供显示未分化的患者iPS细胞的显微照片。图84B提供在所指示iPS细胞系中从TBK1的外显子8扩增的PCR产物的测序色谱图，确认患者细胞系中不显著的杂合L306I非病理性变体。图84C至图84D提供显示从患者iPS细胞分化的运动神经元的显微照片。

[0117] 图85A至图85B展示在患者神经元中观察到的减少的核TDP-43。图85A提供针对TDP-43(红色)、β-III微管蛋白(绿色)进行免疫染色且用标记核的DAPI(蓝色)复染的对照和患者神经元的代表性显微照片。比例尺，100μm。图85B提供比较对照神经元与患者的TDP-43免疫染色和DAPI荧光的皮尔森相关分析。圆点代表单个细胞且显示为来自n＝4个对照细胞系和1个患者细胞系的至少25个细胞的平均值和s.d.(不成对t测试，双侧，$P<0.05$)。

[0118] 图86A至图86C展示，患者运动神经元响应TDP-43清除而产生截短的STMN2。在从患者iPS细胞分化的运动神经元中，在通过siTARDBP进行TDP-43基因敲低后，通过qRT-PCR分析而分析的RNA水平。图86A显示TDP-43的RNA水平。图86B显示全长STMN2的RNA水平。图86C显示与对照(siCTRL)相比，隐性STMN2的RNA水平。

[0119] 图87A至图87C展示患者STMN2基因座测序。图87A显示患者iPS细胞系中从STMN2的第一内含子扩增的PCR产物的测序结果，它与参考序列进行比对。图87B鉴别出患者与由常见单核苷酸变体(SNP)组成的参考序列之间的一个错配。图87C提供，从STMN2的第一内含子的ASO靶向区域扩增的PCR产物的测序色谱图确认在此基因座处无杂合且突出显示ASO的匹配。

[0120] 图88A至图88B展示患者运动神经元中具有SJ+94ASO(SEQ ID NO:73)的隐性和全长STMN2 RNA的水平。图88A显示隐性STMN2RNA水平。图88B显示在患者运动神经元中在通过siTARDP减少TDP-43后的全长STMN2 RNA水平。从左到右，将神经元与30nM、3nM、0.3nM或0.03nM的STMN2靶向ASO(SJ+94)或非靶向对照ASO(NTC)一起培养。

[0121] 图89展示，由于患者运动神经元中TDP43的核清除，ASO SJ+94在阻抑后使全长STMN2 RNA增加。在患者神经元中用MG-132(1μM)进行蛋白酶体抑制后全长STMN2的qRT-PCR分析产生减少的STMN2表达，所述蛋白酶体抑制诱导TDP-43的核清除。在这些条件下与用非靶向对照ASO(NTC)处理的那些RNA相比，ASO SJ+94使全长STMN2RNA增加。

[0122] 图90展示在通过siRNA减少TDP-43后，STMN2蛋白水平的免疫印迹分析。通过BCA将蛋白质输入标准化，并且相对于用对照siRNA处理的hMN中的水平来表示STMN2水平。数据显示为来自n＝3个独立实验的技术重复的平均值和s.d.(不成对t测试，双侧，$P<0.05$)。

[0123] 图91A至图91E展示，患者运动神经元中TDP-43清除后的生长缺陷可通过STMN2 ASO SJ+94来挽救。图91A概述用于评价轴突损伤后hMN中的STMN2恢复的细胞效应的实验策

略。图91B提供在轴突切断术后18小时，微流体装置中患者运动神经元的代表性显微照片。来自NTC和SJ+94的由红色矩形突出显示的视野分别在图像(i)和(ii)中放大。图91C显示，显示为圆点的单个神经突的长度以及平均值和标准偏差。(不成对t测试，双侧)。图91D提供在轴突切断术后18小时，微流体装置中患者运动神经元的代表性显微照片。来自NTC和SJ-1的由红色矩形突出显示的视野分别在图像(i)和(ii)中放大。图91C显示，显示为圆点的单个神经突的长度以及平均值和标准偏差。(不成对t测试，双侧)。

[0124] 图92展示，TDP-43清除后的神经突生长缺陷可通过STMN2 ASO SJ-1、SJ+94和SJ+101来挽救。单个神经突显示为圆点。

[0125] 图93展示，STMN2可通过STMN2 ASO SJ-1、SJ+94和SJ+101在TDP-43清除的神经元中恢复。

[0126] 图94展示，在TDP-43清除的神经元中，cry STMN2可通过STMN2ASO SJ-1、SJ+94和SJ+101减少。

[0127] 图95A至图95B展示患者运动神经元中具有SJ-1ASO的隐性和全长STMN2 RNA的水平。图95A显示隐性STMN2 RNA水平。图95B显示在患者运动神经元中通过siTARDBP(siTDP-43)减少TDP-43后全长STMN2 RNA水平。从左到右，将神经元与30nM、3nM、0.3nM或0.03nM的STMN2靶向ASO(SJ-1)或非靶向对照ASO(NTC)一起培养。

[0128] 图96展示，由于患者运动神经元中TDP3的核错误定位，ASO SJ-1在阻抑后使全长STMN2 RNA增加：在患者神经元中用MG-132(1μM)进行蛋白酶体抑制后全长STMN2的qRT-PCR分析产生减少的STMN2表达，所述蛋白酶体抑制诱导TDP-43的核错误定位。在这些条件下与用非靶向对照ASO(NTC)处理的那些RNA相比，ASO SJ-1使全长STMN2 RNA增加。

[0129] 图97展示在患者运动神经元中，在通过siRNA减少TDP-43后，通过蛋白质印迹测量的STMN2蛋白水平。通过总蛋白质含量将蛋白质负载标准化，并且相对于用对照siCTRL处理的hMN中的水平来表示STMN2水平。数据显示为来自n＝3个独立实验的技术重复的平均值和s.d.。与非靶向对照(NTC)相比，通过SJ-1、SJ+94和SJ+101诱导的STMN2水平增加的p值指示在每一结果的上方。所述增加在每一情况下是显著的(不成对t测试，双侧，$P<0.05$)。

具体实施方式

[0130] RNA结合蛋白TDP-43的错误定位或清除会导致编码微管调控剂的STMN2表达减少。STMN2为正常轴突生长和再生所必需。TDP-43功能降低产生无效或改变的STMN2 RNA序列，从而导致STMN2蛋白表达减少。STMN2可为疾病风险(例如神经变性疾病)的有前途的治疗靶和生物标记物。

[0131] 本文所述的工作涉及用于阻抑或防止在STMN2 mRNA中纳入隐性外显子的组合物和方法。在STMN2 mRNA中纳入隐性外显子可能产生截短的转录物和蛋白质。在一些方面中，纳入隐性外显子导致早期多腺苷酸化。STMN2表达可通过阻抑在TDP-43变得钳合或功能降低时出现的STMN2的隐性剪接形式来恢复，例如通过阻断隐性形式的出现或累积并将其转化回或恢复功能性STMN2 RNA(例如通过施用反义寡核苷酸)。此外，本文所述的工作涉及用于增加STMN2的蛋白质合成、即增加STMN2蛋白表达的组合物和方法。

[0132] 剂和药物组合物

[0133] 本公开涵盖特异性结合STMN2 mRNA、前mRNA或初生RNA序列的剂(例如反义寡核苷

酸)，所述STMN2 mRNA、前mRNA或初生RNA序列在TDP-43功能下降或TDP病理发生时出现且丰度增加，由此阻抑或防止纳入无效或改变的STMN2 RNA序列。在一些方面中，剂防止STMN2蛋白降解。在一些方面中，剂恢复STMN2蛋白水平。在一些方面中，剂阻抑或防止在STMN2 RNA中纳入隐性外显子。在某些方面中，剂特异性结合编码隐性外显子的STMN2 mRNA、前mRNA或初生RNA序列。

[0134] 在一些方面中，本公开还涵盖特异性结合ELAVL3 mRNA、前mRNA或初生RNA序列的剂(例如反义寡核苷酸)。当TDP-43功能下降或TDP病理发生时，ELAVL3可能下调。在一些方面中，剂阻抑或防止ELAVL3的隐性剪接。

[0135] 在一些实施方案中，剂(例如反义寡核苷酸)结合到STMN2 RNA序列(例如无效或改变的STMN2 RNA序列)。在一些方面中，剂与短的无效或改变的STMN2 RNA序列的结合导致RNA聚合酶的持续产生。例如，剂可直接阻抑隐性外显子的多腺苷酸化位点处的早熟转录终止，或可模拟TDP-43在它的靶位点的结合活性，由此改变隐性外显子处的转录终止。在一些方面中，剂阻抑或防止在STMN2 RNA中纳入隐性外显子。在一些方面中，剂防止STMN2蛋白降解。在一些方面中，剂增加STMN2水平(例如通过外显子跳跃)。在一些方面中，剂恢复正常长度或蛋白质编码STMN2 RNA(例如前mRNA或mRNA)。在一些方面中，剂增加STMN2 RNA的量或活性。在一些方面中，剂增加STMN2的蛋白质表达。

[0136] 术语“增加的”或“增加”在本文中使用且通常意指增加统计学上显著的量；为避免任何疑问，术语“增加的”或“增加”意指与参考水平相比增加至少10％，例如与参考水平相比增加至少约20％、或至少约30％、或至少约40％、或至少约50％、或至少约60％、或至少约70％、或至少约80％、或至少约90％、或高达且包括增加100％、或10％-100％之间的任何增加，或与参考水平相比增加至少约2倍、或至少约3倍、或至少约4倍、或至少约5倍、或至少约10倍、或2倍与10倍或更大之间的任何增加。

[0137] 在一些方面中，剂使STMN2 RNA的量或活性增加至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、或至少约10倍。在一些方面中，剂使STMN2蛋白表达增加至少约2倍、至少约3倍、至少约4倍、至少约5倍、至少约6倍、至少约7倍、至少约8倍、至少约9倍、或至少约10倍。

[0138] 在一些实施方案中，剂(例如反义寡核苷酸)靶向STMN2转录物的一个或多个位点，例如5’剪接位点、3’剪接位点、正常结合位点和/或多腺苷酸化位点。在一些方面中，剂靶向STMN2转录物的一个或多个位点，例如靠近5’剪接位点的位点、靠近3’剪接位点的位点、靠近正常结合位点的位点和/或靠近多腺苷酸化的位点。在某些实施方案中，剂靶向一个或多个位点，包括由TDP-43调控的5’剪接位点、TDP-43正常结合位点和/或隐性多腺苷酸化位点。在一些实施方案中，剂靶向单股位点。在某些实施方案中，剂靶向位于TDP-43结合位点与多腺苷酸化位点之间的单股区域。在一些实施方案中，剂靶向靠近隐性剪接位点的位点。在一些实施方案中，剂靶向靠近早熟多腺苷酸化位点的位点。在一些实施方案中，剂靶向位于隐性剪接位点与早熟多腺苷酸化位点之间的区域。在一些实施方案中，剂不靶向或结合到多腺苷酸化位点。在一些实施方案中，剂不靶向或结合到STMN2转录物的多腺苷酸化位点。在一些实施方案中，剂不靶向或结合到隐性多腺苷酸化位点。在一些方面中，剂靶向且促进STMN2外显子2到外显子1的剪接。

[0139] STMN2外显子1可具有以下序列：

[0140] AGCTCCTAGGAAGCTTCAGGGCTTAAAGCTCCACTCTACTTGGACTGTACTATCAGGCCCCCAAAATGGGGGGAGCCGACAGGGAAGGACTGATTTCCATTTCAAACTGCATTCTGGTACTTTGTACTCCAGCACCATTGGCCGATCAATATTTAATGCTTGGAGATTCTGACTCTGCGGGAGTCATGTCAGGGGACCTTGGGAGCCAATCTGCTTGAGCTTCTGAGTGATAATTATTCATGGGCTCCTGCCTCTTGCTCTTTCTCTAGCACGGTCCCACTCTGCAGACTCAGTGCCTTATTCAGTCTTCTCTCTCGCTCTCTCCGCTGCTGTAGCCGGACCCTTTGCCTTCGCCACTGCTCAGCGTCTGCACATCCCTACAATGGCTAAAACAGCAATGGGACTCGGCAGAAGACCTTCGAGAGAAAGGTAGAAAATAAGAATTTGGCTCTCTGTGTGAGCATGTGTGCGTGTGTGCGAGAGAGAGAGACAGACAGCCTGCCTAAGAAGAAATGAATGTGAATGCGGCTTGTGGCACAGTTGACAAGGATGATAAATCAATAATGCAAGCTTACTATCATTTATGAATAGC(SEQ ID NO:1)。

[0141] STMN2外显子2可具有以下序列：

[0142] CCTACAAGGAAAAAATGAAGGAGCTGTCCATGCTGTCACTGATCTGCTCTTGCTTTTACCCGGAACCTCGCAACATCAACATCTATACTTACGATGG(SEQ ID NO:2)。

[0143] 隐性外显子可具有以下序列:GACTCGGCAGAAGACCTTCGAGAGAAAGGTAGAAAATAAGAATTTGGCTCTCTGTGTGAGCATGTGTGCGTGTGTGCGAGAGAGAGAGACAGACAGCCTGCCTAAGAAGAAATGAATGTGAATGCGGCTTGTGGCACAGTTGACAAGGATGATAAATCAATAATGCAAGCTTACTATCATTTATGAATAGC(SEQ ID NO:3)。

[0144] 可用剂的示例性类型包括小的有机或无机分子;糖精;寡糖;多糖;选自由肽、蛋白质、肽类似物和衍生物组成的组的生物大分子;拟肽;选自由siRNA、shRNA、反义RNA、核糖酶和适体组成的组的核酸;从选自由细菌、植物、真菌、动物细胞和动物组织组成的组的生物材料制得的提取物;天然或合成组合物;抗体;和其任一组合。

[0145] 在一些实施方案中,剂是寡核苷酸、蛋白质或小分子。在一些实施方案中,剂包含一个或多个寡核苷酸。在一些方面中,寡核苷酸是剪接切换寡核苷酸。在某些方面中,寡核苷酸是反义寡核苷酸(ASO)。在一些实施方案中,剂并非反义寡核苷酸。在一些实施方案中,剂是能够结合到靶位点(例如STMN2转录物)且改变靶代谢的小分子(例如布拉扑兰(Branaplam,Novartis)或利司扑兰(Risdiplam,Roche))。

[0146] 在一些实施方案中,剂是寡核苷酸、蛋白质或小分子。在一些实施方案中,剂包含一个或多个寡核苷酸。包含多个寡核苷酸的剂可视为多聚体化合物。在一些方面中,剂包含寡核苷酸的一个或多个拷贝。在一些方面中,剂包含多个寡核苷酸的一个或多个拷贝。在一些方面中,多个寡核苷酸可共价连接。在一些方面中,寡核苷酸是剪接切换寡核苷酸。在某些方面中,寡核苷酸是反义寡核苷酸(ASO)。在一些实施方案中,剂是能够结合到靶位点(例如STMN2转录物)且改变靶代谢的小分子(例如布拉扑兰(Novartis)或利司扑兰(Roche))。在一些方面中,剂不展现毒性,例如血小板毒性。

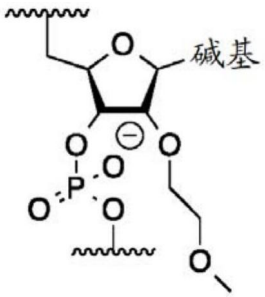
[0147] 剂可靶向5'剪接位点、3'剪接位点、正常结合位点或多腺苷酸化位点中的一个或多个。在一些方面中,剂靶向STMN2转录物的靠近5'剪接位点的位点、靠近3'剪接位点的位点、靠近正常结合位点的位点和/或靠近多腺苷酸化的位点中的一个或多个。在一些实施方案中,剂靶向靠近隐性剪接位点的位点。在一些实施方案中,剂靶向靠近早熟多腺苷酸化位点的位点。在一些实施方案中,剂靶向STMN2转录物的单股区域。在一些实施方案中,剂靶向位于TDP-43结合位点与多腺苷酸化位点之间的单股区域。在一些实施方案中,剂靶向位于隐性剪接位点与早熟多腺苷酸化位点之间的区域。在一些方面中,多腺苷酸化位点是STMN2

转录物的多腺苷酸化位点。在一些方面中，多腺苷酸化位点是隐性外显子的多腺苷酸化位点(例如是隐性多腺苷酸化位点)。在一些实施方案中，剂不靶向5'剪接位点(例如TDP-43 5'剪接位点)。在一些实施方案中，剂不靶向正常结合位点(例如正常TDP-43结合位点)。在一些实施方案中，剂不靶向多腺苷酸化位点(例如隐性多腺苷酸化位点)。在一些方面中，

[0148] 在某些实施方案中，反义寡核苷酸可靶向5'剪接位点、3'剪接位点、正常结合位点或多腺苷酸化位点中的一个或多个。在一些实施方案中，反义寡核苷酸不靶向5'剪接位点(例如TDP-43 5'剪接位点)。在某些方面中，反义寡核苷酸靶向STMN2转录物的靠近5'剪接位点的位点、靠近3'剪接位点的位点、靠近正常结合位点的位点和/或靠近多腺苷酸化的位点中的一个或多个。在一些实施方案中，反义寡核苷酸靶向STMN2转录物的单股区域。在某些实施方案中，反义寡核苷酸靶向位于TDP-43结合位点与多腺苷酸化位点之间的单股区域。在一些实施方案中，反义寡核苷酸靶向靠近隐性剪接位点的位点，例如靶向隐性剪接位点-1处的位点。在一些实施方案中，反义寡核苷酸靶向靠近早熟多腺苷酸化位点的位点。在一些实施方案中，反义寡核苷酸靶向位于隐性剪接位点与早熟多腺苷酸化位点之间的区域。在一些方面中，反义寡核苷酸靶向相对于隐性剪接接头+90到+105、或更具体来说+94或+101的区域。在一些实施方案中，反义寡核苷酸不靶向正常结合位点(例如正常TDP-43结合位点)。在一些实施方案中，反义寡核苷酸不靶向多腺苷酸化位点(例如隐性多腺苷酸化位点)。

[0149] 在某些实施方案中，反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-85组成的组的序列。在一些实施方案中，反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-74组成的组的序列。在一些方面中，反义寡核苷酸包含选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:78。在某些方面中，反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:52。在一些实施方案中，反义寡核苷酸包含选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:73。在一个实施方案中，反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:73。在一个实施方案中，反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:53。在一个实施方案中，反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:72。

[0150] 表1提供示例性反义寡核苷酸、和在一些情况下STMN2内含子内的相应靶位点的列表。SEQ ID NO:93-108内加下划线的碱基代表侧接隐性剪接位点的碱基。SEQ ID NO:112-114内加下划线的碱基代表TDP-43蛋白的结合位点。本文所述的寡核苷酸是使用多种化学修饰来合成。例如，SEQ ID NO:37-74的反义寡核苷酸是使用具有以下结构的MOE糖：

[0151] 

[0152] 和硫代磷酸酯键进行完全修饰。还可测试其它修饰。

[0153] 表1:寡核苷酸

[0154]

名称	寡核苷酸序列	靶位点
SJ-24	TATGAATATAATTTTAAA (SEQ ID NO: 37)	TTTAAAATTATATTCATA (SEQ ID NO: 91)
SJ-20	GCAATATGAATATAATTT (SEQ ID NO: 38)	AAATTATATTCATATTGC (SEQ ID NO: 92)
SJ-18	CTGCAATATGAATATAAT (SEQ ID NO: 39)	ATTATATTCATATTGCAG (SEQ ID NO: 93)
SJ-16	TC CTGCAATATGAATATA (SEQ ID NO: 40)	TATATTCATATTGCAG GA (SEQ ID NO: 94)
SJ-14	AGTC CTGCAATATGAATA (SEQ ID NO: 41)	TATTCATATTGCAG GACT (SEQ ID NO: 95)
SJ-13	GAGTC CTGCAATATGAAT (SEQ ID NO: 42)	ATTCATATTGCAG GACTC (SEQ ID NO: 96)
SJ-12	CGAGTC CTGCAATATGAA (SEQ ID NO: 43)	TTCATATTGCAG GACTCG (SEQ ID NO: 97)
SJ-10	GCCGAGTC CTGCAATATG (SEQ ID NO: 44)	CATATTGCAG GACTCGGC (SEQ ID NO: 98)
SJ-9	TGCCGAGTC CTGCAATAT (SEQ ID NO: 45)	ATATTGCAG GACTCGGCA (SEQ ID NO: 99)
SJ-8	CTGCCGAGTC CTGCAATA (SEQ ID NO: 46)	TATTGCAG GACTCGGCAG (SEQ ID NO: 100)
SJ-7	TCTGCCGAGTC CTGCAAT (SEQ ID NO: 47)	ATTGCAG GACTCGGCAGA (SEQ ID NO: 101)
SJ-6	TTCTGCCGAGTC CTGCAA (SEQ ID NO: 48)	TTGCAG GACTCGGCAGAA (SEQ ID NO: 102)
SJ-5	CTTCTGCCGAGTC CTGCA (SEQ ID NO: 49)	TGCAG GACTCGGCAGAAG (SEQ ID NO: 103)
SJ-4	TCTTCTGCCGAGTC CTGC (SEQ ID NO: 50)	GCAG GACTCGGCAGAAGA (SEQ ID NO: 104)
SJ-3	GTCTTCTGCCGAGTC CTG (SEQ ID NO: 51)	CAG GACTCGGCAGAAGAC (SEQ ID NO: 105)
SJ-2	GGTCTTCTGCCGAGTC CT (SEQ ID NO: 52)	AG GACTCGGCAGAAGACC (SEQ ID NO: 106)
SJ-1	AGGTCTTCTGCCGAGTC C (SEQ ID NO: 53)	G GACTCGGCAGAAGACCT (SEQ ID NO: 107)
SJ+1	AAGGTCTTCTGCCGAGTC	GACTCGGCAGAAGACCTT

[0155]

	(SEQ ID NO: 54)	(SEQ ID NO: 108)
SJ+3	CGAAGGTCTTCTGCCGAG (SEQ ID NO: 55)	CTCGGCAGAAGACCTTCG (SEQ ID NO: 109)
SJ+6	TCTCGAAGGTCTTCTGCC (SEQ ID NO: 56)	GGCAGAAGACCTTCGAGA (SEQ ID NO: 110)
SJ+25	ATTCTTATTTTCTACCTTT (SEQ ID NO: 57)	AAAGGTAGAAAATAAGAAT (SEQ ID NO: 111)
SJ+45	CATGCTCACACAGAGAGCCA (SEQ ID NO: 58)	TGGCTCTCTGTGTGAGCATG (SEQ ID NO: 112)
SJ+47	CACATGCTCACACAGAGAGC (SEQ ID NO: 59)	GCTCTCTGTGTGAGCATGTG (SEQ ID NO: 113)
SJ+53	CACACACGCACACATGCTCACACA (SEQ ID NO: 60)	TGTGTGAGCATGTGTGCGTGTGTG (SEQ ID NO: 114)
SJ+2	GAAGGTCTTCTGCCGAGT (SEQ ID NO: 61)	
SJ+4	TCGAAGGTCTTCTGCCGA (SEQ ID NO: 62)	
SJ+5	CTCGAAGGTCTTCTGCCG (SEQ ID NO: 63)	
SJ-2 (17)	GTCTTCTGCCGAGTCCT (SEQ ID NO: 64)	
SJ-2 (19)	AGGTCTTCTGCCGAGTCCT (SEQ ID NO: 65)	
SJ-2 (20)	AAGGTCTTCTGCCGAGTCCT (SEQ ID NO: 66)	
SJ+189	TTTAATTTCTTCAGTATTGC (SEQ ID NO: 67)	
SJ+168	TATTCATAAATGATAGTAAGC (SEQ ID NO: 68)	
SJ+184	TTTAATTTCTTCAGTATTGCTATTC (SEQ ID NO: 69)	
SJ+159	ATAAATGATAGTAAGCTTGCATTAT (SEQ ID NO: 70)	
SJ+206	GAGACAGCAATCTTTTGTTTT (SEQ ID NO: 71)	
SJ+101	TTCACATTCATTTCTTCTTAG (SEQ ID NO: 72)	

[0156]

SJ+94 (20)	CATTTCTTCTTAGGCAGGCT (SEQ ID NO: 73)	
SJ+94 (28)	TTCACATTCATTTCTTCTTAGGCAGGCT (SEQ ID NO: 74)	
LNA-SJ-16	T+CCT+GCA+ATA+TGA+ATA+TA (SEQ ID NO: 75)	
LNA-SJ-13	G+AGT+CCT+GCA+ATA+TGA+AT (SEQ ID NO: 76)	
LNA-SJ-10	G+CCG+AGT+CCT+GCA+ATA+TG (SEQ ID NO: 77)	
LNA-SJ-8	C+TGC+CGA+GTC+CTG+CAA+TA (SEQ ID NO: 78)	
LNA-SJ-6	T+TCT+GCC+GAG+TCC+TGC+AA (SEQ ID NO: 79)	
LNA-SJ-4	T+CTT+CTG+CCG+AGT+CCT+GC (SEQ ID NO: 80)	
LNA-SJ-2	G+GTC+TTC+TGC+CGA+GTC+CT (SEQ ID NO: 81)	
LNA-SJ+6	T+CTC+GAA+GGT+CTT+CTG+CC (SEQ ID NO: 82)	
LNA SJ+189	+T+TTAAT+TTCTTCAG+TAT+TG+C (SEQ ID NO: 83)	
LNA SJ+168	+TA+TTCATAAA+TGA+TAG+TAAG+C (SEQ ID NO: 84)	
LNA SJ+206	GAGA+CAG+CAAT+CTT+TTGTTT+T (SEQ ID NO: 85)	
诺西那生 (nusinersen)	TCACTTTCATAATGCTGG (SEQ ID NO: 86)	
NTC	CCTATAGGACTATCCAGGAA (SEQ ID NO: 87)	
tofersen	CAGGATACATTTCTACAGCT (SEQ ID NO: 88)	
TDP-43 ASO	AAGGCTTCATATTGTACTTT (SEQ ID NO: 89)	
NC5	GCGACTATACGCGCAATATG (SEQ ID NO: 90)	

[0157] 寡核苷酸(例如反义寡核苷酸)可经设计以结合mRNA区域,所述mRNA区域防止5'帽处的核糖体组装,防止mRNA成熟期间的多腺苷酸化,或影响剪接事件(Bennett和Swayze,Annu.Rev.Phamacol.Toxicol.,2010;Watts和Corey,J.Pathol.,2012;Kole等人,Nat.Rev.Drug Discov.,2012;Saleh等人,In Exon Skipping:Methods and Protocols,2012,该等文献各自以引用方式并入本文中)。在一些方面中,寡核苷酸(例如反义寡核苷

酸)经设计以靶向一个或多个位点,包括例如5'TDP-3剪接位点或TDP-43正常结合位点。在一些方面中,寡核苷酸靶向一个或多个剪接位点。在一些方面中,寡核苷酸靶向由TDP-43调控的5'剪接位点或TDP-43正常结合位点中的一个或多个。在一些方面中,反义寡核苷酸经设计以不靶向多腺苷酸化位点(例如隐性多腺苷酸化位点)。在一些方面中,寡核苷酸靶向位于隐性剪接位点与多腺苷酸化位点之间的未结构化区域(参见图83)。

[0158] 反义寡核苷酸是小DNA序列(例如长度为约8-50个碱基对),它能够通过沃森-克里克碱基配对(Watson-Crick base pairing)靶向RNA转录物,从而减少或改进蛋白质表达。寡核苷酸由磷酸骨架和糖环构成。在一些实施方案中,寡核苷酸未经修饰。在其它实施方案中,寡核苷酸包括一个或多个修饰,例如以改善反义寡核苷酸的溶解度、结合、功效和/或稳定性。相对于未经修饰的RNA或DNA,经修饰的寡核苷酸可包含至少一个修饰。在一些实施方案中,寡核苷酸经修饰以包括核苷间键修饰、糖修饰和/或核碱基修饰。此类修饰的实例为本领域技术人员已知。

[0159] 在一些实施方案中,寡核苷酸是通过用经修饰核苷酸取代至少一个核苷酸来修饰,使得体内稳定性与相应未经修饰的寡核苷酸相比有所增强。在一些方面中,经修饰的核苷酸是糖修饰的核苷酸。在另一方面中,经修饰的核苷酸是核碱基修饰的核苷酸。

[0160] 在一些实施方案中,寡核苷酸可含有至少一种经修饰的核苷酸类似物。核苷酸类似物可位于靶特异性活性(例如剪接位点选择调节活性)基本上不受影响的位置,例如位于寡核苷酸分子的5′端和/或3′端的区域中。在一些方面中,各端可通过纳入经修饰的核苷酸类似物来稳定。

[0161] 在一些方面中,优选的核苷酸类似物包括糖和/或骨架修饰的核糖核苷酸(即,包括磷酸-糖骨架的修饰)。例如,核糖核苷酸的磷酸二酯键可经修饰以包括氮或硫杂原子中的至少一个。在优选的骨架修饰的核糖核苷酸中,连接到相邻核糖核苷酸的磷酸酯基团被例如硫代磷酸酯基团的经修饰基团替代。在优选的糖修饰的核糖核苷酸中,2′OH-基团被选自H、OR、R、卤基、SH、SR、NH2、NHR、NR2或ON的基团替代,其中R是C1-C6烷基、烯基或炔基且卤基是F、Cl、Br或I。

[0162] 在一些实施方案中,经修饰的寡核苷酸包含一个或多个经修饰核苷,所述经修饰核苷包含经修饰糖部分。在一些实施方案中,经修饰的寡核苷酸包含一个或多个经修饰核苷,所述经修饰核苷包含经修饰核碱基。在一些实施方案中,经修饰的寡核苷酸包含一个或多个经修饰的核苷间键。在某些实施方案中,经修饰的寡核苷酸包含以下中的至少两个:包含经修饰糖部分的一个或多个经修饰核苷、包含经修饰核碱基的一个或多个经修饰核苷、和一个或多个经修饰核苷间键。在某些实施方案中,经修饰的寡核苷酸包含含有经修饰糖部分的一个或多个经修饰核苷、含有经修饰核碱基的一个或多个经修饰核苷、和一个或多个经修饰核苷间键。

[0163] 糖修饰

[0164] 在一些实施方案中,经修饰糖部分是非二环修饰的糖部分。在一些实施方案中,经修饰糖部分是二环或三环糖部分。在一些实施方案中,经修饰糖部分是糖替代品。此类糖替代品可包含对应于那些其它类型的经修饰糖部分的一个或多个取代。

[0165] 在一些实施方案中,经修饰糖部分是包含具有一个或多个取代基的呋喃糖基环的非二环修饰的糖部分,所述一个或多个取代基均不桥接呋喃糖基环的两个原子以形成二环

结构。此类非桥接取代基可处于呋喃糖基的任一位置，包括(但不限于)2’位、4’位和/或5’位的取代基。在某些实施方案中，非二环修饰的糖部分的一个或多个非桥接取代基是支链的。

[0166] 在一些实施方案中，经修饰糖部分包含桥接呋喃糖基环的两个原子以形成第二环的取代基，从而产生二环糖部分。在一些方面中，二环糖部分包含4’呋喃糖环原子与2’呋喃糖环原子之间的桥。

[0167] 在一些方面中，二环糖部分和纳入此类二环糖部分的核苷由异构构型进一步定义。在一些实施方案中，LNA核苷呈α-L构型。在一些实施方案中，LNA核苷呈β-D构型。

[0168] 在一些实施方案中，寡核苷酸修饰包括锁定核酸(LNA)，其中2′-羟基连接到糖环的3′或4′碳原子，由此形成二环糖部分。键优选地是桥接2′氧原子和4′碳原子的亚甲基(—CH2—)n基团，其中n是1或2。LNA和其制备描述于WO 98/39352和WO 99/14226中，所述专利的全部内容均以引用方式并入本文中。

[0169] 在一些实施方案中，经修饰糖部分包含一个或多个非桥接糖取代基和一个或多个桥接糖取代基(例如5’-取代的糖和4’-2’桥接的糖)。

[0170] 在一些实施方案中，经修饰糖部分是糖替代品。在一些方面中，糖部分的氧原子被例如硫、碳或氮原子替代。在一些方面中，此类经修饰糖部分还包含如本文所述的桥接和/或非桥接取代基。在一些方面中，糖替代品包含具有不为5个原子的环。在某些方面中，糖替代品包含6元四氢吡喃(THP)。在一些方面中，糖替代品包含非环状部分。

[0171] 核碱基修饰

[0172] 经修饰的寡核苷酸可包含含有未经修饰的核碱基的一个或多个核苷。在一些实施方案中，经修饰的寡核苷酸包含含有经修饰核碱基的一个或多个核苷。在一些实施方案中，经修饰的寡核苷酸包含不含核碱基的一个或多个核苷。

[0173] 在某些实施方案中，经修饰核碱基选自:5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶、烷基或炔基取代的嘧啶、烷基取代的嘌呤以及N-2、N-6和O-6取代的嘌呤。在某些实施方案中，经修饰核碱基选自:2-氨基丙基腺嘌呤、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、6-N-甲基鸟嘌呤、6-N-甲基腺嘌呤、2-丙基腺嘌呤、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶、5-丙炔基(-C℃-C]3/4)尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、6-偶氮胞嘧啶、6-偶氮胸腺嘧啶、5-核糖基尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤基、8-氨基、8-硫醇、8-硫烷基、8-羟基、8-氮杂和其它8-取代的嘌呤、5-卤基，特别是5-溴、5-三氟甲基、5-卤尿嘧啶和5-卤胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤、7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、3-脱氮鸟嘌呤、3-脱氮腺嘌呤、6-N-苯甲酰基腺嘌呤、2-N-异丁基鸟嘌呤、4-N-苯甲酰基胞嘧啶、4-N-苯甲酰基尿嘧啶、5-甲基4-N-苯甲酰基胞嘧啶、5-甲基4-N-苯甲酰基尿嘧啶、通用碱基、疏水碱基、混杂碱基、大小扩大的碱基和氟化碱基。其他经修饰核碱基包括三环嘧啶，例如1,3-二氮杂吩噁嗪-2-酮、1,3-二氮杂吩噻嗪-2-酮和9-(2-氨基乙氧基)-1,3-二氮杂吩噁嗪-2-酮(G-钳)。经修饰核碱基还可包括其中嘌呤或嘧啶碱基被其它杂环替代的那些核碱基，例如7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮鸟苷、2-氨基吡啶和2-吡啶酮。

[0174] 同样优选的是核碱基修饰的核糖核苷酸，即含有至少一个非天然核碱基而非天然核碱基的核糖核苷酸。经修饰核碱基的实例包括(但不限于)5位的尿苷和/或胞苷修饰，例如5-(2-氨基)丙基尿苷、5-溴尿苷;在8位经修饰的腺苷和/或鸟苷，例如8-溴鸟苷;脱氮核

苷酸，例如7-脱氮-腺苷；O-烷基化和N-烷基化核苷酸，例如N6-甲基腺苷。本发明的寡核苷酸试剂还可用改善寡核苷酸试剂的体内药理学特性的化学部分来修饰。

[0175] 核苷间修饰

[0176] 在一些实施方案中，经修饰寡核苷酸的核苷使用任一核苷间键连接到一起。核苷间连接基团的两个主要类别通过磷原子的存在或不存在来定义。代表性含磷核苷间键包括(但不限于)磷酸酯，它含有磷酸二酯键(“P＝O”)(也称为未经修饰的键或天然键)、磷酸三酯、甲基膦酸酯、氨基磷酸酯以及硫代磷酸酯(“P＝S”)和二硫代磷酸酯(“HS-P＝S”)。代表性不含磷核苷间连接基团包括(但不限于)亚甲基甲基亚氨基(-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-)、硫代二酯、硫羰氨基甲酸酯(-O-C(＝O)(NH)-S-)；硅氧烷(-O-SiH_2-O-)；和N,N’-二甲基肼(-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-)。与天然磷酸酯键相比，经修饰核苷间键可用于改变、通常增加寡核苷酸的核酸酶抗性。在某些实施方案中，具有手性原子的核苷间键可制备为外消旋混合物或单独的对映异构体。制备含磷和不含磷核苷间键的方法为本领域技术人员所熟知。

[0177] 其它修饰为本领域技术人员已知且实例可参见WO 2019/241648、US 10,307,434、US 9,045,518和US 10,266,822，该等专利中的每一个以引用方式并入本文中。

[0178] 寡核苷酸可具有足以靶向无效或改变的STMN2 RNA的任一大小和/或化学组成。在一些实施方案中，寡核苷酸介于约5-300个核苷酸或经修饰核苷酸之间。在一些方面中，寡核苷酸介于约10-100个、15-85个、20-70个、25-55个或30-40个核苷酸或经修饰核苷酸之间。在某些方面中，寡核苷酸介于约15-35个、15-20个、20-25个、25-30个或30-35个核苷酸或经修饰核苷酸之间。

[0179] 在一些实施方案中，寡核苷酸和靶RNA序列(例如无效或改变的STMN2 RNA)具有100％序列互补性。在一些方面中，相对于靶序列，寡核苷酸可包含序列变化，例如插入、缺失和单点突变。在一些实施方案中，寡核苷酸与靶RNA(例如STMN2 mRNA、前mRNA或初生RNA)具有至少70％序列同一性或互补性。在某些实施方案中，寡核苷酸与靶序列具有至少70％、75％、80％、85％、90％、95％、97％、99％或100％序列同一性。

[0180] 靶向无效或改变的STMN2 RNA序列(例如STMN2 mRNA、前mRNA或初生RNA序列)的反义寡核苷酸可通过本领域技术人员已知的任何方法来设计。在某些方面中，一个或多个寡核苷酸是合成的。

[0181] 在一些实施方案中，STMN2是作为基因疗法施用。在一些实施方案中，STMN2是与本文所述的剂组合施用。

[0182] 在一些实施方案中，剂是c-Jun N末端激酶(JNK)的抑制剂。在一些方面中，JNK抑制剂选自由以下组成的组：小的有机或无机分子；糖精；寡糖；多糖；选自由肽、蛋白质、肽类似物和衍生物组成的组的生物大分子；拟肽；选自由siRNA、shRNA、反义RNA、核糖酶和适体组成的组的核酸；从选自由细菌、植物、真菌、动物细胞和动物组织组成的组的生物材料制得的提取物；天然或合成组合物；抗体；和其任一组合。在某些方面中，剂是小分子抑制剂、寡核苷酸(例如经设计以减少JNK的表达)或基因疗法(例如经设计以抑制JNK)。在一些方面中，抑制JNK会恢复或增加STMN2蛋白水平。在某些实施方案中，剂是靶向JNK的寡核苷酸(例如反义寡核苷酸)。

[0183] 本公开还涵盖药物组合物，所述药物组合物包含结合无效或改变的STMN2 RNA序列的剂(例如反义寡核苷酸)。在一些实施方案中，药物组合物包含结合编码隐性外显子的

STMN2 mRNA、前mRNA或初生RNA序列的剂。在一些实施方案中，药物组合物包含防止STMN2蛋白降解的剂。在一些实施方案中，药物组合物包含增加STMN2蛋白的表达、例如激活STMN2蛋白表达的剂。在一些方面中，组合物包含寡核苷酸、蛋白质或小分子。在一些实施方案中，组合物包含寡核苷酸(例如反义寡核苷酸)，其中寡核苷酸特异性结合编码隐性外显子的STMN2 mRNA、前mRNA或初生RNA序列。在一些方面中，剂(例如反义寡核苷酸)阻抑或防止在STMN2 RNA中纳入隐性外显子。在一些方面中，剂阻抑隐性剪接。

[0184] 在一些实施方案中，药物组合物包含靶向一个或多个位点(例如一个或多个剪接位点、结合位点或多腺苷酸化位点)的剂(例如反义寡核苷酸)。在一些实施方案中，药物组合物包含靶向一个或多个剪接位点(例如由TDP-43调控的5'剪接位点)的剂。在一些实施方案中，药物组合物包含靶向正常结合位点(例如TDP-43正常结合位点)的剂。在一些实施方案中，药物组合物包含靶向多腺苷酸化位点(例如隐性多腺苷酸化位点)的剂。在一些实施方案中，药物组合物包含靶向靠近隐性剪接位点的位点或靠近多腺苷酸化位点(例如早熟多腺苷酸化位点)的位点的剂。在一些实施方案中，药物组合物包含靶向位于隐性剪接位点与多腺苷酸化位点之间的位点的剂。在一些实施方案中，药物组合物包含不靶向一个或多个剪接位点(例如由TDP-43调控的5'剪接位点)的剂。在一些实施方案中，药物组合物包含不靶向正常结合位点(例如TDP-43正常结合位点)的剂。在一些实施方案中，药物组合物包含不靶向多腺苷酸化位点(例如隐性多腺苷酸化位点)的剂。

[0185] 在一些方面中，药物组合物包含多聚体化合物，例如包含两种或多种反义寡核苷酸的化合物。两种或多种反义寡核苷酸可包含具有相同序列的两种或多种反义寡核苷酸，或替代地可包含具有不同序列的两种或多种反义寡核苷酸。在一些方面中，两种或多种反义寡核苷酸是共价连接的。在一些方面中，药物组合物包含两种或多种反义寡核苷酸。两种或多种反义寡核苷酸可包含相同反义寡核苷酸的多个拷贝和/或多个不同反义寡核苷酸的单个拷贝的组合。

[0186] 在某些实施方案中，药物组合物包含含有选自由SEQ ID NO:37-85组成的组的序列的反义寡核苷酸。在一些实施方案中，药物组合物包含含有选自由SEQ ID NO:37-74组成的组的序列的反义寡核苷酸。在一些方面中，药物组合物包含反义寡核苷酸，所述反义寡核苷酸包含选自由以下组成的组的序列：SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:78。在某些方面中，药物组合物包含含有SEQ ID NO:52的反义寡核苷酸。在一些实施方案中，药物组合物包含反义寡核苷酸，所述反义寡核苷酸包含选自由以下组成的组的序列：SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:73。在某些实施方案中，药物组合物包含含有SEQ ID NO:73的反义寡核苷酸。

[0187] 在一些实施方案中，药物组合物包含有效量的结合编码隐性外显子的STMN2 mRNA序列的剂(例如反义寡核苷酸)和有效量的第二剂。在一些方面中，第二剂是治疗或抑制神经变性病症的剂。在一些方面中，第二剂是治疗或抑制创伤性脑损伤的剂。在一些方面中，第二剂是治疗或抑制蛋白酶体抑制剂诱发的神经病的剂。

[0188] 在一些实施方案中，药物组合物包含有效量的结合到无效或改变的STMN2 RNA序列的剂(例如反义寡核苷酸)和有效量的STMN2(例如作为基因疗法施用)。

[0189] 在一些实施方案中，药物组合物包含有效量的结合到无效或改变的STMN2 RNA序

列的第一剂(例如反义寡核苷酸)和抑制JNK的第二剂。

[0190] 在一些实施方案中,药物组合物包含有效量的结合编码隐性外显子的STMN2 mRNA、前mRNA或初生RNA序列的剂(例如反义寡核苷酸)、有效量的第二剂和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0191] 包含结合到无效或改变的STMN2 RNA序列的剂(例如反义寡核苷酸)的组合物可用于治疗与TDP-43功能下降或TDP病理相关的疾病或疾患。在一些方面中,包含结合到无效或改变的STMN2 RNA序列的剂(例如反义寡核苷酸)的组合物可用于治疗与如本文所述STMN2蛋白的突变或降低的水平(例如在神经元细胞中)相关的疾病或疾患。

[0192] 治疗方法

[0193] 本公开涵盖使用包含恢复正常长度或蛋白质编码STMN2 RNA的剂(例如反义寡核苷酸)的组合物的多种治疗方法。在一些方面中,剂(例如反义寡核苷酸)特异性结合STMN2 mRNA、前mRNA或初生RNA序列,所述STMN2 mRNA、前mRNA或初生RNA序列在TDP-43功能下降或TDP病理发生时出现且丰度增加,由此阻抑或防止纳入无效或改变的STMN2 RNA序列。在一些方面中,剂恢复正常全长或蛋白质编码STMN2 RNA的表达。在一些方面中,剂阻抑或防止在STMN2 RNA中纳入隐性外显子。在一些方面中,剂激活STMN2的蛋白质表达。

[0194] 在一些方面中,本公开涵盖治疗任一疾病或疾患,其中疾病与TDP-43功能下降或TDP病理相关。在一些实施方案中,本文公开的发明涉及治疗神经元细胞中突变或降低的TDP-43水平(例如具有TDP-43相关病理的疾病或疾患)的方法。在一些实施方案中,本文公开的发明涉及治疗TDP-43相关痴呆(例如ALS、FTD、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病或TBI)的方法。

[0195] 在一些实施方案中,本文公开的发明涉及治疗与突变、增加或降低的TDP-43水平相关的疾病或疾患的方法。在一些实施方案中,本文公开的发明涉及治疗与TDP-43错误定位相关的疾病或疾患的方法。在一些实施方案中,本文公开的发明涉及治疗与突变或降低的STMN2蛋白水平和/或STMN2蛋白的错误定位相关的疾病或疾患的方法。在一些实施方案中,本文公开的发明涉及治疗与蛋白酶体抑制剂诱发的神经病(例如因功能性核TDP-43的量减少而发生的神经病)相关的疾病或疾患的方法。在一些实施方案中,本文公开的发明涉及治疗神经变性病症的方法。在一些实施方案中,本文公开的发明涉及治疗与TBI相关或因TBI而发生的病症或疾患(例如脑震荡)的方法。

[0196] 在一些方面中,突变或降低的TDP-43(例如核TDP-43)水平导致突变或降低的STMN2蛋白水平。TDP-43的错误定位可导致胞质溶胶中TDP-43的水平增加,但核TDP-43的水平降低。此外,STMN2水平可因TDP-43突变而降低。在一些方面中,突变或增加的TDP-43(例如核TDP-43)水平导致突变或降低的STMN2蛋白水平。

[0197] 在一些方面中,治疗方法包括增加STMN2蛋白的水平和/或防止所述蛋白降解或延迟。在一些方面中,治疗方法包括校正突变或降低的STMN2蛋白水平。在一些方面中,治疗方法包括增加STMN2 RNA的量或活性。在一些方面中,治疗方法包括增加STMN2蛋白的量,例如增加蛋白表达的激活。在一些方面中,治疗方法包括阻抑或防止在STMN2 RNA(例如STMN2 mRNA)中纳入隐性外显子。在一些方面中,治疗方法包括挽救神经突生长和轴突再生。

[0198] 在一些实施方案中,治疗方法包括向受试者施用有效量的剂(例如反义寡核苷酸),其中剂防止STMN2蛋白降解。在一些实施方案中,治疗方法包括向受试者施用有效量的

剂,其中剂恢复正常长度或蛋白质编码STMN2 RNA。在一些实施方案中,治疗方法包括向受试者施用有效量的剂,其中剂结合到无效或改变的STMN2 RNA序列。在一些实施方案中,治疗方法包括向受试者施用有效量的剂,其中剂阻抑或防止在STMN2 RNA中纳入隐性外显子(例如在神经元细胞中)。在一些方面中,剂通过外显子跳跃增加STMN2水平。在一些方面中,剂是寡核苷酸、蛋白质或小分子。例如,剂可为特异性结合编码隐性外显子的STMN2 mRNA、前mRNA或初生RNA序列的寡核苷酸(例如反义寡核苷酸)。

[0199] 在某些实施方案中,治疗方法包括向受试者施用有效量的反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-85组成的组的序列。在一些方面中,治疗方法包括向受试者施用有效量的反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-74组成的组的序列。在一些实施方案中,治疗方法包括向受试者施用有效量的反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸包含选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:78。在一些实施方案中,治疗方法包括向受试者施用有效量的反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:52。在一些实施方案中,治疗方法包括向受试者施用有效量的反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸包含选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:73。在一些实施方案中,治疗方法包括向受试者施用有效量的反义寡核苷酸,其中反义寡核苷酸包含SEQ ID NO:73。在一些实施方案中,治疗神经变性疾病或病症(例如ALS、FTD、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病或TBI)的方法包括向受试者施用反义寡核苷酸,所述反义寡核苷酸包含选自由SEQ ID NO:37-85组成的组、或替代地选自由SEQ ID NO:37-74组成的组的序列。在一些实施方案中,治疗神经变性疾病或病症(例如ALS、FTD、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病或TBI)的方法包括向受试者施用反义寡核苷酸,所述反义寡核苷酸包含选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:78。在一些实施方案中,治疗神经变性疾病或病症(例如ALS、FTD、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病或TBI)的方法包括向受试者施用包含SEQ ID NO:52的反义寡核苷酸。在一些实施方案中,治疗神经变性疾病或病症(例如ALS、FTD、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病或TBI)的方法包括向受试者施用反义寡核苷酸,所述反义寡核苷酸包含选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:73。在一些实施方案中,治疗神经变性疾病或病症(例如ALS、FTD、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病或TBI)的方法包括向受试者施用包含SEQ ID NO:73的反义寡核苷酸。在一些实施方案中,治疗方法包括施用第二剂。

[0200] 在一些实施方案中,剂(例如反义寡核苷酸)是以有效地增加和/或恢复STMN2蛋白水平的量施用(例如体外或体内)。

[0201] 在一些方面中,剂(例如反义寡核苷酸)阻抑隐性剪接。在一些实施方案中,用阻抑或防止在STMN2 RNA中纳入隐性外显子的剂治疗的受试者展现改善的神经元(例如运动轴突)生长和/或修复。在一些方面中,剂防止STMN2蛋白降解。在一些方面中,剂改善神经变性疾病的症状,包括共济失调、神经病、突触功能障碍、认知缺陷和/或寿命缩短。

[0202] 在一些实施方案中,使用基因组编辑(例如CRISPR/Cas)来阻抑或防止在STMN2 RNA中纳入隐性外显子。

[0203] 如本文所用的“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”或“改善”

在用于提到疾病、病症或医学疾患时是指疾患的治疗性治疗，其中目标是逆转、缓和、改善、抑制、减缓或停止症状或疾患的进展或严重程度。术语“治疗”包括减轻或缓和疾患的至少一种不良效应或症状。如果一个或多个症状或临床标记物减少，那么治疗通常是“有效的”。替代地，如果疾患的进展减缓或停止，那么治疗是“有效的”。也就是说，“治疗”不仅包括改善症状或标记物，并且还包括停止或至少减缓将在治疗不存在下预期的症状的进展或恶化。有益或所需临床结果包括(但不限于)与治疗不存在下所预期相比，一个或多个症状的缓和、缺陷程度降低、稳定(即不恶化)例如神经变性病症的状态、延迟或减缓神经变性病症的进展和延长寿命。

[0204] “神经变性病症”是指涉及至少部分地由神经干细胞和/或祖细胞的至少一种退化介导或表征的神经损失的疾病病状。神经变性病症的非限制性实例包括聚谷氨酰胺扩张病症(例如HD、齿状核红核苍白球丘脑下核萎缩、肯尼迪病(Kennedy's disease，也称为脊髓延髓肌萎缩)和脊髓小脑共济失调(例如1型、2型、3型(也称为马查多-约瑟夫病(Machado-Joseph disease))、6型、7型和17型))、其它三核苷酸重复扩张病症(例如脆性X综合征、脆性XE精神发育迟缓、弗氏共济失调(Friedreich's ataxia)、营养不良性肌强直、8型脊髓小脑共济失调和12型脊髓小脑共济失调)、亚历山大病(Alexander disease)、阿耳珀病(Alper's disease)、阿尔茨海默氏病、肌萎缩侧索硬化(ALS)、共济失调毛细管扩张、巴藤病(Batten disease，也称为施-伏-斯-巴四氏病(Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten disease))、卡纳万病(Canavan disease)、科凯恩综合征(Cockayne syndrome)、皮质基底核变性、克罗伊茨费尔特-雅各布病(Creutzfeldt-Jakob disease)、吉兰-巴雷综合征(Guillain-Barrésyndrome)、缺血性中风、克拉伯病(Krabbe disease)、库鲁病(kuru)、路易体痴呆(Lewy body dementia)、多发性硬化、多系统萎缩、非亨廷顿舞蹈病(non-Huntingtonian type of Chorea)、帕金森氏病、佩-梅病(Pelizaeus-Merzbacher disease)、匹克病(Pick's disease)、原发性侧索硬化、进行性核上性麻痹、植烷酸贮积症(Refsum's disease)、桑德霍夫病(Sandhoff disease)、谢耳德病(Schilder's disease)、脊髓损伤、脊髓性肌萎缩(SMA)、斯蒂尔埃里克森-奥尔谢夫斯基病(SteeleRichardson-Olszewski disease)、额颞叶痴呆(FTD)和脊髓痨(Tabes dorsalis)。在一些情况下，神经变性病症涵盖与身体损伤(例如头部创伤、轻度至重度创伤性脑损伤(TBI)、弥漫性轴突损伤、大脑挫伤、急性脑肿胀等)相关的对CNS或PNS的神经损伤或损害。

[0205] 在一些实施方案中，神经变性病症是与神经元细胞中TDP-43的突变或降低的水平相关的病症。在一些实施方案中，神经变性病症是与突变或降低的STMN2蛋白水平和/或STMN2蛋白的错误定位相关的病症。在一些实施方案中，神经变性病症选自由以下组成的组：肌萎缩侧索硬化(ALS)、额颞叶痴呆(FTD)、额颞叶变性(FTLD)、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、包涵体肌炎(IBM)和其组合。在一些方面中，神经变性病症是ALS。在一些方面中，神经变性病症是ALS与FTD和/或FTLD的组合。在一些方面中，神经变性病症是阿尔茨海默氏病。在一些方面中，神经变性病症是帕金森氏病。

[0206] “蛋白酶体抑制剂诱发的神经病”在本文中用于指因功能性核TDP-43的量减少而发生的病症或疾患。核TDP-43的总体水平可降低，或水平降低可因TDP-43的细胞质聚集的增加而发生，此会诱导核TDP-43的排空。在一些方面中，蛋白酶体抑制导致STMN2的表达减少。

[0207] “创伤性脑损伤”或“TBI”是指当外力损伤脑时发生的颅内损伤。TBI可基于它们的严重程度(例如轻度、中度或重度)、机制(例如闭合性或穿透性头部损伤)或其它特征(例如位置)来分类。TBI可产生身体、认知、社交、情绪和行为症状。与TBI相关的疾患包括脑震荡。TBI和与TBI相关的疾患与TDP-43病理相关。在一些方面中,STMN2的变化发生在TBI或与其相关的疾患中。

[0208] 在一些实施方案中,创伤性脑损伤是或引起与神经元细胞中TDP-43的突变水平相关的病症。在一些实施方案中,创伤性脑损伤是或引起与突变或降低的STMN2蛋白水平和/或STMN2蛋白的错误定位相关的病症。在一些实施方案中,创伤性脑损伤的严重程度是基于神经元细胞中功能性TDP-43的减少来测量。在一些实施方案中,脑震荡的严重程度是基于神经元细胞中功能性TDP-43的减少来测量。

[0209] 为向受试者施用,本文公开的剂可在药学上可接受的组合物中提供。这些药学上可接受的组合物包含治疗有效量的一种或多种剂,与一种或多种药学上可接受的载体(添加剂)和/或稀释剂配制在一起。本发明的药物组合物可被特殊配制用于以固体或液体形式施用,包括适于以下的那些形式:(1)口服施用,例如灌服剂(水性或非水性溶液或悬浮液)、灌胃剂、锭剂、糖锭剂、胶囊、丸剂、片剂(例如经靶向用于颊侧、舌下和全身吸收的那些片剂)、推注、粉剂、颗粒剂、糊剂用于施用到舌;(2)肠胃外施用,例如通过皮下、肌内、鞘内、颅内、静脉内或硬膜外注射,作为例如无菌溶液或悬浮液,或持续释放制剂;(3)局部应用,例如作为施加到皮肤的乳膏、软膏或控释贴剂或喷雾;(4)阴道内或直肠内,例如作为阴道环、乳膏或泡沫;(5)舌下;(6)眼部;(7)经皮;(8)经粘膜;或(9)经鼻。此外,剂可植入患者中或使用药物递送系统来注射。(参见,例如Urquhart等人,Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.24:199-236(1984);Lewis编辑,“Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals”(Plenum Press,New York,1981);美国专利号3,773,919;和美国专利号35 3,270,960,所有所述文献的内容以引用方式并入本文中。)

[0210] 如本文所用的术语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内,适于与人和动物的组织接触使用而没有过度毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的益处/风险比相称的那些剂、材料、组合物和/或剂型。

[0211] 如本文所用的术语“药学上可接受的载体”意指参与将主题剂从身体的一个器官或部分携带或转运到身体的另一器官或部分的药学上可接受的材料、组合物或媒介物,例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、制造助剂(例如润滑剂、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸钙或硬脂酸锌或硬脂酸)或溶剂包封材料。每一载体在与制剂的其它成分相容且不损伤受试者的意义上必须是“可接受的”。可用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括:(1)糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素和它的衍生物,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素和乙酸纤维素;(4)粉末状黄蓍胶;(5)麦芽;(6)明胶;(7)润滑剂,例如硬脂酸镁、月桂基硫酸钠和滑石;(8)赋形剂,例如可可脂和栓剂蜡;(9)油,例如花生油、棉籽油、红花油、麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10)二醇,例如丙二醇;(11)多元醇,例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇(PEG);(12)酯,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏溶液(Ringer’s solution);(19)乙醇;(20)pH缓冲溶液;(21)聚酯、聚碳酸酯和/或聚酸酐;(22)增量剂,例如多肽和氨基酸;(23)血清组分,例如

血清白蛋白、HDL和LDL；(22)C_2-C_{12}醇，例如乙醇；和(23)用于药物制剂中的其它无毒相容性物质。润湿剂、着色剂、脱模剂、包衣剂、甜味剂、调味剂、芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可存在于制剂中。术语例如“赋形剂”、“载体”、“药学上可接受的载体”等在本文中可互换使用。

[0212] 如本文所用的短语“治疗有效量”意指包含本文所述剂的剂、材料或组合物的量，它以适用于任何医学治疗的合理益处/风险比，在动物的至少细胞亚群中有效地产生某种所需的治疗效应。例如，施用到受试者的剂的量足以产生TDP-43功能的统计学上显著的可测量的增加。

[0213] 本文公开的剂和组合物的治疗有效量的确定为本领域技术人员所熟知。通常，治疗有效量可随着受试者的病史、年龄、疾患、性别和其它药学活性剂的施用而变化。

[0214] 如本文所用的术语“施用”是指通过方法或途径将剂或组合物置于受试者(例如有需要的受试者)中，所述方法或途径使剂或组合物至少部分定位于所需位点，使得产生所需效应。适用于本发明方法的施用途径包括局部和全身施用途径。通常，与受试者全身相比，局部施用导致更多的施用剂被递送到特定位置，而全身施用导致剂基本上被递送至受试者全身。

[0215] 本文公开的组合物和剂可通过本领域已知的任何合适的途径施用，包括(但不限于)口服或肠胃外途径，包括静脉内、肌内、皮下、经皮、气道(气溶胶)、肺部、鼻、直肠和局部(包括颊侧和舌下)施用。示例性施用模式包括(但不限于)注射、输注、滴注、吸入或摄入。“注射”包括(但不限于)静脉内、肌内、动脉内、鞘内、室内、颅内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊髓内、脑脊髓内和胸骨内注射和输注。在本文所述方面的优选实施方案中，组合物是通过静脉内输注或注射来施用。

[0216] 如本文所用的“受试者”意指人或动物(例如哺乳动物)。通常，动物是脊椎动物，例如灵长类动物、啮齿类动物、家畜或游戏动物。灵长类动物包括黑猩猩、食蟹猴、蜘蛛猴和狨猴，例如恒河猴(Rhesus)。家畜和游戏动物包括牛、马、猪、鹿、野牛、水牛、猫科动物(例如家猫)、犬科动物(例如狗、狐狸、狼)、鸟类(例如鸡、鸸鹋、鸵鸟)和鱼类(例如鳟鱼、鲶鱼和鲑鱼)。患者或受试者包括前述的任何子集，例如上述的全部，但不包括一个或多个组或物种，例如人、灵长类动物或啮齿类动物。在本文所述方面的某些实施方案中，受试者是哺乳动物，例如灵长类动物，例如人。术语“患者”和“受试者”在本文中可互换使用。受试者可为雄性或雌性。在一些实施方案中，受试者患有与TDP-43的突变或降低的水平(例如在神经元细胞中)相关的疾病或疾患。

[0217] 筛选方法

[0218] 本公开涵盖筛选一种或多种测试剂(例如一种或多种反义寡核苷酸)以鉴别用于治疗与TDP病理相关的疾病或疾患或降低所述疾病或疾患的可能性的候选剂的方法。在一些方面中，疾病或疾患与TDP-43的突变或降低的水平(例如在神经元细胞中)相关。本公开还涵盖筛选一种或多种测试剂以鉴别用于治疗与突变或降低的STMN2蛋白水平相关的疾病或疾患或降低所述疾病或疾患的可能性的候选剂的方法。

[0219] 在一些实施方案中，所述方法包括提供具有降低的TDP-43水平的神经元细胞；使细胞与一种或多种测试剂接触；确定接触的细胞是否具有增加的STMN2蛋白水平；以及如果接触的细胞具有增加的STMN2蛋白水平，那么将测试剂鉴别为候选剂。在一些方面中，确定接触的细胞是否具有增加的STMN2蛋白水平的步骤包括测量接触的细胞中的STMN2蛋白水

平。在一些方面中，使用ELISA(例如夹心ELISA)、斑点印迹和/或蛋白质印迹来测量STMN2蛋白水平。在一些方面中，确定接触的细胞是否具有增加的STMN2蛋白水平的步骤包括评价接触的细胞的形态学或功能。例如，缺乏STMN2的神经元可具有从具有STMN2的神经元的形态学改变的形态学。在一些方面中，使用免疫印迹和/或免疫细胞化学来评价接触的细胞的形态学或功能。在一些方面中，可进一步评价接触的细胞以确定它是否表达全长STMN2 RNA。STMN2 RNA表达可使用qRT-PCR来测量。

[0220] 在一些实施方案中，所述方法包括提供具有突变TDP-43水平的神经元细胞；使细胞与一种或多种测试剂接触；确定接触的细胞是否具有增加的STMN2蛋白水平；以及如果接触的细胞具有增加的STMN2蛋白水平，那么将测试剂鉴别为候选剂。在一些方面中，确定接触的细胞是否具有增加的STMN2蛋白水平的步骤包括测量接触的细胞中的STMN2蛋白水平。在一些方面中，使用ELISA、斑点印迹和/或蛋白质印迹来测量STMN2蛋白水平。在一些方面中，确定接触的细胞是否具有增加的STMN2蛋白水平的步骤包括评价接触的细胞的形态学或功能。例如，缺乏STMN2或具有减少的STMN2量的神经元可具有从具有正常STMN2水平(即来自对照样品的STMN2水平)的神经元的形态学改变的形态学。在一些方面中，使用免疫印迹和/或免疫细胞化学来评价接触的细胞的形态学或功能。在一些方面中，可进一步评价接触的细胞以确定它是否表达全长STMN2 RNA。STMN2 RNA表达可使用qRT-PCR来测量。

[0221] 在一些实施方案中，所述方法包括提供具有降低的TDP-43水平的神经元细胞；使细胞与一种或多种测试剂接触；以及确定接触的细胞在STMN2 RNA中是否具有隐性外显子。可使用FISH RNA或RT-PCT、qPCR、qRT-PCR或RNA测序来评价接触的细胞以鉴别STMN2 RNA中是否存在隐性外显子。在一些实施方案中，所述方法包括提供具有降低的TDP-43水平的神经元细胞；使细胞与一种或多种测试剂接触；以及确定接触的细胞是否表达全长STMN2 RNA。接触的细胞可使用RNA FISH或RT-PCT、qPCR、qRT-PCR或RNA测序来评价。

[0222] 在一些实施方案中，所述方法包括提供具有突变TDP-43水平的神经元细胞；使细胞与一种或多种测试剂接触；以及确定接触的细胞在STMN2 RNA中是否具有隐性外显子。可使用FISH RNA或RT-PCT、qPCR或RNA测序来评价接触的细胞以鉴别STMN2 RNA中是否存在隐性外显子。在一些实施方案中，所述方法包括提供具有突变TDP-43水平的神经元细胞；使细胞与一种或多种测试剂接触；以及确定接触的细胞是否表达全长STMN2 RNA。接触的细胞可使用RNA FISH或RT-PCT、qPCR、qRT-PCR或RNA测序来评价。

[0223] 生物标记物

[0224] 在一些方面中，本公开涵盖STMN2和/或ELAVL3作为与TDP-43功能下降相关的疾病或疾患(例如具有实质性TDP-43相关病理的疾病或疾患)的生物标记物的用途。在一些方面中，STMN2和/或ELAVL3可用作疾病或疾患存在的生物标记物。在其它方面中，STMN2和/或ELAVL3可用作监测疾病或疾患进展的生物标记物。在一些方面中，评价STMN2和/或ELAVL3蛋白水平。在一些方面中，评价STMN2和/或ELAVL3转录物水平。

[0225] 在一些实施方案中，疾病或疾患与神经元细胞中TDP-43的突变或降低的水平相关。在一些实施方案中，疾病或疾患与神经元细胞中突变或增加的TDP-43水平相关。在一些实施方案中，疾病或疾患是神经变性疾病(例如肌萎缩侧索硬化(ALS)、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病或额颞叶痴呆(FTD))。在一些实施方案中，疾病或疾患与创伤性脑损伤相关或因其而发生。

[0226] 在一些方面中，用于检测与TDP-43功能下降相关的疾病或疾患的方法包括从受试者获得样品和评价样品以确定它是否展现突变或降低的STMN2和/或ELAVL3蛋白水平。在一些实施方案中，使用本领域技术人员已知的任一方法(包括免疫印迹、免疫细胞化学、斑点印迹和/或ELISA)来测量STMN2和/或ELAVL3蛋白水平。在某些方面中，使用ELISA测量STMN2和/或ELAVL3蛋白水平。在一些方面中，用于检测与TDP-43功能下降相关的疾病或疾患的方法包括从受试者获得样品和评价样品以确定它是否展现降低的STMN2和/或ELAVL3转录物水平。在一些实施方案中，使用本领域技术人员已知的任一方法(包括RNA FISH、RT-PCR、qPCR或RNA测序)来测量STMN2和/或ELAVL3转录物水平。在某些方面中，使用qRT-PCR测量STMN2和/或ELAVL3转录物水平。降低的STMN2和/或ELAVL3蛋白和/或转录物水平可为由疾病或病症引起的TDP-43功能下降的指示。在一些方面中，通过在延长时间段内分析来自受试者的多个样品以监测STMN2和/或ELAVL3蛋白和/或转录物的水平(例如响应于治疗方案)来评价与TDP-43功能下降相关的疾病或疾患的进展。

[0227] 在一些方面中，用于检测受试者的神经变性疾病(例如ALS、FTD、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病)的方法包括从患病受试者获得样品(例如生物流体样品)，和确定样品是否含有改变的STMN2和/或ELAVL3蛋白水平。在某些方面中，使用ELISA进行确定。在一些方面中，用于检测受试者的神经变性疾病(例如ALS、FTD、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病)的方法包括从患病受试者获得样品(例如生物流体样品)，和确定样品是否含有降低的STMN2和/或ELAVL3转录物水平。可使用RNA FISH、RT-PCR、qPCR或RNA测序进行样品的筛选。在某些方面中，使用qRT-PCR测量STMN2和/或ELAVL3转录物水平。降低的STMN2和/或ELAVL3蛋白和/或转录物水平可为由神经变性疾病或病症引起的TDP-43功能下降的指示。

[0228] 在一些方面中，用于检测受试者的创伤性脑损伤(TBI)的方法包括从受试者获得样品(例如生物流体样品)，和确定样品是否含有改变的STMN2和/或ELAVL3蛋白水平。在某些方面中，使用ELISA进行确定。在一些方面中，用于检测受试者的创伤性脑损伤(TBI)的方法包括从受试者获得样品(例如生物流体样品)，和针对降低的STMN2和/或ELAVL3转录物水平来筛选样品。可使用RNA FISH、RT-PCR、qPCR或RNA测序进行样品的筛选。在某些方面中，使用qRT-PCR测量STMN2和/或ELAVL3转录物水平。降低的STMN2和/或ELAVL3蛋白和/或转录物水平可为由TBI引起的TDP-43功能下降的指示。

[0229] 在一些方面中，本公开涵盖STMN2的隐性变体作为与TDP-43功能下降相关的疾病或疾患(例如具有实质性TDP-43相关病理的疾病或疾患)的生物标记物的用途。在一些实施方案中，疾病或疾患是神经变性疾病(例如ALS、FTD、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病)。在一些实施方案中，疾病或疾患与创伤性脑损伤相关或由其引起。

[0230] 在一些方面中，用于检测与TDP-43功能下降相关的疾病或疾患的方法包括从受试者获得样品，和评价样品以确定它是否包括STMN2的隐性变体。在一些实施方案中，使用RNA FISH、RT-PCR、qPCR或RNA测序来评价STMN2转录物。在某些方面中，使用qRT-PCR测量STMN2转录物。STMN2的隐性变体的存在可为TDP-43功能下降的指示。

[0231] 在一些方面中，用于检测神经变性疾病的方法包括从受试者获得样品(例如生物流体样品)，和针对STMN2的隐性变体筛选样品。可使用PCR来进行样品的筛选。STMN2的隐性变体的存在可为由神经变性疾病或病症引起的TDP-43功能下降的指示。

[0232] 在一些方面中，用于检测TBI的方法包括从受试者获得样品(例如生物流体样品)，

和针对STMN2的隐性变体筛选样品。可使用PCR来进行样品的筛选。STMN2的隐性变体的存在可为由创伤性脑损伤引起的TDP-43功能下降的指示。

[0233] 实施例：

[0234] 实施例1：

[0235] 在里程碑式的发现中，发现TDP-43(TAR DNA结合蛋白43)是许多ALS散发性病例和FTD的实质性子集中泛素阳性包涵体的主要成分(7)。TDP-43是主要的核DNA/RNA结合蛋白(8)，在转录调控(9)、剪接(10,11)、前miRNA加工(12)、应激颗粒形成(13,14)以及mRNA转运和稳定性(15,16)中起功能作用。随后，在ALS和FTD家族中都鉴别出常染色体显性的表观致病的TARDBP突变，将遗传学和病理学与神经变性联系起来(17-21)。因此，阐明TDP-43错误定位和突变在疾病中的作用对于理解散发性和家族性ALS是至关重要的。

[0236] 与TDP-43病理相关的神经变性是功能丧失机制、毒性功能获得机制还是两者组合的结果尚不清楚(22)。早期研究显示，野生型和突变型TDP-43的过表达导致它的聚集和核定位的丧失(22)。尽管这些研究以及TARDBP突变的常染色体显性遗传模式似乎将支持功能获得的观点，但通常与它的聚集相关的核TDP-43的丧失表明它的正常功能也可能受损。随后的发现揭露，发育中的胚胎或有丝分裂后运动神经元中的TDP-43清除可具有深远的后果(23-27)。

[0237] 鉴于TDP-43在神经元RNA代谢中起的无数作用，关键问题变成：TDP-43错误定位后被错调的RNA底物是什么以及它们是如何导致运动神经病的?回答这个问题的早期努力利用交联和免疫沉淀以及来自患者或经受TARDBP基因敲低的小鼠的全脑均质物的RNA测序(RNA-seq)(11,28)。这些所得发现导致普遍的理解，即许多转录物受TDP-43调控，偏爱含有UG重复和长内含子的冗长RNA；然而，在这些实验中测序的脑均质物中神经胶质RNA的突出限制对TDP-43的特定神经元靶的了解。因此，无法伪造TDP-43靶RNA与运动神经元变性机制之间明确的连接。

[0238] 为鉴别在错调时导致神经元变性的底物，在纯化的人运动神经元中寻找由TDP-43调控的RNA的属性。由于活的ALS患者中的易受攻击的运动神经元基本上不可用于分离和实验扰动，所以已开发出定向分化方法，用于将人多能干细胞引导至运动神经元(hMN)中，以在体外研究ALS和其它神经变性疾患(29-31)。在这里，在TDP-43基因敲低后进行hMN的RNA-seq，以鉴别丰度受TDP-43缺陷正向或负向调控的转录物。鉴别出总共885种转录物需要TDP-43来维持正常的RNA水平。尽管任何数量的这些靶的错调可能在运动神经元变性中起微妙的作用，但人们注意到，运动神经元中编码STMN2的最丰富的转录物之一对TARDBP的下降特别敏感，但对FUS或C9ORF72活性不敏感。此外，已确定表达突变TDP-43的hMN和蛋白酶体被药理学抑制的hMN中的STMN2水平也降低，这已显示诱导啮齿动物神经元中TDP-43的细胞质累积和聚集(32)。还显示，已知微管稳定性调控剂STMN2编码正常人运动神经元生长和修复所必需的蛋白质。重要的是，由于TDP-43活性的丧失而导致的STMN2功能的丧失可能与ALS患者功能相关，这是因为还发现它的表达在ALS患者的运动神经元中可再现地减少。

[0239] 结果

[0240] 人运动神经元(hMN)的分化和纯化

[0241] 为产生hMN，使用经修改的14天策略使人胚胎干细胞系HUES3Hb9::GFP(33,34)在贴壁培养条件下(35,36)分化成GFP+hMN(图7A)。此方法依赖于通过SMAD信号传导的小分子

抑制的神经诱导、通过FGF和NOTCH信号传导抑制的加速神经分化以及通过激活视黄酸(RA)和音猬因子(Sonic Hedgehog)信号传导路径的MN模式化(图7A)。在分化的第14天,常规获得包含约18%-20% GFP+细胞的培养物(图7B)。在荧光激活细胞分选(FACS)后2天,>95%的所得细胞表达转录因子HB9(图7C至图7D)。再过8天后,培养物由表达转录因子Islet-1(80%)以及泛神经元细胞骨架蛋白b-III微管蛋白(97%)和微管相关蛋白2(MAP2)(90%)的神经元构成(图7E至图7F)。FACS和在补充有神经营养因子的神经胶质条件化培养基中培养10天后的全细胞膜片钳记录揭露这些纯化的hMN具有电生理学活性(图7G至图7I)。去极化后,hMN展现初始快速内向电流,然后是缓慢外向电流,此分别与功能电压激活的钠和钾通道的表达一致(图7G)。此外,hMN激发重复动作电位(图7H),并且对兴奋性神经递质红藻氨酸有反应(图7I)。总之,这些数据展示,这些纯化的hMN培养物具有预期的功能特性。

[0242] 具有降低的TDP-43水平的hMN的RNA-Seq

[0243] 在ALS中观察到的减少的核TDP-43正在成为可能导致下游神经变性事件的潜在细胞机制(7,37)。因此,需要通过基因敲低和RNA-Seq方法的组合鉴别出纯化的hMN群体中由TDP-43调控的特定RNA。使用缀合到Alexa Fluor 555的短干扰RNA,首先验证转染条件以实现高水平的siRNA递送(约94.6%)到hMN中(图8A至图8C)。然后在纯化的hMN中,使用靶向TDP-43转录物的两种不同的siRNA(siTDP43)、具有不靶向任何特定基因的加扰序列的两种对照siRNA(siSCR和siSCR_555)且在siRNA递送后三个不同的时间点(2天、4天和6天)来实施TDP-43RNAi(图8A)。在siRNA转染后,从神经元分离总RNA和蛋白质。qRT-PCR测定验证在所有时间点,用siTDP43处理的MN的TDP-43mRNA水平下调,但在用加扰对照处理的那些MN中未下调,并且最大基因敲低发生在siRNA转染后4天(图8D)。此外,还通过免疫印迹测定在蛋白质水平上确认TDP-43的清除,其中siTDP43处理的MN显示TDP-43水平降低54%-65%(图8E)。

[0244] 为捕获基因表达响应于hMN中TDP-43的部分丧失的全局变化,从siRNA处理的细胞中制备RNA-Seq文库(图1A)。下一代测序后,获得每个基因的表达数据,注释为每百万转录物数(TPM)。初始无监督分级聚类揭露基于MN生产批次的转录效应(实验1对实验2)。(图9A)RNA-Seq样品的后续主要组分分析集中在500个最大差异表达的基因上,然后基于siTDP-43处理(pc1)分离样品,此指示TDP-43水平的降低导致可靠的转录差异,随后是MN生产批次(pc2)(图1B)。对TDP-43转录物的TPM值的检查确认,它的丰度仅在用siTDP43处理的MN中显著降低(图9B)。然后使用生物信息学工具的DESeq2套件(38)进行差异基因表达分析,所述套件在5%的错误发现率(FDR)下在TDP-43基因敲低后在hMN中鉴别出总共885个统计学上差异表达的基因(图1C至图1D)。在这些细胞中,与用加扰序列siRNA对照处理的MN中的那些值相比,392个基因的TPM值显著较高('上调'),并且493个基因的TPM值显著较低('下调')(图1C至图1D)。

[0245] 除改变哺乳动物CNS中数百个基因的总转录水平(11)外,降低的TDP-43水平还可影响基因剪接(11,39-42)。尽管剪接变体的全局分析传统上涉及剪接敏感的外显子阵列(11,39),但RNA-Seq读段的亚型解卷积的计算方法的发展正在迅速进化(43-45)。使用生物信息学算法'Cuffdiff 2'(45)对数据进行的有限检查确实能够检测到POLDIP3基因作为具有两个显著亚型切换事件的差异剪接的首选候选基因(图9C),先前已经将它与体外和体内的TDP-43功能缺陷相关联(42,46)。

[0246] 在TDP-43基因敲低后鉴别为显著错调的885个基因中，选择候选子集进行进一步验证。首先，考虑具有富集的神经元表达的基因(STMN2(47,48)、ELAVL3(49))以及与神经发育和神经病症相关的基因(RCAN1(50)、NAT8L(51))。此外，将具有合理表达水平(TPM≥5)和高倍数变化的基因视为‘阳性对照’(SELPLG、NAT8L)，这是因为假设这些候选基因将更强健且更可能得到验证。然后在TDP-43基因敲低后从独立的生物重复获得RNA，并且通过qRT-PCR确定11个候选基因(包括TARDBP)的相对表达水平。值得注意的是，相对于用加扰对照处理的细胞，在用任一siTDP-43处理的细胞中确认这些基因中9/11的差异基因表达(图1E至图1F)。这些结果指示所选基因中可再现的表达差异且验证来自RNA-Seq分析的发现。

[0247] 表达突变TDP-43的hMN中的STMN2水平下调

[0248] 随后提出问题，即在TDP-43清除后，导致ALS的TDP-43突变形式的表达是否也会扰动丰度改变的任一RNA。为此，研究推定的TDP-43靶RNA，它在具有致病性TARDBP突变的患者iPS细胞源性运动神经元中在TDP-43基因敲低后显示可再现改变的表达(图10)。基于以前使用多能干细胞的经验，已知定向分化方法倾向于产生异质培养物，使得定量、比较分析具有挑战性(52)。此外，有丝分裂祖细胞的存在尤其麻烦，这是因为它们可取代培养物并扭曲结果。为克服这些障碍，使用针对细胞表面标记物的242种抗体在分化的HUES3 Hb9::GFP细胞系上进行无偏差的基于FACS的免疫剖析分析(53)，以鉴别在GFP+和GFP细胞上富集的标记(图11A)。通过对NCAM+/EpCAM-细胞进行分选，确定培养物可去除增殖的Edu^+细胞，并在大量诱导的多能干细胞分化中使MAP2+/Islet-1+神经元的数量标准化(图11B至图11D)。使用此细胞表面标记，区分出5种对照iPSC细胞系(11a、15b、17a、18a和20b)和具有不同TDP-43突变的4种iPSC细胞系(36a(Q343R)、47d(G298S)、CS(M337V)和RB20(A325T))，并且对所得MN进行FACS纯化。如预期的，每个iPS细胞系展现它的自身分化成$NCAM^+$MN的倾向(图11E至图11F)。然而，在分选后，获得所有iPSC细胞系的均质神经元培养物(图2B)。

[0249] 在进一步神经元培养10天后，收集这些FACS纯化的MN的总RNA且进行qRT-PCR以研究受TDP-43清除可再现影响最大的基因产物(ALOX5AP、STMN2、ELAVL3和RCAN1)的水平。对于两种基因(STMN2和ELAVL3)，观察到转录物水平显著降低(图2C至图2F)。与TDP-43清除实验一致，未观察到密切相关的STMN1 RNA的丰度的显著变化，此表明TDP-43与STMN2之间的特定关系(图2H、图12E)。此外，未观察到突变神经元与对照神经元之间TDP-43转录物水平的显著差异(图2G)。总之，这些数据表明，TDP-43致病点突变的存在可改变STMN2和ELAVL3 mRNA水平，而不影响它的自身水平。

[0250] 随后探究ALS相关突变可能阻碍TDP-43调控靶转录物的能力的方式。先前的研究已报道衍生自表达突变TDP-43的iPSC细胞系的hMN重演TDP-43病理的一些方面，包括它在可溶性和不溶性细胞蛋白提取物中的累积(54,55)以及细胞质错误定位(56)。因为突变神经元中减少的核TDP-43可模拟由siRNA诱导的部分丧失，所以使用免疫荧光来测试TDP-43错误定位的迹象。然而，在对照和突变神经元中，观察到TDP-43的主要核染色(图2I)。皮尔森相关系数分析支持这些观察且揭露突变和对照神经元的TDP-43免疫染色与DNA复染之间的强关联(图2J)。这些结果与一些TDP-43iPS疾病建模研究(56)一致，但与其他研究不一致(54)，并且增加需要额外细胞扰动来诱导TDP-43错误定位的可能性(57)。总的来说，所述数据表明，在表达突变TDP-43的神经元中，TDP-43清除后受影响的基因子集也发生变化，并且这些变化先于TDP-43的标志性细胞质聚集。因此，至少通过这些有限数量的转录物的镜头，

数据表明TDP-43的突变可部分地导致功能丧失的转录表型。

[0251] 在hMN中,STMN2水平由TDP-43调控

[0252] 有趣的是,观察到微管解聚蛋白样2(STMN2)的转录物在表达突变TDP-43的神经元中和TDP-43清除后都有所减少。STMN2是属于微管结合蛋白的微管解聚蛋白家族的四种蛋白质(STMN1、STMN2、SCLIP/STMN3和RB3/STMN4)中的一种,在神经元细胞骨架调控和轴突再生路径中起功能作用(47,48,58-62)。在人中,STMN1和STMN3基因展现普遍的表达,而STMN2和STMN4在CNS组织中富集(63)。考虑到ALS(64-66)中细胞骨架路径的相关性和它在CNS中的富集的越来越多的证据,决定集中于进一步表征STMN2与TDP-43之间的关系。

[0253] 首先,检查STMN2转录物的显著下调是否也导致STMN2蛋白水平的降低。在独立的RNAi实验中,使用结合STMN2 mRNA的两组不同的引物对进行qRT-PCR,并且发现相对于对照在siTDP43处理的hMN中显著下调(约50%-60%)(图3A)。然后对hMN蛋白裂解物实施免疫印迹测定,并且发现在siTDP-43处理的hMN中STMN2蛋白水平也降低(图3B)。

[0254] 然后考虑两种其它ALS连锁基因FUS或C9ORF72(5,67)的下调是否也将改变hMN中的STMN2水平。结构类似于TDP-43的FUS蛋白也参与RNA代谢(68),并且已在家族性ALS和FTD病例中检测到FUS变体(69)。C9ORF72的功能是活跃的研究领域,但C9ORF72内含子区域的大重复扩增负责大量家族性和散发性ALS和FTD病例(70-72)。诱导靶向TDP-43、FUS或C9ORF72的RNAi后,通过qRT-PCR发现相应siRNA靶向基因显著下调。(图12A至图12C)。TDP-43的下调不会改变FUS或C9ORF72的表达水平,并且FUS或C9ORF72的表达减少显示对其它ALS连锁基因无效应(图12A至图12C)。尽管TDP-43的基因敲低再次降低STMN2的水平,但对于FUS或C9ORF72并非如此(图3C)。重要的是,这些结果展示,STMN2下调不是RNAi诱导的结果,而是响应TDP-43部分丧失的特定分子机制。

[0255] 通过高度保守的RNA识别基序(73),TDP-43可结合到RNA分子以调控它们。为确定TDP-43是否与具有许多规范TDP-43结合基序的STMN2 RNA直接相关(图12F至图12G),开发出TDP-43免疫沉淀的条件(图3D)且随后进行甲醛RNA免疫沉淀(fRIP)。逆转交联后,进行定量qRT-PCR以检测结合的RNA分子。寻找来自TDP-43RNA转录物(因为此自调控已充分建立(11))以及STMN2转录物的扩增。在两种情况下,在TDP-43拉下后观察到富集,但对于IgG对照或当不同的ALS相关蛋白SOD-1被拉下时并未观察到富集(图3E至图3F)。总之,结果指示,TDP-43与STMN2 mRNA直接相关,并且TDP-43水平降低导致STMN2水平降低。

[0256] STMN2在hMN中的功能

[0257] 随后探究STMN2在hMN中的功能。首先,在产生MN的分化过程中检查STMN2的表达(图12D)。支持先前的表达研究(62,63,74)发现,STMN2蛋白在分化的神经元中选择性表达,这是因为它无法在干细胞或神经元祖细胞中被检测到(图12D)。然后使用免疫细胞化学来探测STMN2的亚细胞定位,并发现它定位于存在于神经突尖端的离散细胞质点处且特定富集在核周区中(图3G)。使用针对高尔基体相关蛋白GOLGIN97的人特异性抗体确定这个区域对应于高尔基体(图3H),证实了STMN2 N末端作为小泡运输和膜结合的棕榈酰化靶的预测(75)。还预测STMN2在神经突延伸和损伤期间在生长锥发挥作用(47)。当在分化和分选后不久对hMN染色时,在微管与F-肌动蛋白束(限定生长锥的组分)之间的界面处观察到STMN2的强染色(图3I)。这些发现支持STMN2微管动力学在生长锥处的作用。总之,所述数据指示,STMN2可能在ALS发病机制中涉及的细胞骨架缺陷和改变的轴突转运路径中起作用(76)。

[0258] 为探究hMN中STMN2水平降低的细胞后果，生成STMN2敲除的干细胞。具体来说，使用CRISPR/Cas9介导的基因组编辑策略(图4A)在两种hES细胞系(WA01和HUES3 Hb9::GFP)中的人STMN2基因座中生成大的缺失。在实施初级PCR筛选以鉴别在STMN2基因中具有18kb缺失的克隆后(图4B)，通过免疫印迹和免疫细胞化学来确认分化的hMN中的蛋白质敲除(图4C至图4D)。如预期的，发现与亲本STMN2+/+细胞系相比，衍生自候选缺失克隆的hMN展现完全不存在STMN2染色。

[0259] 鉴于已报道的STMN2通过促进微管的动态不稳定性在调控轴突生长中的作用(77)，实施表征STMN2-/-hMN中的神经突生长的表型测定。培养7天后，将分选的hMN固定且针对β-III-微管蛋白染色以标记神经元过程(图4E)。量化距细胞体中心给定间隔处的交叉数量的Sholl分析(78)揭露与$STMN2^{+/+}$相比，$STMN2^{-/-}$细胞系中的神经突延伸显著减少(图4F至图4G)。单独地，在已显示增加神经突延伸的ROCK抑制剂Y-27632存在下培养神经元。在这些实验中，神经突生长的差异甚至更加显著，其中该分子增强$STMN^{+/+}$细胞系的生长，但未增强$STMN^{-/-}$细胞系的生长，这表明STMN2在这个信号传导级联中的作用(图4H)。对WA01细胞系观察到相似的结果(图13)。

[0260] 随后提出问题，即STMN2是否不仅在神经元生长中起作用，而且也在损伤后神经元修复中起作用。为测试这些假设，将分选的hMN平铺于微流体装置中，所述微流体装置允许独立培养来自神经元细胞体的轴突(79)(图4I)。在该装置的细胞体区室中培养7天的细胞通过微通道将轴突延伸到轴突室中(图4J)。进行轴突室的反复真空抽吸和再灌注，直到轴突被有效地切割而不干扰细胞体区室中的细胞体。然后在一段时间内从微通道测量神经突长度，以评价损伤后的轴突修复。分析揭露，对于所测量的所有时间点，与$STMN2^{+/+}$相比，$STMN2^{-/-}$细胞系中的再生长显著减少(图4K)。对WA01细胞系观察到相似的结果(图13)。总之，这些数据指示，降低STMN2的水平可能对hMN中神经元过程的生长和复杂性以及轴突切断术后的修复具有可测量的表型效应。

[0261] 蛋白酶体功能调控TDP-43定位和STMN2水平

[0262] 先前的研究确立，hMN中的蛋白酶体抑制可触发突变SOD-1的累积(31)。因此，检查了MG-132介导的蛋白酶体抑制是否影响作为散发性ALS的潜在模型的hMN中的TDP-43定位。首先，确立可抑制蛋白酶体而不诱导明显细胞毒性的小分子处理的范围和时间(图14A至图14D)。确定神经元可耐受过夜的1μM处理，这使蛋白酶体活性降低至小于正常活性的10％(图14E)。然后进行脉冲追踪实验以确定蛋白酶体抑制对TDP-43定位的影响(图5A)。引人注目的是，使用如上所述的皮尔森相关系数分析，观察到在MG-132的24小时1μM脉冲后，核中的TDP-43染色大大减少(图5B至图5C)。值得注意的是，在冲洗后，发现TDP-43染色在4天后变得与未激发的神经元不可区分(图5B至图5C)。因此，hMN中的蛋白酶体抑制诱导可逆的TDP-43错误定位。这些发现类似于对初级皮质和海马神经元的应激条件研究，其中蛋白酶体抑制也导致TDP-43核染色的丧失(32)。

[0263] 为确定蛋白酶体抑制后TDP-43发生了什么，通过免疫印迹分析检查去污剂可溶性部分和去污剂不溶性部分中的TDP-43水平。在从用低剂量的MG-132处理的对照神经元获得的可溶性裂解物中(图5A)，发现TDP-43水平显著降低(图5D)。对UREA或不溶性部分进行了探测且发现蛋白酶体抑制会触发TDP-43变得不可溶(图5D)。最后，探测用短期高剂量或长期低剂量的MG-132处理的神经元中的STMN2水平。在两种情况下，观察到STMN2 mRNA水平显

著降低(图5E)。总之,这些数据将蛋白质稳态与TDP-43定位和STMN2水平联系起来。

[0264] TDP-43阻抑hMN中隐性外显子的出现

[0265] TDP-43在调控RNA剪接的核中起重要作用,并且最新研究强调了它阻抑非保守或隐性外显子维持内含子完整性的能力(80)。当隐性外显子被纳入RNA转录物中时,在许多情况下,它们的纳入可通过破坏它的翻译或通过促进无义介导的衰变来影响基因产物的正常水平(80)。有趣的是,在小鼠与人之间尚未观察到由TDP-43隐性外显子阻抑调控的基因重叠(80)。检查测序数据以寻找在人癌细胞中观察到的受TDP-43可再现调控的基因中的隐性外显子的证据(81)。在这95个基因中的9个基因中发现了映射到隐性外显子的读段,包括PFKP,它在RNA-Seq实验中始终是下调的(图15A、图3C)。基于这一观察,还细查了映射到在TDP-43清除后在hMN中始终错调的其它基因的RNA-Seq读段。在ELAVL3和STMN2中都发现了纳入隐性外显子的有力证据(图15B至图15C)。然后提出问题,即在蛋白酶体抑制后,纳入隐性外显子是否可能导致hMN中的STMN2水平降低。为实现这一目标,开发出RT-PCR测定来检测含有隐性外显子的转录物(图5F)。只有用蛋白酶体抑制剂处理的hMN具有可检测水平的预期PCR产物(图5G),并且PCR产物的桑格测序确认了预期的剪接接头(图15D至图15E)。总之,所述数据表明STMN2下调的机制对于TDP-43清除和错误定位是相似的。

[0266] STMN2在人成年原代脊髓MN中表达并且在ALS中发生变化

[0267] 最后,试图测试体外发现是否与ALS患者的体内运动神经元相关。为此,使用人成年脊髓组织的免疫组织化学来研究对照和ALS患者中STMN2的表达。据预测,来自散发性ALS病例的死后脊髓MN中STMN2蛋白的水平将发生变化,这通常表现为核TDP-43染色的病理性丧失和细胞质TDP-43免疫反应性包涵体的累积(7,37)。与在干细胞源性hMN中观察到的相似,强STMN2免疫反应性存在于人成年腰椎MN的细胞质区域中,但不存在于周围神经胶质细胞中(图6A至图6C)。测定在3个对照病例(无脊髓疾病的证据)和3个ALS病例中的腰脊髓组织切片中展现强STMN2免疫反应性的MN的百分比。与假设一致,发现在从散发性ALS病例收集的组织样品中,对STMN2抗体具有明显免疫反应性的腰MN的百分比显著降低(图6D)。ALS死后样品的几项独立表达研究进一步支持所述结果。三项研究对ALS患者的运动神经元进行了激光解剖,以进行表达研究(82-84)。询问该数据并且观察到相对于对照样品,ALS患者样品的STMN2转录物水平降低(图6E至图6F)。

[0268] 讨论

[0269] 所述研究表明,在人运动神经元中,数百种转录物的丰度可能受TDP-43的调控,包括先前在研究ALS的上下文中出现的几种RNA。例如,所述发现表明,BDNF的表达可能部分受TDP-43调控,这是值得注意的,因为先前已观察到这种神经营养蛋白的表达降低(85)。先前已在SOD1 ALS小鼠模型中显示MMP9定义了对变性最敏感的运动神经元群体(86)。所述研究表明,TDP-43功能降低可能更广泛地诱导这种因子的表达,这可能使运动神经元对变性敏感。对这里鉴别的转录物的进一步询问可能提供对TDP-43的扰动导致运动神经元功能障碍的方式的见解。

[0270] 重要的悬而未决的问题是,TDP-43家族性突变的机械性后果是什么,以及它们的效应与TDP-43在散发性疾病患者中病理性再定位时发生的事件有什么关系。由TDP-43调控的运动神经元转录物的鉴别为探究与家族性和散发性疾病相关的不同TDP-43操纵的潜在影响提供了机会。首先,提出问题,即在TDP-43清除后被鉴别为减少的靶RNA的子集是否在

TDP-43突变患者产生的运动神经元中显示显著的表达变化。有趣的是，在RNA结合蛋白ELAVL3和微管调控剂STMN2的表达中发现了适度但显著的变化，但没有发现其它推定的靶。因此，靶RNA的表达减少被视为TDP-43表型，患者突变显示部分功能丧失效应。

[0271] 在过表达时，先前已显示突变TDP-43易于聚集(22)。一些研究还表明，当在患者特异性运动神经元中以天然水平表达时，突变TDP-43同样易于聚集(54,56,57)。为确定核突变TDP-43的聚集或丧失是否可导致实验中STMN2和ELAVL3的表达减少，在这些患者运动神经元中仔细监测了TDP-43，但没有鉴别出这种缺陷。尽管无法排除低于检测范围的适度的核TDP-43丧失或不溶性负责观察到的STMN2和ELAVL3表达的下降，但所述发现与突变蛋白可能仅具有降低的亲和力或加工某些底物的能力的观点一致。可能将需要这项研究范围之外的进一步生物化学实验来辨别这些潜在的假设。

[0272] 据信，如果在家族性患者运动神经元中发生突变TDP-43的大规模聚集或核丧失，这将是可检测的。发现蛋白酶体抑制诱导TDP-43的显著核丧失，以及它的不溶性累积。在发现蛋白酶体抑制导致来自SOD1ALS患者特异性干细胞的运动神经元中的不溶性SOD1累积、但在仅具有正常SOD1的对照运动神经元中不累积后，产生了进行该操作的灵感(31)。有趣的是，并且正如其它人在不同情况下明显观察到的(32)，蛋白酶体抑制导致核TDP-43丧失以及它的不溶性累积，无论是否处于疾病基因型的控制中。这一结果很吸引人，这是因为它表明由任何数量的ALS相关突变或事件诱导的蛋白质稳态破坏可能是散发性ALS中最常见的组织病理学发现的上游。所述发现进一步认为，TDP-43重定位于细胞质可能最初提供了对破坏的蛋白质稳态的保护性和适应性反应(87)。然而，可能是这种反应的生物化学性质和这些复合物可能经受的液晶转化导致短暂的反应成为病理状态，该病理状态长期清除运动神经元的由TDP-43调控的重要RNA(88)。蛋白酶体抑制后TDP-43靶从运动神经元中清除的发现与该模型一致。

[0273] 尽管发现数百种RNA受到TDP-43清除的影响，但注意到并非所有转录物看上去都受到TDP-43改变的同等影响，数量适中的转录物(包括编码STMN2、ELAVL3的转录物)特别敏感。这一观察提出了具有实质性治疗意义的重要问题：TDP-43病理在患者中的主要效应以及它在运动神经病和变性中可能发挥的作用是否通过少量靶RNA传播?如果是这样，理解这些关键TDP-43靶的功能、它们被破坏的机制以及它们是否可被恢复可能是重要的，这是因为它可能会揭示TDP-43病理下游的恢复运动神经元功能的路径。鉴于STMN直系同源物的既定功能和TDP-43清除对STMN2水平的效应程度，人们想知道它是否可能是这种靶。

[0274] 微管解聚蛋白家族是公认的微管稳定性调控剂，并已被证明可调控苍蝇的运动轴突生物学(77)。使用基因编辑来确定STMN2是否在人干细胞源性运动神经元中具有重要功能，并且发现在该蛋白质不存在下，运动轴突的生长和修复都显著受损。尽管体外生成的hMN与真正的MN共享许多分子和功能特性(29)，但来自基于干细胞的ALS模型的发现的体内验证是对它们与疾病机制和治疗策略相关性的关键测试(89)。因此，使用人成年脊髓组织来提供体内证据，证实ALS中STMN2水平改变的发现。STMN2表达减少的可能机制是隐性外显子的出现。正确靶向的反义寡核苷酸可阻抑这种剪接事件并恢复STMN2表达。

[0275] 材料和方法

[0276] hESC和hiPSC的细胞培养以及向MN的分化

[0277] 多能干细胞用包被有Matrigel™(BD Biosciences)的组织培养皿上的mTeSR1培养

基(Stem Cell Technologies)生长,并且维持在37℃的5%CO2培养箱中。干细胞在1mM EDTA处理后作为小的细胞聚集体进行传代。在解离后16-24小时,将10μM ROCK抑制剂(Sigma,Y-27632)添加到培养物中以防止细胞死亡。使用基于贴壁培养条件的经修改方案与SMAD信号传导的双重抑制、NOTCH和FGF信号传导的抑制以及视黄酸和SHH信号传导的模式化组合进行MN分化。简单地说,使用accutase™(Stem Cell Technologies)将ES细胞解离成单细胞并且以80,000个细胞/cm^2的密度平铺于经matrigel包被的培养板上,所述培养板具有补充有ROCK抑制剂(10μM Y-27632,Sigma)的mTeSR1培养基(Stem Cell Technologies)。当细胞达到100%汇合时,将培养基更换为分化培养基(1/2Neurobasal(Life Technologies™)1/2DMEM-F12(Life Technologies™),补充有1×B-27补充物(Gibco®)、1×N-2补充物(Gibco®)、1× Gibco®GlutaMAX™(Life Technologies™)和100μM非必需氨基酸(NEAA))。这个时间点被定义为运动神经元分化的第0天(d0)。用如下小分子进行处理:在d0-d5时,10μM SB431542(Custom Synthesis)、100nM LDN-193189(Custom Synthesis)、1μM视黄酸(Sigma)和1μM Smoothend激动剂(Custom Synthesis);在d6-d14时,5μM DAPT(Custom Synthesis)、4μM SU-5402(Custom Synthesis)、1μM视黄酸(Sigma)和1μM Smoothend激动剂(Custom Synthesis)。

[0278] GFP+MN的荧光激活细胞分选(FACS)

[0279] 在d14时,在5% CO2/37℃培养箱中使用accutase™处理1小时将分化的培养物解离成单细胞。使用1000μL Pipetman®进行重复(10-20次)但温和的移液以实现单细胞制备。使细胞旋转沉降,用PBS洗涤1×并重悬浮于分选缓冲液(1×不含阳离子的PBS、15mM HEPES,pH 7(Gibco®)、1%BSA(Gibco®)、1×青霉素-链霉素(Gibco®)、1mM EDTA和DAPI(1μg/mL)中。在即将进行FACS分析和纯化之前使细胞通过45μm过滤器。常规使用BD FACS Aria II细胞分选仪将Hb9::GFP^+细胞纯化到含有MN培养基(Neurobasal(Life Technologies™)、1×N-2补充物(Gibco®)、B-27补充物(Gibco®)、GlutaMax和NEAA)和10μM ROCK抑制剂(Sigma,Y-27632)以及10ng/mL神经营养因子GDNF、BDNF和CNTF(R&D)的收集管中。使用DAPI信号来解析细胞活力,并使用未暴露于MN模式化分子(RA和SAG)的分化细胞作为绿色荧光门控的阴性对照。对于不含Hb9::GFP报道基因的细胞系,将单细胞悬浮液与针对NCAM的抗体(BD Bioscience,BDB557919,1:200)和针对EpCAM的抗体(BD Bioscience,BDB347198,1:50)在分选缓冲液中一起孵育25分钟,然后用PBS 1×洗涤一次并重悬浮于分选缓冲液中。对于RNA-Seq实验,将200,000个GFP^+细胞/孔平铺于预先包被有matrigel的24孔组织培养皿中。使用补充有各自10ng/mL的GDNF、BDNF和CNTF(R&D Systems)的MN培养基来喂养和成熟纯化的MN。RNA-Seq实验和大多数下游测定是用包被有0.1mg/ml聚-D赖氨酸(Invitrogen)和5μg/ml层粘连蛋白(Sigma-Aldrich)的d10纯化的MN(在FACS后培养10天)生长板以约130000个细胞/cm^2的浓度进行。

[0280] RNAi

[0281] 用靶向TDP-43mRNA的Silencer® Select siRNA(Life Technologies™)或用非靶向siRNA对照(其具有预测不与任何人转录物结合的加扰序列)来诱导纯化的GFP^+MN培养物的RNAi。将冻干的siRNA重悬浮于不含核酸酶的水中且作为20μM储备溶液储存在-20℃下直到

备用。为进行转染，根据制造商的说明书，将siRNA稀释于Optimem(Gibco®)中并与RNAiMAX(Invitrogen)混合。孵育30min后，将混合物逐滴添加到MN培养物中，以使得在1:10ptimem:MN培养基(Neurobasal(Life TechnologiesTM)、N2补充物(Gibco®)、B-27补充物(Gibco®)、GlutaMax和NEAA)和各自10ng/mL的GDNF、BDNF和CNTF(R&D)中，每孔中的最终siRNA浓度是60nM。在转染后12-16小时更换培养基。RNA-Seq实验和验证测定是用在转染后4天收集的材料来进行。

[0282] 免疫细胞化学

[0283] 对于免疫荧光，将细胞用冰冷的4% PFA在4℃下固定15分钟，用1×PBS中的0.2%Triton-X透化45分钟并用1×PBS-T(0.1%Tween-20)中的10%驴血清封闭1小时。然后将细胞与一级抗体(稀释于封闭溶液中)在4℃下一起孵育过夜。用1×PBS-T洗涤至少4次(每次孵育5min)，然后将细胞与二级抗体(稀释于封闭溶液中)在室温下一起孵育1小时。用DAPI对核染色。在本研究中使用以下抗体：Hb9(1:100,DSHB,MNR2 81.5C10-c)、TUJ1(1:1000,Sigma,T2200)、MAP2(1:10000,Abcam ab5392)、Ki67(1:400,Abcam,ab833)、GFP(1:500,Life Technologies™,A10262)、Islet1(1:500,Abcam ab20670)、TDP-43(1:500,ProteinTech Group)、STMN2(1:4000,Novus)、AlexaFluor™ 647-鬼笔环肽(1:200)。所用二级抗体(488、555、594和647)是AlexaFluor™(1:1000,Life Technologies™)和DyLight(1:500,Jackson ImmunoResearch Laboratories)。使用FIJI软件来分析显微照片以确定相关系数。

[0284] 免疫印迹测定

[0285] 为分析TDP-43和STMN2蛋白表达水平，使d10 MN在冰上在含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂(Roche)的RIPA缓冲液(150mM氯化钠；1%Triton X-100；0.5%脱氧胆酸钠；0.1%SDS；50mM Tris，pH 8.0)中裂解20min，并高速离心。常规使用24孔培养物的200μL RIPA缓冲液/孔，如通过BCA(Thermo Scientific)测定，它产生约20μg总蛋白质。用RIPA缓冲液洗涤两次后，将不溶性沉淀重悬浮于200μl UREA缓冲液(Bio-Rad)中。对于免疫印迹测定，通过SDS-PAGE(BioRad)分离2-3μg总蛋白质，转移到PDVF膜(BioRad)并用针对TDP-43的抗体(1:1000,ProteinTech Group)、针对GAPDH的抗体(1:1000,Millipore)和针对STMN2的抗体(1:3000,Novus)进行探测。基于相应的RIPA可溶性对应物的蛋白质浓度来加载不溶性沉淀。使用Restore™ PLUS蛋白质印迹剥离缓冲液(Thermo Scientific)对同一PDVF膜进行2-3次免疫测定。使用GAPDH水平来标准化每一样品，并使用LiCor软件来量化蛋白质条带信号。

[0286] RNA制备、qRT-PCR和RNA测序

[0287] 根据制造商的说明书，使用Trizol LS(Invitrogen)从d10 MN分离总RNA用于RNA-Seq实验和验证测定。将500μL添加到24孔培养物的每孔中。根据iSCRIPT试剂盒(Bio-rad)使用总共300-1000ng总RNA通过逆转录来合成cDNA。然后使用SYBR green(Bio-Rad)和iCycler系统(Bio-rad)进行定量RT-PCR(qRT-PCR)。使用GAPDH表达来标准化所测定的所有基因的定量水平。相对于相关对照样品(主要是经sired处理的MN或具有1×TDP-43水平的细胞)显示标准化表达。为比较患者细胞系，相对于所汇集数据点的平均值显示标准化表达。所有引物序列均可按要求获得。对于下一代RNA测序(RNA-Seq)，将每个siRNA样品或

AAVS1-TDP43基因型的至少两个技术重复纳入分析中。在RNA提取后,使用通过生物分析仪测定的RNA完整性指数(RIN)高于7.5的样品进行文库制备。简单地说,根据制造商的说明,使用illumina TruSeq RNA试剂盒v2从约250ng总RNA生成RNA测序文库。在HiSeq 2000平台上的Harvard Bauer核心测序设施上对文库进行测序。使用bcbioRNASeq工作流程和工具链来分析所有FASTQ文件(90)。将FASTQ文件与GRCh37/hg19参考基因组进行比对。使用DESeq2生物信息学工具套件进行差异表达测试(38)。使用Cufflinks的Cuffdiff模块来鉴别差异剪接。使用Salmon生成计数,并使用tximport在基因水平对它们进行加载(91,92)。然后使用本杰明和霍贝格的方法(93)校正所有p值用于多重比较。

[0288] 电生理学记录

[0289] 将GFP^{+}MN以5,000个细胞/cm^{2}的密度平铺于经聚-D-赖氨酸/层粘连蛋白包被的盖玻片上并在MN培养基中培养10天,用小鼠神经胶质细胞条件化2-3天并且补充各自10ng/mL的GDNF、BDNF和CNTF(R&D Systems)。如先前所报道(31,94)进行电生理学记录。简单地说,在室温(21℃-23℃)下使用Multiclamp 700B(Molecular Devices)进行全细胞电压钳或电流钳记录。用Digidata 1440A A/D接口将数据数字化并使用pCLAMP 10_软件(Molecular Devices)来记录。以20kHz对数据采样并以2kHz进行低通过滤。膜片式移液管被从Sutter Instruments P-97拉料器上的硼硅酸盐玻璃毛细管中拉出,并且具有2-4MW的电阻。通过用Parafilm包裹柄来降低移液管电容,并使用放大器电路进行补偿。串联电阻通常为5-10MW,始终小于15MW,并至少补偿80%。使用P/4协议以数字方式减去线性漏电流。从-80mV的保持电位引出电压到增量为10mV的介于-80mV到30mV范围内的测试电位。细胞内溶液是基于钾的溶液并含有葡萄糖酸K,135;$MgCl_2$,2;KCl,6;HEPES,10;Mg ATP,5;0.5(含KOH的pH 7.4)。细胞外溶液是基于钠的溶液并含有NaCl,135;KCl,5;$CaCl_2$,2;$MgCl_2$,1;葡萄糖,10;HEPES,10,含NaOH的pH 7.4)。红藻氨酸购自Sigma。

[0290] 甲醛RNA免疫沉淀

[0291] 根据MagnaRIP说明书(Millipore),使hMN(2百万个细胞)的6孔板中的1孔交联并处理。在本研究中使用以下抗体:SOD1(Cell Signaling Technologies)、TDP-43(FL9,D.Cleveland的馈赠)和小鼠IgG(cell signaling technology)。将每一RIP RNA部分的Ct值标准化到相同qPCR测定的输入RNA部分的Ct值,以解释RNA样品制备差异。为计算dCt[标准化RIP],确定Ct[RIP]-(Ct[输入]-log2(输入稀释因子)),其中稀释因子是100或1%。为确定倍数富集,用dCt[标准化RIP]-dCt[标准化IgG]获得ddCt,然后计算倍数富集=2^-ddCt。

[0292] STMN2敲除世代

[0293] 使用以下网站资源来设计STMN2引导RNA:来自Schier Lab的CHOPCHOP(chopchop.rc.fas.harvard.edu)(95)。将引导基因克隆到含有人U6启动子(custom synthesis Broad Institute,Cambridge),然后是通过用BbsI裂解获得的克隆位点,以及氨苄西林(ampicillin)抗性的载体中。为进行克隆,在订购之前修饰了所有gRNA。使用以下修饰来生成与BbsI粘性末端相容的悬突:如果有义链的5'核苷酸不是G,那么去除这个核苷酸并用G取代;对于反向互补链,去除最3'核苷酸并用C取代,同时将AAAC添加到5'末端。使用所得经修饰的STMN2 gRNA序列进行Cas9核酸酶基因组编辑:引导基因1:5'CACCGTATAGATGTTGATGTTGCG 3'(外显子2)(SEQ ID NO:4),引导基因2:5'

CACCTGAAACAATTGGCAGAGAAG 3’(外显子3)(SEQ ID NO:5)，引导基因3：5’CACCAGTCCTTCAGAAGGCTTTGG 3’(外显子4)(SEQ ID NO:6)。通过首先退火并磷酸化PCR管中的两种gRNA进行克隆。将1μL的浓度为100μM的两条链添加到1μL T4 PNK(New England Biolabs)、1μL T4连接缓冲液和6μL H2O中。将管置于热循环仪中并在37℃下孵育30min，然后在95℃下孵育5min并以5℃/分钟的速率缓慢降到25℃。随后将退火的寡核苷酸以1:100稀释，并将2μL添加到含有2μL 100μM pUC6载体、2μL NEB缓冲液2.1、1μL 10mM DTT、1μL 10mM ATP、1μL BbsI(New England Biolabs)、0.5μL T7连接酶(New England Biolabs)和10.5μL H2O的连接反应中。在热循环仪中用以下循环孵育该溶液：37℃保持5分钟，然后21℃保持5分钟，重复总共6次。随后将载体克隆于OneShot Top10(ThermoFisher Scientific)细胞中并平铺于LB-氨苄西林琼脂板上并且在37℃孵育过夜。使用Qiagen MIDIprep试剂盒(Qiagen)分离载体并使用nanodrop测量DNA浓度。使用M13F(-21)引物通过Genewiz对载体测序来验证正确的克隆。

[0294] 使用Neon转染系统(ThermoFisher Scientific)以及100μL试剂盒(ThermoFisher Scientific)进行干细胞转染。在转染之前，将干细胞在含有10μM Rock抑制剂的mTeSR1中孵育1小时。随后通过添加accutase并在37℃下孵育5min来解离细胞。使用Countess对细胞计数并将细胞以$2.5*10^6$个细胞/mL的浓度重悬浮于R培养基中。然后将细胞溶液添加到管中，该管含有1μg含引导基因的每一载体和1.5μg pSpCas9n(BB)-2A-Puro(PX462)V2.0(来自Feng Zhang(Addgene)的馈赠)。在用嘌呤霉素(puromycin)抗性载体转染时，将电穿孔的细胞立即释放于10-cm皿中的含有10μM Rock抑制剂的预孵育的37℃mTeSR培养基中。在用嘌呤霉素抗性载体转染后24小时，开始选择。抽出培养基并更换为含有不同浓度的嘌呤霉素的mTESR1培养基：1μg/μL、2μg/μL和4μg/μL。再24小时后，抽出培养基并更换为mTeSR1培养基。将细胞培养10天，然后将细胞群落挑取到24孔板中用于扩增。

[0295] 使用Qiagen DNeasy血液和组织试剂盒(Qiagen)从经嘌呤霉素选择的群落中提取基因组DNA，并进行PCR筛选以确认STMN2基因中预期缺失的存在。在1％琼脂糖凝胶上的电泳后分析PCR产物。简单地说，通过缺失外部的一对引物对靶向序列进行PCR扩增，所述引物经设计以产生1100bp缺失条带来检测缺失的克隆。所用引物的序列如下：OUT_FWD，5’GCAAAGGAGTCTACCTGGCA 3’(SEQ ID NO:7)和OUT_REV，5’GGAAGGGTGACTGACTGCTC 3’(SEQ ID NO:8)。使用免疫印迹分析进一步确认敲除细胞系。

[0296] 神经突生长测定

[0297] 随机选择用于Sholl分析的单个Tuj1阳性神经元，并使用具有40×物镜的Nikon Eclipse TE300成像。使用ImageJ(NIH)插件NeuronJ(78)追踪神经突，并使用Fiji的Sholl工具(96)进行Sholl分析，从而量化距细胞体10-μm间隔处的交叉数。使用Prism 6(Graph Pad,La Jolla,CA,USA)通过比较每一10-μm间隔的KO克隆的交叉数与亲本WT细胞系的交叉数来进行统计学分析。通过标准司徒顿t测试来评价显著性，其中$p<0.05$的p值视为显著的。

[0298] 轴突切断术

[0299] 将分选的运动神经元以约250,000个神经元/装置的浓度培养于标准神经元微流体装置(SND150,XONA Microfluidics)中，所述标准神经元微流体装置安装在包被有0.1mg/ml聚-D-赖氨酸(Sigma-Aldrich)和5μg/ml层粘连蛋白(Invitrogen)的玻璃盖玻片上。在培养的第7天时，通过轴突室的重复真空抽吸和再灌注进行轴突切断术，直到轴突被

有效地切割而不干扰细胞体区室中的细胞体。

[0300] TDP-43和STMN2免疫组织化学分析

[0301] 根据Partners和Harvard IRB方案，从马萨诸塞州阿尔茨海默氏病研究中心(Massachusetts Alzheimer's Disease Research Center,ADRC)收集3个散发性ALS病例和3个对照(无脊髓疾病的证据)的死后样品。进行TDP-43免疫反应性的组织学分析(兔多克隆抗体,ProteinTech Group)以确认诊断。对于STMN2分析，使用标准免疫组织化学程序对福尔马林固定的腰脊髓的切片染色，只是在封闭之前进行柠檬酸盐缓冲液抗原恢复。简单地说，将样品再水合，用水冲洗，用3％过氧化氢封闭，然后用正常血清封闭，与STMN2兔源性一级抗体(1:100稀释,Novus)一起孵育，然后与合适的二级抗体(以1:200缀合到辣根过氧化物酶的抗兔IgG)一起孵育，并且暴露于ABC Vectastain试剂盒和DAB过氧化物酶底物，并在固定前用苏木素短暂复染。检查每一样品的多个水平。

[0302] STMN2剪接分析

[0303] 根据制造商的说明书，使用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen)从神经元分离总RNA。根据iSCRIPT试剂盒(Bio-rad)使用总共300-1000ng总RNA通过逆转录来合成cDNA。然后使用一种隐性外显子特异性引物进行RT-PCR，且然后使用Agilent 2200Tapestation进行分析。

[0304] 统计学分析

[0305] 使用双尾不成对司徒顿t测试来评价qRT-PCR测定和STMN2免疫组织化学分析的统计学显著性，其中*p<0.05的p值视为显著的。II型误差控制在0.05的常规水平。

[0306] 参考文献

[0307] 1.Pasinelli,P.&Brown,R.H.Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis:insights from genetics.Nat.Rev.Neurosci.7,710-723(2006).

[0308] 2.Rowland,L.P.&Shneider,N.A.Amyotrophic lateraral sclerosis.NewEngland Journal of Medicine 344,1688-1700(2001).

[0309] 3.Ravits,J.et al.Deciphering amyotrophic latrral sclerosis:What phenotype,neuropathology and genetics are telling us about pathogenesis.Amyotroph Lateral Scler FrontotemporalDegener 14,5-18(2013).

[0310] 4.Miller,R.G.,Mitchell,J.D.&Moore,D.H.Riluzolefor amyotrophic lateral sclerosis(ALS)/motor neuron disease(MND).Cochrane Database SystRev 3,CD001447(2012).

[0311] 5.Ling,S.-C.,Polymenidou,M.&Cleveland,D.W.Converging mechanisms in ALS and FTD:disrupted RNA and protein homeostasis.Neuuron 79,416-438(2013).

[0312] 6.Dion,P.A.,Daoud,H.&Rouleau,G.A.Genetics of motor neuron disorders:new insights into Pathogenic mechanisms.Nat.Rev.Genet.10,769-782(2009).

[0313] 7.Neumann,M.et al.Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis.Science 314,130-133(2006).

[0314] 8.Chen-Plotkin,A.S.,Lee,V.M.-Y.&Trojanowski,J.Q.TAR DNA-binding protein 43in neurodegenerative disease.Nature Reviews Neurology 6,211-220(2010).

[0315] 9.Ignatius,S.H.,Wu,F.,Harrich,D.,GarciaMartinez,L.F.&Gaynor,

R.B.Cloning and Characterization of a Novel Cellular Protein,Tdp-43,That Binds toHuman-Immunodeficiency-Virus Type-1Tar Dna-Sequence Motifs.J Virol 69,3584-3596(1995).

[0316] 10.Buratti,E.et al.Nuclear facter TDP-43 and SR proteins promote in vitro and in vivo CFTR exon 9skipping.EMBO J 20,1774-1784(2001).

[0317] 11.Polymenidou,M.et al.Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute toneuronal vulnerability from loss of TDP-43.Nat Neurosci14,459-468(2011).

[0318] 12.Kawahara,Y.&Mieda-Sato,A.TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes.P NatlAcad Sci Usa 109,3347-3352(2012).

[0319] 13.Liu-Yesucevitz,L.et al.Tar DNA Binding Protein-43(TDP-43) Associates with Stress Granules:Analysis of Cultured Cells and Pathological Brain Tissue.PLoS ONE 5,(2010).

[0320] 14.Parker,S.J.et al.Endogenous TDP-43 localized tostress granules can subsequently form protein aggregates.Neurochem.Int.60,415-424(2012).

[0321] 15.Alami,N.H.et al.Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations.Neuron 81,536-543(2014).

[0322] 16.Volkening,K.,Leystra-Lantz,C.,Yang,W.,Jaffee,H.&Strong,M.J.Tar DNA binding protein of 43kDa(TDP-43),14-3-3proteins and copper/zinc superoxide dismutase(SOD1)interact tomodulate NFL mRNA stability.Implications for altercd RNA processing in amyotrophic lateral sclerosis(ALS).Brain Research 1305,168-182(2009).

[0323] 17.Benajiba,L.et al.TARDBP rnutations in motoneuron disease with frontotemporal lobar degeneration.Ann Neurol.65,470-473(2009).

[0324] 18.Rutherford,N.J.et al.Novel Mutations in TARDBP(TDP-43)in Patients with Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis.PLoS Genet 4,(2008).

[0325] 19.Sreedharan,J.et al.TDP-43 mutations infamilial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis.Science 319,1668-1672(2008).

[0326] 20.Van Deerlin,V.M.et al.TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology:a genetic and histopathological analysis.The Lancet Neurology 7,409-416(2008).

[0327] 21.Yokoseki,A.et al.TDP-43 mutation infamilial amyotrophic lateral sclerosis.Ann Neurol.63,538-542(2008).

[0328] 22.Lee,E.B.,Lee,V.M.-Y.&Trojanowski,J.Q.Gains or losses:molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration.Nat.Rev.Neurosci.13,38-50(2012).

[0329] 23.Kraemer,B.C.et al.Loss of murine TDP-43 disrupts motor function and plays an essential role in embryogenesis.Acta Neuropathol 119,409-419

(2010).

[0330] 24.Sephton,C.F.et al.TDP-43 is a developmentally regulated protein essential for early embryonic development.J.Biol.Chem.285,6826-6834(2010).

[0331] 25.Wu,L.-S.,Cheng,W.-C.&Shen,C.-K.J.Targeted depletion of TDP-43 expression in the spinal cord motor neurons leads to the development of amyotrophic lateral sclerosis-like phenotypes in mice.J.Biol.Chem.287,27335-27344(2012).

[0332] 26.Yang,C.et al.Par tial loss of TDP-43 function causes phenotypes of amyotrophic lateral sclerosis.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.111,E1121-9(2014).

[0333] 27.Iguchi,Y.et al.Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration.Brain 136,1371-1382(2013).

[0334] 28.Tolleryey,J.R.et al.Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43.Nat Neurosci 14,452-4458(2011).

[0335] 29.Davis-Dusenbery,B.N.,Williams,L.A.,Klim,J.R.&Eggan,K.How to make spinal motor neurons.Development 141,491-501(2014).

[0336] 30.Han,S.S.W.,Williams,L.A.&Eggan,K.C.Constructing and deconstructing stem cell models of neurological disease.Neuron 70,626-644(2011).

[0337] 31.Kiskinis,E.et al.Pathways disrupted in human ALS motor neurons identified through genetic correction of mutant SOD1.CellStem Cell14,781-795(2014).

[0338] 32.van Eersel,J.et al.Cytoplasmic accumulation and aggregation of TDP-43 upon proteasome inhibition in cultured neurons.PLoS ONE 6,e22850(2011).

[0339] 33.Di Giorgio,F.P.,Boulting,G.L.,Bobrowicz,S.&Eggan,K.C.Human Emnryonic Stemm Cell-Derived Motor Neurons Are Sensitive to the Toxic Effect of Glial Cells Carrying an ALS-Causing Mutation.Stem Cell3,637-648(2008).

[0340] 34.Amoroso,M.W.et al .Accelerated high-yield generation oflimb-innervating motor neurons from human stem cells.J Neurosci 33,574-586(201 3).

[0341] 35.Chambers,S.M.et al.Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling.NatBiotechnol27,275-280(2009).

[0342] 36.Chambers,S.M.et al.Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors.Nat Biotechnol30,715-720(2012).

[0343] 37.Mackenzie,I.R.A.et al.Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations.Ann Neurol.61,427-434(2007).

[0344] 38.Love,M.I.,Huber,W.&Anders,S.Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2.GenomeBiology 15,550(2014).

[0345] 39.Amold,E.S.et al.ALS-linked TDP-43mutations produce aberrant RNA splicing and adult-onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.110,E736-45(2013).

[0346] 40.Fiesel,F.C.,Weber,S.S.,Supper,J.,Zcll,A.&Kahle,P.J.TDP-43 regulates global translational yield by splicing of exon junction complex component SKAR.Nucleic AcidsRes 40,2668-2682(2012).

[0347] 41.Prudencio,M.et al.Misregulation of human sortilin splicing leads to the generation of a nonfunetional progranulin receptor.P NatlAcad Sci Usa 109,21510-21515(2012).

[0348] 42.Yang,C.et al.Partial loss of TDP-43 function causes phenotypes of amyotrophic lateral sclerosis.Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A.111,E1121-9(2014).

[0349] 43.Bernard,E.,Jacob,L.,Mairal,J.&Vert,J.-P.Efricient RNA isoform identification and quantification from RNA-Seq data with network flows.Bioinformatics 30,2447-2455(2014).

[0350] 44.Bryant,D.W.,Priest,H.D.&Mockler,T.C.Detection and quantification of alternative splicing variants using RNA-seq.Methods MolBiol883,97-110(201 2).

[0351] 45.Trapnell,C.et al.Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq.NatBiotechnol31,46-53(2013).

[0352] 46.Shiga,A.et al.Alteration of POLDIP3 Splicing Associated with Loss of Function of TDP-43 in Tissues Affected with ALS.PLoS ONE 7,(201 2).

[0353] 47.Grenningloh,G.,Soehrman,S.,Bondallaz,P.,Ruchti,E.&Cadas,H.Role of the microtubule destabilizing proteins SCG 10 and stathmin in neuronal growth.J.Neurobiol.58,60-69(2004).

[0354] 48.Shin,J.E.,Geisler,S.&DiAntonio,A.Dynamic regulation of SCG 10 in regenerating axons after injury.Exp Neurol 252,1-11(2014).

[0355] 49.Kasashima,K.,Sakashita,E.,Saito,K.&Sakamoto,H.Complexformation of the neuron-sPecific ELAV-like hu RNA-binding proteins.NucleicAcidsRes 30, 4519-4526(2002).

[0356] 50.Martin,K.R.et al.Over-expression of RCAN1 causes Down syndrome-like hippocampal deficits that alter learning and memory.Human Molecular Genetics 21,3025-3041(2012).

[0357] 51.Ariyannur,P.S.et al.Methamphetamine-induced neuronal protein NAT8L is the NAA biosynthetic enzyme:implications for specialized acetyl coenzyme A metabolism in the CNS.Brain Research 1335,1-13(2010).

[0358] 52.Boulting,G.L.et al.A functionally characterized test set of human induced pluripotent stem cells.Nat Biotechnol 29,279-286(2011).

[0359] 53.Yuan,S.H.et al.Cell-surface marker signatures for the isolation of neural stem cells,glia and neurons de rived from human pluripotent stem

cells.PLoS ONE 6,e17540(2011).

[0360] 54.Egawa,N.et al.Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Plu ripotent Stem Cells.Sci Transl Med4,145ra104-145ra104(2012).

[0361] 55.Serio,A.et al.Astrocyte pathology and the absence of non-cell autonomy in an induccd pluripotent stem cell model of TDP-43 proteinopathy.Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A.110,4697-4702(2013).

[0362] 56.Bilican,B.et al.Mutant induced pluripotent stem celllines recapitulate aspeets of TDP-43 proteinopathies and reveal cell-specific vulnerability.Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A.109,5803-5808(2012).

[0363] 57.Zhang,Z.et al.Downregulation of MicroRNA-9in iPSC-Derived Neurons of FTD/ALS Patients with TDP-43 Mutations.PLoS ONE 8,e76055(2013).

[0364] 58.Mason,M.,Lieberman,A.R.,Grenningloh,G.&Anderson,P.N.Transcriptional upregulation of SCG 10 and CAP-23is correlated with regeneration of the axons of peripheral and central neurons in vivo.MolCellNeurosci20,595-615(2002).

[0365] 59.Morii,H.,Shiraishi-Yamaguchi,Y.&Mori,N.SCG10,a microtubule destabilizing factor,stimulates the neu rite outgrowth by modulating microtubule dynamics in rat hippocampal primary cultured neurons.J.Neurobiol.66,1101-1114(2006).

[0366] 60.Shin,J.E.et al.SCG10 is a JNK target in the axonal degeneration pathway.PNatlAcadSci Usa 109,E3696-E3705(2012).

[0367] 61.Sobczak,A.et al.Calmyrin1 binds to SCG10 protein(stathmin2)to modulate neurite outgrowth.Biochim BiophysActa 1813,1025-1037(2011).

[0368] 62.Stein,R.,Mori,N.,Matthews,K.,Lo,L.C.&Anderson,D.J.Thc NGF-inducible SCG10 mRNA encodes a novel membrane-bound protein present in growth cones and abundant in developing neurons.Neuron 1,463-476(1988).

[0369] 63.Bieche,I.et al.Expression of stathmin family genes in human tissues: non-neural-restricted expression for SCLIP.Genomics 81,400-410(2003).

[0370] 64.Smith,B.N.et al.Exome-wide rare variant analysis identifies TUBA4A mutations associated with familial ALS.Neuron 84,324-331(2014).

[0371] 65.Wu,C.-H.et al.Mutations in the profilin 1gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis.Nature 488,499-503(2012).

[0372] 66.Nicolas,A.et al.Genome-wide Analyses Identify KIF5A as a Novel ALS Gene.Neuron 97,1268-1283.e6(2018).

[0373] 67.Guerreiro,R.,Bras,J.&Hardy,J.SnapShot:Genetics of ALS and FTD.Cell 160,798-U485(2015).

[0374] 68.Lagier-Tourenne,C.et al.Divergent reles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs.Nat Neurosci 15,

1488-1497(2012).

[0375] 69.Lattante,S.,Rouleau,G.A.&Kabashi,E.TARDBP and FUS Mutations Associated with A myotrophic Lateral Sclerosis:Summary and Update.Hum.Mutat.34,812-826(2013).

[0376] 70.DeJesus-Hernandez,M.et al.Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS.Neuron 72,245-256(2011).

[0377] 71.Renton,A.E.,Chiò,A.&Traynor,B.J.State ofplay in amyotrophic lateral sclerosis genetics.Nat Neurosci 17,17-23(2014).

[0378] 72.Renton,A.E.et al.A Hexanucleotide Repeat Expansion in C9ORF72 Is the Cause of Chromosome 9p21-Linked ALS-FTD.Neuron 72,257-268(2011).

[0379] 73.Buratti,E.&Baralle,F.E.Multiple roles of TDP-43 in gene expression,splicing regulation,and human disease.FrontBiosci 13,867-878(2008).

[0380] 74.Sugiura,Y.&Mo ri,N.SCG10 expresses growth-associated manner in developing rat brain,but shows a different pattern to p19/stathmin or GAP-43.Brain Res.Dev.Brain Res.90,73-91(1995).

[0381] 75.Levy,A.D.et al.Subcellular Golgilocalization of stathmin family proteins is promoted by a specific set of DHHC palmitoyl transferases.Mol Biol Cell22,1930-1942(2011).

[0382] 76.Taylor,J.P.,Brown,R.H.&Cleveland,D.W.Deeoding ALS:from genes to mechanism.Nature 539,197-206(2016).

[0383] 77.Chauvin,S.&Sobel,A.Neuronal stathmins:A family of phosphoproteins cooperating for neuronal development,plasticity and regeneration.Progress in Neurobiology 126,1-18(2015).

[0384] 78.Meijering,E.et al.Design and validation of a toolfor neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images.Cytometry PartA 58A,167-176(2004).

[0385] 79.Taylor,A.M.et al.A microfluidic culture platform for CNS axonalinjury,regeneration and transport.Nat Methods 2,599-605(2005).

[0386] 80.Ling,J.P.,Pletnikova,O.,Troncoso,J.C.&Wong,P.C.TDP-43 repression of nonconserved cryptic exons is compromised in ALS-FTD.Science 349,650-655(2015).

[0387] 81.Humphrey,J.,Emmett,W.,Fratta,P.,Isaacs,A.M.&Plagnol,V.Quantitative analysis of cryptic splicing associated with TDP-43 depletion.BMC Med Genomics 10,38(2017).

[0388] 82.Rabin,S.J.et al.Sporadic ALS has compartment-specific aberrant exon splicing and altered cell-matrix adhesion biology.Human Molecular Genetics 19,313-328(2009).

[0389] 83.Highley,J.R.et al.Loss of nuclear TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis(ALS)causes altcred expression of splicing machinery and widespread dysregulation of RNA splicing in motor neurones.Neuropathology and Applied Neurobiology 40,670-685(201 4).

[0390] 84.D'Erchia,A.M.et al.Massive transcriptome sequencing of human spinal cord tissues provides new insights into motor neuron degeneration in ALS.SciRep 7,10046(2017).

[0391] 85.Hen riques,A.,Pitzer,C.&Schneider,A.Neurotrophic growthfactors for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis:where do we stand? FrontNeurosci 4,32(2010).

[0392] 86.Kaplan,A.et al.Neuronal Matrix Metalloproteinase-9Is a Determinant of Selective Neurodegeneration.Neuron 81,333-348(2014).

[0393] 87.Markmiller,S.et al.Context-Dependent and Disease-Spccific Diversity in Protein Interactions within Stress Granules.Cell172,590-604.e13 (2018).

[0394] 88.Taylor,J.P.,Brown,R.H.&Cleveland,D.W.Decoding ALS:from genes to mechanism.Nature 539,197-206(2016).

[0395] 89.de Boer,A.S.et al.Genetic validation of a therapeutic target in a mouse model of ALS.Sci Transl Med 6,248ra104-248ra104(2014).

[0396] 90.Steinbaugh,M.J.et al.bcbioRNASeq:R package for bcbio RNA-seq analysis.F1000Research6,1976(2017).

[0397] 91.Patro,R.,Duggal,G.,Love,M.I.,Irizarry,R.A.&Kingsford,C.Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression.Nat Methods 14,417-419(2017).

[0398] 92.Soneson,C.,Love,M.I.&Robinson,M.D.Differential analyses for RNA-seq:transcript-level estimates improve gene-level inferences.F1000Research4, 1521(2016).

[0399] 93.Benjamini,Y.&Hochberg,Y.Controlling the False Discovery Rate:A Practical and Powerful Approach to MultiPle Testing.http://www.jstor.org/stable/2346101 1,289-300(1995).

[0400] 94.Son,E.Y.et al.Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons.CellStem Cell 9,205-218(2011).

[0401] 95.Labun,K.,Montague,T.G.,Gagnon,J.A.,Thyme,S.B.&Valen,E.CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering.NucleicAcidsRes 44,W272-W276(2016).

[0402] 96.Ferreira,T.A.et al.Neuronal morphometry directly from bitmap images.Nat Methods 11,982-984(2014).

[0403] 实髓例2:

[0404] 最近报道了人运动神经元中由RNA结合蛋白TDP-43调控的mRNA转录物的属性。参

见Klim,J.R.等人,ALS-implicated protein TDP-43 sustains levels of STMN2,a mediator of motor neuron growth and repair.Nat Neurosci,2019.22(2):第167-179页。尽管TDP-43调控人运动神经元中的数百种转录物,但受TDP-43清除影响最大的一种转录物是STMN2。STMN2是参与微管组装的蛋白质并且是神经元表达的最丰富的转录物之一。在数据的深度分析中揭露,TDP-43阻抑STMN2转录物中的隐性外显子。这个隐性外显子的纳入会防止全长形式表达,从而导致STMN2蛋白的水平显著降低。细胞培养物中的TDP-43基因敲低以及来自展现TDP-43病理的患者的死后组织显示改变的STMN2剪接。含有隐性外显子的转录物含有它自身的终止和起始位点,并因此潜在地编码17个氨基酸的肽。人模型中的这种变化在来自死后脊髓的RNA测序数据中得到验证。因此,考虑了隐性STMN2转录物或它编码的肽是否可用作罹患或患有ALS的人或展现TDP-43蛋白病(例如帕金森氏病、创伤性脑损伤、阿尔茨海默氏病)的其它患者的CSF/流体生物标记物。

[0405] 图17A至图17C显示,可容易地从CSF源性胞外体收集RNA,并且然后将所述RNA转化成cDNA,以测定完整和隐性STMN2转录物以及用于标准化的对照RNA(图17A)。验证TaqMan Q-RT-PCR测定以显示它使用TDP-43基因敲低方法在人神经元中同时检测完整和隐性STMN2转录物。将STMN2转录物标准化到管家核糖体亚单位RNA18S5。在所培养人神经元中,使用反义寡核苷酸(ASO)清除细胞的TDP-43或使用siRNA诱导TDP-43基因敲低来降低TDP-43水平。在两种条件下,鉴别出隐性外显子相对于对照的强诱导(图17B)。使用经验证的多重qPCR测定,使用300ul患者样品从CSF源性胞外体分离下一RNA以确定隐性STMN2的水平(n=7个健康对照,n=2个疾病模拟物,并且n=9名ALS患者)。相对于对照样品,大多数ALS样品展示高于平均水平的STMN2隐性外显子,其中几个样品显示较高数量级的水平(图17C)。应注意,即使在这组适度样品中,ALS患者中隐性外显子表达的增加也是高度显著的($P<0.005$)。还应注意,患有非ALS运动神经元疾病的两个个体(模拟物)显示对照剪接水平。最后,患者数据存在有趣的"纹理",即一些患者显示高水平的表达,而另一些患者显示更正常的水平。假设具有较低水平的患者可能处于疾病的早期,或患有非TDP-43疾病。

[0406] ALS的最常见病理学标志是TDP-43的细胞质累积和核清除。许多小组和公司有兴趣开发挽救这些TDP-43定位和功能变化的治疗剂。然而,到目前为止,还没有生物标记物可用于活人中来监测TDP-43功能障碍或它的挽救。这里所述的测定可完全以这种方式使用。此外,人们对STMN2和它的隐性剪接本身作为ALS靶很感兴趣。该测定将允许在临床研究期间直接测量患者中的靶接合。

[0407] 实施例3

[0408] 患者的背景

[0409] 该患者目前是40岁的男性,他的ALS症状最初于2017年4月开始,左手无力。无力逐渐恶化并扩散至涉及双侧手和手臂萎缩。大约在2018年5月,患者出现了进行性恶化的腿部痉挛、无力和萎缩以及构音困难。ALS的诊断于2017年11月在临床上确立,并于2018年3月通过EMG研究确认。没有ALS家族史;全面的外显子组和基因组扫描没有发现任何记载的导致ALS的突变,例如C9ORF72或SOD1基因的突变。

[0410] 该患者进行了三种FDA批准的ALS疗法:利鲁唑(riluzole)、依达拉奉(edaravone)和奎尼丁(Nuedexta)。此外,该患者于2019年6月和11月在韩国(Korea)接受了自体间充质干细胞治疗。尽管进行了上述疗法,患者的临床病程和ALSFRS轨迹仍在加速。

[0411] 项目原理

[0412] 微管解聚蛋白2(STMN2)是控制微管稳定性的只在CNS中(并且具体来说主要在脊髓运动神经元中)表达的179个氨基酸的蛋白质。作为SCG10(颈上神经节10)研究多年,STMN2对损伤后的轴突再生长至关重要。引人注目的是,在2019年,两篇重要论文独立地记载了,微管解聚蛋白2的功能在许多散发性ALS病例中、以及在编码TDP43和C9ORF72的基因突变引起的ALS中受到阻抑(1,2)。这些发现最近被第三实验室独立地确认(3)。

[0413] 重要的是,这些研究将人运动神经元中最丰富的转录物之一STMN2鉴别为中枢TDP-43相互作用RNA。他们还各自为散发性ALS中的机制提供了支持,其中由衰老、环境暴露、损伤或ALS/FTD引起的突变导致的蛋白质稳态的破坏导致了TDP43的错误定位、聚集和RNA代谢的改变,这是几乎在所有散发性ALS病例中都存在的病理。尽管许多转录物的丰度由于TDP-43功能的丧失而改变,但在TDP-43基因敲低或功能丧失后STMN2的突然丧失提供了令人信服的证据,将STMN2与TDP-43病理和保护轴突并预防神经病的机制的破坏联系起来。

[0414] 根据这一令人印象深刻的最新文献,对患者的组织采样,并开发培养条件以对他的运动神经元的影响建模。针对该途径和患者细胞进行了一系列研究,以研究STMN2的TDP-43调控机制,其中TDP-43结合到STMN2前mRNA外显子1与2之间的内含子上。TDP-43水平的降低或核外出导致相同的STMN2结果:早期多腺苷酸化和隐性外显子的剪接,导致STMN2 mRNA转录物截短,以全长转录物为代价(图81)。因此,鉴于诺西那生成功地治疗了脊髓性肌萎缩,STMN2的TDP-43调控似乎有可能用作疾病生物标记物,或甚至剪接转换反义寡核苷酸的治疗靶。

[0415] 在广泛筛选后,鉴别出一组三种ASO,其中一种(SJ+94):(i)有效校正了患者运动神经元中TDP-43诱导的STMN2错误剪接,和(ii)是无毒的。对该组中的其它两种ASO进行了进一步分析。

[0416] 与健康个体相比,患者的运动神经元具有较少的核TDP-43

[0417] 该组中最终导致ASO(包括SJ+94和SJ-1)的科学发现是:(1)散发性ALS患者具有TDP-43的错误定位,即与健康个体相比较少的核TDP-43,和(2)TDP-43的这种错误定位导致STMN2的错误剪接,从而导致散发性ALS患者中截短的隐性STMN2,这是他们的疾病进展的驱动因素。

[0418] 从患者捐献的细胞对细胞进行重新编程以生成诱导性多能干细胞(iPSC)MGH 138(图84A)。使用序列分析,确认干细胞系(MGH 138)的基因型是患者的基因型(图84B)。通过这种确认,从患者的iPS细胞生成了干细胞源性运动神经元(hMN)(图84C至图84D)。然后将患者的运动神经元用于本文所述的所有体外概念验证测试。

[0419] 患者的运动神经元一旦生成,就确定患者的运动神经元对健康对照的核TDP-43是否存在任何差异。如上文所讨论,基于死后CNS组织的多重分析,可表现为细胞质错误定位的核TDP-43丧失是散发性ALS的病理标志。尽管在运动神经元中比在死后组织中更难检测,但至少一项先前研究已报道,来自ALS患者的iPSC源性神经元可重演TDP-43病理,包括它的细胞质错误定位。

[0420] 从患者的iPS细胞以及五个健康对照iPSC细胞系中分离出神经元。使用免疫细胞化学来探测TDP-43于神经元中的亚细胞定位(图85A)。在对照神经元中,使用皮尔森系数分

析观察到主要的核TDP-43染色,这揭露了TDP-43免疫染色与DNA复染之间的强相关性(图85B)。相反,患者的iPS细胞源性神经元显示TDP-43与核染色之间的相关性降低,这指示与对照相比,患者的运动神经元中的核TDP-43水平较低,确认了患者中的TDP-43病理(图85B)。

[0421] 患者特异性体外模型

[0422] 在过去的两年内,三项独立公开的研究已显示,散发性ALS患者的核TDP-43清除导致STMN2的截短。然而,这些研究涉及散发性ALS患者的死后组织。因此,研究了患者的运动神经元以观察患者的STMN2是否同样受TDP-43调控。因此,尽管已证明与非ALS对照相比,患者运动神经元中的核TDP-43水平降低,但它随后在体外细胞测定中进一步降低,以更清楚地评价潜在ASO在阻抑患者运动神经元中的隐性STMN2中的效能(如果有的话)。这种方法是必需的,这是因为TDP-43和STMN2功能障碍的明确确证需要CNS组织的详细分析和解剖,这并非任何活的ALS患者的选择。此外,这种体外方法与散发性ALS患者中的体内TDP-43病理(功能性TDP-43丧失)完全一致。

[0423] 为测试患者的STMN2是否受TDP-43调控,用siTARDBP RNA处理患者的运动神经元,以降低TDP-43水平。进行定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)来测量TDP-43mRNA水平,并确认相对于暴露于非靶向siRNA(siCTRL)的患者,患者运动神经元中的TDP-43mRNA水平已降低(图86A)。进一步确认了,患者运动神经元中的TDP-43清除导致STMN2全长转录物的减少和STMN2 RNA的截短(错误剪接)形式的强烈诱导(图86B至图86C)。

[0424] 因此,这些结果确认患者的STMN2受TDP-43调控。此外,已确立患者运动神经元中TDP-43水平的清除直接导致STMN2的错误剪接,从而产生截短的隐性STMN2 mRNA转录物,以全长转录物为代价。根据这些结果,随后评价了患者运动神经元的病理效应是否适应使用反义寡核苷酸的治疗性调节,即用于诺西那生、依替利森(eteplirsen)、米博美森(mipomersen)、米拉森(milasen)和加西福森(jacifusen)的药理学方法。

[0425] ASO的设计和筛选

[0426] 为确保设计的ASO与患者的遗传标记相匹配,从提取自患者iPS细胞的基因组DNA中PCR扩增了STMN2隐性外显子周围的区域,即TDP-43功能障碍时保留的内含子区域。关注该区域是因为假设,STMN2转录中的缺陷可通过将ASO靶向从隐性剪接位点到隐性多腺苷酸化位点并且包括TDP-43结合位点的RNA区域来挽救。然后对PCR产物进行桑格测序,并确认靶向区域是患者序列与参考基因组之间的完美匹配(图87A、图87C)。

[0427] 设计并合成了靶向该区域的ASO,以试图校正在患者运动神经元的STMN2转录物中观察到的剪接缺陷。具体来说,几个ASO被设计成与预测为未结构化并且因此潜在地可用于ASO结合的前mRNA区域互补(该区域在隐性剪接位点后的第94至第121位碱基)。这些ASO是使用两种不同的化学法合成的(2'-O-甲氧基乙基RNA(MOE),以及具有锁定核酸的MOE嵌合体;所有序列都含有硫代磷酸酯键)并且沿着内含子平铺排列,范围从隐性外显子的5'到3'多腺苷酸化位点(图82)。由于所述化合物不含DNA,预计这些靶向的ASO将结合到转录物,并在空间上用于促进正确的STMN2剪接。

[0428] 在患者的运动神经元中,针对(1)阻抑截短的STMN2转录物的生成以及(2)恢复全长STMN2转录物的能力筛选了总共51种ASO。ASO SJ+94和ASO SJ-1在下述反复筛选实验后被选作候选物,这基于它们在患者运动神经元中阻抑STMN2的隐性剪接和恢复全长STMN2

RNA的能力(后者在两个不同的实验中进行)、提高患者运动神经元中的STMN2蛋白水平以及促进患者运动神经元中的轴突再生长的能力,从而产生真正临床益处的潜能。

[0429] 在第一个实验中,用siTARDBP处理患者的运动神经元,然后将患者的运动神经元与一定浓度范围(介于30nM到0.03nM范围内)的各种ASO一起培养,然后提取总RNA。使用提取的RNA通过逆转录来合成cDNA。使用qRT-PCR来评价使用RNA18S5表达标准化的截短的STMN2 RNA和全长STMN2 RNA的水平。尽管许多ASO显示了有前途的结果,但ASO SJ+94的结果引人注目,这是因为在患者的运动神经元中,它能够以剂量依赖性方式(i)阻抑隐性剪接(图88A),和(ii)相对于非靶向对照ASO-NTC恢复全长STMN2 RNA(图88B)。此外,在患者的运动神经元中,ASO SJ-1的结果在(i)阻抑隐性剪接(图95A)和(ii)相对于非靶向对照ASO-NTC恢复全长STMN2 RNA(图95B)方面既有效又安全。

[0430] ASO效能的汇总

[0431] 已确立,在患者运动神经元中,当核TDP-43减少时,ASO(SJ+94)和ASO(SJ-1)阻抑STMN2的隐性剪接并恢复全长STMN2 RNA。然后对它进行评价以观察当TDP-43错误定位时,它在不同的实验范例中是否将证明有效。死后组织研究已显示,TDP-43错误定位和它在细胞质中的聚集是散发性ALS的标志。几个小组已报道,类似于在散发性ALS患者的死后组织中观察到的TDP-43的细胞质聚集是响应于蛋白酶体的药理学抑制而发生(1,4)。也已显示TDP-43的这种错误定位会导致它的转录物(包括STMN2)的表达发生变化。

[0432] 在患者神经元中诱导TDP-43核清除的蛋白酶体抑制(MG-132(1uM))导致STMN2表达减少(图89)。事实上,用ASO SJ+94处理的患者运动神经元维持了比用非靶向对照ASO(NTC)处理的患者运动神经元显著更高水平的全长STMN2 RNA(p值为0.0024)(图89)。此外,用ASO SJ-1处理的患者运动神经元维持了比用非靶向对照ASO(NTC)处理的患者运动神经元显著更高水平的全长STMN2 RNA(高30%),这转化为0.0003的p值(图96)。

[0433] 在确立并验证STMN2 ASO可影响转录物水平后,试图确定它们是否也可挽救在TDP-43减少后观察到的降低的蛋白质水平。用siRNA和非靶向ASO(NTC)或来自筛选的一种先导化合物处理患者的运动神经元(图90、图97)。作为阳性对照,将患者的运动神经元与SP600125一起培养,SP600125是先前已展示提高STMN2蛋白水平的确立的JNK抑制剂(JNKi)(1,5)。后续免疫印迹分析显示,STMN2蛋白水平在通过siTDP丧失核TDP-43后降低并在JNK抑制后增加(图90)。与用非靶向对照ASO(NTC)处理的细胞不同,观察到先导候选物使STMN2恢复到siRNA对照的水平。这些综合结果表明,测试的ASO防止初生STMN2RNA转录物加工成截短形式,有利于全长转录物将蛋白质水平恢复到正常水平。

[0434] ASO对轴突再生的效能的汇总

[0435] 先前已展示,TDP-43清除导致损伤后的轴突再生长减少(1)。在STMN2水平降低或完全缺乏STMN2的hMN中观察到类似的表型,这可通过STMN2的恢复或STMN2的翻译后稳定来挽救(1,2)。这些结果强烈暗示STMN2与ALS中观察到的运动神经病有关。

[0436] 为测试ASO SJ+94是否可在TDP-43清除和损伤后挽救轴突再生长,在微流体装置中培养患者的运动神经元,所述微流体装置允许轴突生长到与神经元细胞体不同的室中(图91A)。在该装置的细胞体区室中培养7天的神经元通过微通道将轴突延伸到轴突室中。用siTARDBP和ASO SJ+94处理神经元,然后割断轴突而不干扰细胞体区室中的细胞体。然后从微通道测量轴突延伸以评价损伤后的再生长(图91B、图91D)。该分析揭露相对于非靶向

对照ASO,使用ASO Sj+94的再生长显著增加(图91C)。该分析另外揭露相对于非靶向对照ASO,使用ASO SJ-1的再生长显著增加(图91E),平均值分别为243um和176um(p值为0.0014)。

[0437] 参考文献

[0438] 1.Klim JR,Williams LA,Limone F,Guerra San Juan I,Davis-Dusenbery BN,Mordes DA,Burberry A,Steinbaugh MJ,Gamage KK,Kirchner R,Moccia R,Cassel SH,Chen K,Wainger BJ,Woolf CJ,Eggan K.ALS-implicated protein TDP-43 sustains levels of STM N2,a mediator of motor neuron growth and repair.Nat Neurosci.2019;22(2):167-79.Epub 2019/01/16.doi:10.1038/s41593-018-0300-4.PubMed PMID:30643292.

[0439] 2.Melamed Z,Lopez-Erauskin J,Baughn MW,Zhang O,Drenner K,Sun Y,Freyermuth F,McMahon MA,Beecari MS,Artates JW,Ohkubo T,Rodriguez M,Lin N,Wu D,Bennett CF,Rigo F,Da Cruz S,Ravits J,Lagier-Tourenne C,ClevelandDW.Premature polyadenylation-mediated loss of stathmin-2is a hallmark of TDP-43-dependent neurodegeneration.Nat Neurosci.2019;22(2):180-90.Epub2019/01/16.doi:10.1038/s41593-018-0293-z.PubMed PMID:30643298;PMCID:PMC6348009.

[0440] 3.Prudencio M,Humphrey J,Pic kles S,Brown AL,Hill SE,Kachergus J,Shi J,Heckman M,Spiegel M,Cook C,Song Y,Yue M,Daughrity L,Carlomagno Y,Jansen-West K,Femandez De Castro C,DeTure M,Koga S,Wang YC,Sivakumar P,Bodo C,Candalija A,Talbot K,Selvaraj BT,Burr K,Chandran S,Newcombe J,Lashley T,Hubbard I,Catalano D,Kim D,PropP N,Fennessey S,Fagegaltier D,Phatnani H,Secrier M,Fisher EM,Oskarsson B,van Blitterswijk M,Rademakers R,Graff-Radford NR,Boeve B,Knopman DS,Petersen R,Joscphs K,Thompson EA,Raj T,Ward ME,Dickson D,Gendron TF,Fratta P,Petrucelli L.Truncated stathmin-2is a marker of TDP-43 pathology in frontotemporal dememtia.J Clin Invest.2020.Epub 2020/08/14.doi:10.1172/JCI139741.PubMed PMID:32790644.

[0441] 4.van Eersel J,Ke YD,Gladbach A,Bi M,Gotz J,Kril JJ,Ittner LM.Cytoplasmic accumulation and aggregation of TDP-43 upon protcasome inhibition in cultured neurons.PLoS One.2011;6(7):e22850.Epub 2011/08/11.doi:10.1371/journal.pone.0022850.PubMed PMID:21829535;PMCID:PMC3146516.

[0442] 5.Shin JE,Miller BR,Babetto E,Cho Y,Sasaki Y,Qayum S,Russler EV,Cavalli V,Milbrandt J,DiAntonio A.SCG10 is a JNK target in the axonal degeneration pathway.Proc Natl Acad Sci U S A.2012;109(52):E3696-705.Epub 2012/11/29.doi:10.1073/pnas.1216204109.PubMed PMID:23188802;PMCID:PMC3535671.

[0443] ***

[0444] 本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验确定本文所述的具体实施方案的许多等同物。本发明的范围并不旨在限于其中阐述的描述或细节。除非指示相反或从上下文中明显看出,否则诸如“一(a)”、“一(an)”和“该/所述(the)”的冠词可意指一个或一个

以上。除非指示相反或从上下文中明显看出，否则如果一个、一个以上或所有的组成员存在于、用于或以其它方式与给定的产品或过程相关，那么在组的一个或多个成员之间包括“或”或“和/或”的权利要求或描述被认为是令人满意的。本发明包括以下实施方案：该组中正好有一个成员存在于、用于或以其它方式与给定的产品或过程相关。本发明包括以下实施方案：一个以上或所有的组成员存在于、用于或以其它方式与给定的产品或过程相关。此外，应理解，本发明涵盖所有的变化、组合和排列，其中一个或多个限制、元素、条款、描述性术语等从一项或多项权利要求(无论是原始的还是随后添加的权利要求)引入另一项权利要求(无论是原始的还是随后添加的)中。例如，依赖于另一权利要求的任何权利要求可被修改以包括在任何其它权利要求(例如依赖于同一基础权利要求的任何其它权利要求)中发现的一个或多个元素、特征或限制。可修改任何一项或多项权利要求，以明确排除任何一个或多个实施方案、元素、特征等。例如，可从任何一项或多项权利要求中排除任何特定的sideroflexin、sideroflexin调节剂、细胞类型、癌症类型等。

[0445] 应理解，(i)任何分类、预测、治疗选择、治疗等方法可包括提供样品(例如从需要对癌症进行分类、预测、治疗选择、治疗的受试者获得的样品，例如从受试者获得的癌症样品)的步骤；(ii)任何分类、预测、治疗选择、治疗等方法可包括提供需要这种分类、预测、治疗选择、治疗或癌症治疗的受试者的步骤。

[0446] 在权利要求叙述方法的情况下，本发明的某些方面提供了适用于进行该方法的产品，例如试剂盒、剂或组合物。

[0447] 在元素被呈现为列表(例如以马库西组(Markush group)格式)的情况下，元素的每个亚组也被公开，并且可从该组中去除任何元素。为了简明起见，本文仅具体叙述了这些实施方案中的一些实施方案，但本公开涵盖所有此类实施方案。还应理解，通常，当本发明或本发明的方面被称为包括特定的元件、特征等时，本发明的某些实施方案或本发明的某些方面是由此类元件、特征等组成或基本上由其组成。

[0448] 当本文提到数值范围时，本发明包括包含端点的实施方案、排除两个端点的实施方案和包含一个端点而排除另一个端点的实施方案。除非另有指示，否则应假设包括两个端点。此外，除非另有指示或根据上下文和本领域普通技术人员的理解显而易见，否则在本发明的不同实施方案中，表示为范围的值可采用所述范围内的任何特定值或子范围，到该范围下限的十分之一单位，除非上下文另有明确规定。当使用诸如“小于X”、“大于X”或“至少X”的短语时(其中X是数字或百分比)，应理解，任何合理的值都可以被选作该范围的下限或上限。还应理解，在本文陈述了数值列表的情况下(无论是否以“至少”开头)，本发明包括涉及由列表中的任何两个值定义的任何中间值或范围的实施方案，并且最低值可取为最小值，最高值可取为最大值。此外，当数字列表(例如百分比)以“至少”开头时，该术语适用于列表中的每个数字。对于其中数值以“约”或“大约”开头的本发明的任何实施方案，本发明包括列举精确值的实施方案。对于其中数值不以“约”或“大约”开头的本发明的任何实施方案，本发明包括该值以“约”或“大约”开头的实施方案。除非另有说明或从上下文中显而易见，否则“大约”或“约”通常包括在任一方向上落入数值的1％、或在一些实施方案中落入数值的5％、或在一些实施方案中落入数值的10％范围内的数值(大于或小于该数值)(例如，其中这个数值将不允许超过可能值的100％)。

[0449] 应理解，除非明确指示相反的情况，否则在本文要求保护的包括一个以上动作的

任何方法中，该方法的动作的顺序不必限于列举方法的动作的顺序，但本公开涵盖顺序如此受限的实施方案。在一些实施方案中，方法可由个体或实体来执行。在一些实施方案中，方法的步骤可由两个或多个个体或实体来执行，使得方法被共同执行。在一些实施方案中，方法可至少部分地通过要求或授权另一个体或实体来执行方法的一个、一个以上或所有步骤来执行。在一些实施方案中，方法包括要求两个或多个实体或个体各自执行方法的至少一个步骤。在一些实施方案中，协调两个或更多个步骤的执行，以使得方法被共同执行。还应理解，除非上下文另有说明或显而易见，否则本文所述的任何产品或组合物都可以被视为“分离的”。还应理解，在适用的情况下，除非另有指示或从上下文中显而易见，否则可适于在精神上执行或作为精神步骤或使用诸如钢笔或铅笔的书写工具以及适于在其上书写的表面(例如纸)来执行的任何方法或方法的步骤都可明确地指示为至少部分地、基本上或完全由机器(例如计算机、装置(设备)或系统)来执行，所述机器在一些实施方案中可被特别改造或设计成能够执行这种方法或步骤或其一部分。

[0450] 本文中所使用的章节标题不应被理解为以任何方式进行限制。明确预期在任何章节标题下呈现的主题可适用于本文所述的任何方面或实施方案。

[0451] 本文的实施方案或方面可涉及本文所述的任何剂、组合物、物品、试剂盒和/或方法。预期任何一个或多个实施方案或方面只要合适就可与任何一个或多个其它实施方案或方面自由组合。例如，提供了不会相互矛盾的两种或多种剂、组合物、物品、试剂盒和/或方法的任一组合。应理解，除非另有指示或清楚地表明，否则本文任一处的术语的任何描述或示例都可应用于该术语在本文中出现的任何地方(例如，在该术语相关的任何方面或实施方案中)。

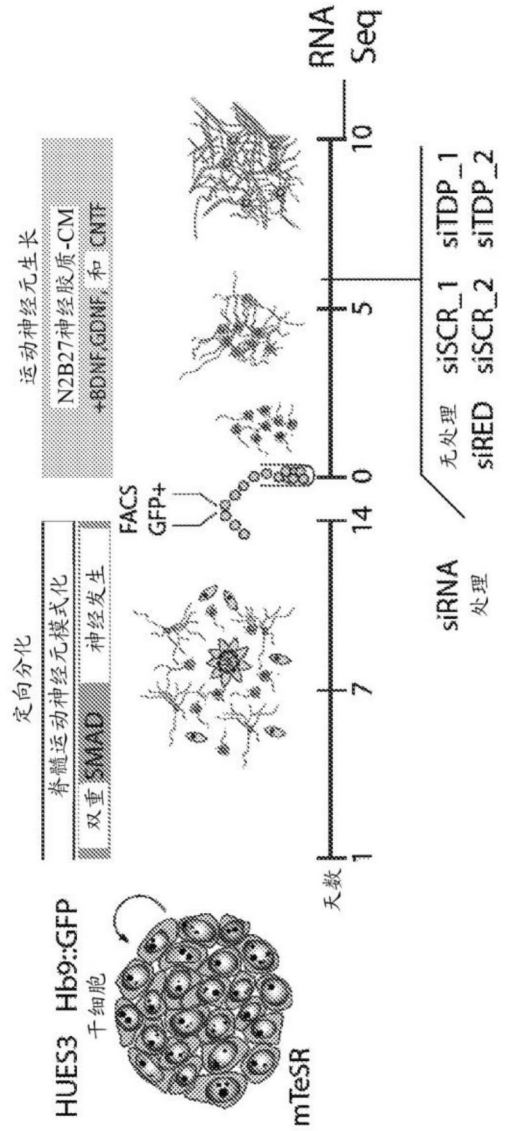

HUES3 Hb9::GFP
干细胞
mTeSR
定向分化
脊髓运动神经元模式化
双重 SMAD 神经发生
运动神经元生长
N2B27神经胶质-CM
+BDNF,GDNF,和 CNTF
FACS
GFP+
天数
1
7
14
0
5
10
siRNA
处理
无处理
siRED
siSCR_1
siSCR_2
siTDP_1
siTDP_2
RNA
Seq

图1A

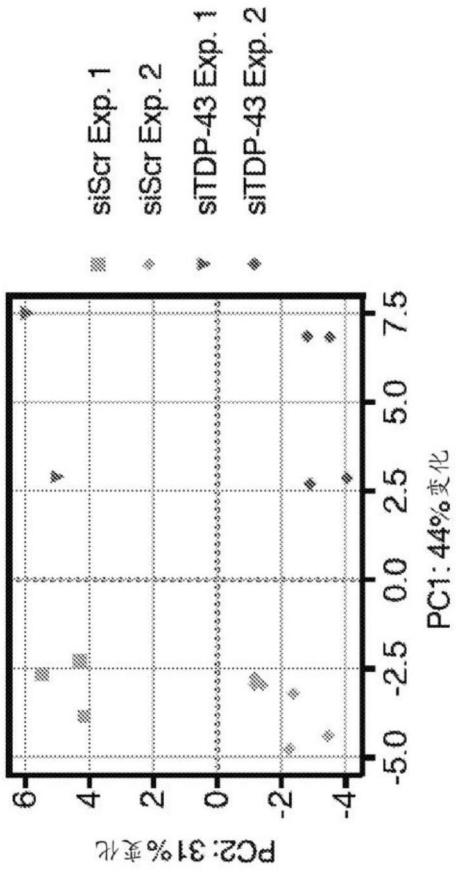

siScr Exp. 1
siScr Exp. 2
siTDP-43 Exp. 1
siTDP-43 Exp. 2
PC1: 44%变化
PC2: 31%变化
-5.0
-2.5
0.0
2.5
5.0
7.5
6
4
2
0
-2
-4

图1B

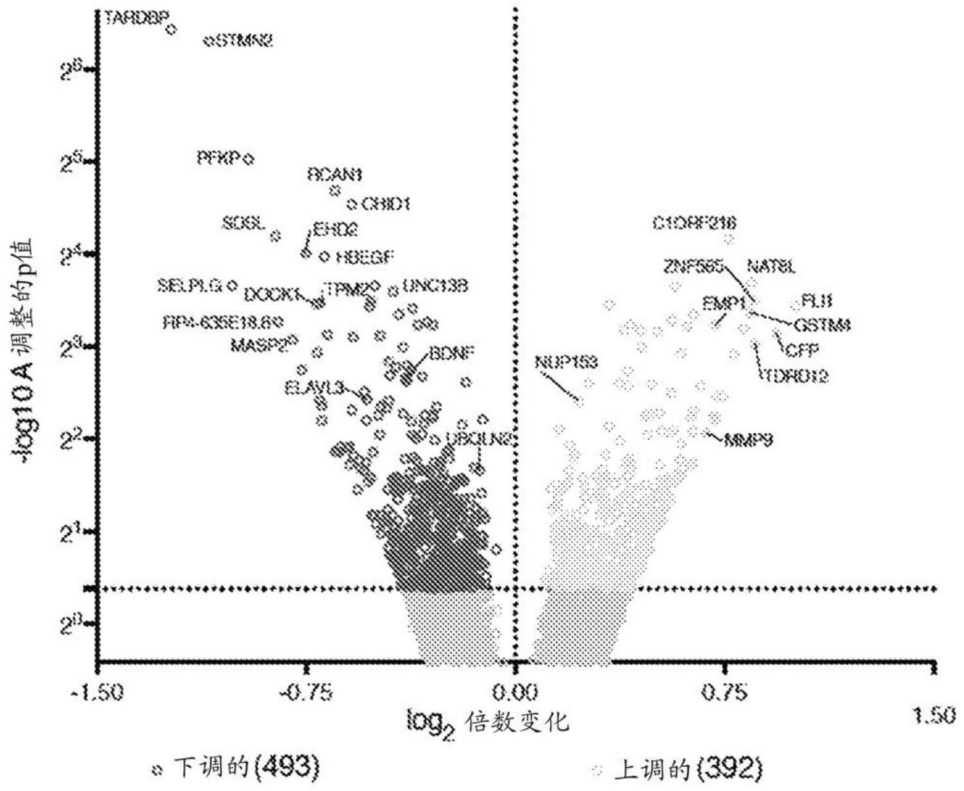

TARDBP
STMN2
PFKP
RCAN1
CHD1
SDSL
EHD2
HBEGF
SELPLG
DOCK1
TPM2
UNC13B
RP4-635E18.6
MASP2
BDNF
ELAVL3
C1ORF216
ZNF565
NAT8L
EMP1
FLI1
GSTM4
CFP
TDRD12
NUP153
MMP9
UBQLN2
-log10A 调整的p值
log2 倍数变化
下调的(493)
上调的(392)

图1C

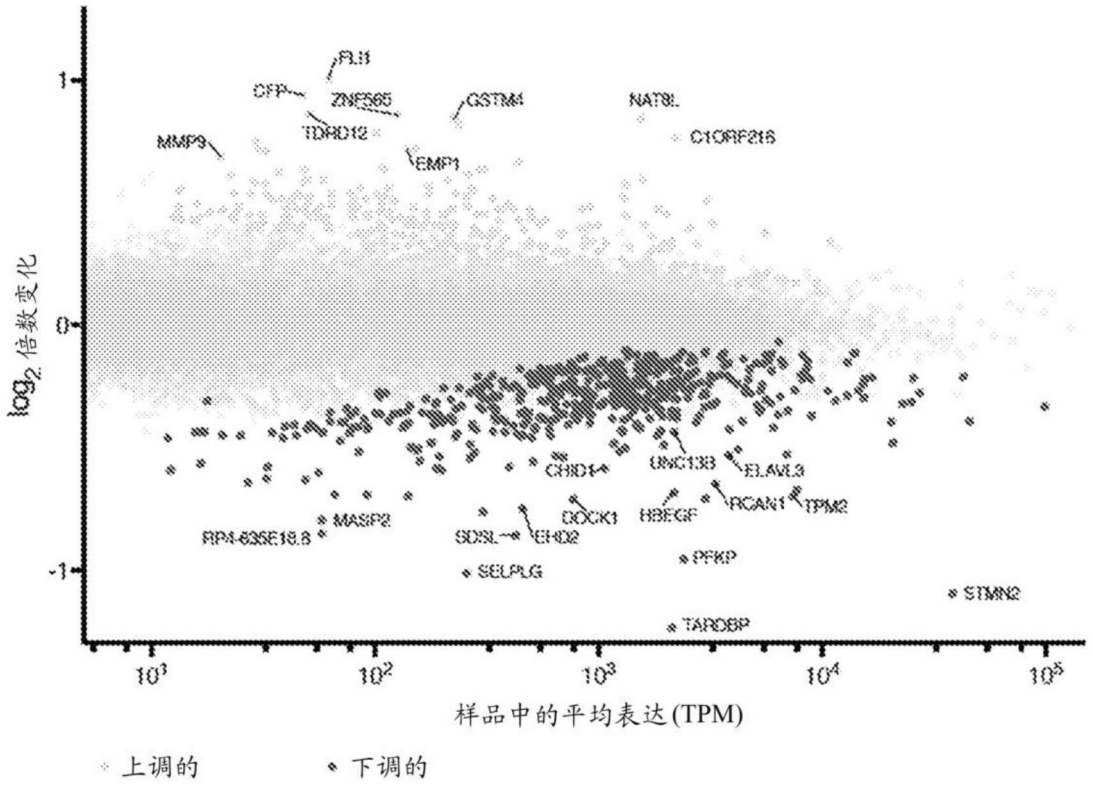

FLI1
CFP
ZNF565
GSTM4
NAT8L
TDRD12
C1ORF216
MMP9
EMP1
CHD1
UNC13B
ELAVL3
RCAN1
TPM2
HBEGF
DOCK1
MASP2
SDSL
EHD2
RP4-635E18.6
PFKP
SELPLG
STMN2
TARDBP
log2 倍数变化
样品中的平均表达(TPM)
上调的
下调的

图1D

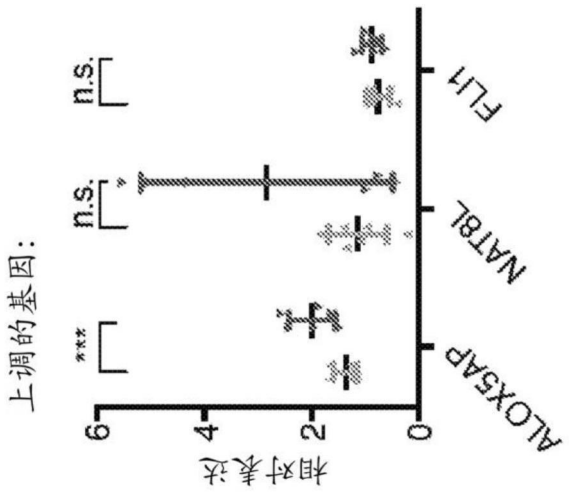


图1E

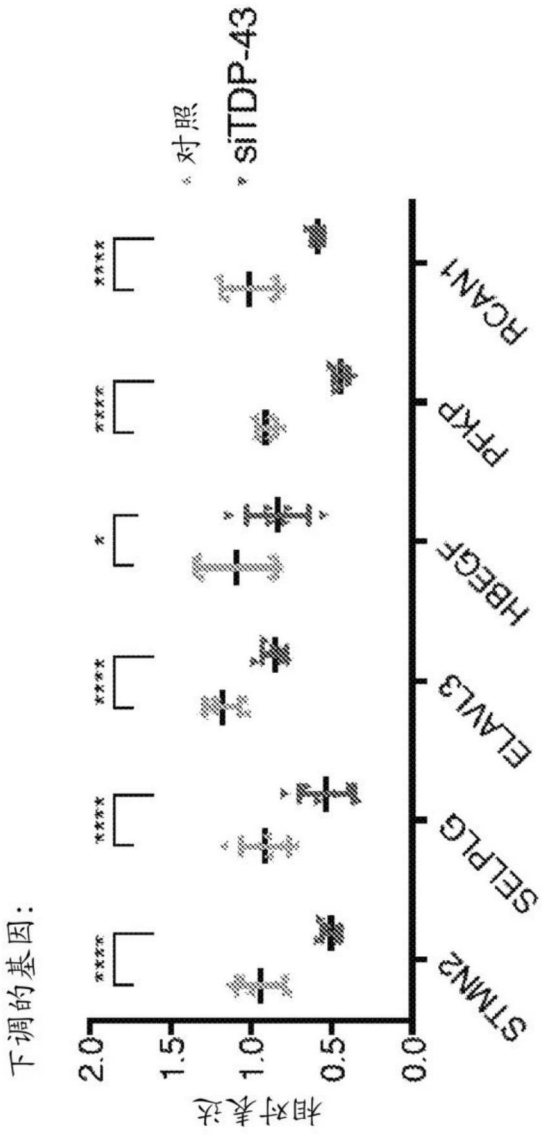

对照
siTDP-43
下调的基因：
相对表达
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
STMN2
SELPLG
ELAVL3
HBEGF
PFKP
RCAN1
****
*

图1F

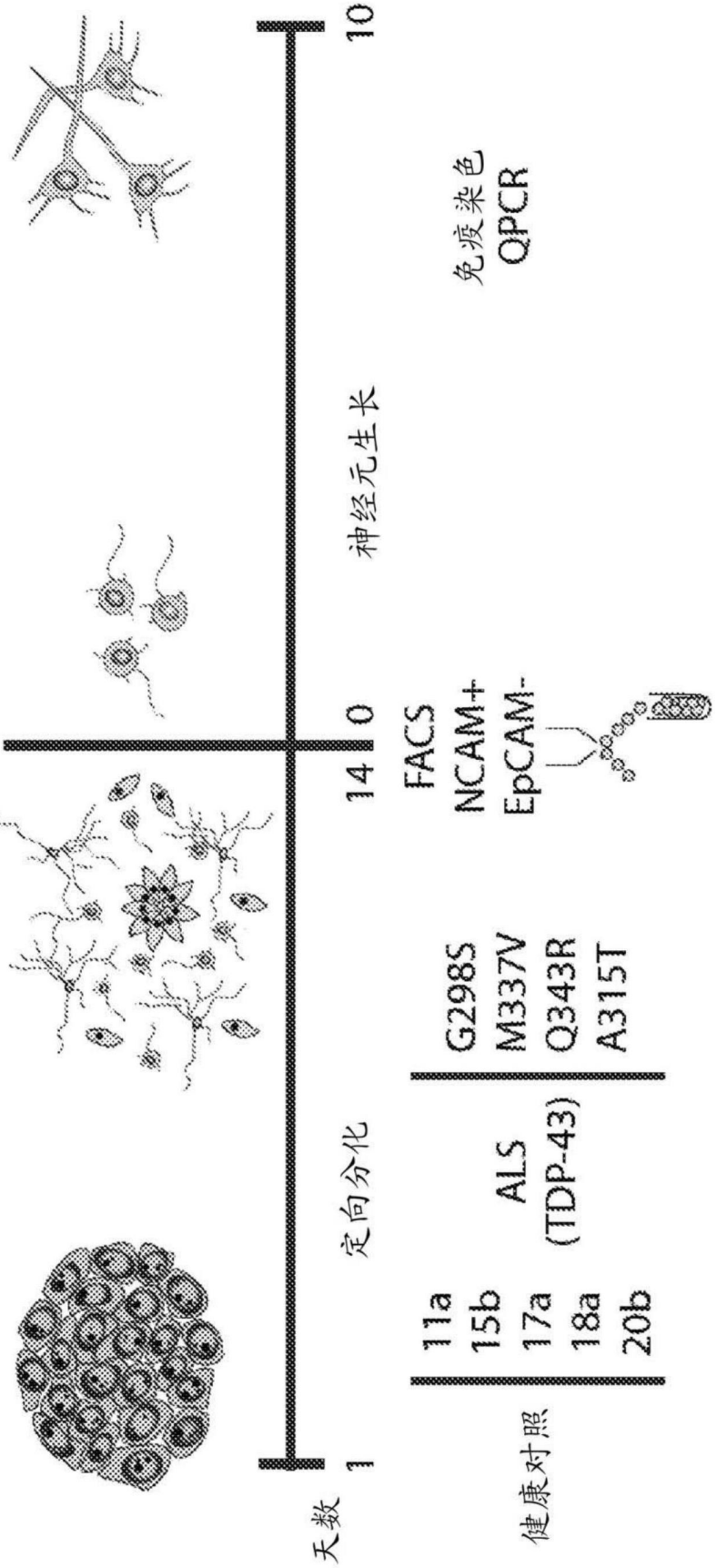

天数
1
定向分化
14
0
神经元生长
10
免疫染色
QPCR
FACS
NCAM+
EpCAM-
健康对照
11a
15b
17a
18a
20b
ALS
(TDP-43)
G298S
M337V
Q343R
A315T

图2A

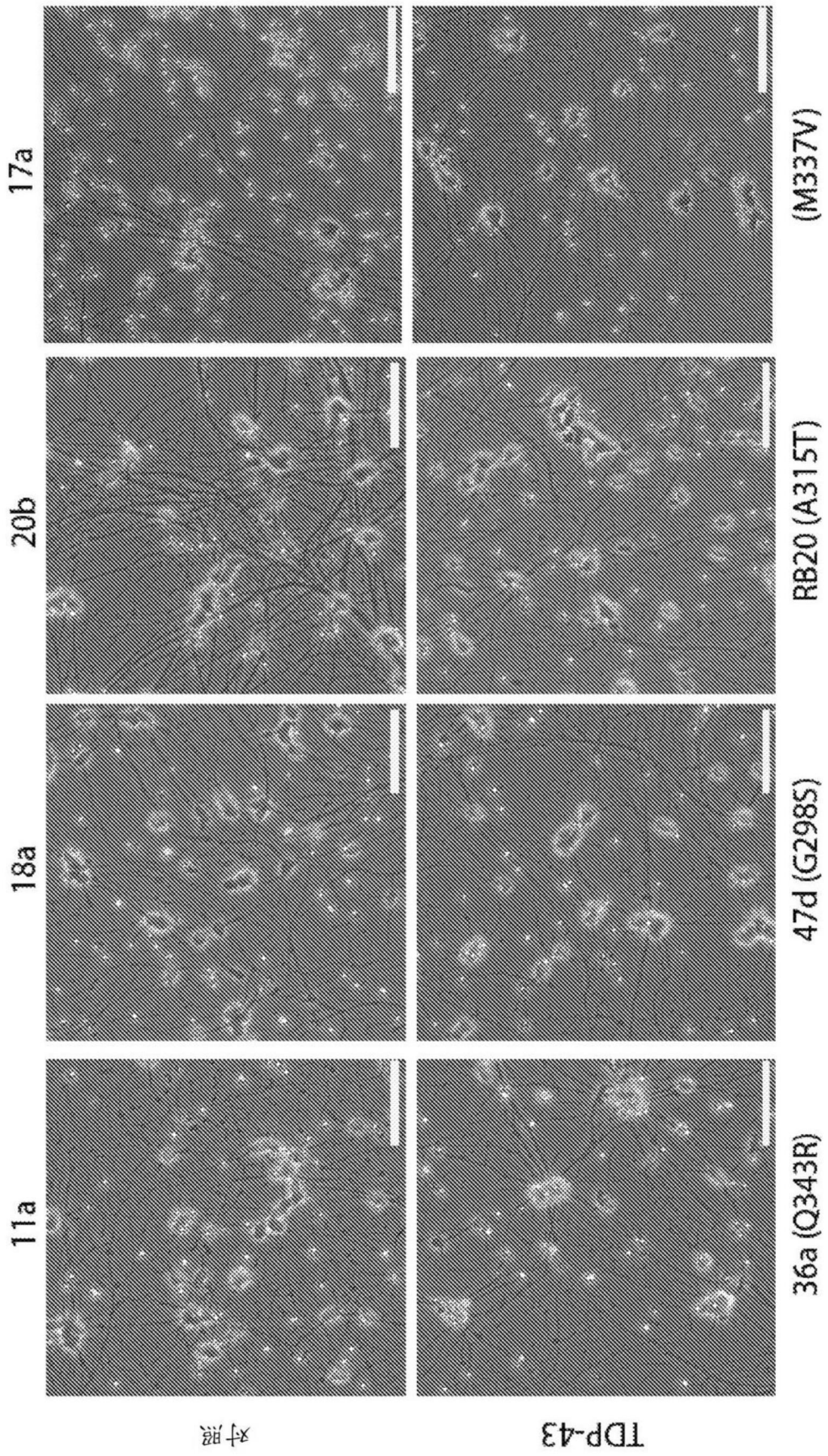


图2B

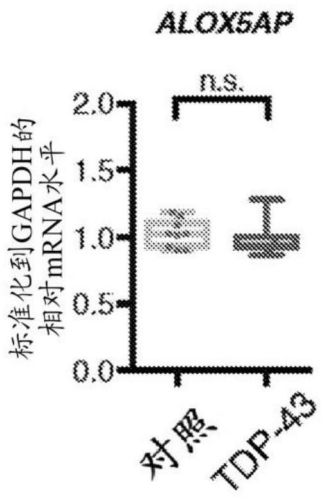

ALOX5AP
n.s.
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
标准化到GAPDH的
相对mRNA水平
对照
TDP-43

图2C

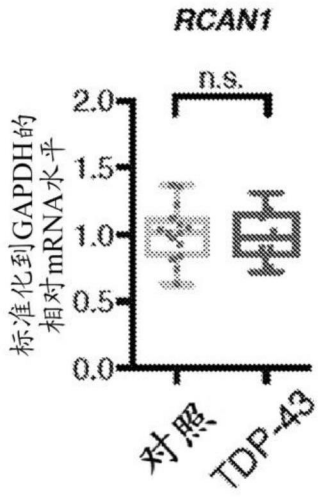

RCAN1
n.s.
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
标准化到GAPDH的
相对mRNA水平
对照
TDP-43

图2D

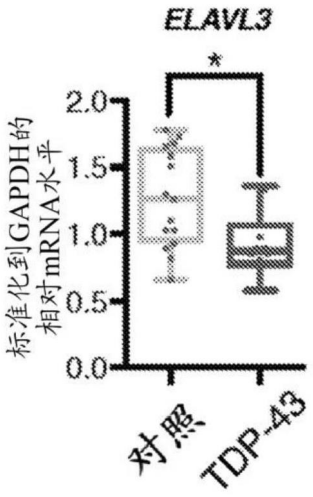

ELAVL3
*
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
标准化到GAPDH的
相对mRNA水平
对照
TDP-43

图2E

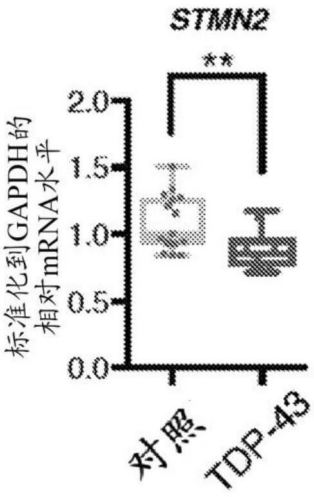

STMN2
**
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
标准化到GAPDH的
相对mRNA水平
对照
TDP-43

图2F

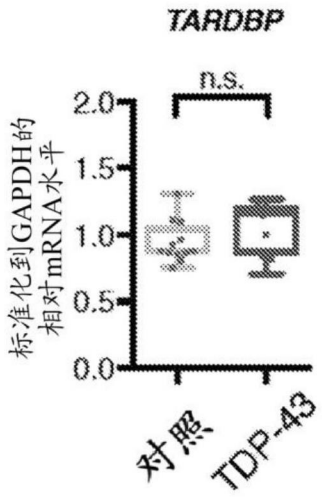

TARDBP
n.s.
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
标准化到GAPDH的
相对mRNA水平
对照
TDP-43

图2G

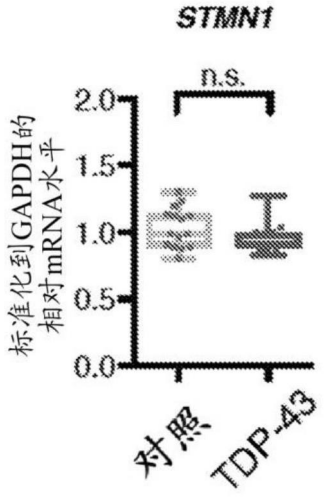

STMN1
n.s.
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
标准化到GAPDH的
相对mRNA水平
对照
TDP-43

图2H

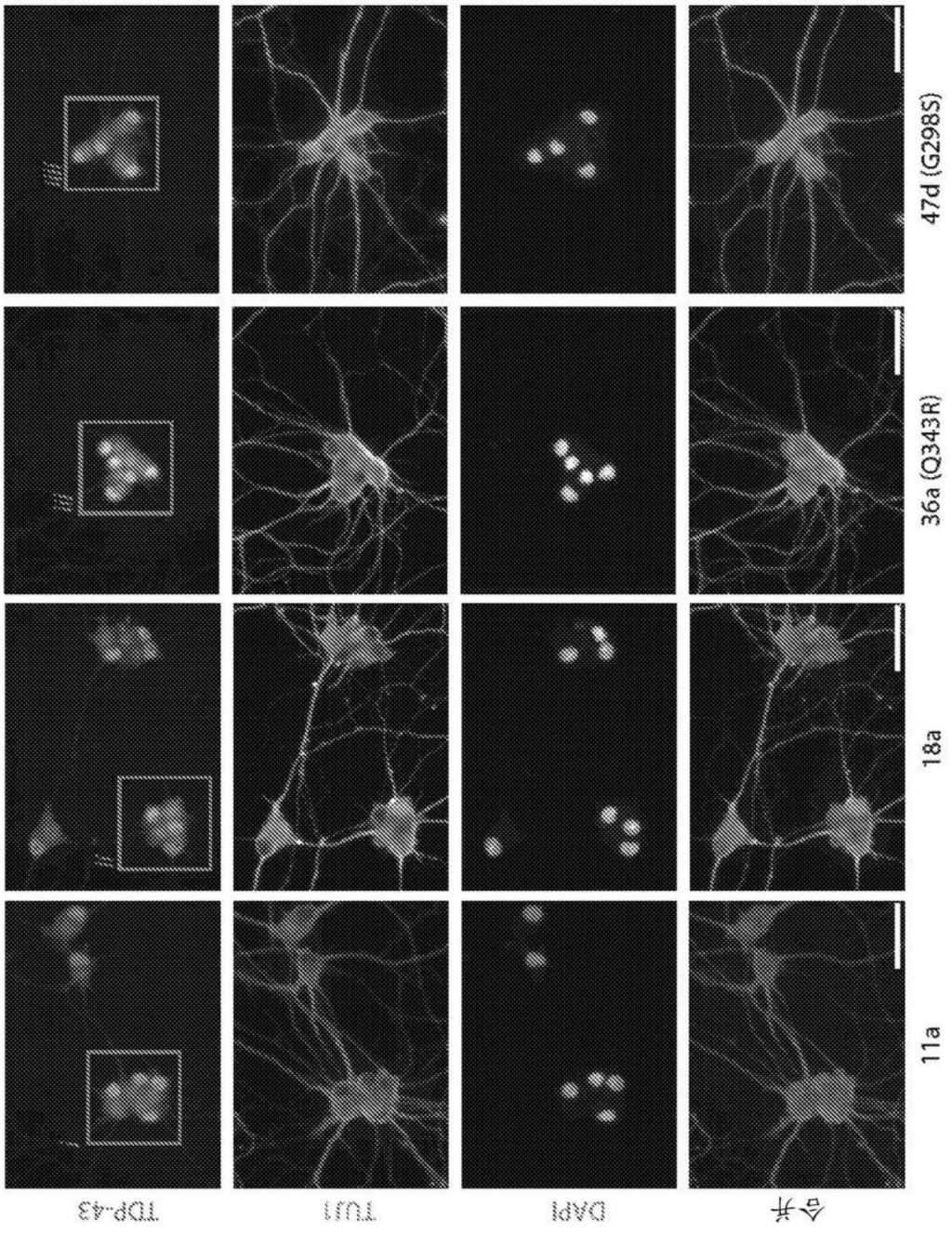


图2I

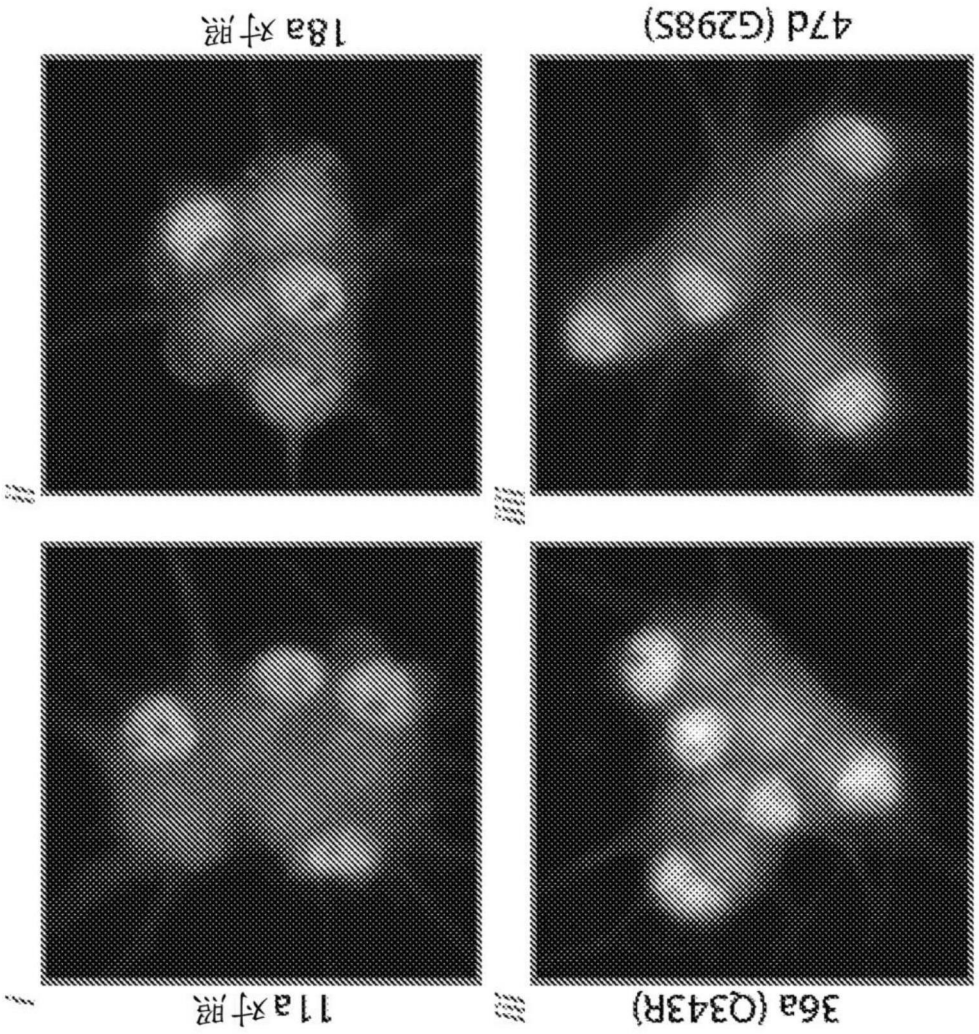


图2I续

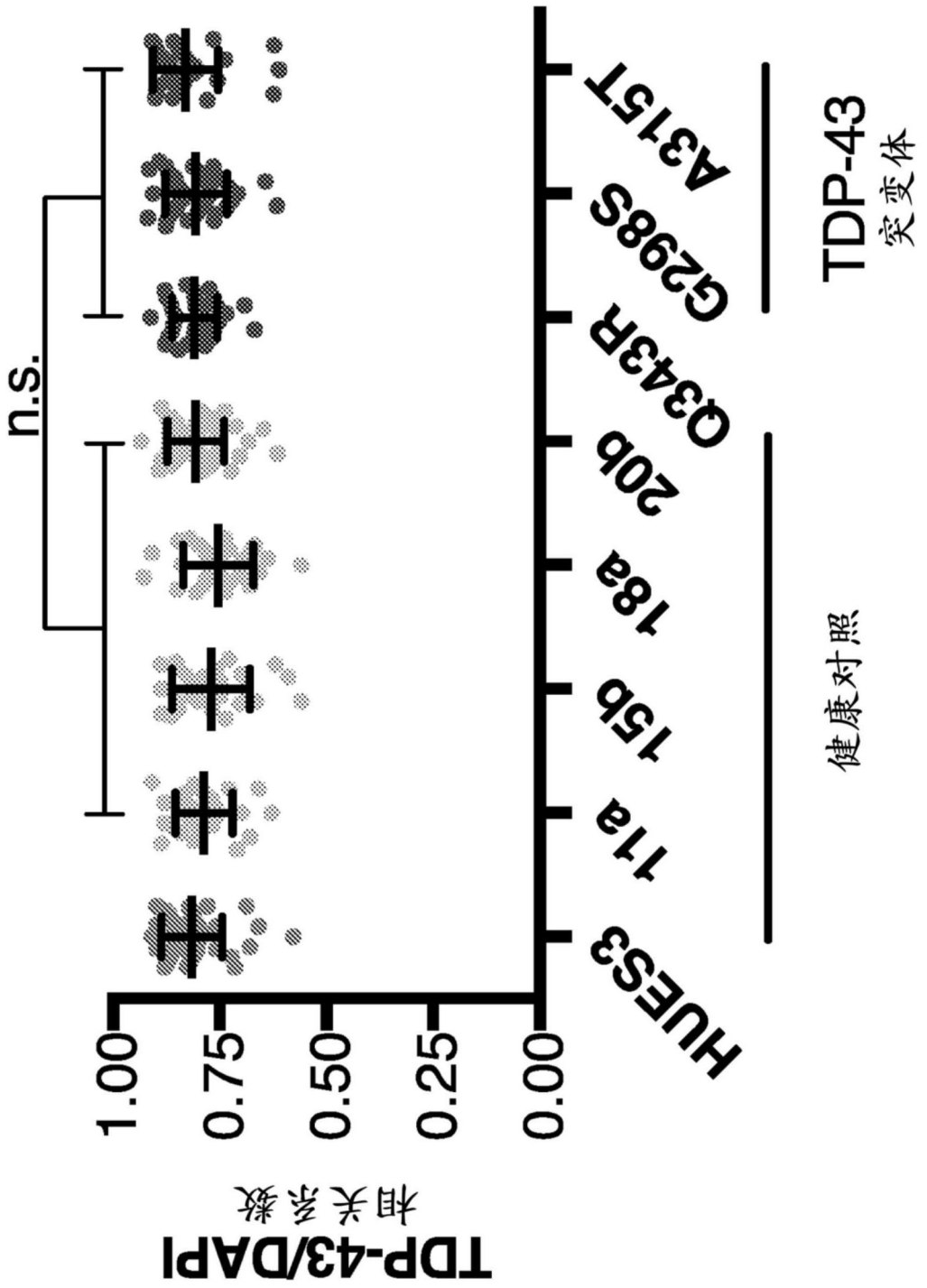

TDP-43/DAPI
相关系数
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
HUES3
11a
15b
18a
20b
Q343R
G298S
A315T
健康对照
TDP-43
突变体
n.s.

图2J

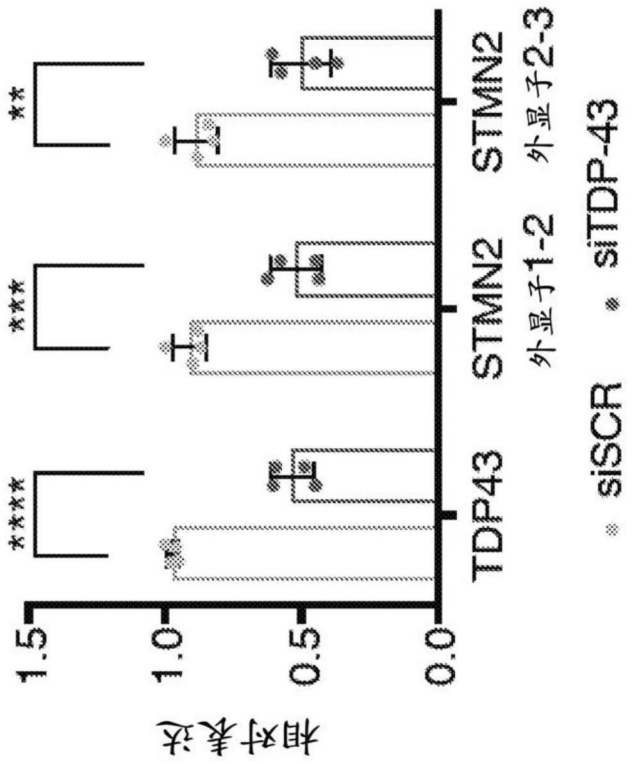


图3A

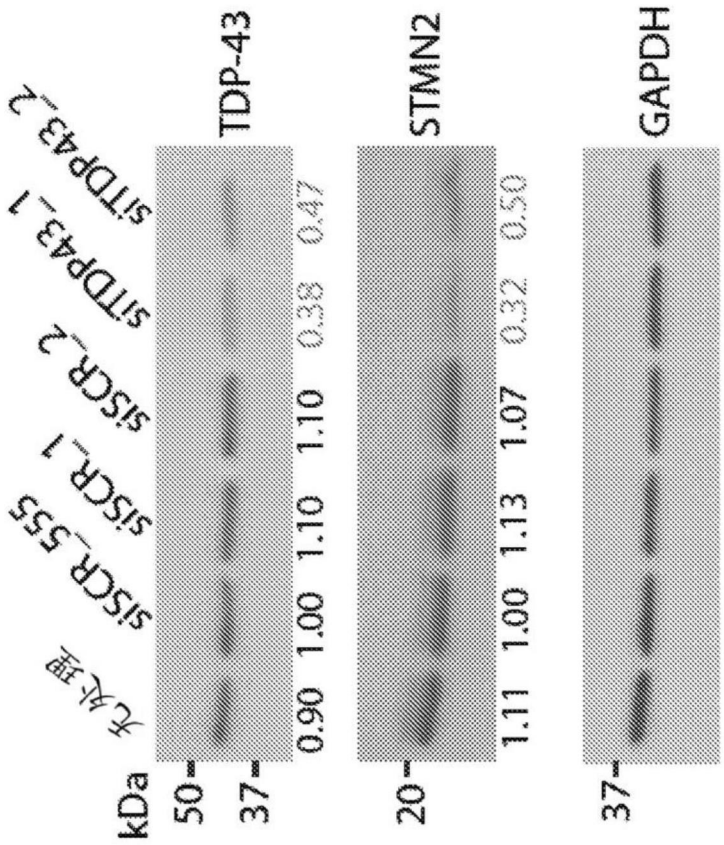

TDP-43
STMN2
GAPDH
kDa
50
37
20
37
未处理
siSCR_555
siSCR_1
siSCR_2
siTDP43_1
siTDP43_2
0.90 1.00 1.10 1.10 0.38 0.47
1.11 1.00 1.13 1.07 0.32 0.50

图3B

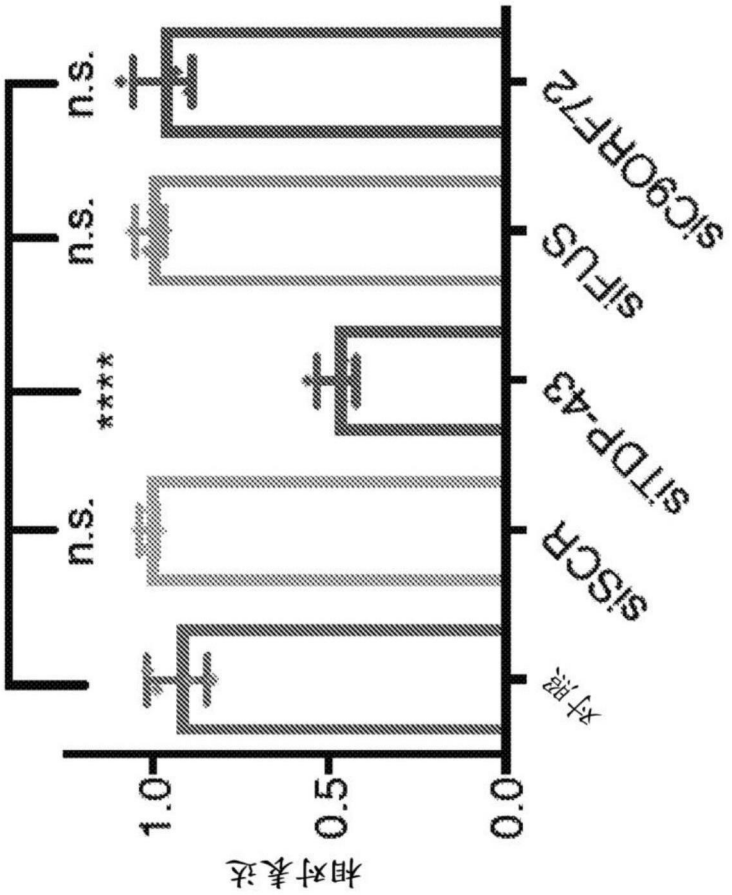


图3C

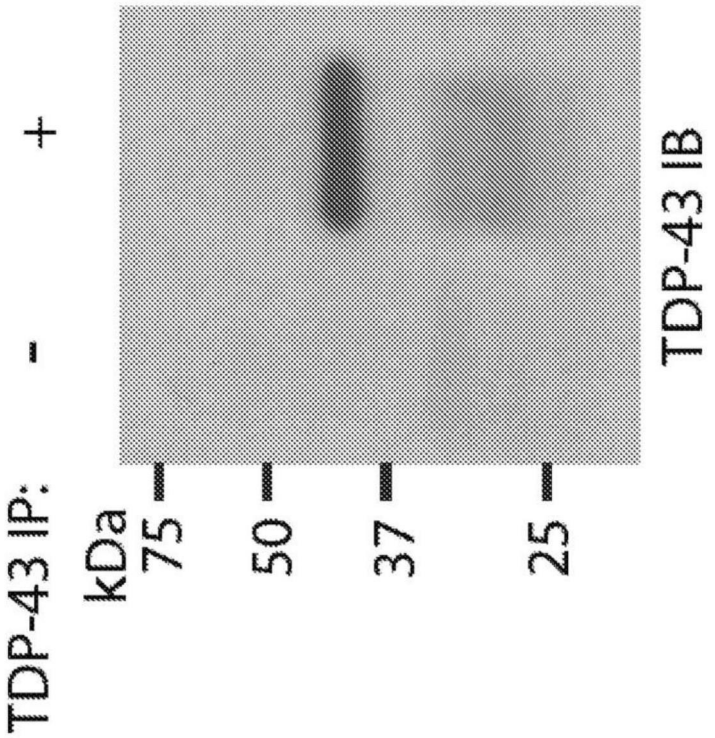

TDP-43 IP:
-
+
kDa
75
50
37
25
TDP-43 IB

图3D

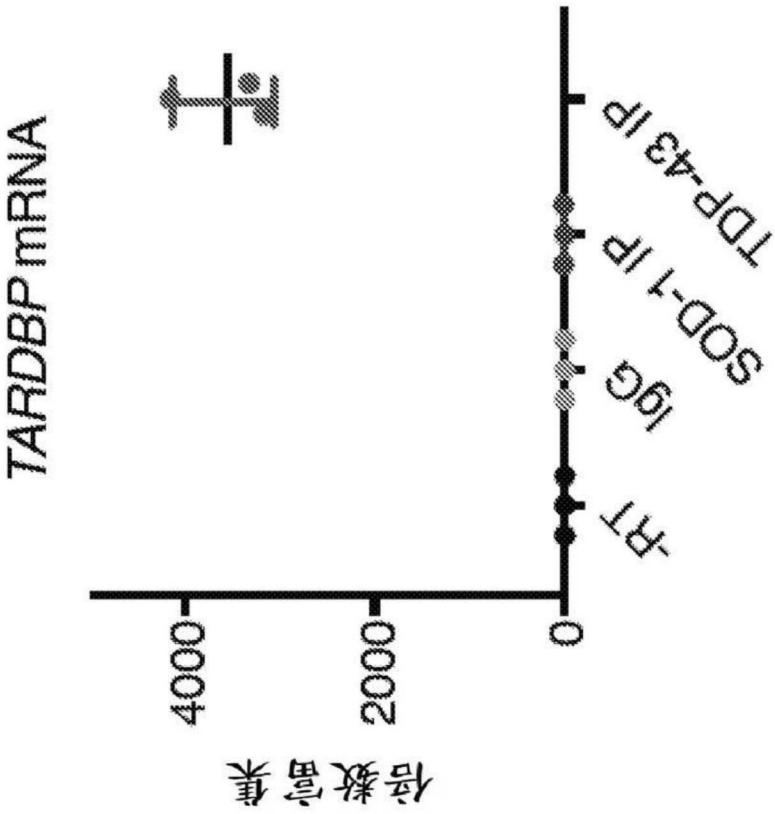

TARDBP mRNA
倍数富集
4000
2000
0
RT
IgG
SOD-1 IP
TDP-43 IP

图3E

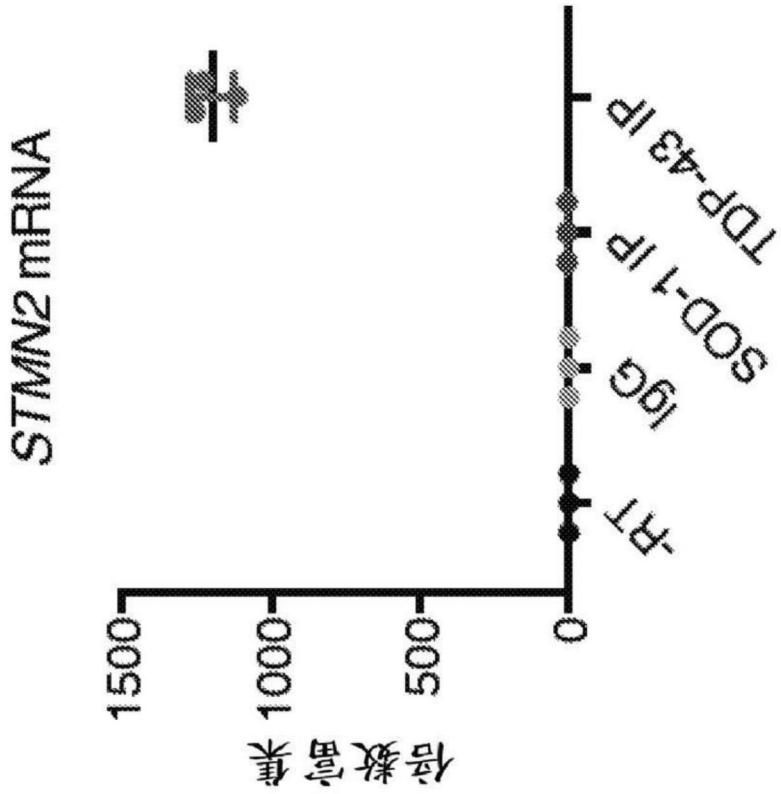


图3F

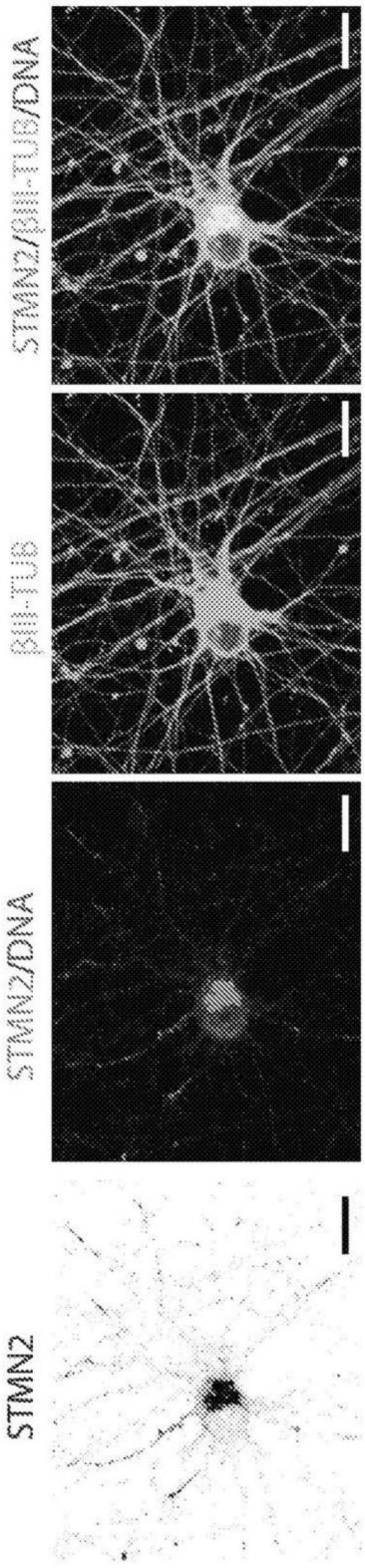


图3G

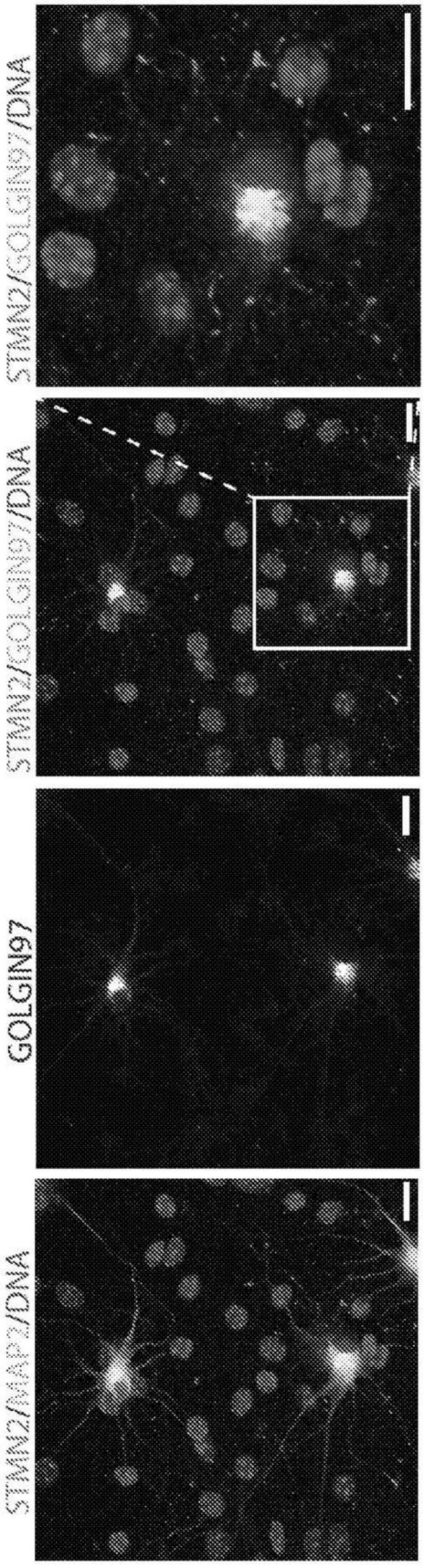

STMN2/GOLGIN97/DNA
STMN2/GOLGIN97/DNA
GOLGIN97
STMN2/MAP2/DNA

图3H

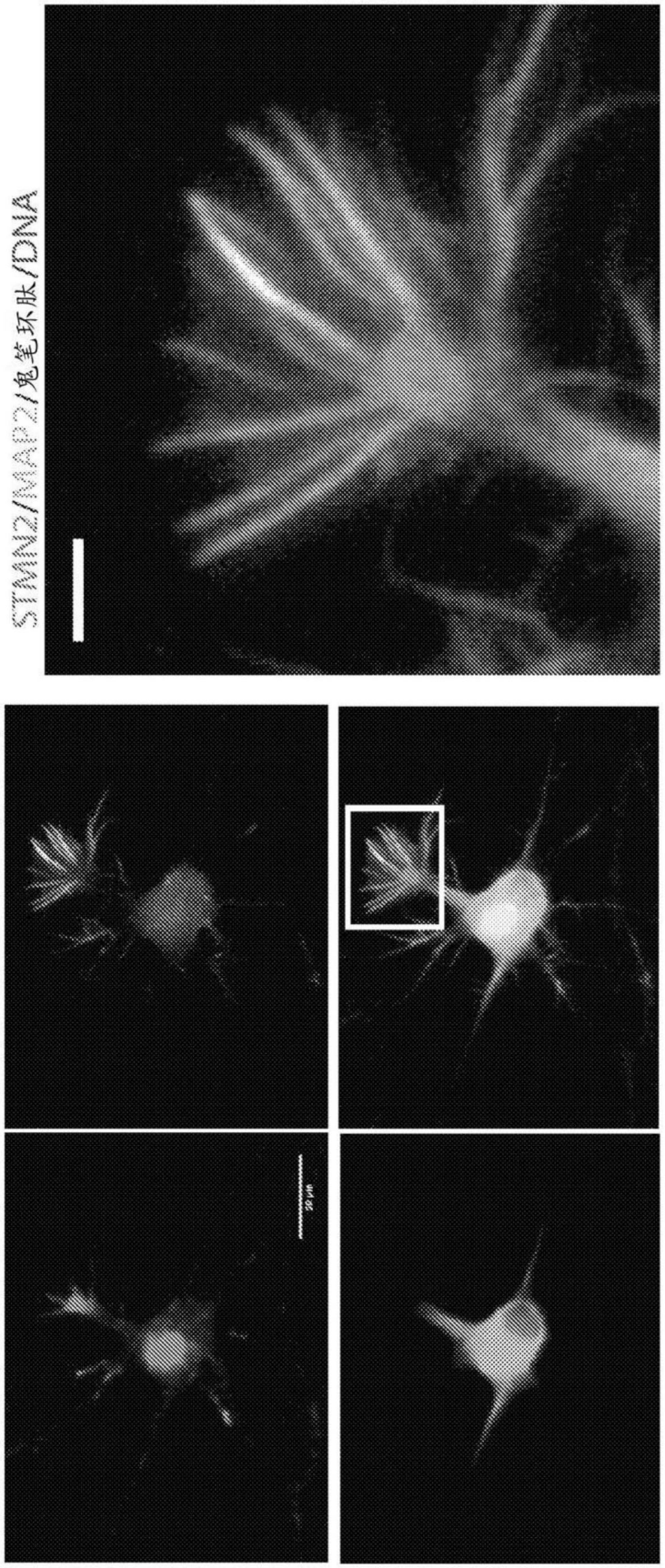


图3I

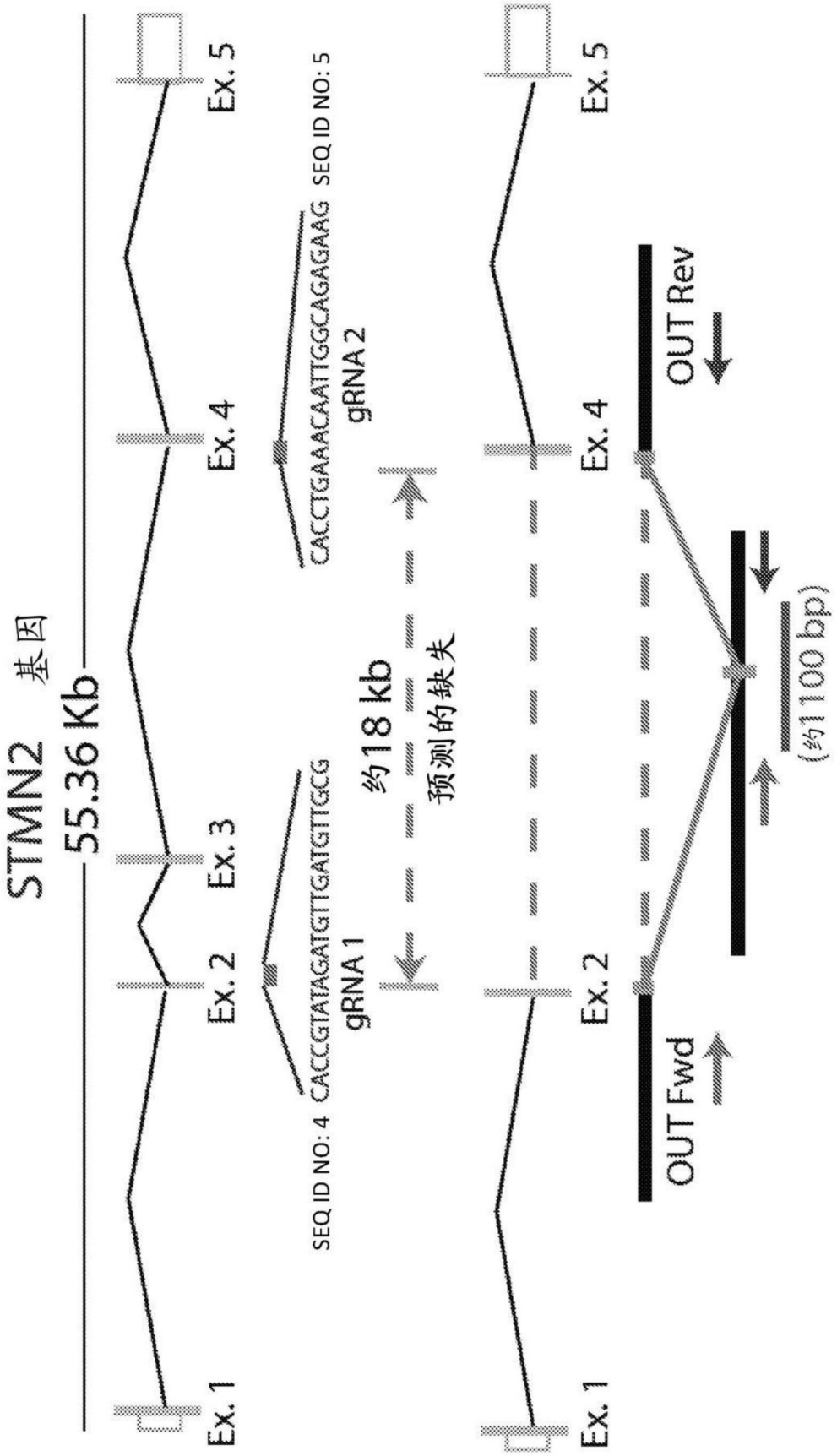

STMN2 基因
55.36 Kb
Ex. 1
Ex. 2
Ex. 3
Ex. 4
Ex. 5
SEQ ID NO: 4 CACCGTATAGATGTTGATGTTGCG
gRNA 1
约18 kb
预测的缺失
CACCTGAAACAATTGGCAGAGAAG SEQ ID NO: 5
gRNA 2
OUT Fwd
OUT Rev
(约1100 bp)

图4A

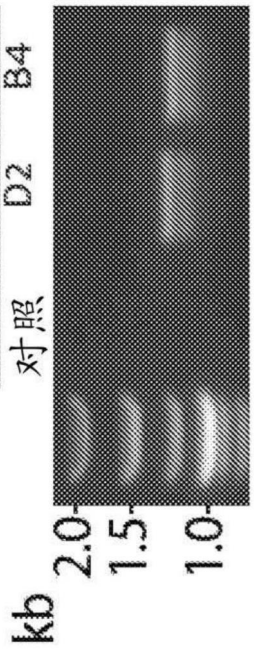


图4B

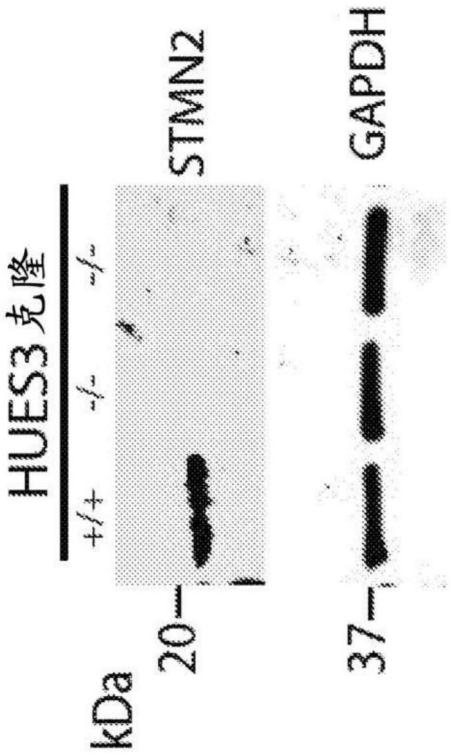


图4C

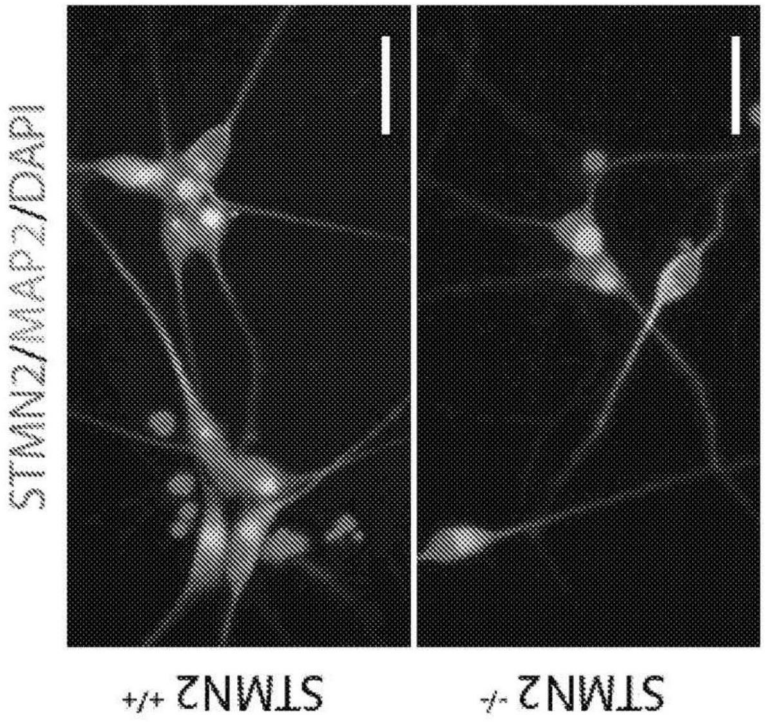

STMN2/MAP2/DAPI
STMN2 +/+
STMN2 -/-

图4D

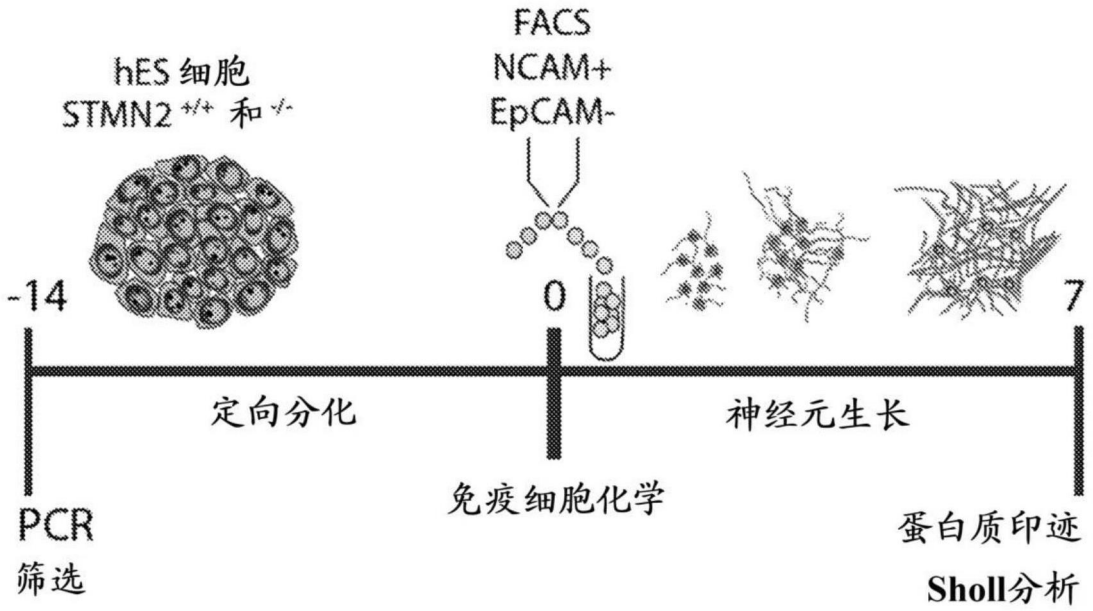

hES 细胞
STMN2 +/+ 和 -/-
FACS
NCAM+
EpCAM-
-14
0
7
定向分化
神经元生长
PCR
筛选
免疫细胞化学
蛋白质印迹
Sholl分析

图4E

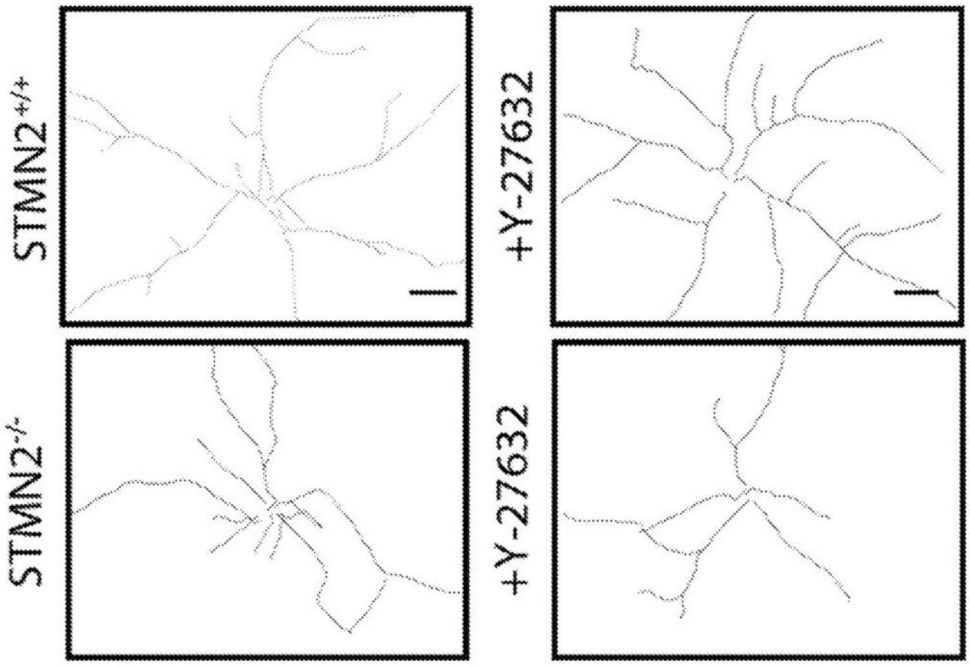

STMN2+/+
+Y-27632
STMN2-/-
+Y-27632

图4F

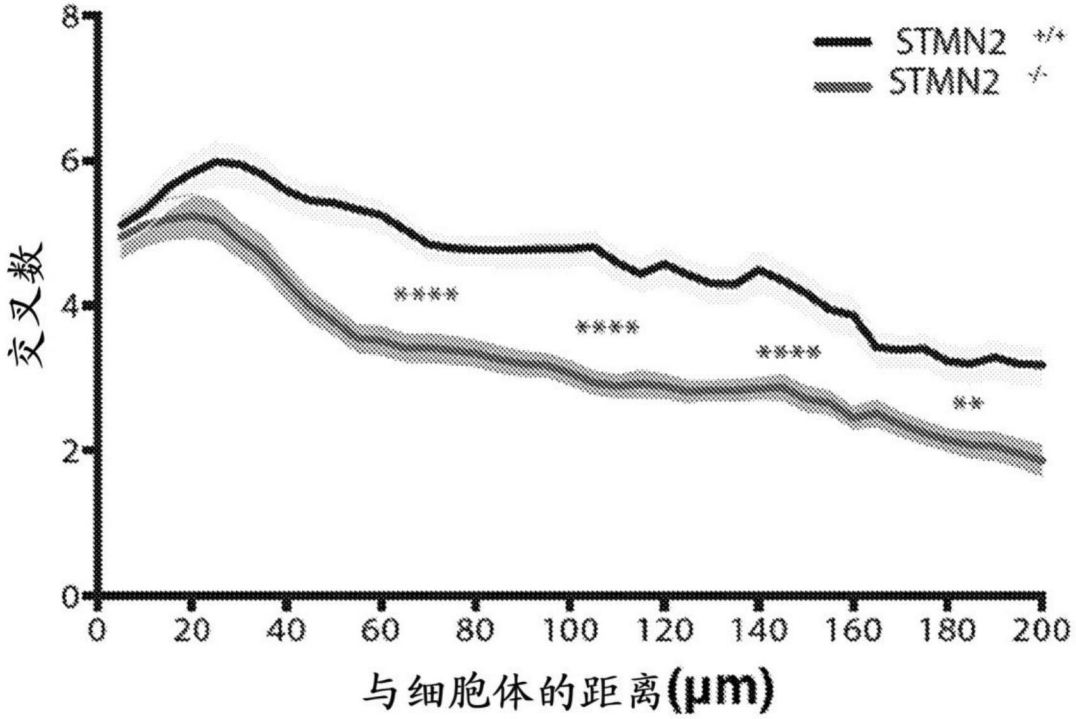

STMN2 +/+
STMN2 -/-
交叉数
0
2
4
6
8
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200
****
****
****
**
与细胞体的距离(μm)

图4G

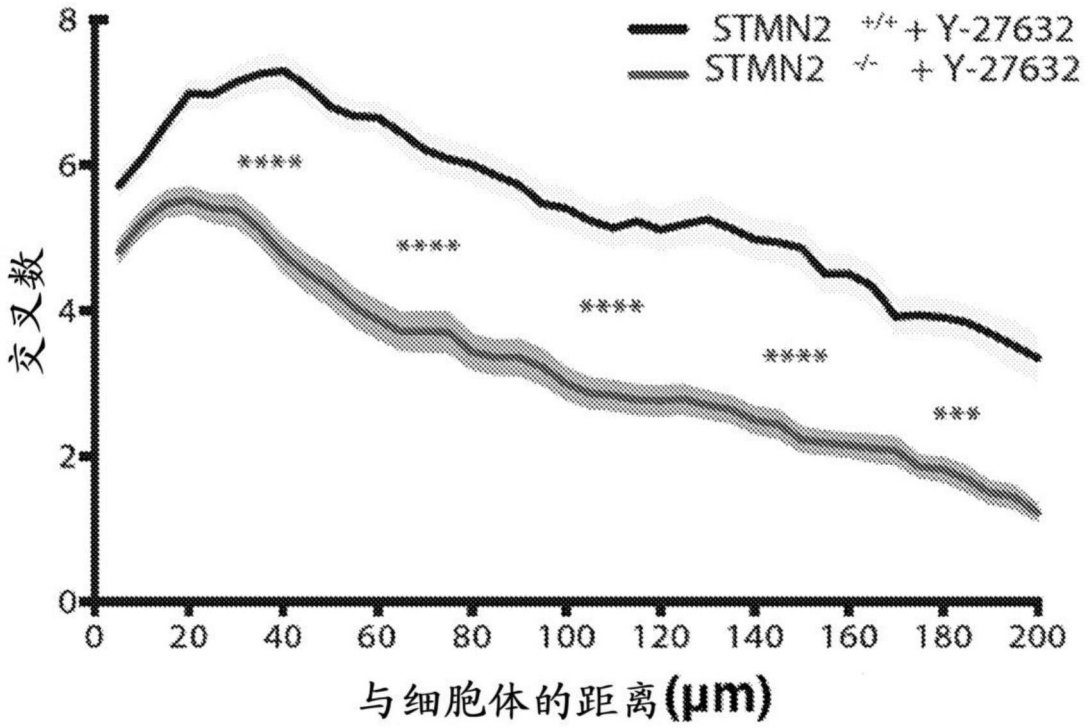

STMN2 +/+ + Y-27632
STMN2 -/- + Y-27632
****
****
****
****
***
交叉数
0
2
4
6
8
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200
与细胞体的距离(μm)

图4H

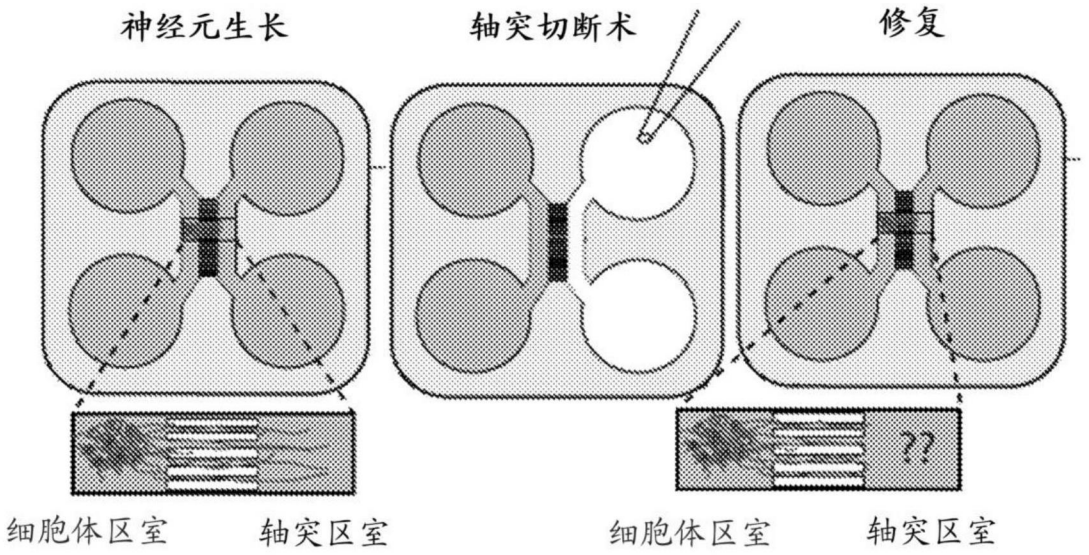

神经元生长
轴突切断术
修复
??
细胞体区室
轴突区室
细胞体区室
轴突区室

图4I

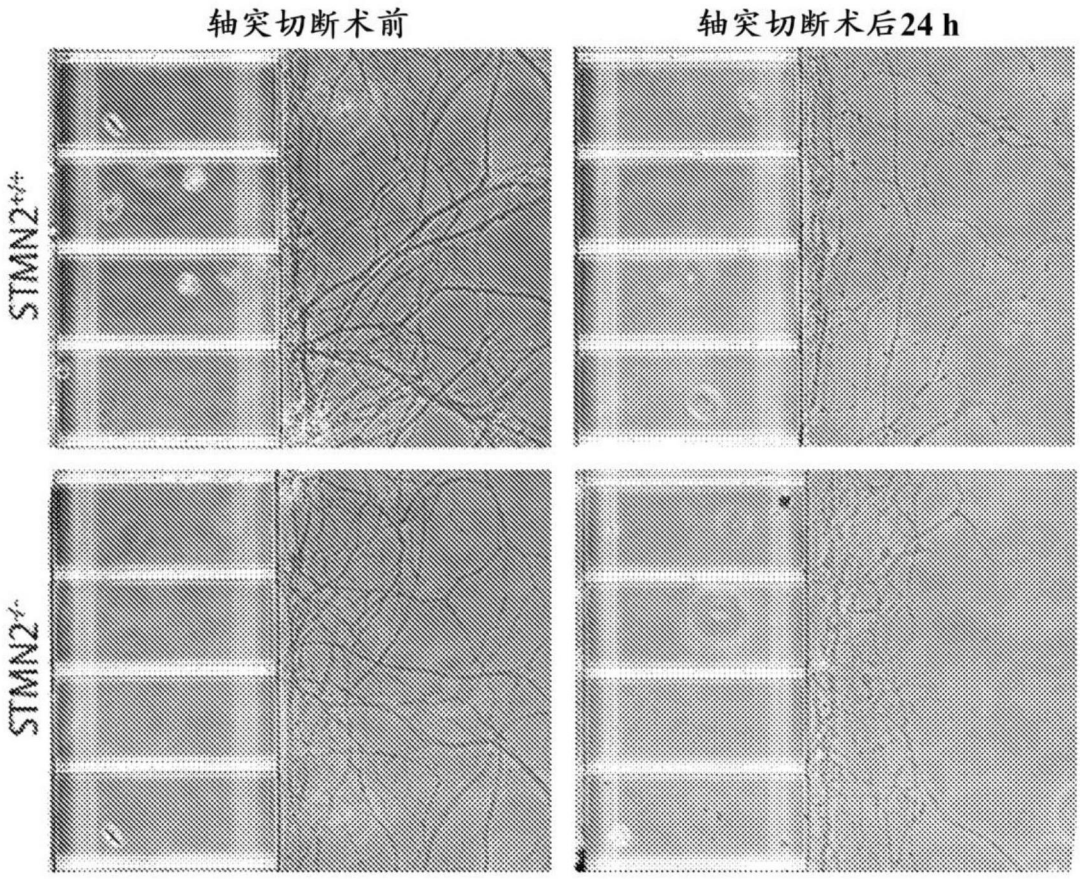


图4J

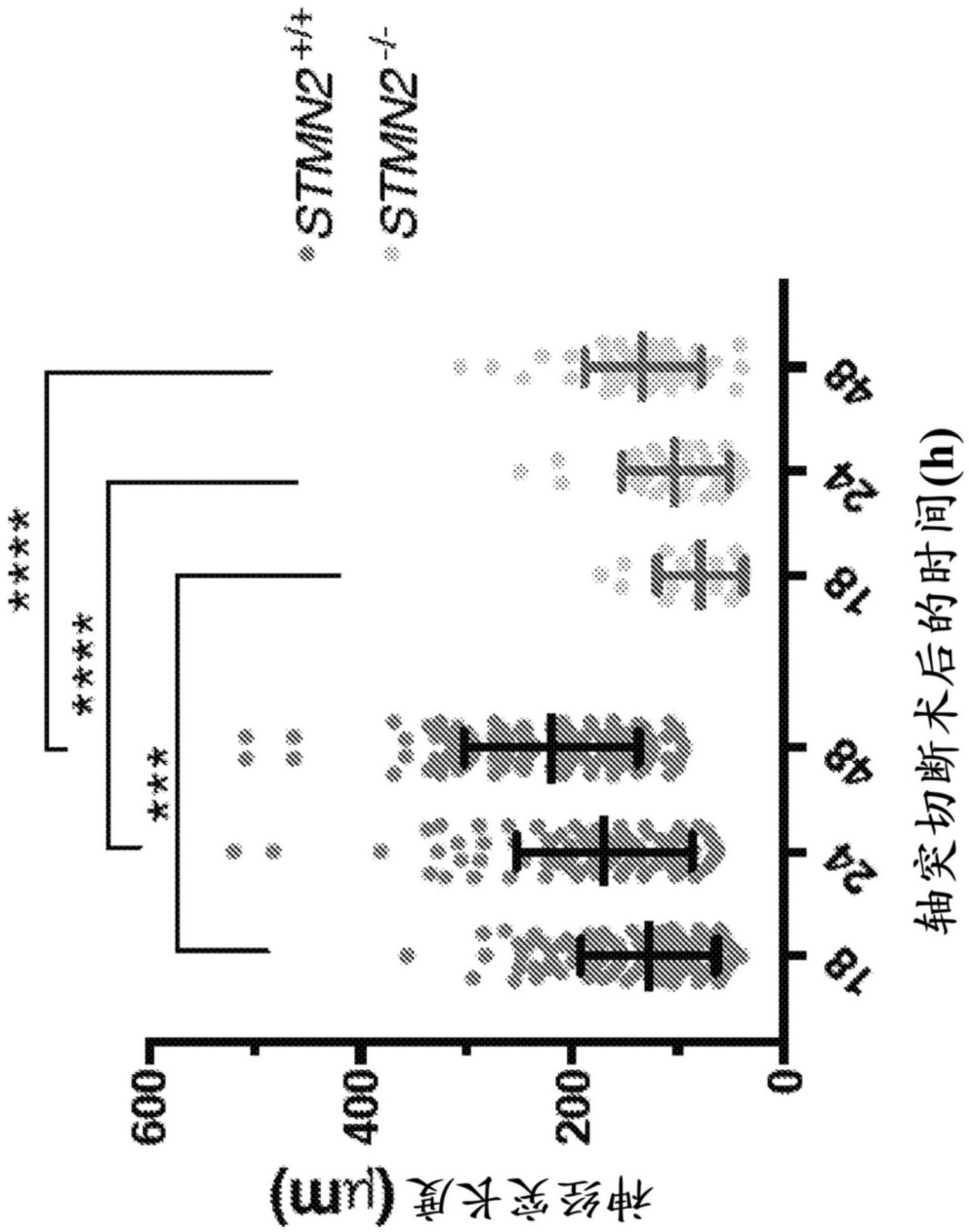


图4K

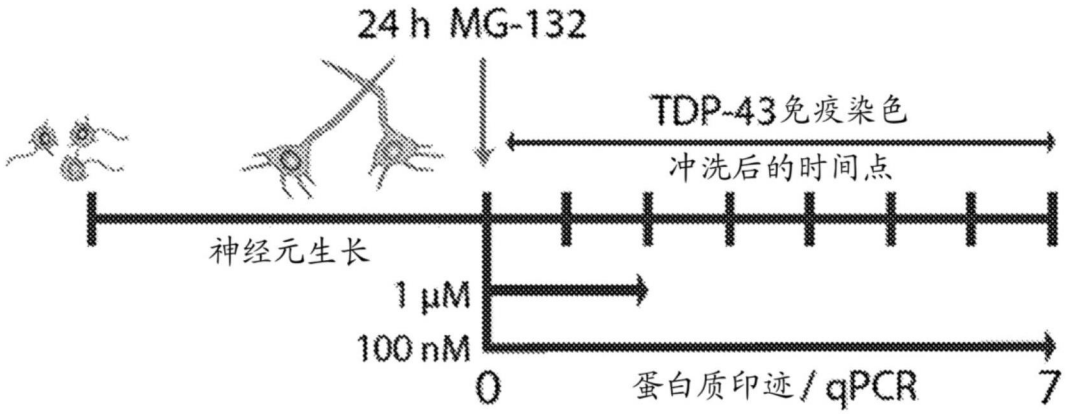

24 h MG-132
TDP-43免疫染色
冲洗后的时间点
神经元生长
1 μM
100 nM
0
蛋白质印迹 / qPCR
7

图5A

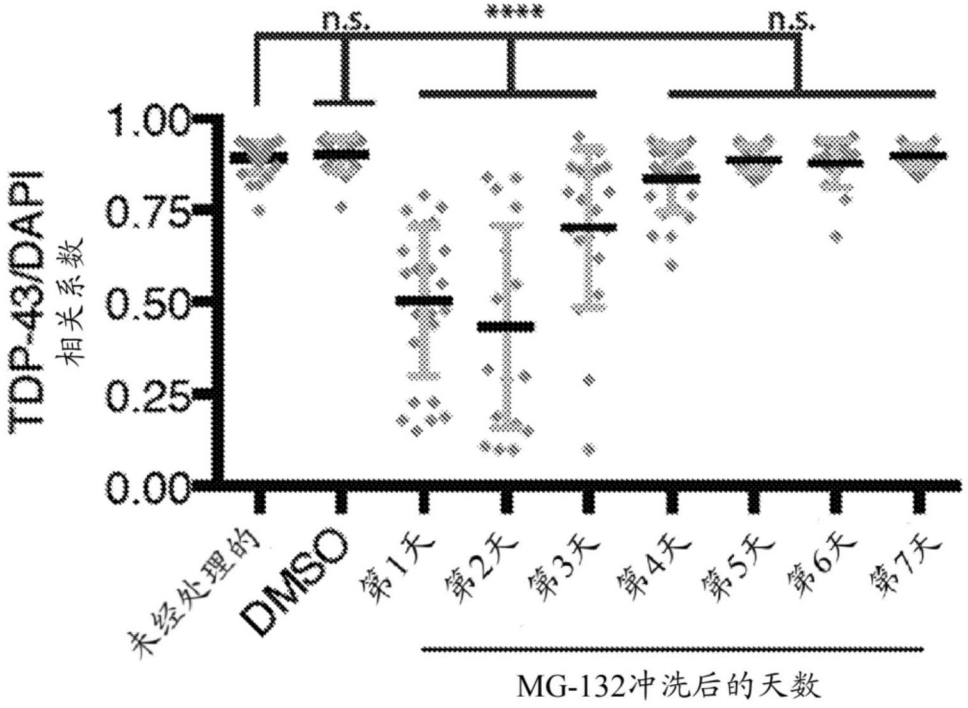

n.s.
****
n.s.
TDP-43/DAPI
相关系数
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
未经处理的
DMSO
第1天
第2天
第3天
第4天
第5天
第6天
第7天
MG-132冲洗后的天数

图5B

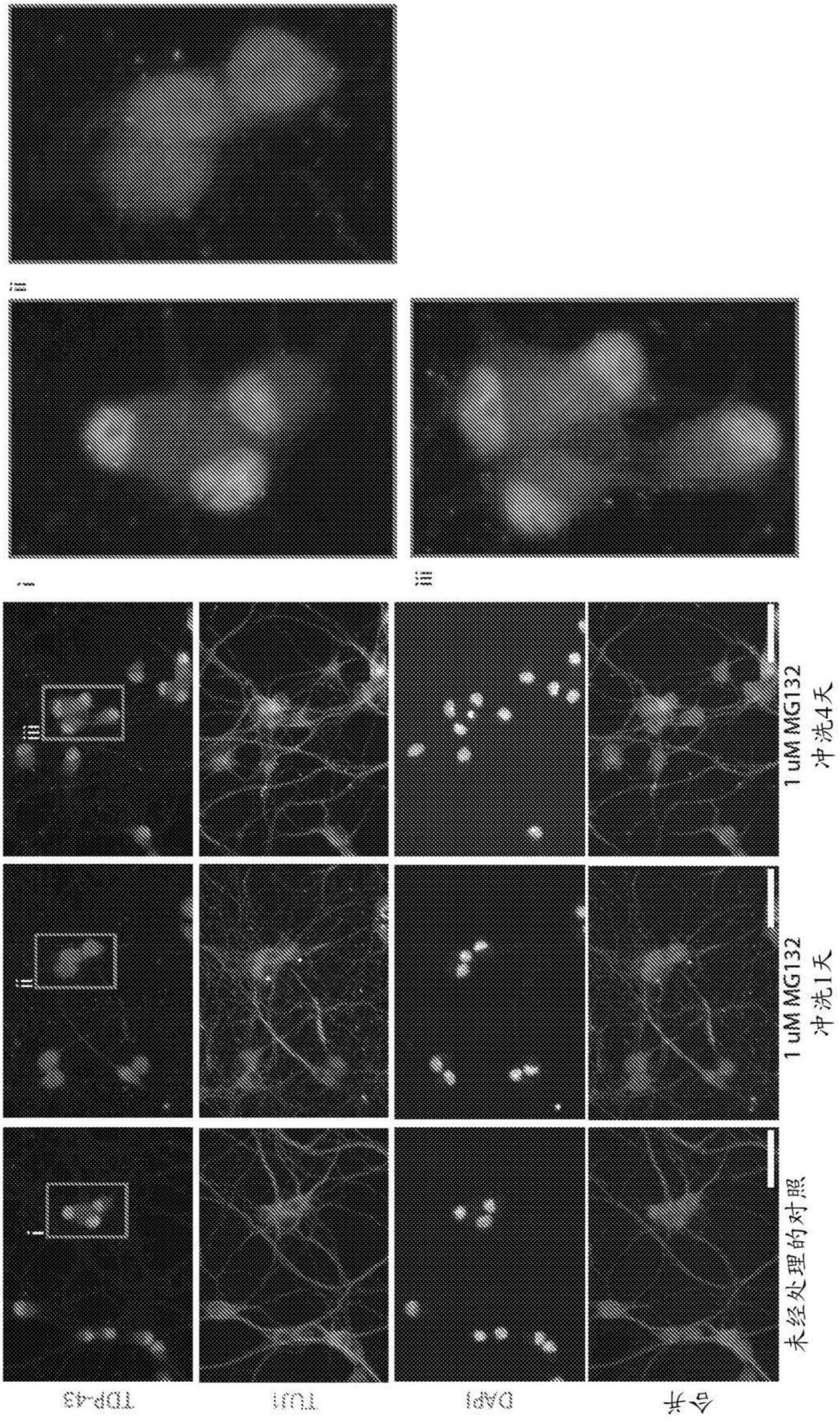

合并
DAPI
TUJ1
TDP-43
未经处理的对照
1 uM MG132
冲洗1天
1 uM MG132
冲洗4天
i
ii
iii
iii
ii
i

图5C

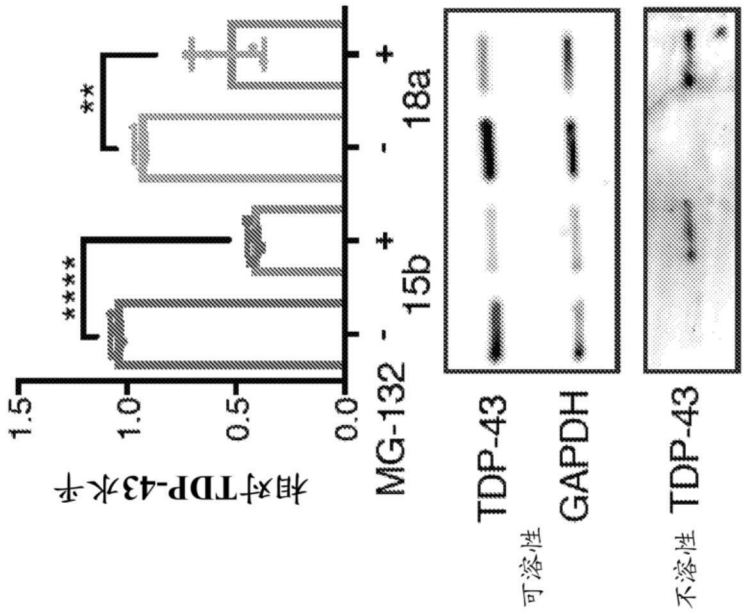

相对TDP-43水平
1.5
1.0
0.5
0.0
****
**
MG-132 - + - +
15b - - 18a
TDP-43
可溶性
GAPDH
TDP-43
不溶性

图5D

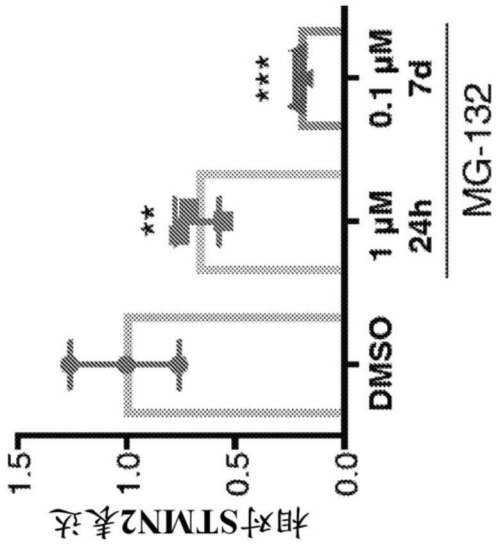

相对STMN2表达
1.5
1.0
0.5
0.0
**
***
DMSO
1 μM 24h
0.1 μM 7d
MG-132

图5E

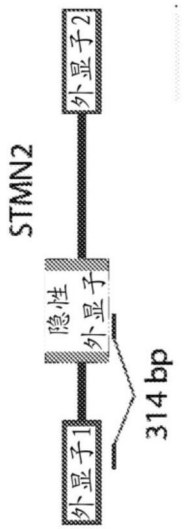


图5F

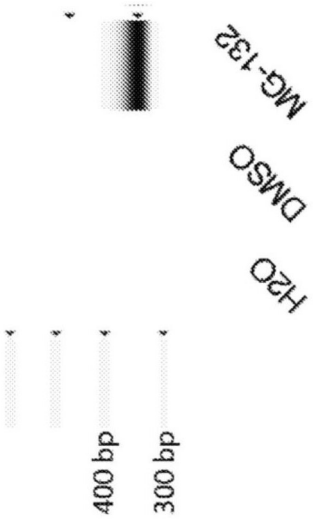


图5G

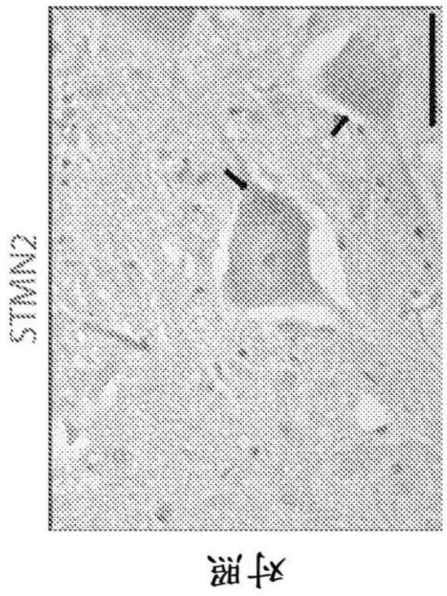


图6A

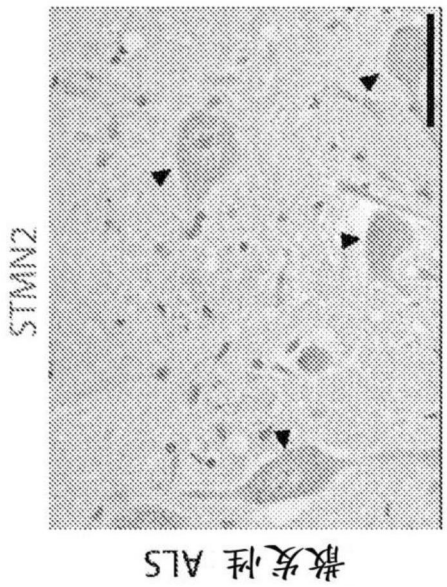


图6B

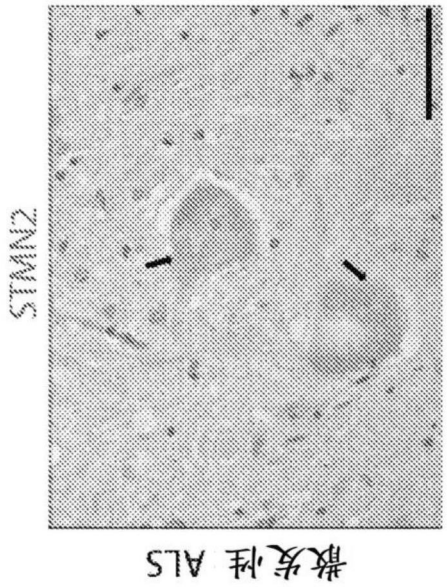


图6C

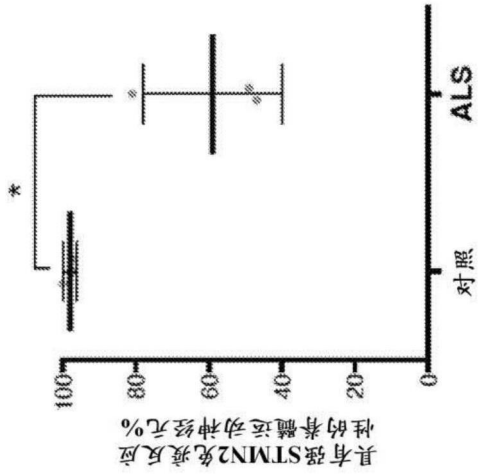


图6D

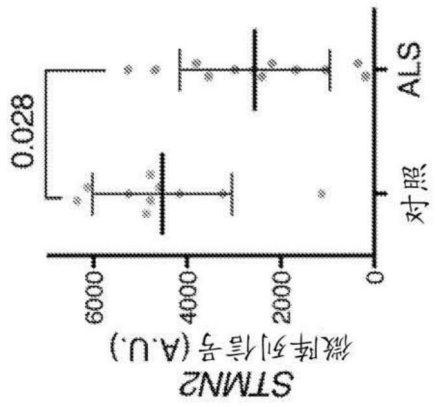

STMN2
微阵列信号(A.U.)
6000
4000
2000
0
0.028
对照
ALS

图6E

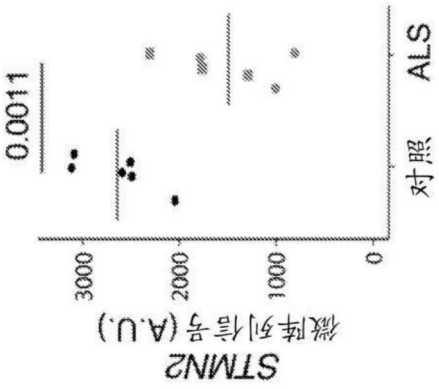

STMN2
微阵列信号(A.U.)
3000
2000
1000
0
0.0011
对照
ALS

图6F

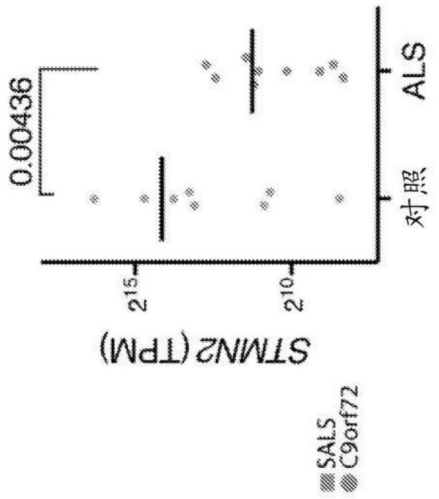

STMN2 (TPM)
2^{15}
2^{10}
0.00436
对照
ALS
SALS
C9orf72

图6G

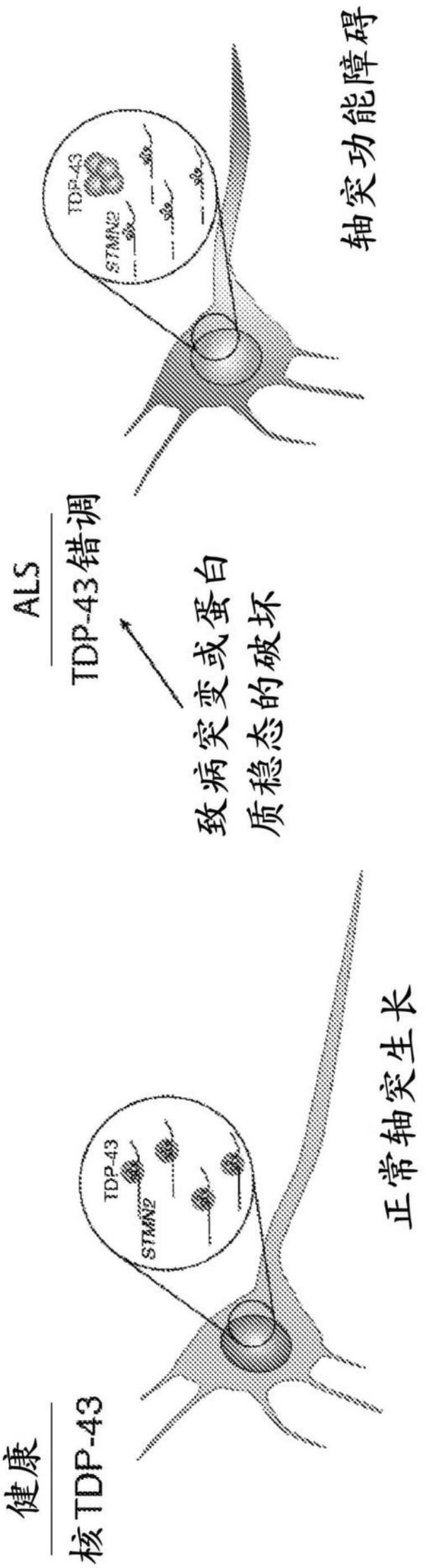

健康
核TDP-43
TDP-43
STMN2
正常轴突生长
ALS
TDP-43错调
致病突变或蛋白
质稳态的破坏
TDP-43
STMN2
轴突功能障碍

图6H

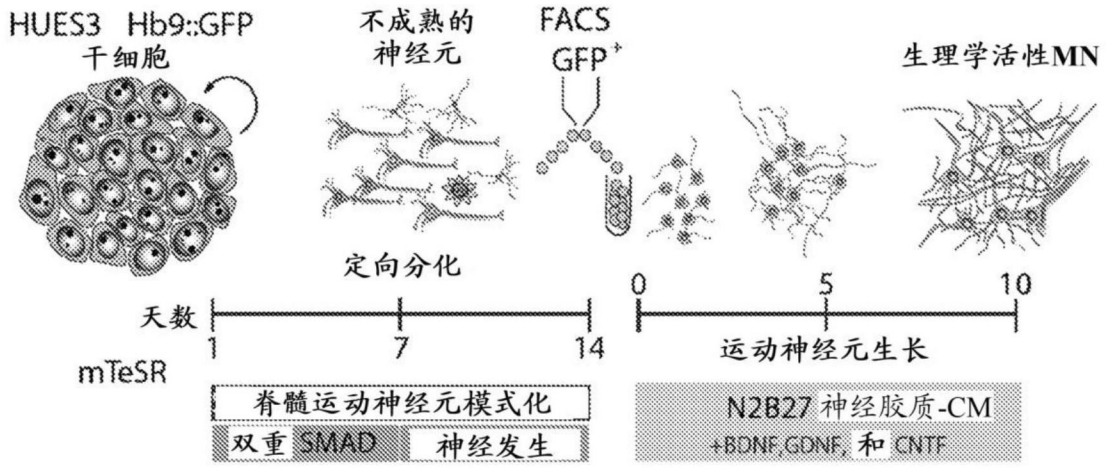

HUES3 Hb9::GFP
干细胞
不成熟的
神经元
FACS
GFP+
生理学活性MN
定向分化
天数
1
7
14
0
5
10
运动神经元生长
mTeSR
脊髓运动神经元模式化
双重 SMAD
神经发生
N2B27 神经胶质-CM
+BDNF,GDNF, 和 CNTF

图7A

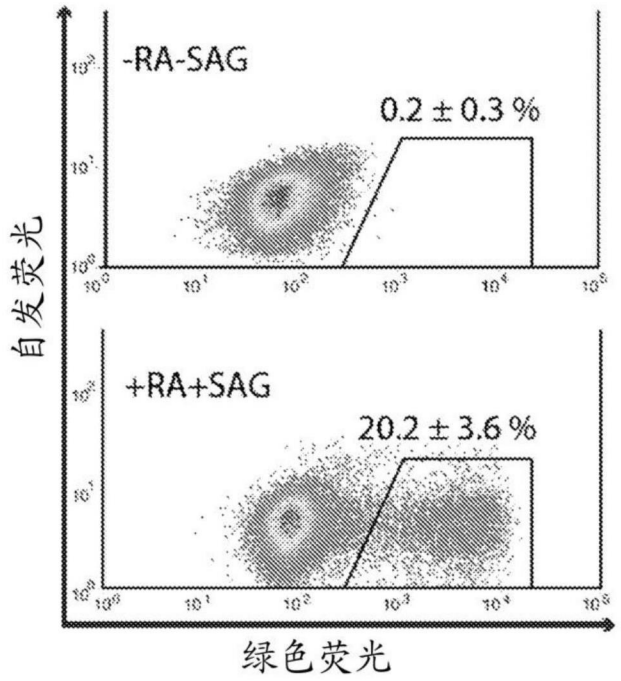

-RA-SAG
0.2 ± 0.3 %
+RA+SAG
20.2 ± 3.6 %
自发荧光
绿色荧光

图7B

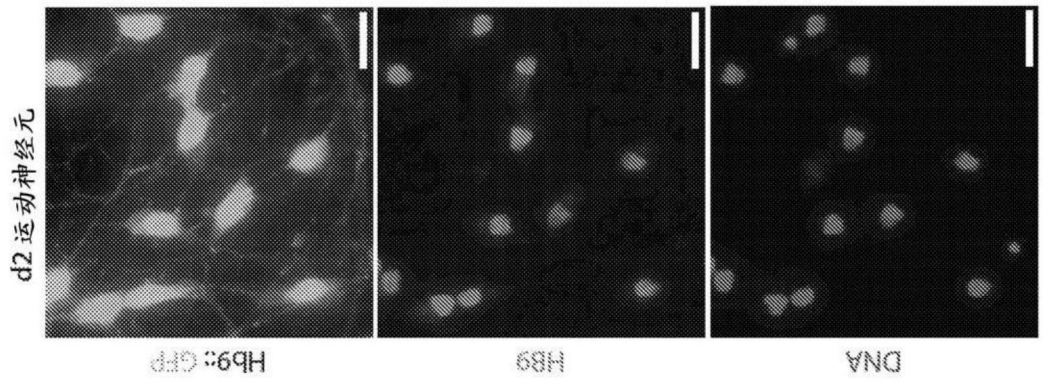

d2 运动神经元
Hb9::GFP
HB9
DNA

图7C

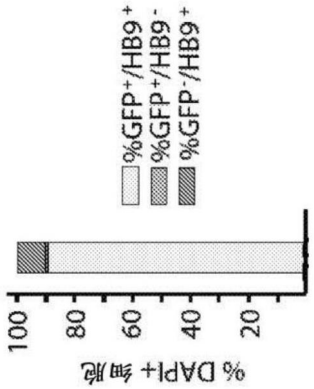

%GFP+/HB9+
%GFP+/HB9-
%GFP-/HB9+
100
80
60
40
20
% DAPI+ 细胞

图7D

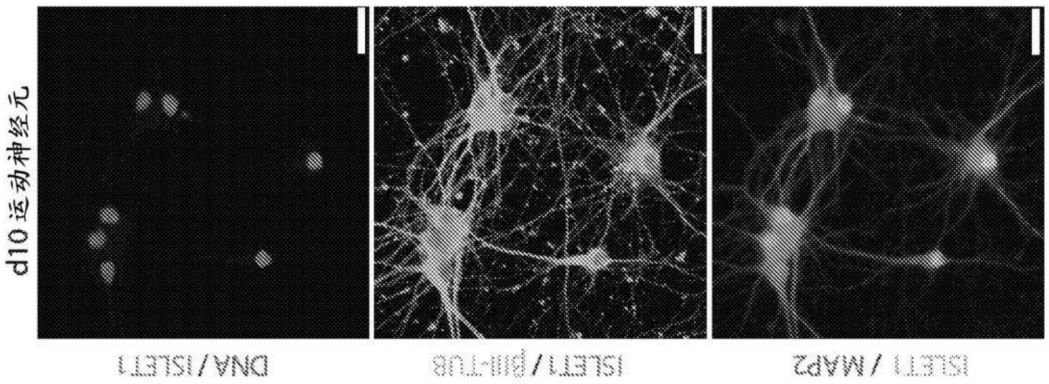

d10 运动神经元
DNA / ISLET1
ISLET1 / βIII-TUB
ISLET1 / MAP2

图7E

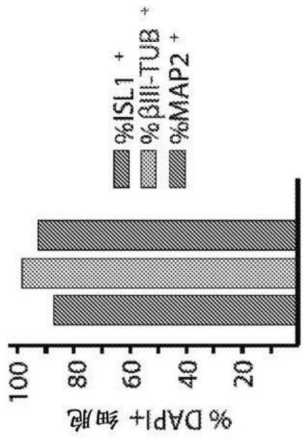


图7F

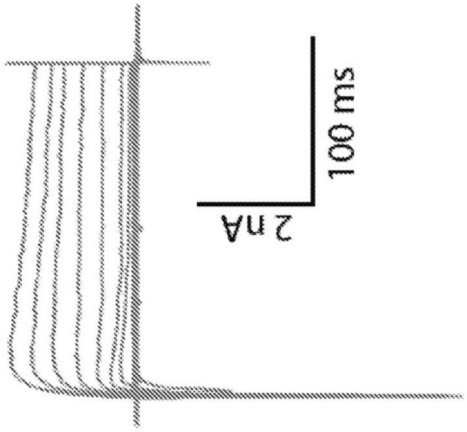


图7G

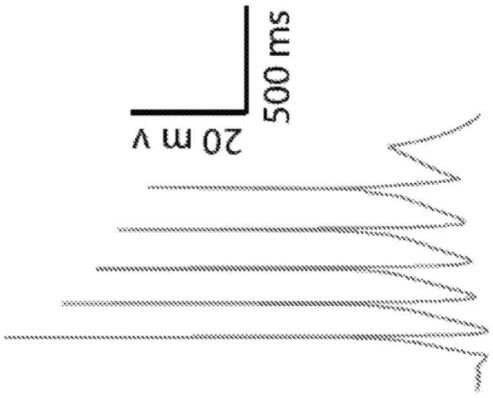


图7H

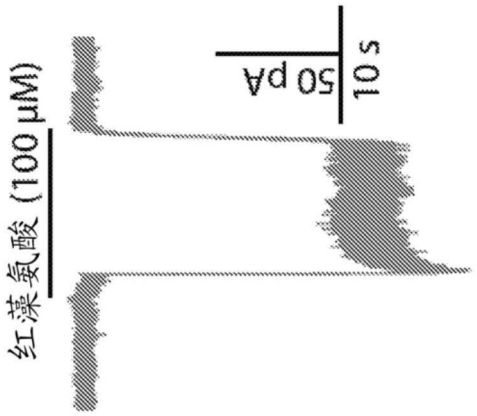


图7I

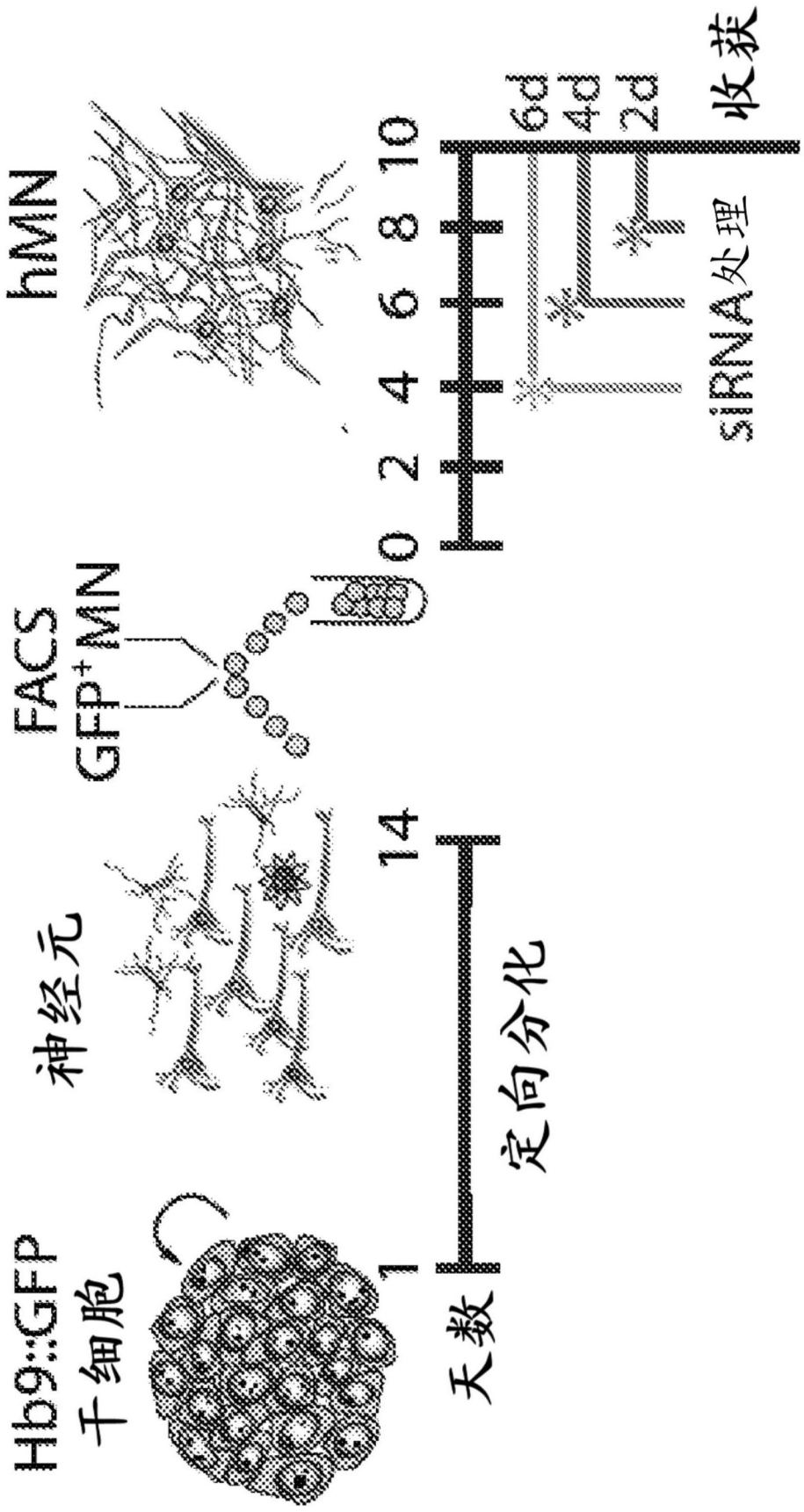

Hb9::GFP
干细胞
神经元
FACS
GFP+MN
hMN
1
14
天数
定向分化
0 2 4 6 8 10
siRNA处理
6d
4d
2d
收获

图8A

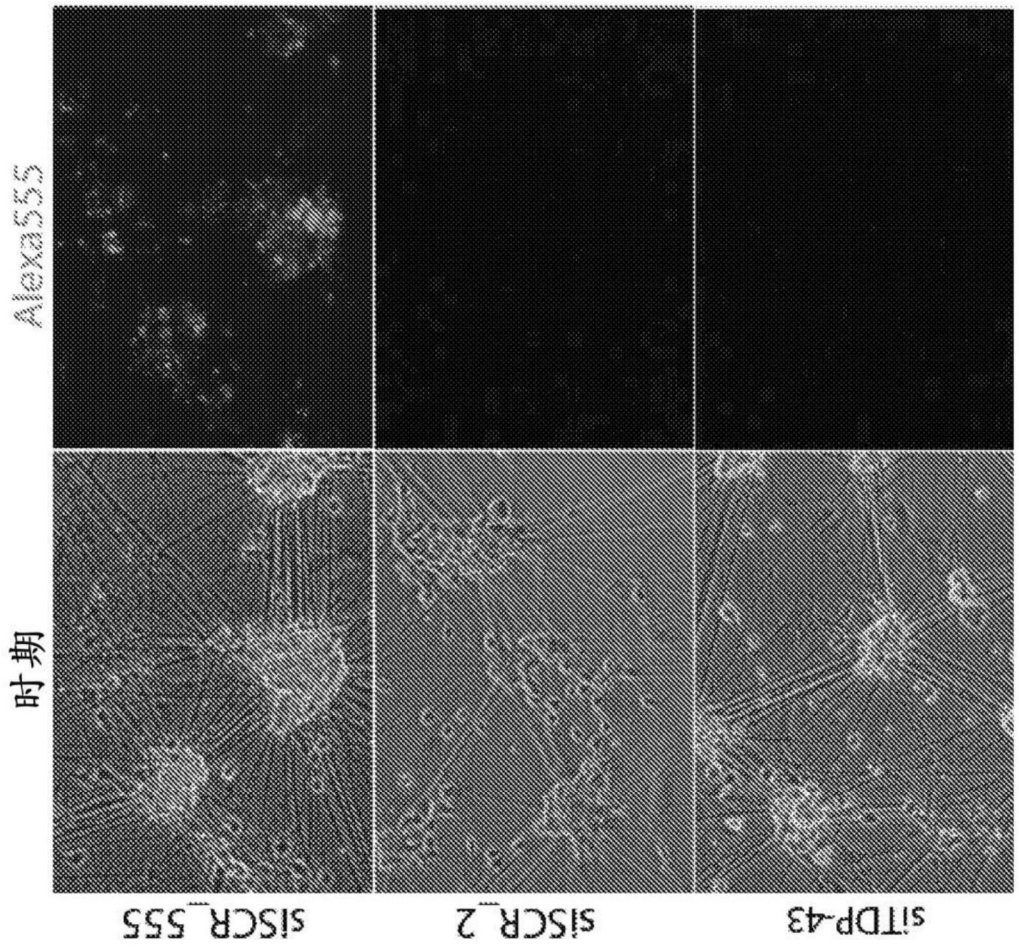


图8B

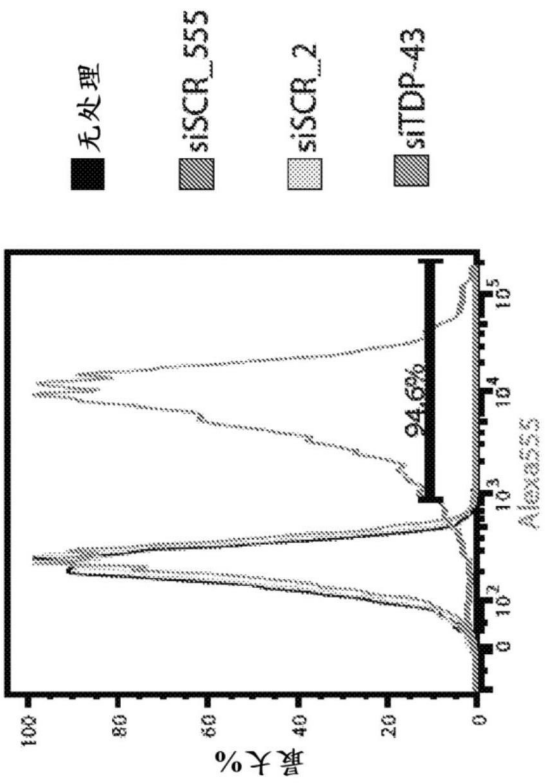


图8C

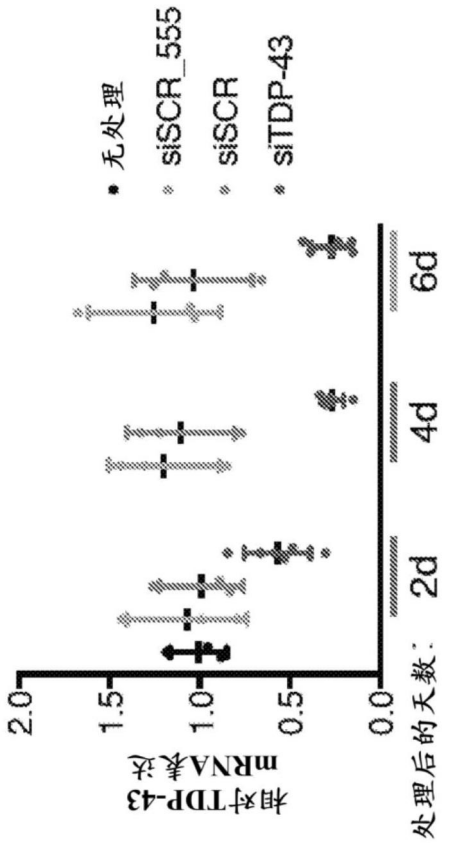

无处理
siSCR_555
siSCR
siTDP-43
相对TDP-43 mRNA表达
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
处理后的天数:
2d
4d
6d

图8D

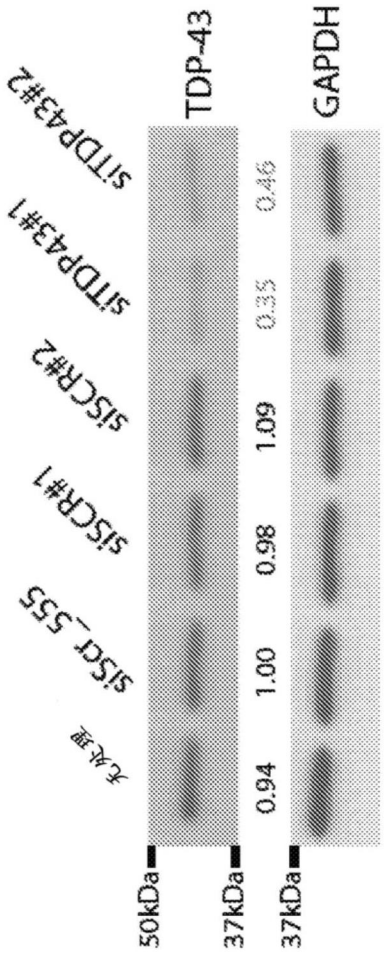

TDP-43
GAPDH
siTDP43#2
siTDP43#1
siSCR#2
siSCR#1
siSCR_555
未处理
0.46
0.35
1.09
0.98
1.00
0.94
50kDa
37kDa
37kDa

图8E

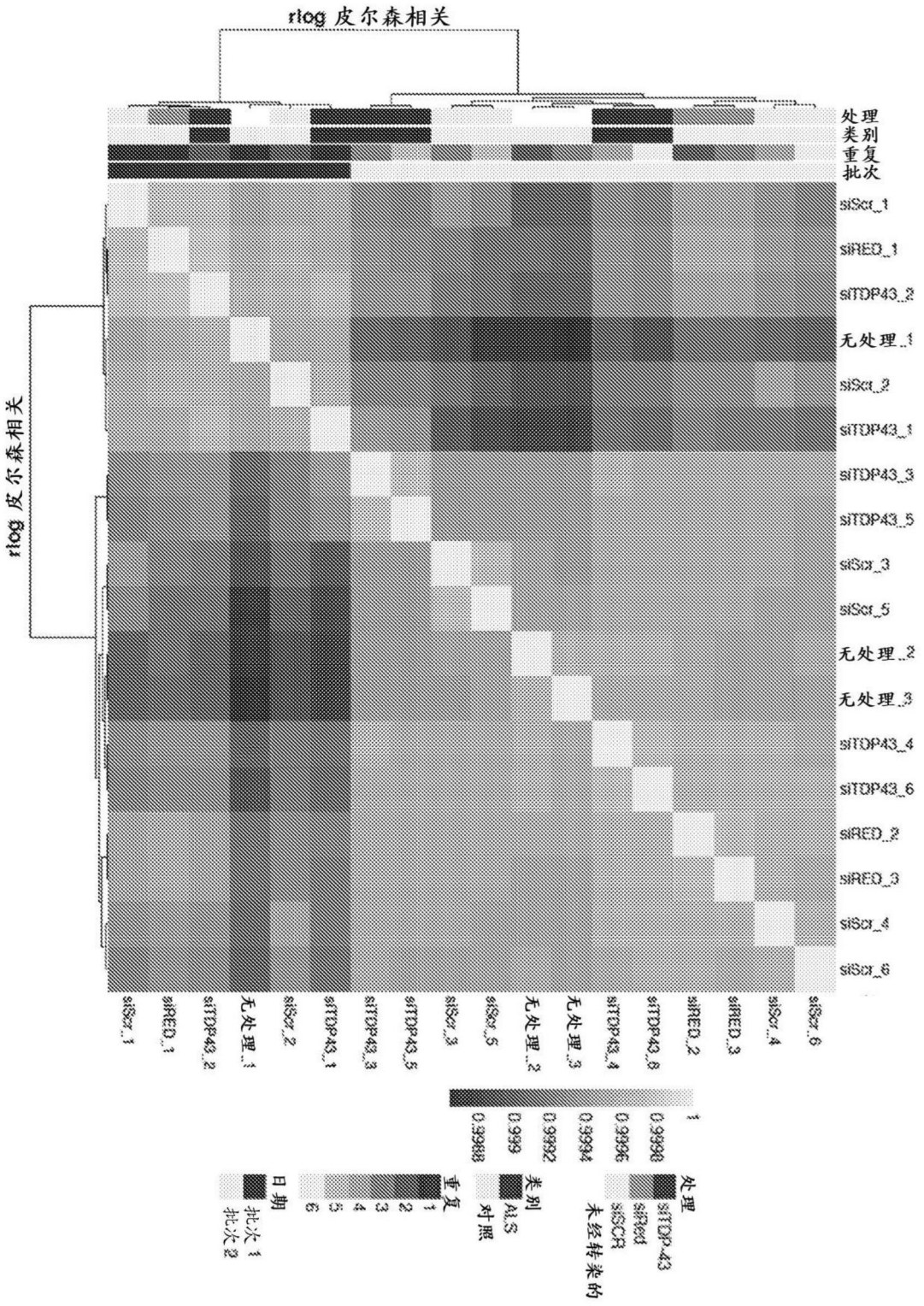

rlog 皮尔森相关
处理
类别
重复
批次
siScr_1
siRED_1
siTDP43_2
无处理_1
siScr_2
siTDP43_1
siTDP43_3
siTDP43_5
siScr_3
siScr_5
无处理_2
无处理_3
siTDP43_4
siTDP43_6
siRED_2
siRED_3
siScr_4
siScr_6
rlog 皮尔森相关
1
0.9998
0.9996
0.9994
0.9992
0.999
0.9988
处理
siTDP-43
siRed
siSCR
未经转染的
类别
ALS
对照
重复
1
2
3
4
5
6
日期
批次 1
批次 2

图9A

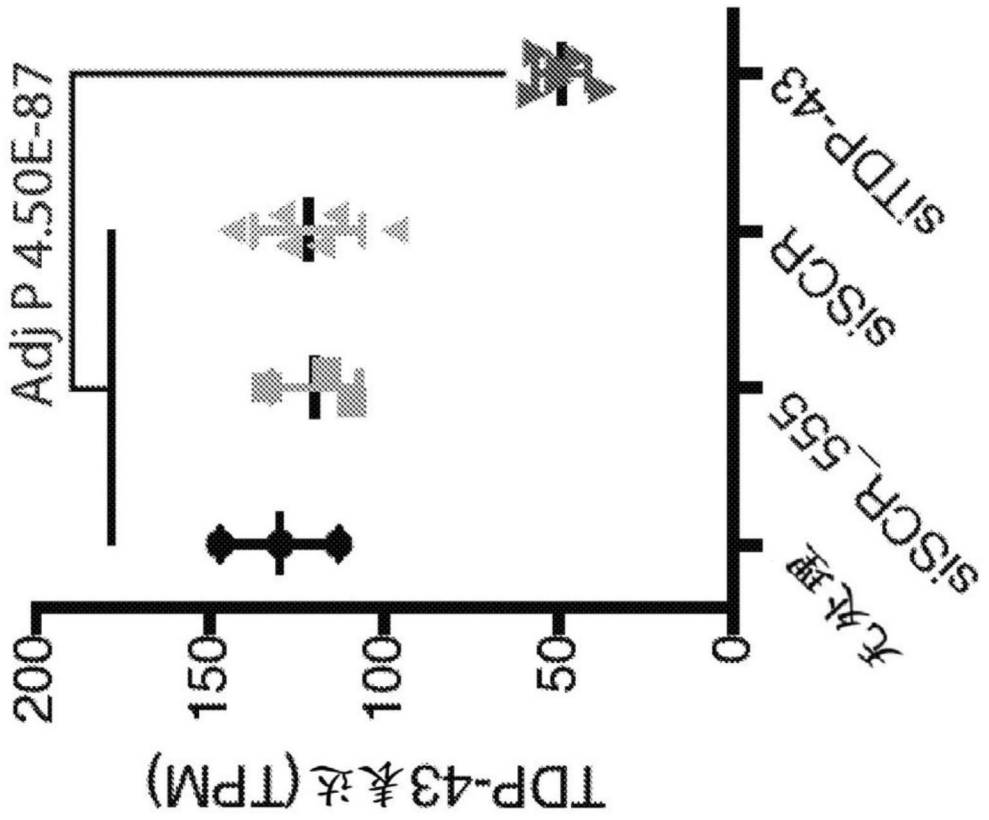

Adj P 4.50E-87
200
150
100
50
0
TDP-43表达(TPM)
无处理
siSCR_555
siSCR
siTDP-43

图9B

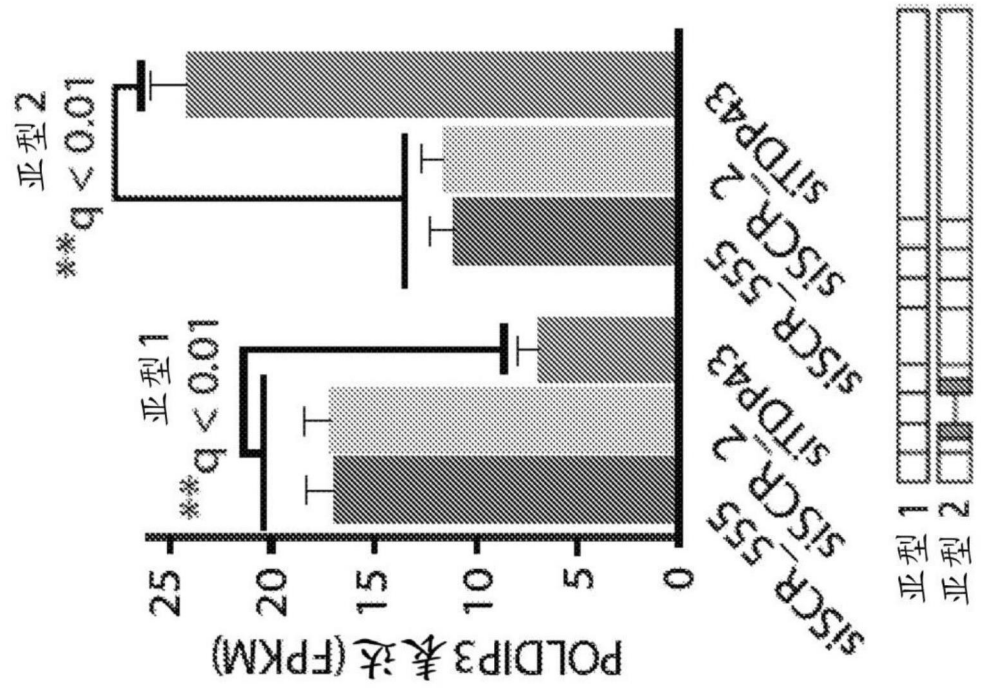

亚型2
**q < 0.01
亚型1
**q < 0.01
25
20
15
10
5
0
POLDIP3表达(FPKM)
siSCR_555
siSCR_2
siTDP43
siSCR_555
siSCR_2
siTDP43
亚型1
亚型2

图9C

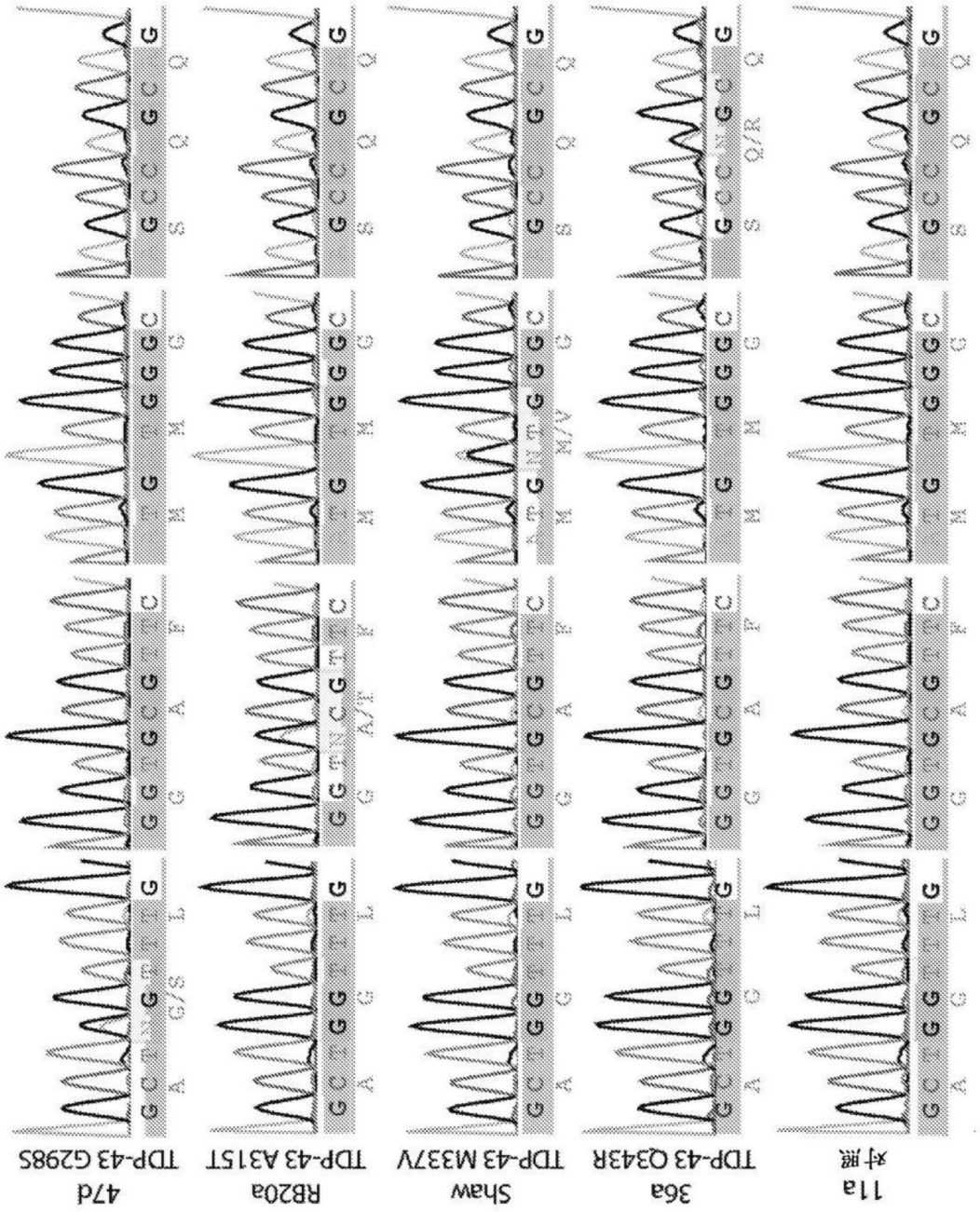

11a
对照
36a
TDP-43 Q343R
Shaw
TDP-43 M337V
RB20a
TDP-43 A315T
47d
TDP-43 G298S

图10

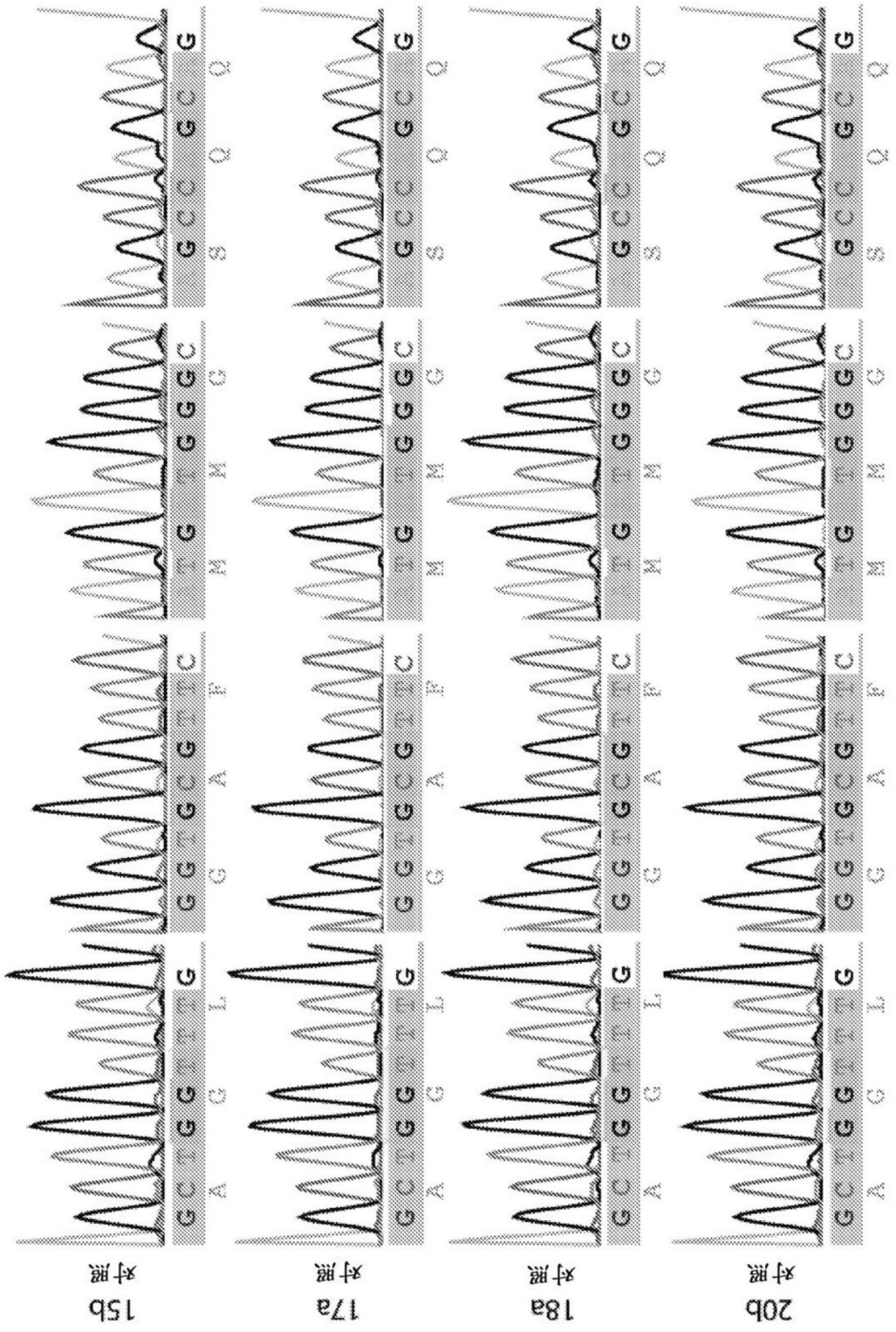


图10续

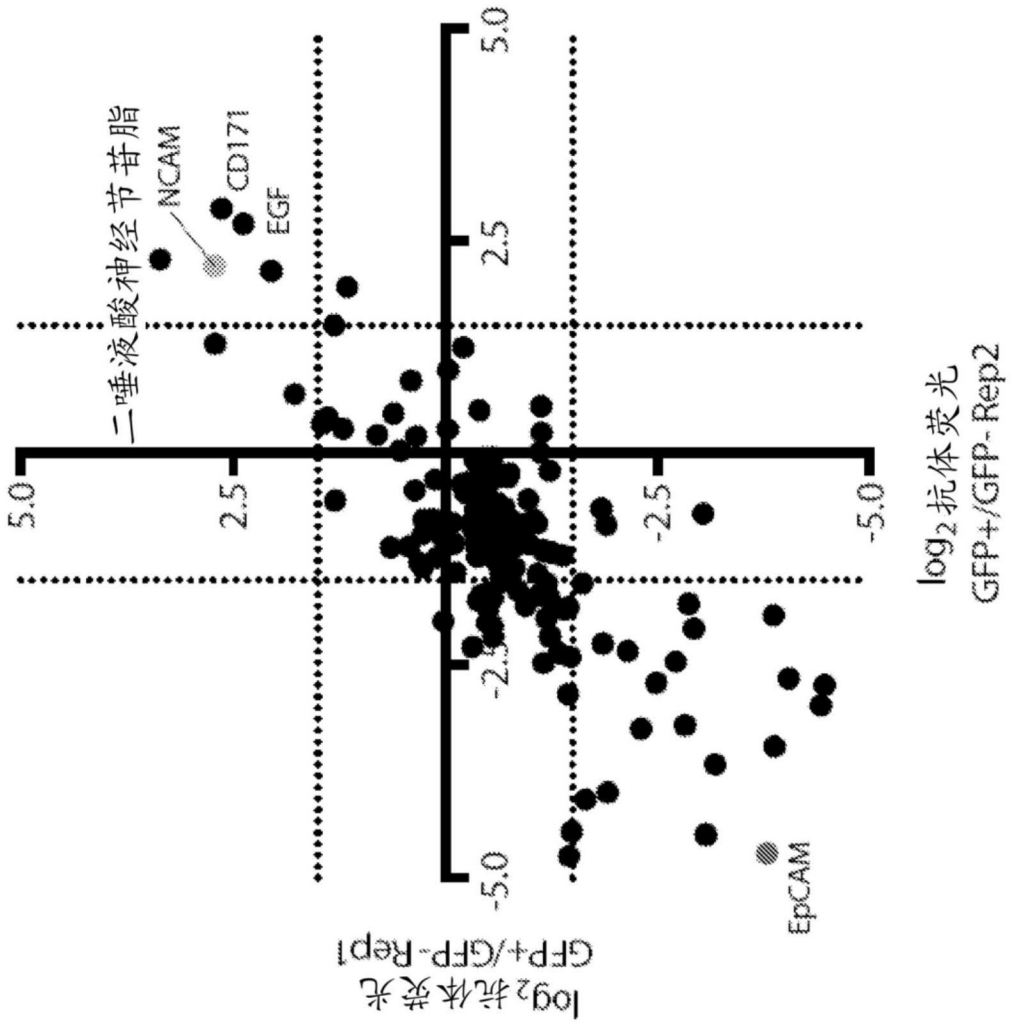

二唾液酸神经节苷脂
NCAM
CD171
EGF
EpCAM
5.0
2.5
-2.5
-5.0
log2抗体荧光
GFP+/GFP-Rep1
log2抗体荧光
GFP+/GFP-Rep2

图11A

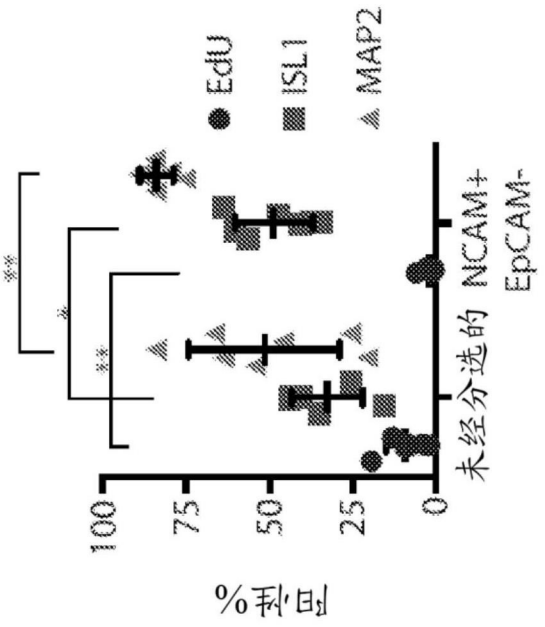

EdU
ISL1
MAP2
阳性%
100
75
50
25
0
未经分选的
NCAM+
EpCAM-

图11B

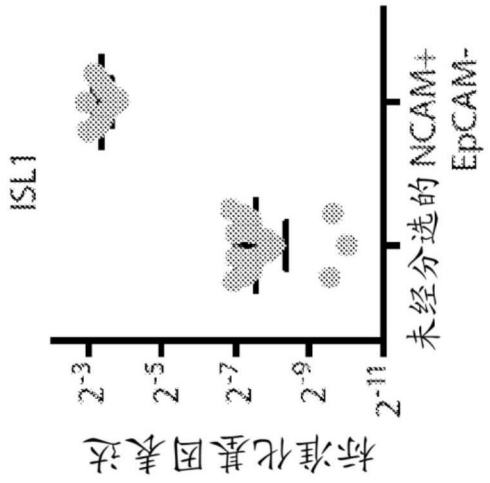

ISL1
标准化基因表达
2-3
2-5
2-7
2-9
2-11
未经分选的 NCAM+
EpCAM-

图11C

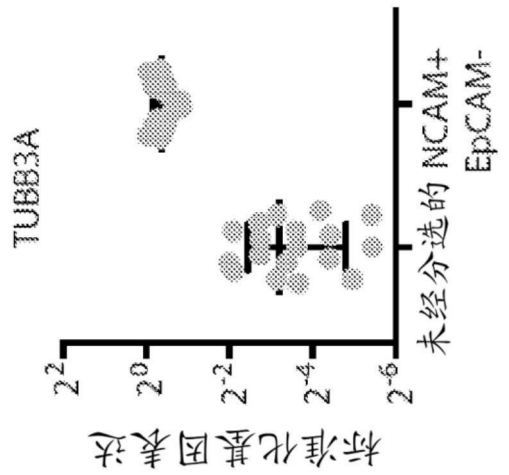

TUBB3A
标准化基因表达
2^{2}
2^{0}
2^{-2}
2^{-4}
2^{-6}
未经分选的 NCAM+ EpCAM-

图11D

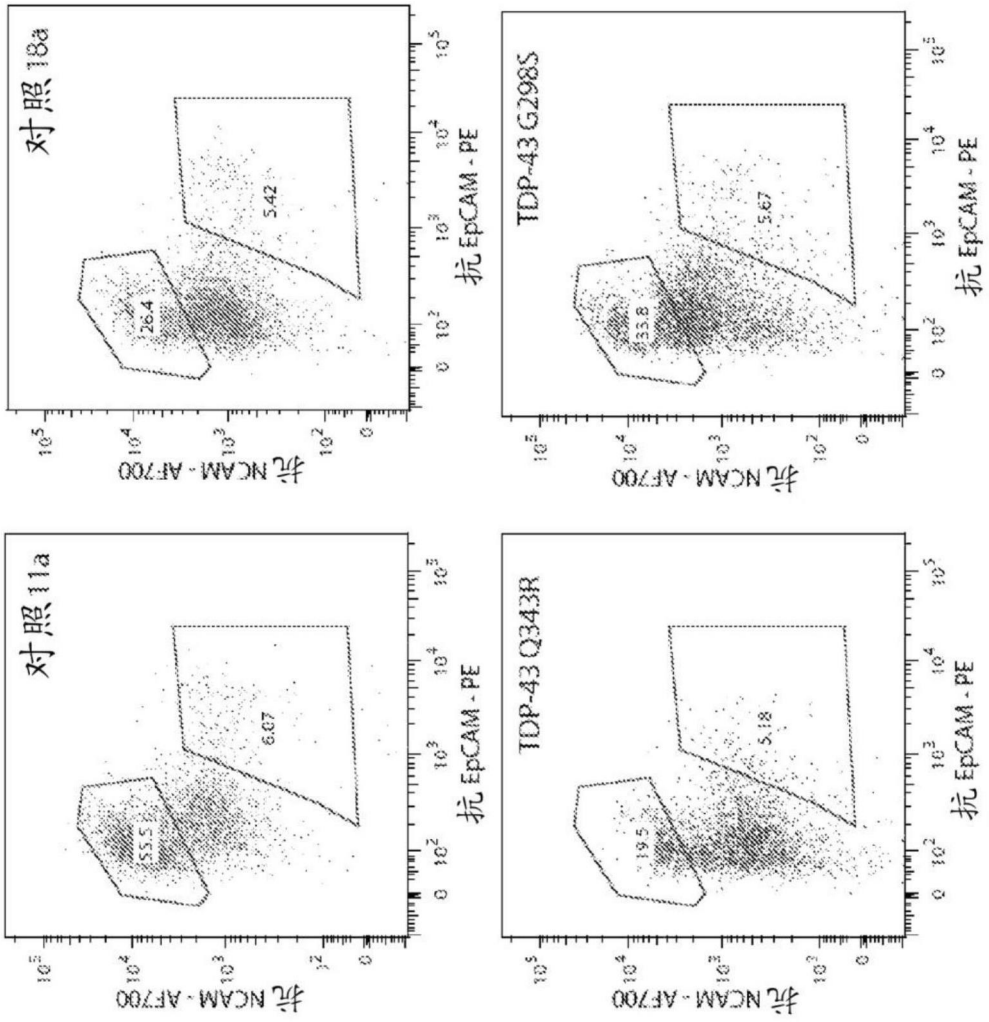

对照 18a
26.4
5.42
TDP-43 G298S
33.8
5.67
对照 11a
55.5
6.07
TDP-43 Q343R
19.5
5.18
抗 NCAM - AF700
抗 EpCAM - PE

图11E

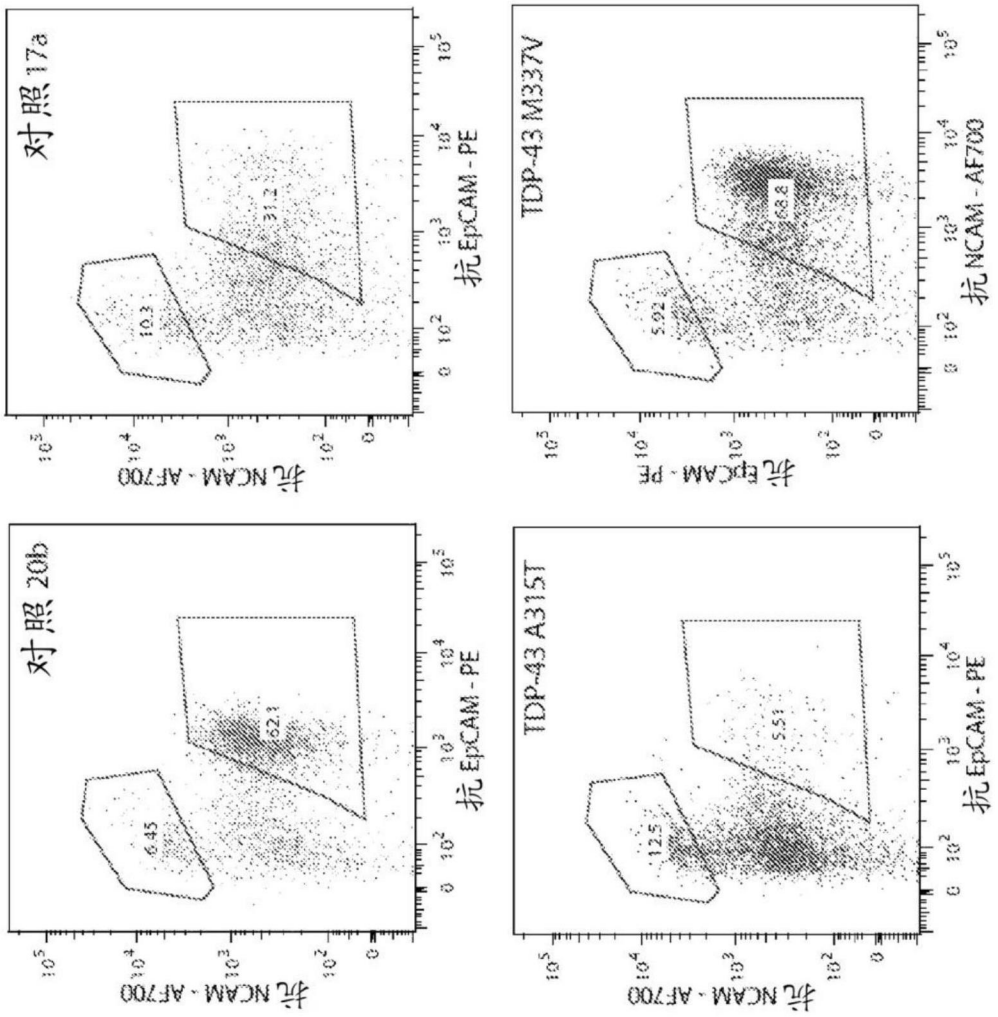

对照17a
10.3
31.2
抗NCAM - AF700
抗EpCAM - PE
TDP-43 M337V
5.92
68.8
抗EpCAM - PE
抗NCAM - AF700
对照20b
6.45
62.1
抗NCAM - AF700
抗EpCAM - PE
TDP-43 A315T
12.5
5.51
抗NCAM - AF700
抗EpCAM - PE

图11E续

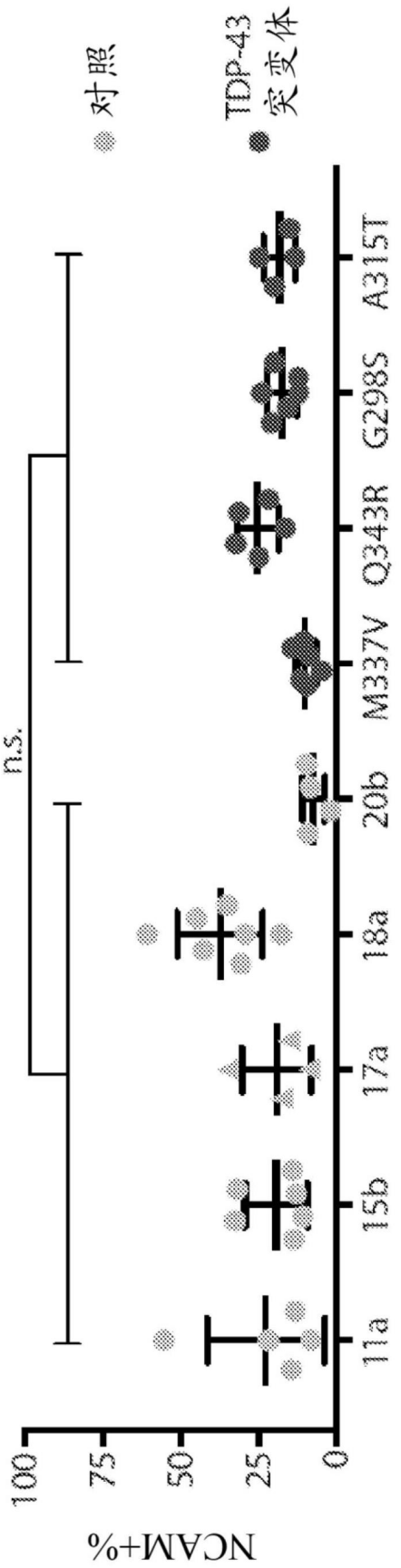

对照
TDP-43
突变体
n.s.
11a
15b
17a
18a
20b
M337V
Q343R
G298S
A315T
0
25
50
75
100
NCAM+%

图11F

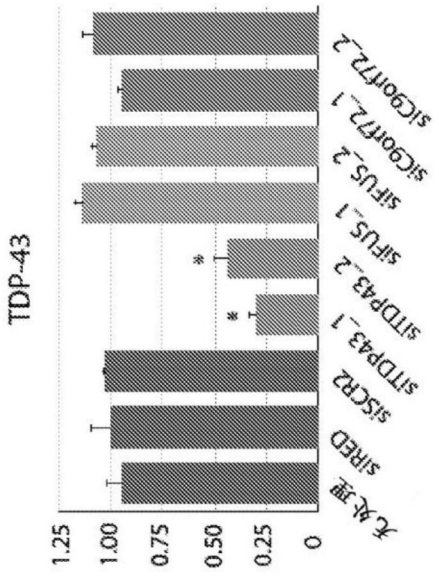

TDP-43
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0
无处理
siRED
siCSR2
siTDP43_1
siTDP43_2
siFUS_1
siFUS_2
siC9orf72_1
siC9orf72_2
*
*

图12A

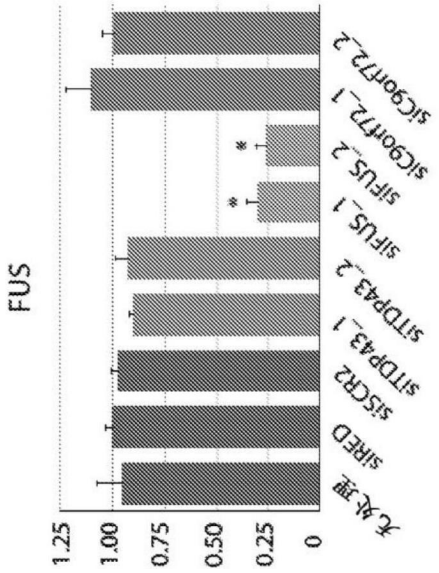

FUS
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0
无处理
siRED
siCSR2
siTDP43_1
siTDP43_2
siFUS_1
siFUS_2
siC9orf72_1
siC9orf72_2
*
*

图12B

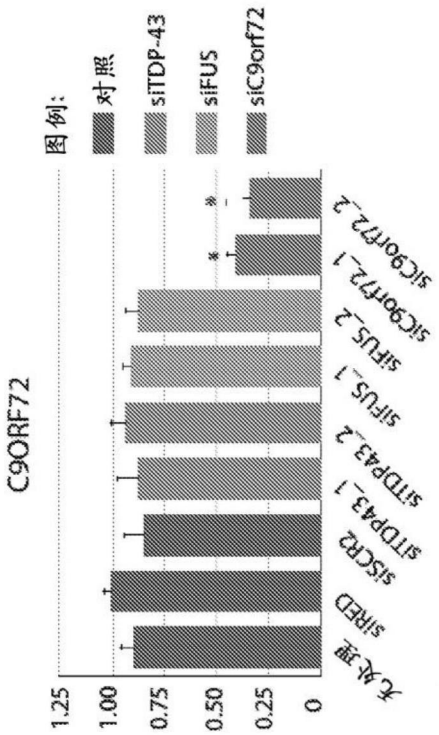

图例:
对照
siTDP-43
siFUS
siC9orf72
C9ORF72
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0
无处理
siRED
siSCR2
siTDP43_1
siTDP43_2
siFUS_1
siFUS_2
siC9orf72_1
siC9orf72_2
*
*

图12C

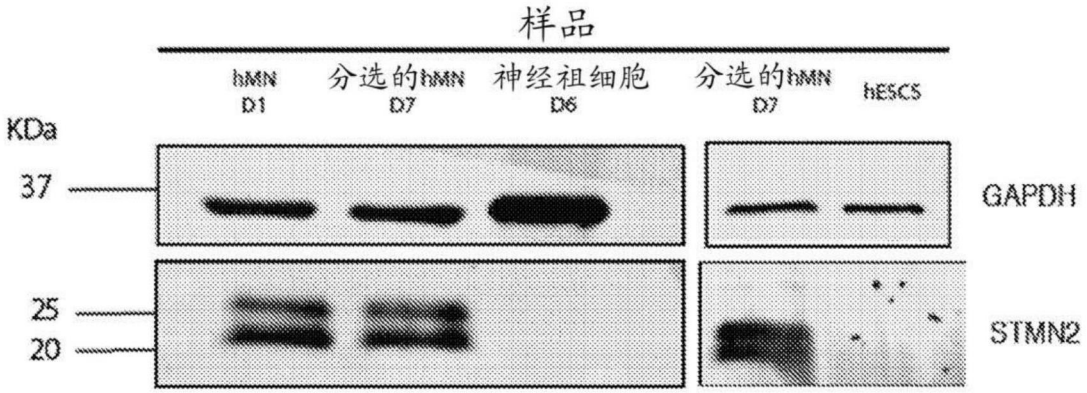

样品
hMN
D1
分选的hMN
D7
神经祖细胞
D6
分选的hMN
D7
hESCS
KDa
37
25
20
GAPDH
STMN2

图12D

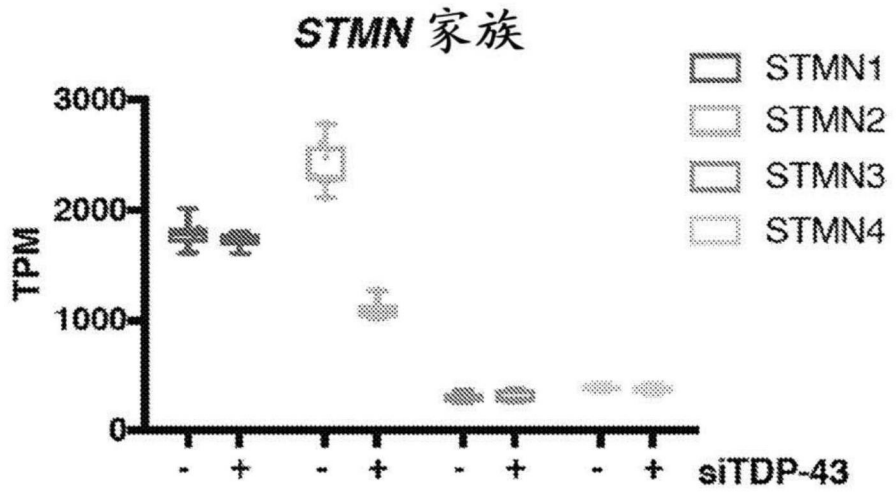


图12E

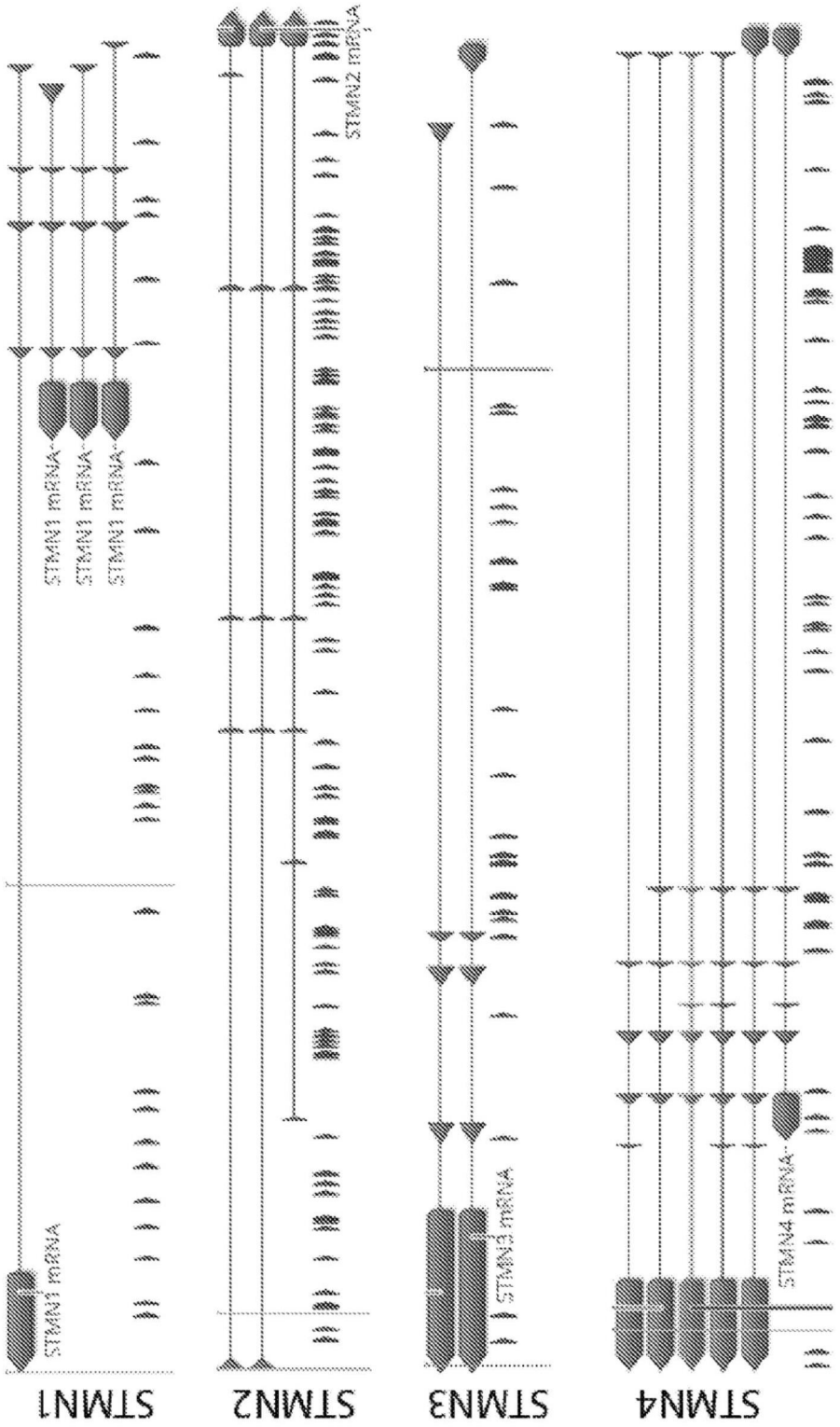

STMN1
STMN1 mRNA
STMN1 mRNA
STMN1 mRNA
STMN1 mRNA
STMN2
STMN2 mRNA
STMN3
STMN3 mRNA
STMN4
STMN4 mRNA

图12F

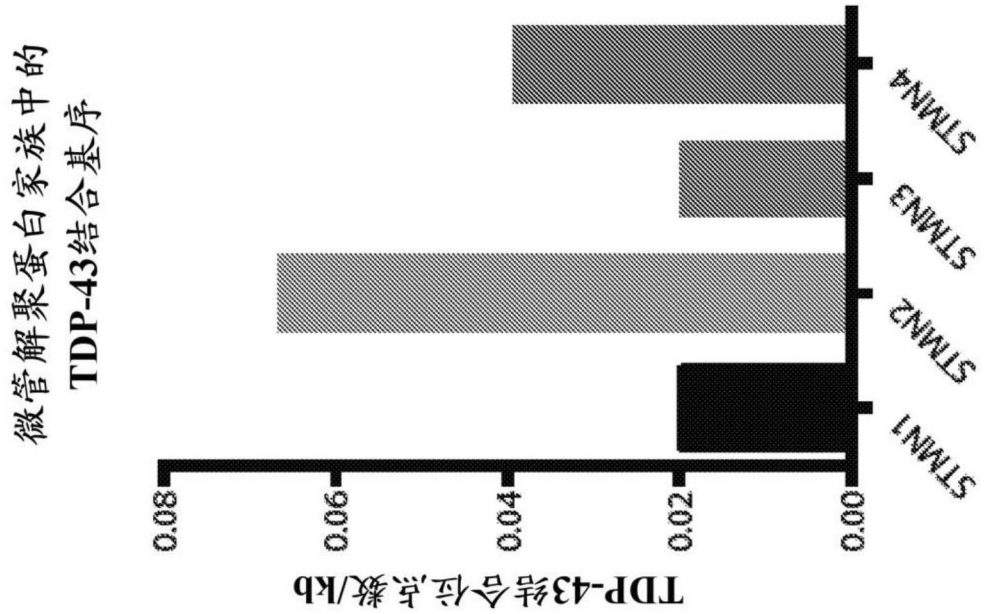


图12G

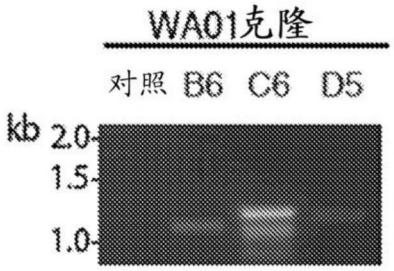


图13A

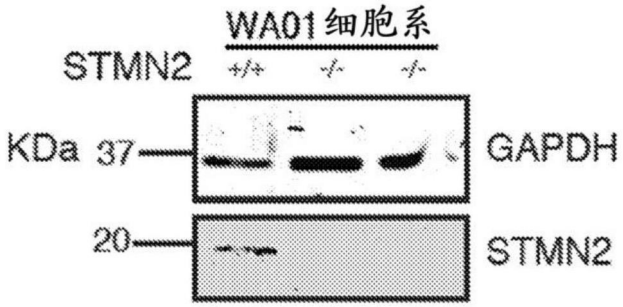


图13B

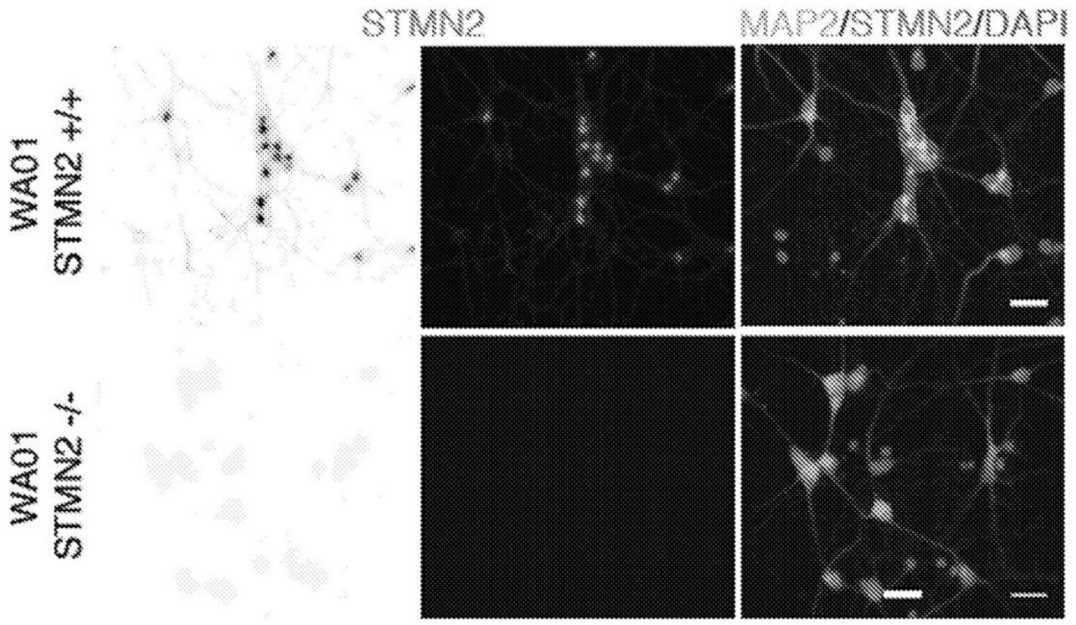

STMN2
MAP2/STMN2/DAPI
WA01
STMN2 +/+
WA01
STMN2 -/-

图13C

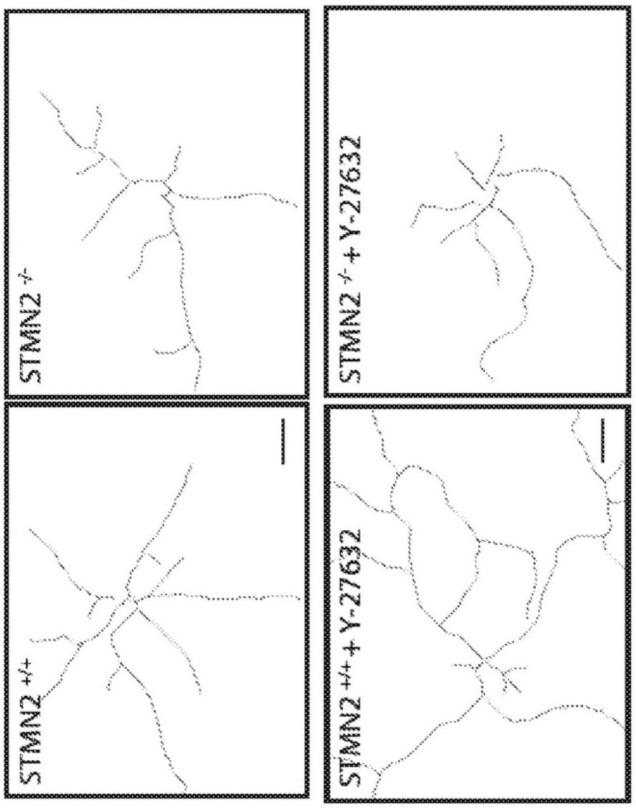

STMN2 -/-
STMN2 -/- + Y-27632
STMN2 +/+
STMN2 +/+ + Y-27632

图13D

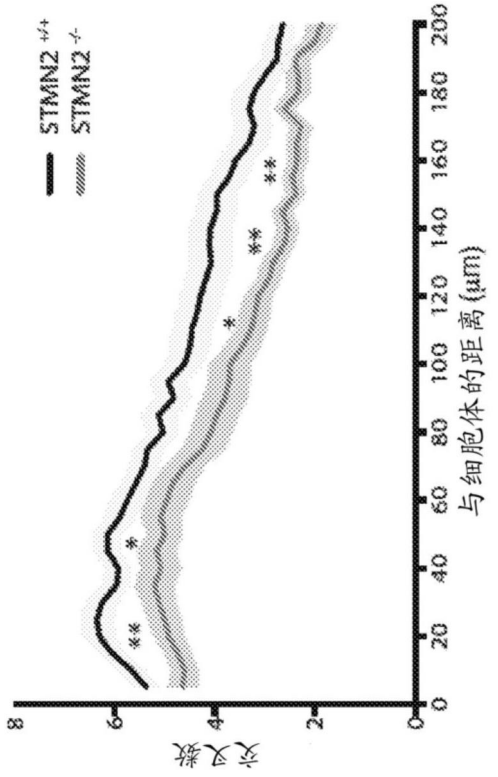

STMN2 +/+
STMN2 -/-
交叉数
与细胞体的距离(μm)
0
2
4
6
8
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
**
*
*
**
**

图13E

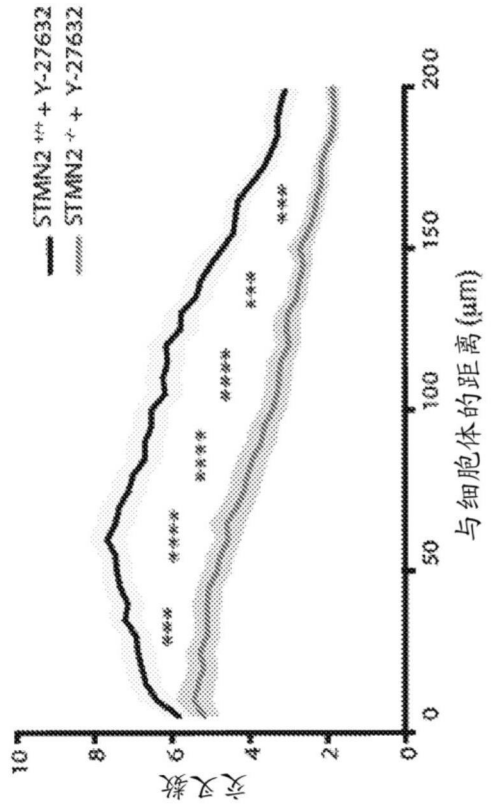

STMN2 +/+ + Y-27632
STMN2 -/- + Y-27632
交叉数
与细胞体的距离(μm)
0
2
4
6
8
10
0
50
100
150
200
***
****
****
****
***
***

图13F

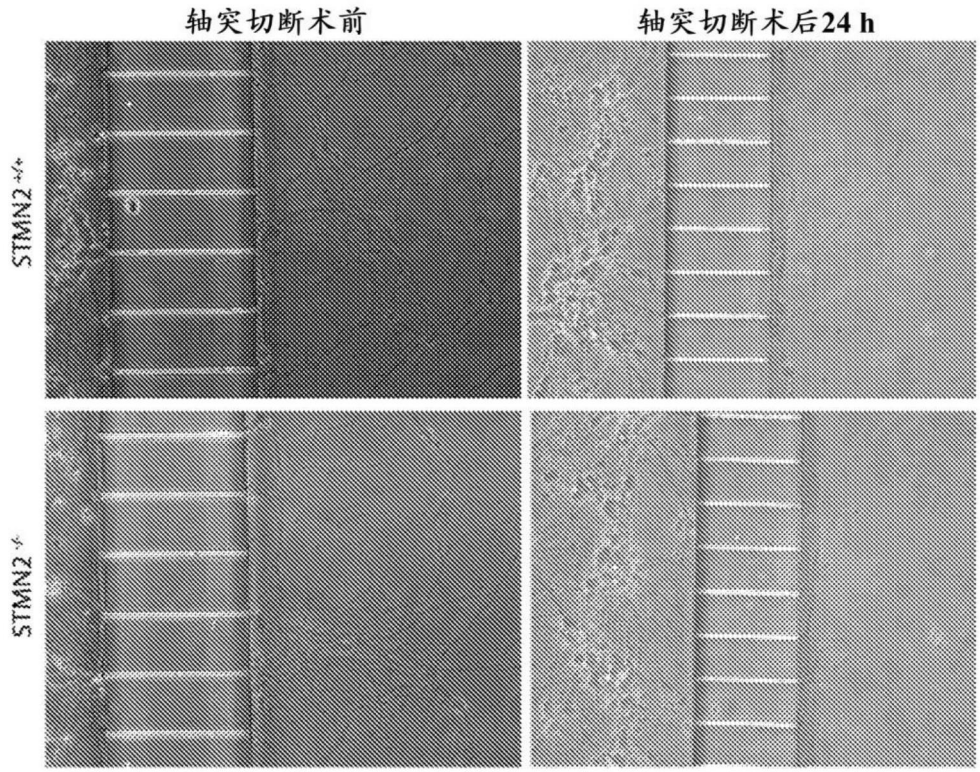

轴突切断术前
轴突切断术后24 h
STMN2+/+
STMN2-/-

图13G

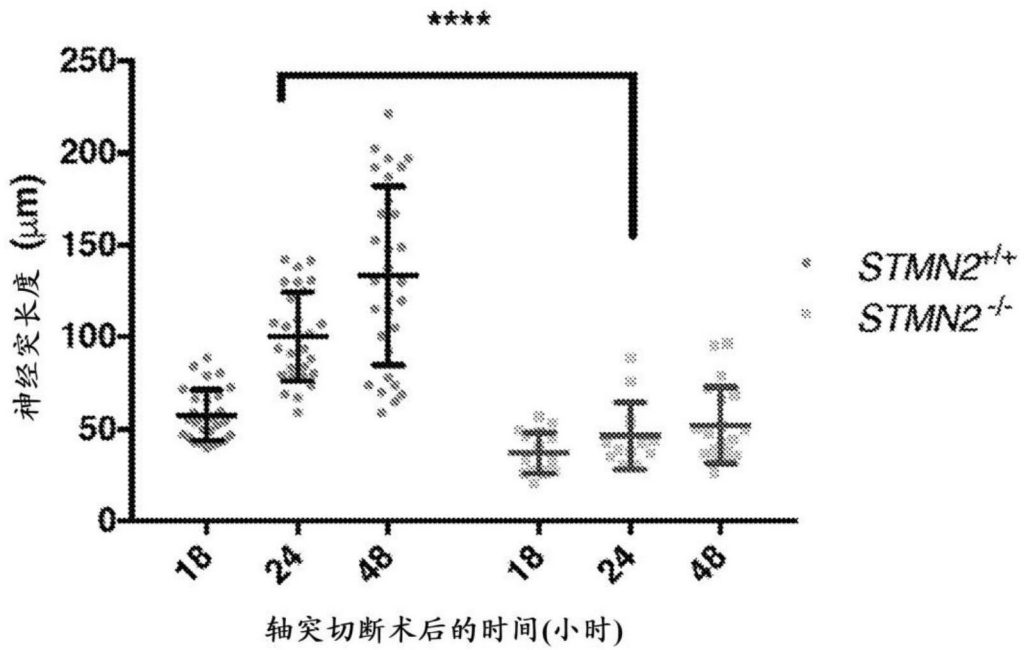

****
250
200
150
100
50
0
神经突长度 (μm)
18
24
48
18
24
48
轴突切断术后的时间(小时)
STMN2+/+
STMN2-/-

图13H

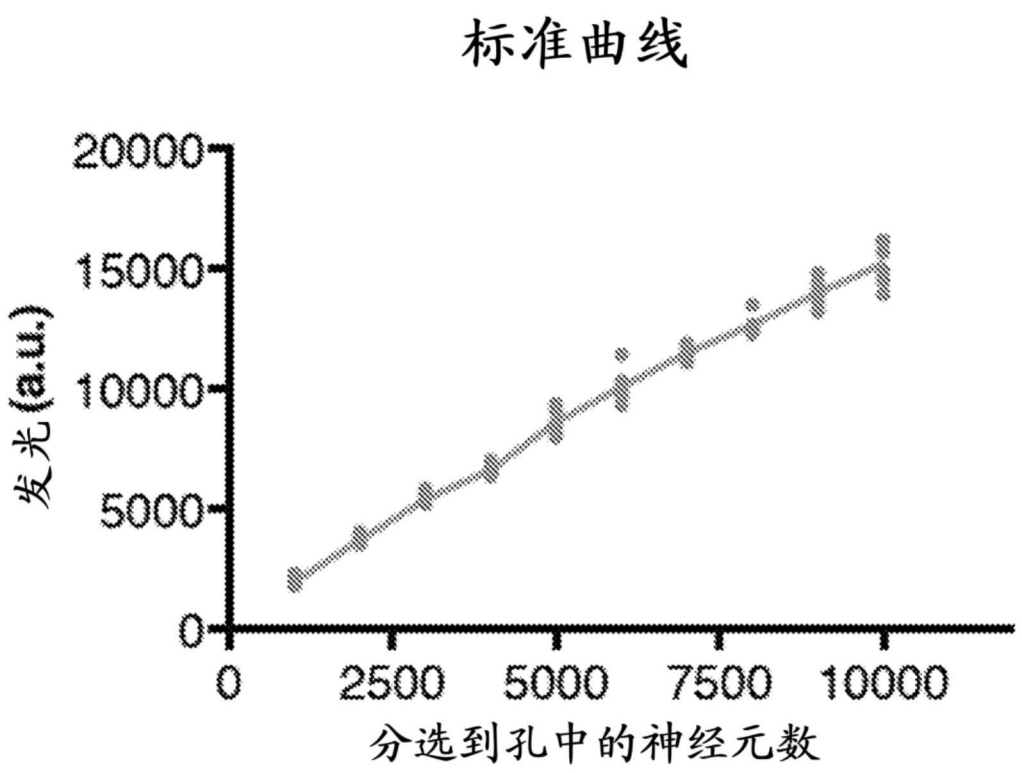

标准曲线
20000
15000
10000
5000
0
发光(a.u.)
0
2500
5000
7500
10000
分选到孔中的神经元数

图14A

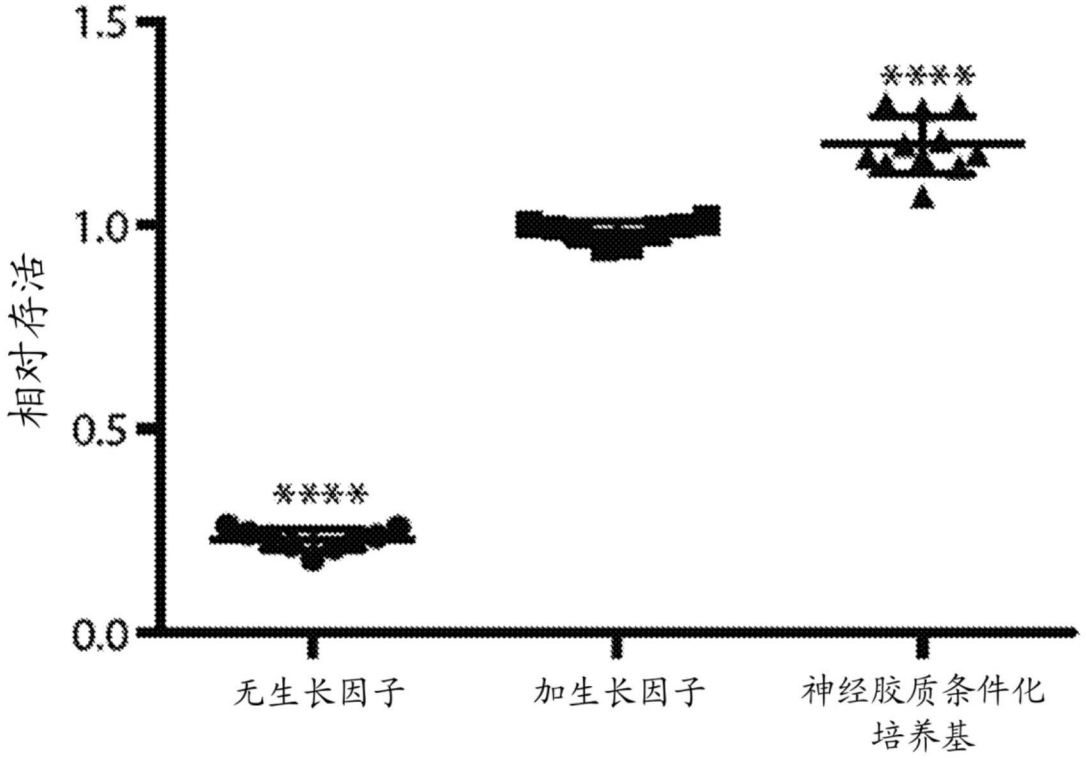

1.5
1.0
0.5
0.0
相对存活
****
****
无生长因子
加生长因子
神经胶质条件化
培养基

图14B

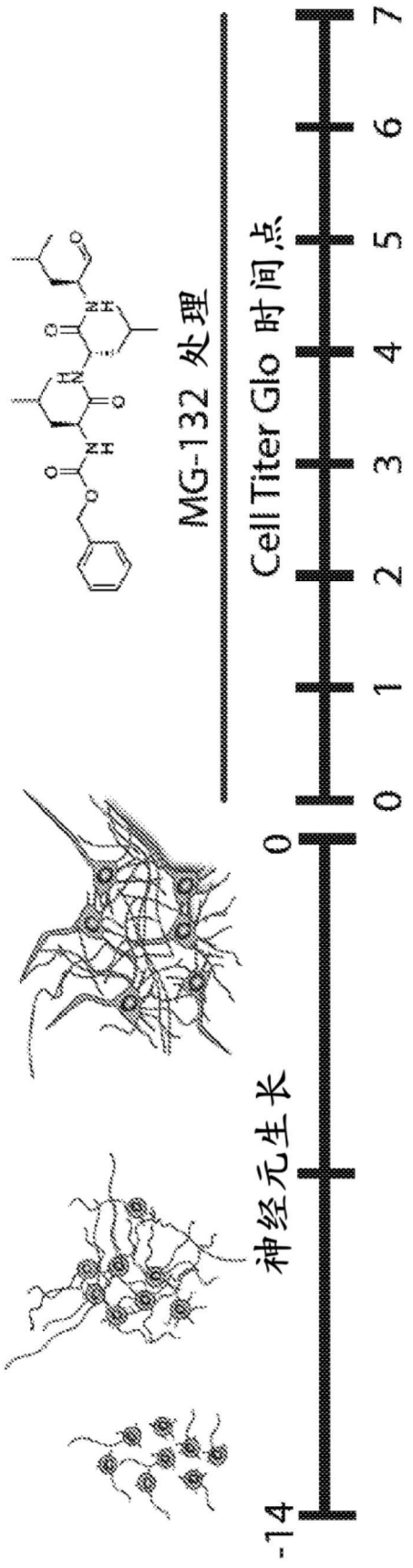


图14C

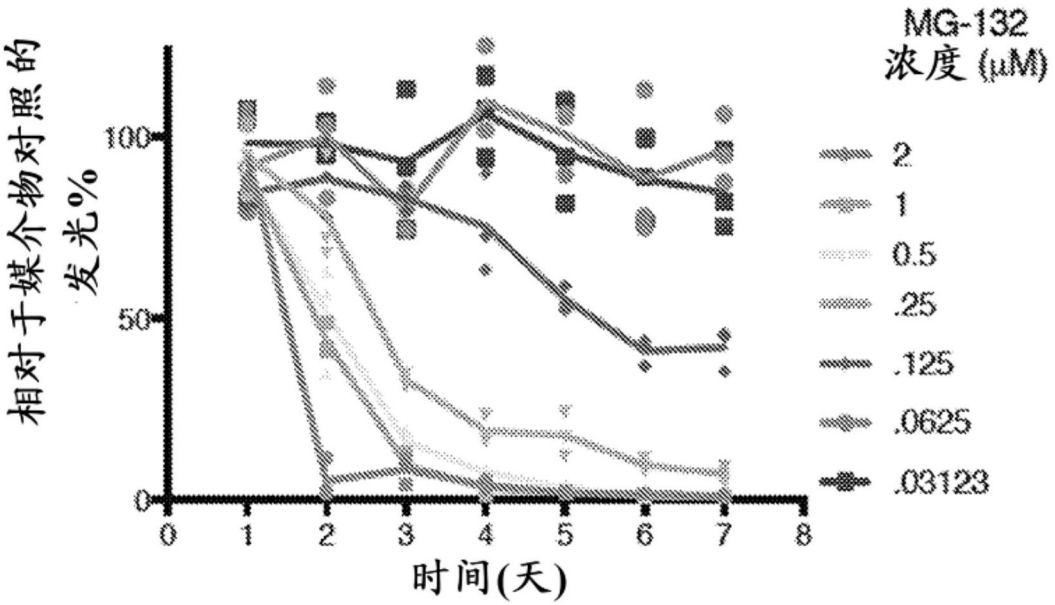

MG-132
浓度 (μM)
2
1
0.5
.25
.125
.0625
.03123
相对于媒介物对照的
发光%
100
50
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8
时间(天)

图14D

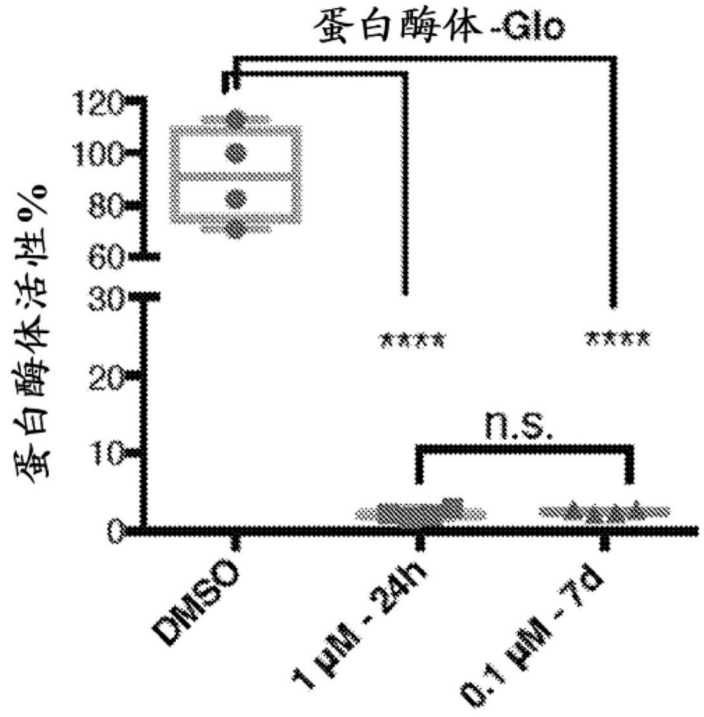

蛋白酶体-Glo
蛋白酶体活性%
120
100
80
60
30
20
10
0
****
****
n.s.
DMSO
1 μM - 24h
0.1 μM - 7d

图14E

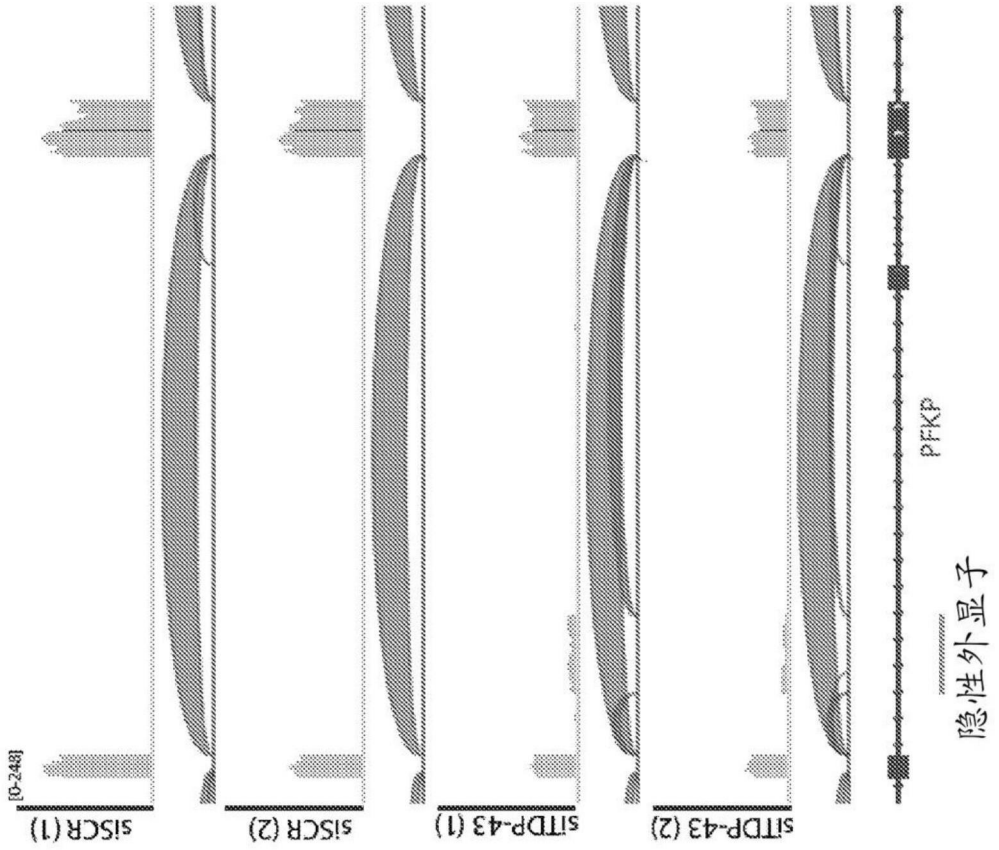

[0-248]
siSCR (1)
siSCR (2)
siTDP-43 (1)
siTDP-43 (2)
PFKP
隐性外显子

图15A

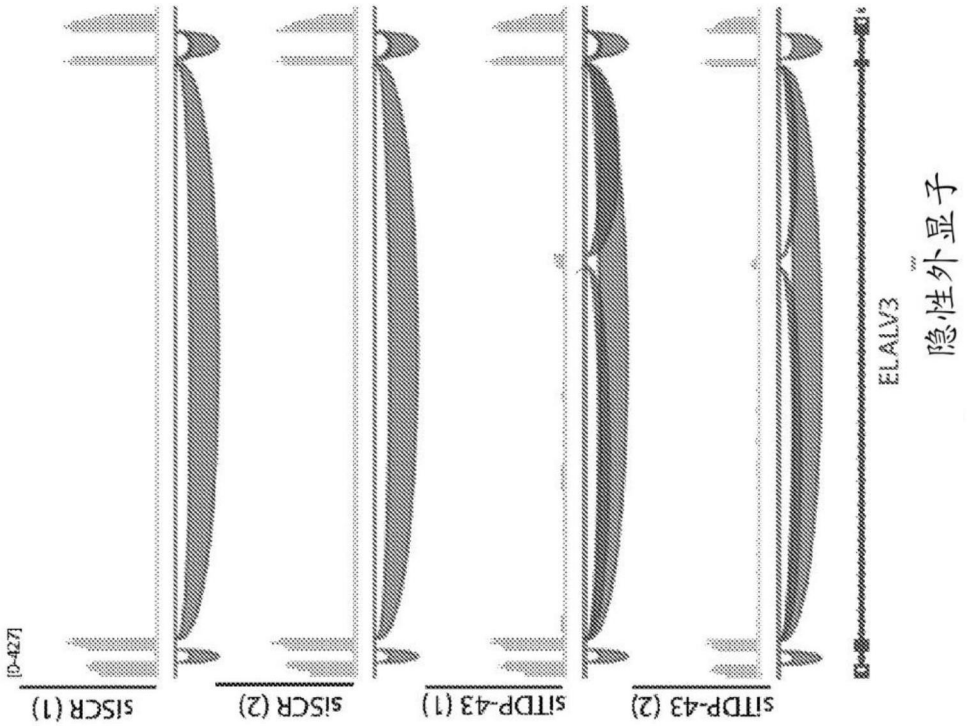

[0-427]
siSCR (1)
siSCR (2)
siTDP-43 (1)
siTDP-43 (2)
ELALV3
隐性外显子

图15B

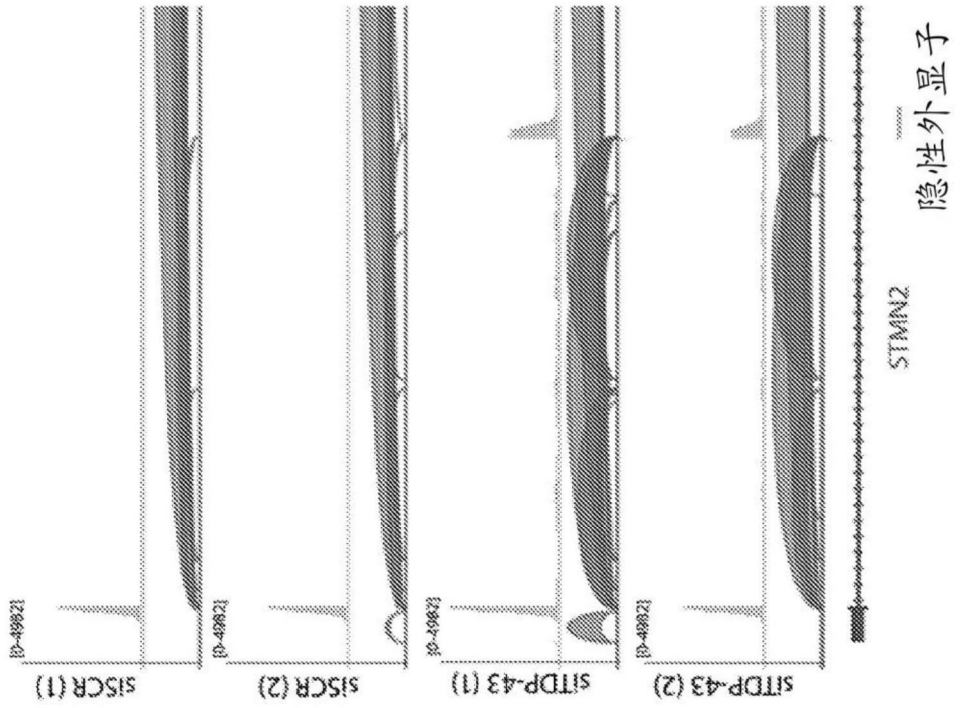

隐性外显子
STMN2
siSCR (1)
siSCR (2)
siTDP-43 (1)
siTDP-43 (2)

图15C

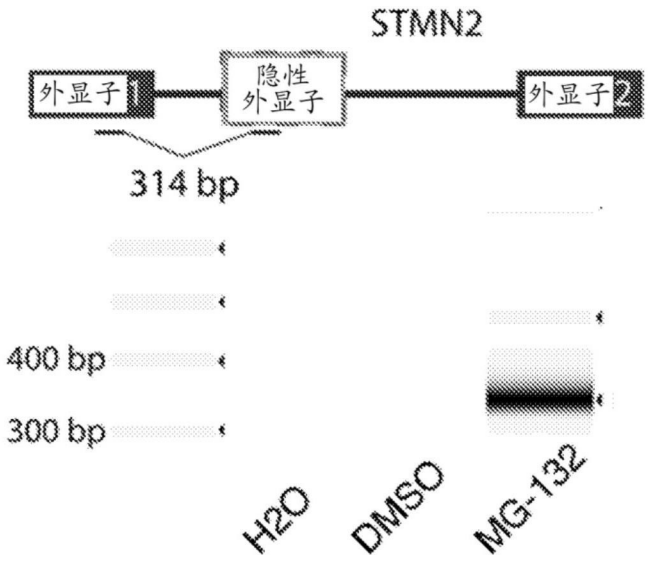

STMN2
外显子 1
隐性外显子
外显子 2
314 bp
400 bp
300 bp
H2O
DMSO
MG-132

图15D

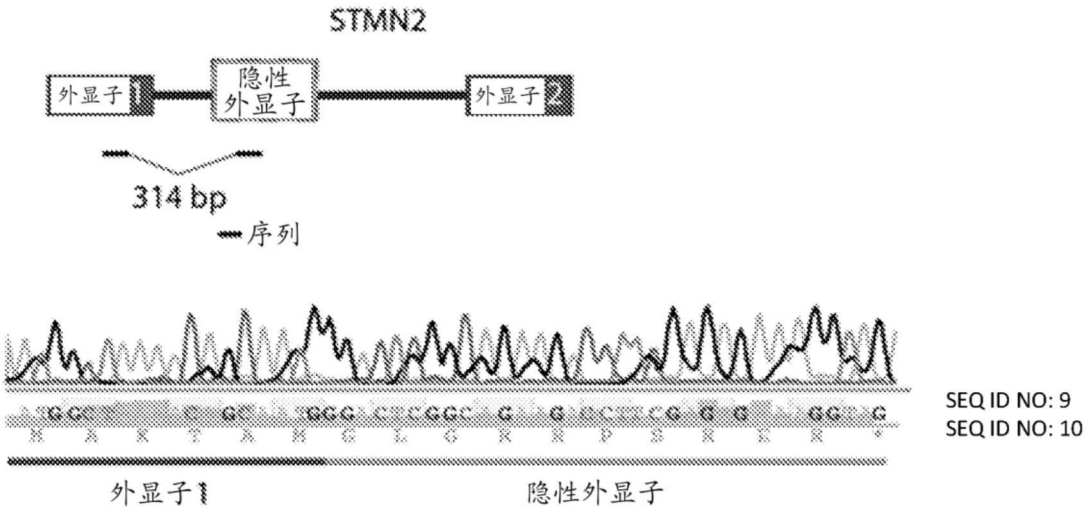

STMN2
外显子1
隐性外显子
外显子2
314 bp
序列
SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 10
外显子1
隐性外显子

图15E

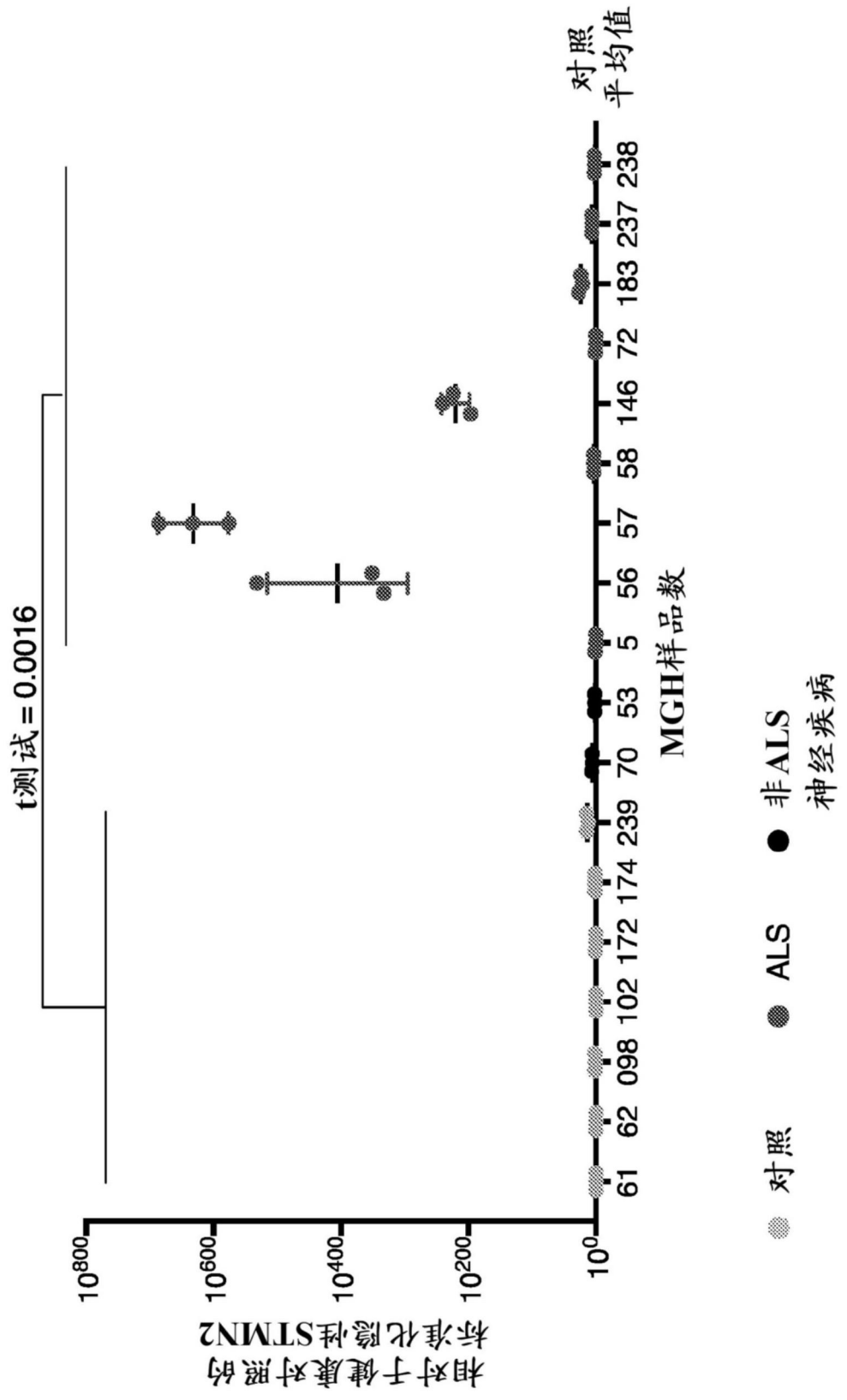

t测试 = 0.0016
相对于健康对照的
标准化隐性STMN2
10^{800}
10^{600}
10^{400}
10^{200}
10^{0}
61 62 098 102 172 174 239 70 53 5 56 57 58 146 72 183 237 238
对照
平均值
MGH样品数
对照
ALS
非ALS
神经疾病

图16A

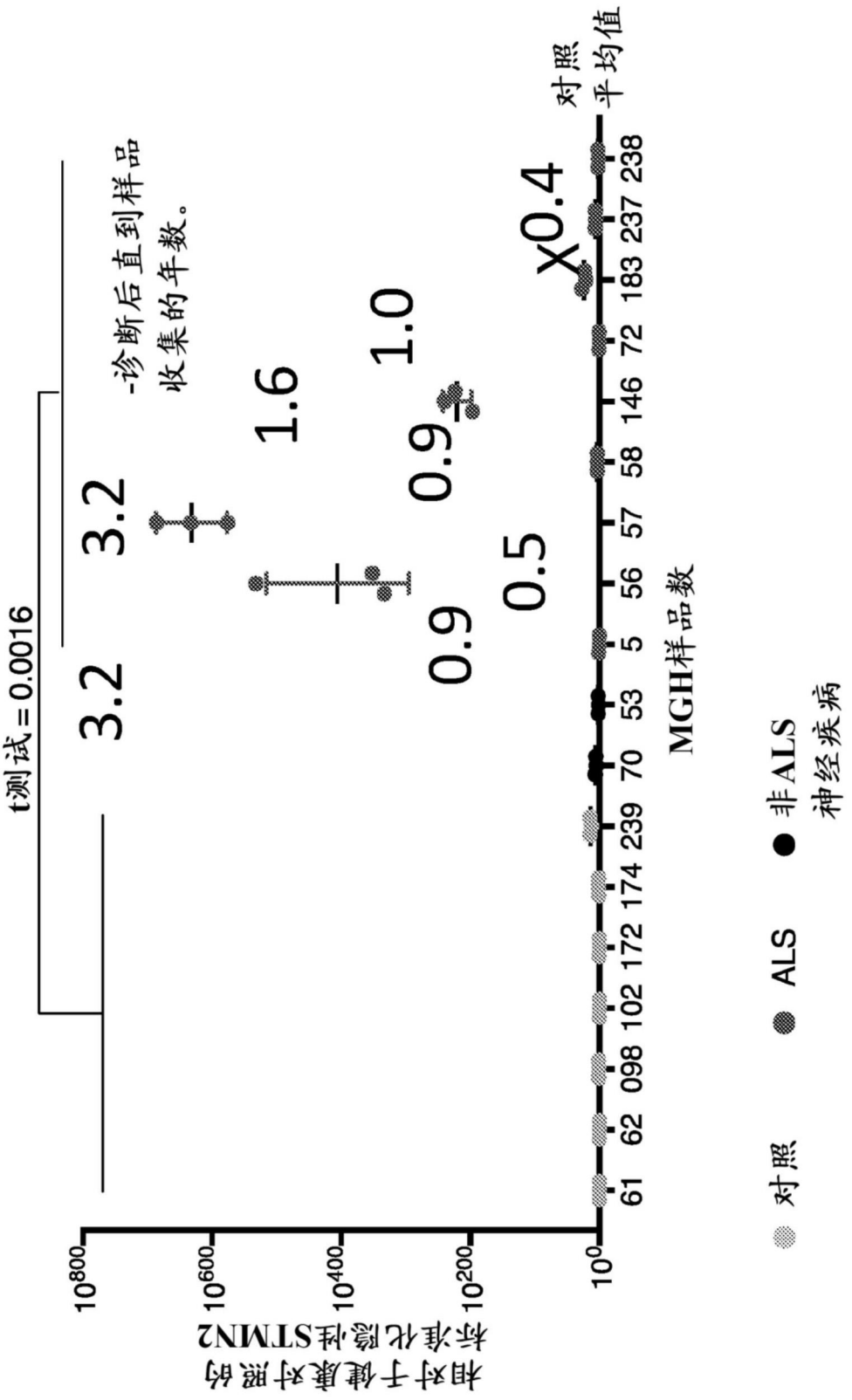

相对于健康对照的
标准化隐性STMN2
10^{800}
10^{600}
10^{400}
10^{200}
10^{0}
t测试 = 0.0016
3.2
3.2
-诊断后直到样品
收集的年数。
1.6
1.0
0.9
0.9
0.5
0.4
对照
平均值
61 62 098 102 172 174 239 70 53 5 56 57 58 146 72 183 237 238
MGH样品数
对照
ALS
非ALS
神经疾病

图16B

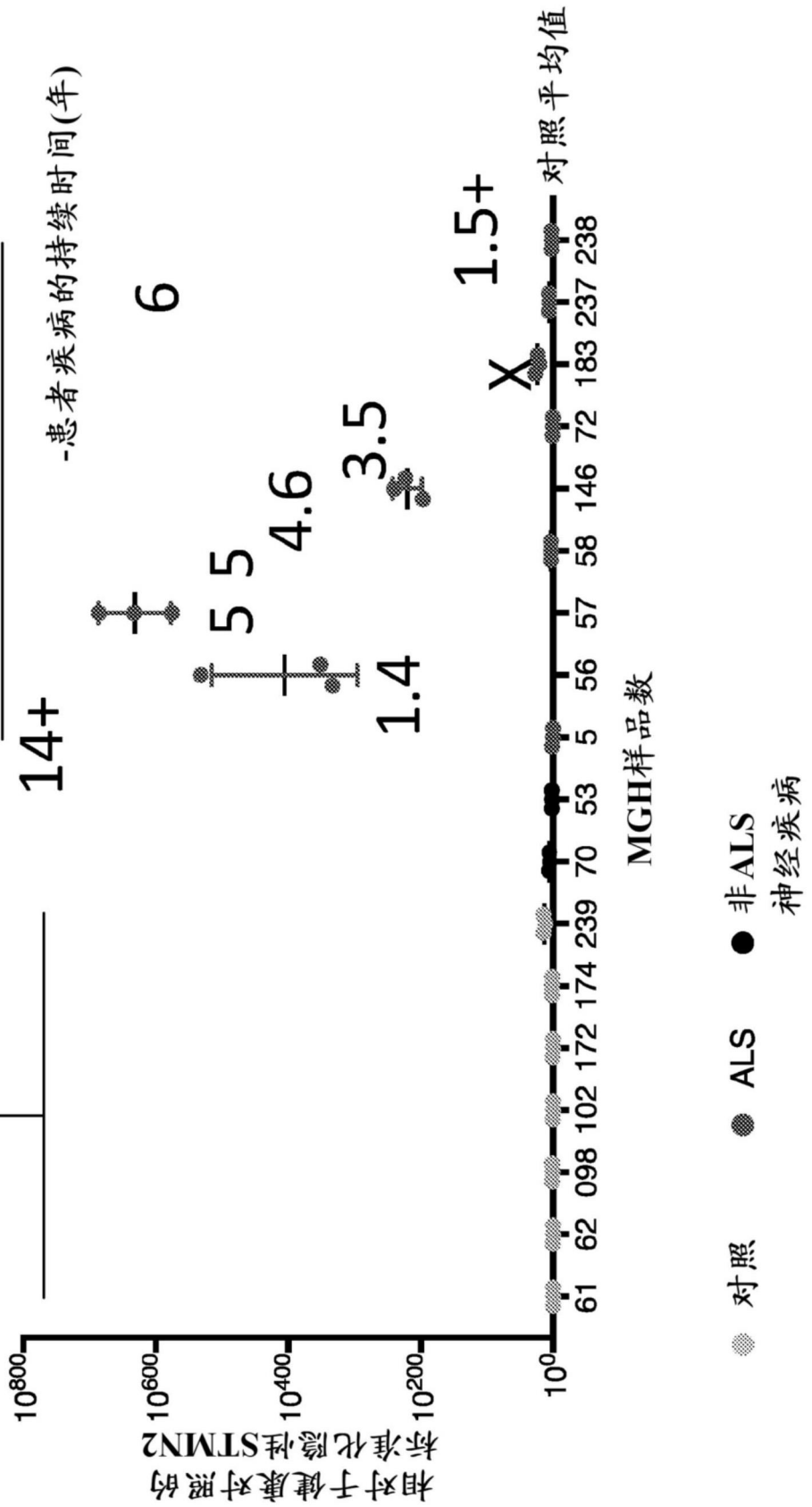

相对于健康对照的
标准化隐性STMN2
10^{800}
10^{600}
10^{400}
10^{200}
10^{0}
t测试=0.0016
14+
-患者疾病的持续时间(年)
6
5 5
4.6
3.5
1.4
1.5+
对照平均值
61 62 098 102 172 174 239 70 53 5 56 57 58 146 72 183 237 238
MGH样品数
对照
ALS
非ALS
神经疾病

图16C

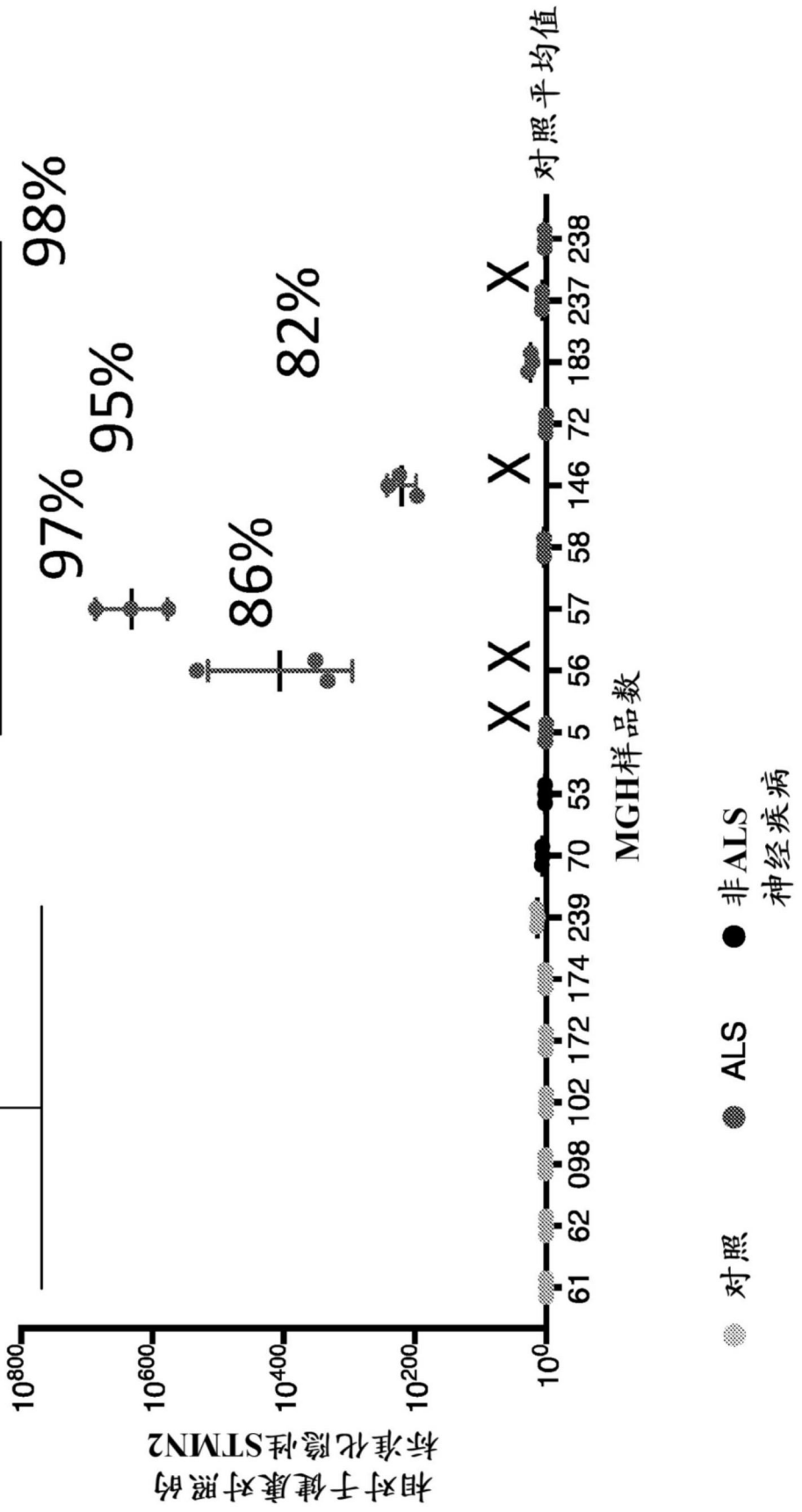

相对于健康对照的
标准化隐性STMN2
10^{800}
10^{600}
10^{400}
10^{200}
10^{0}
t测试 = 0.0016
98%
97%
95%
86%
82%
61 62 098 102 172 174 239 70 53 5 56 57 58 146 72 183 237 238
对照平均值
MGH样品数
对照
ALS
非ALS
神经疾病

图16D

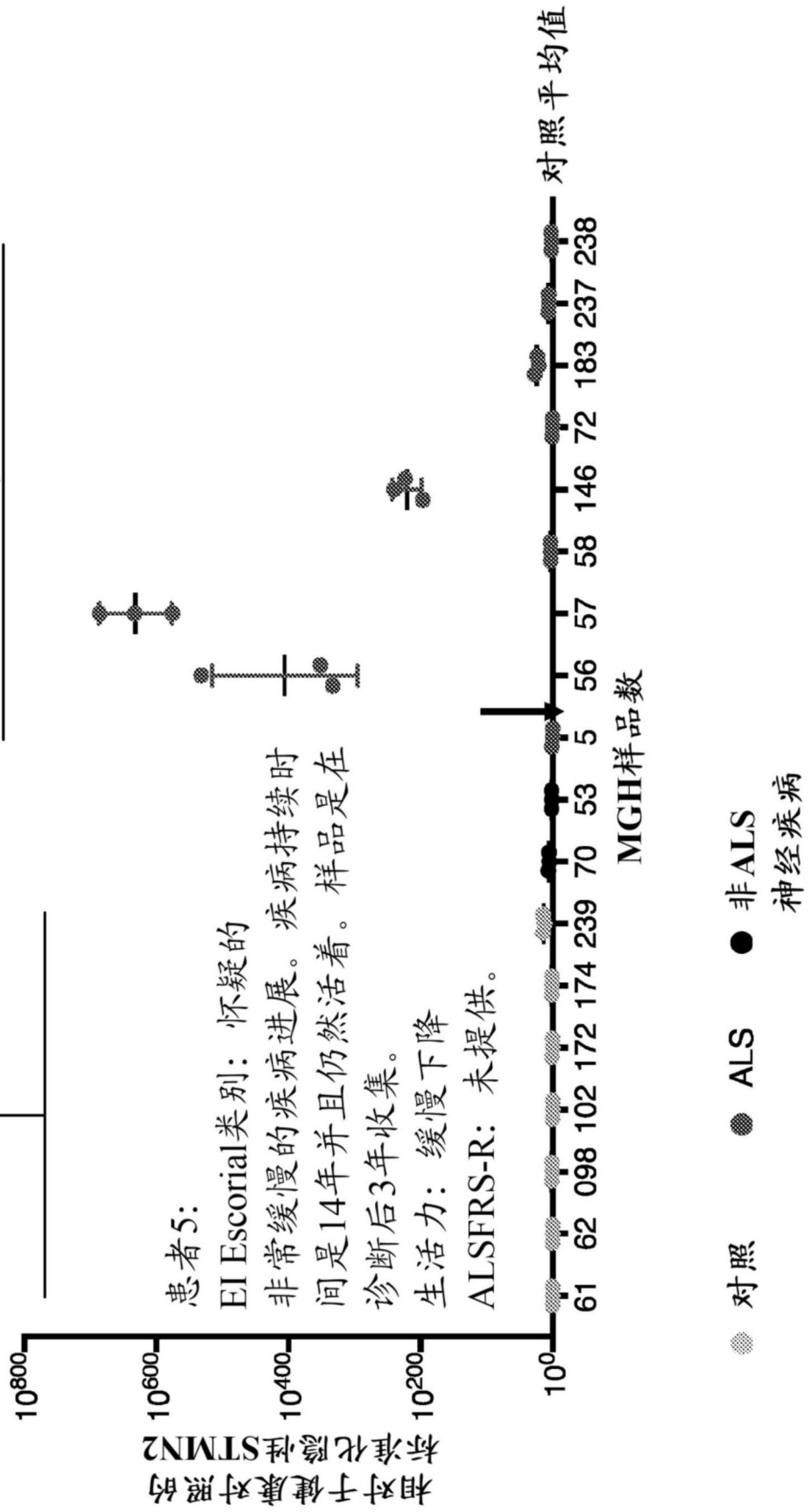

t测试 = 0.0016
患者5:
EI Escorial类别：怀疑的
非常缓慢的疾病进展。疾病持续时间是14年并且仍然活着。样品是在诊断后3年收集。
生活力：缓慢下降
ALSFRS-R：未提供。
相对于健康对照的非活化强度STMN2
10^{800}
10^{600}
10^{400}
10^{200}
10^{0}
61 62 098 102 172 174 239 70 53 5 56 57 58 146 72 183 237 238
对照平均值
MGH样品数
对照
ALS
非ALS神经疾病

图16E

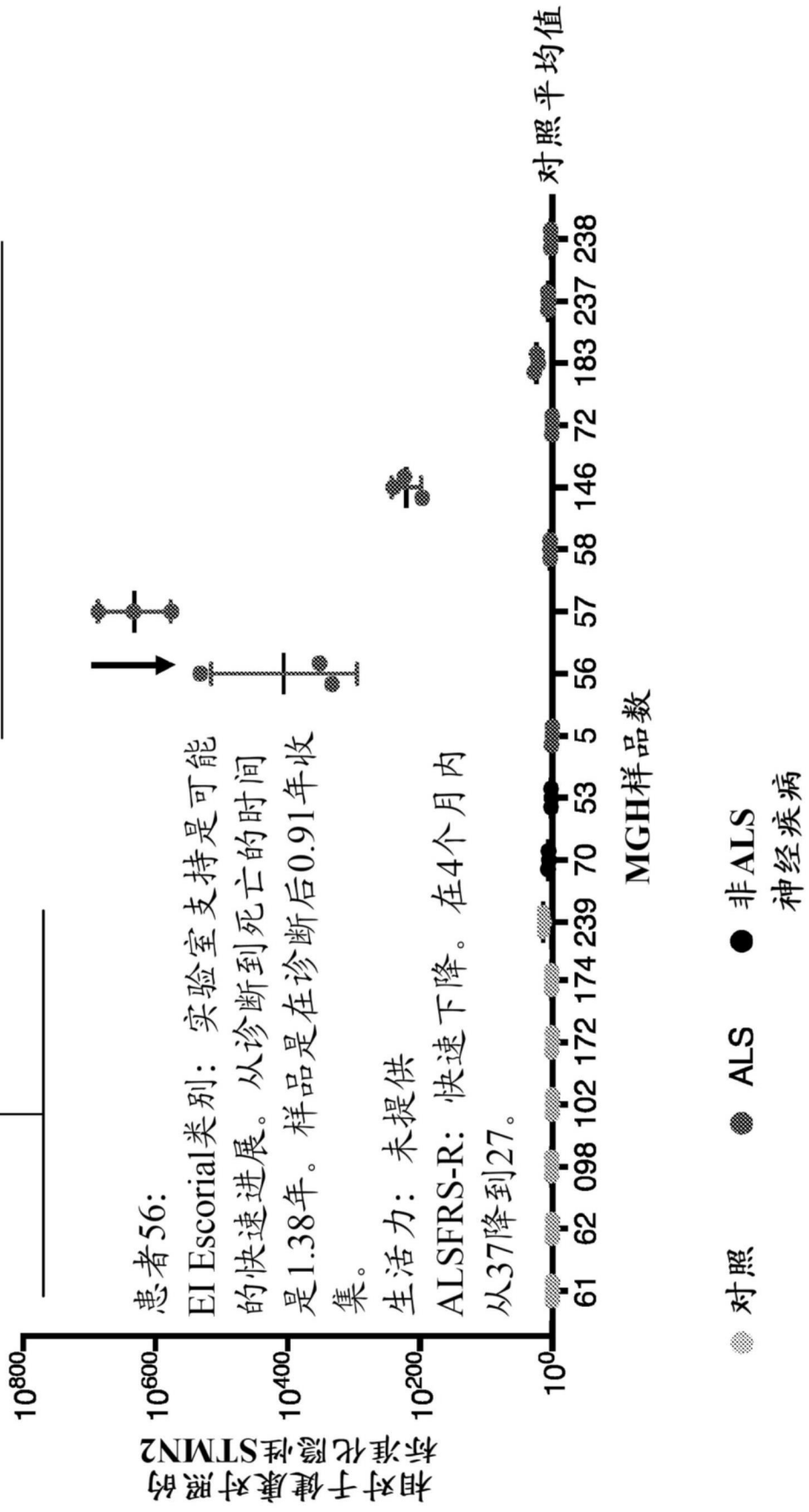

t测试 = 0.0016
患者56:
EI Escorial类别：实验室支持是可能的快速进展。从诊断到死亡的时间是1.38年。样品是在诊断后0.91年收集。
生活力：未提供
ALSFRS-R：快速下降。在4个月内从37降到27。
相对于健康对照的标准化强度STMN2
10^{800}
10^{600}
10^{400}
10^{200}
10^{0}
61 62 098 102 172 174 239 70 53 5 56 57 58 146 72 183 237 238
对照平均值
MGH样品数
对照
ALS
非ALS神经疾病

图16F

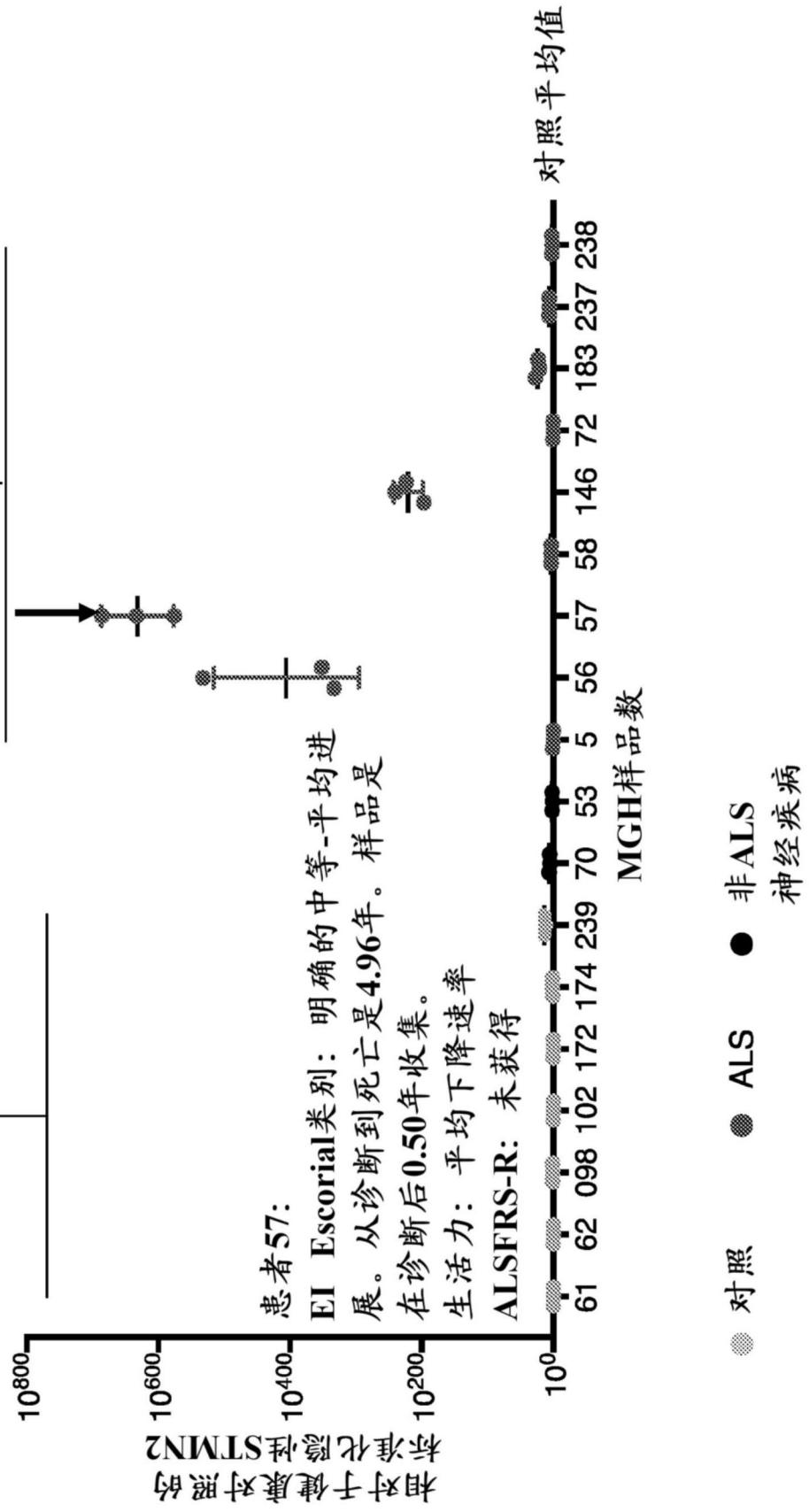

相对于健康对照的
标准化感染性STMN2
10^{800}
10^{600}
10^{400}
10^{200}
10^{0}
t测试 = 0.0016
患者57:
EI Escorial类别：明确的中等-平均进展。从诊断到死亡是4.96年。样品是在诊断后0.50年收集。
生活力：平均下降速率
ALSFRS-R：未获得
61 62 098 102 172 174 239 70 53 5 56 57 58 146 72 183 237 238
对照平均值
MGH样品数
对照
ALS
非ALS
神经疾病

图16G

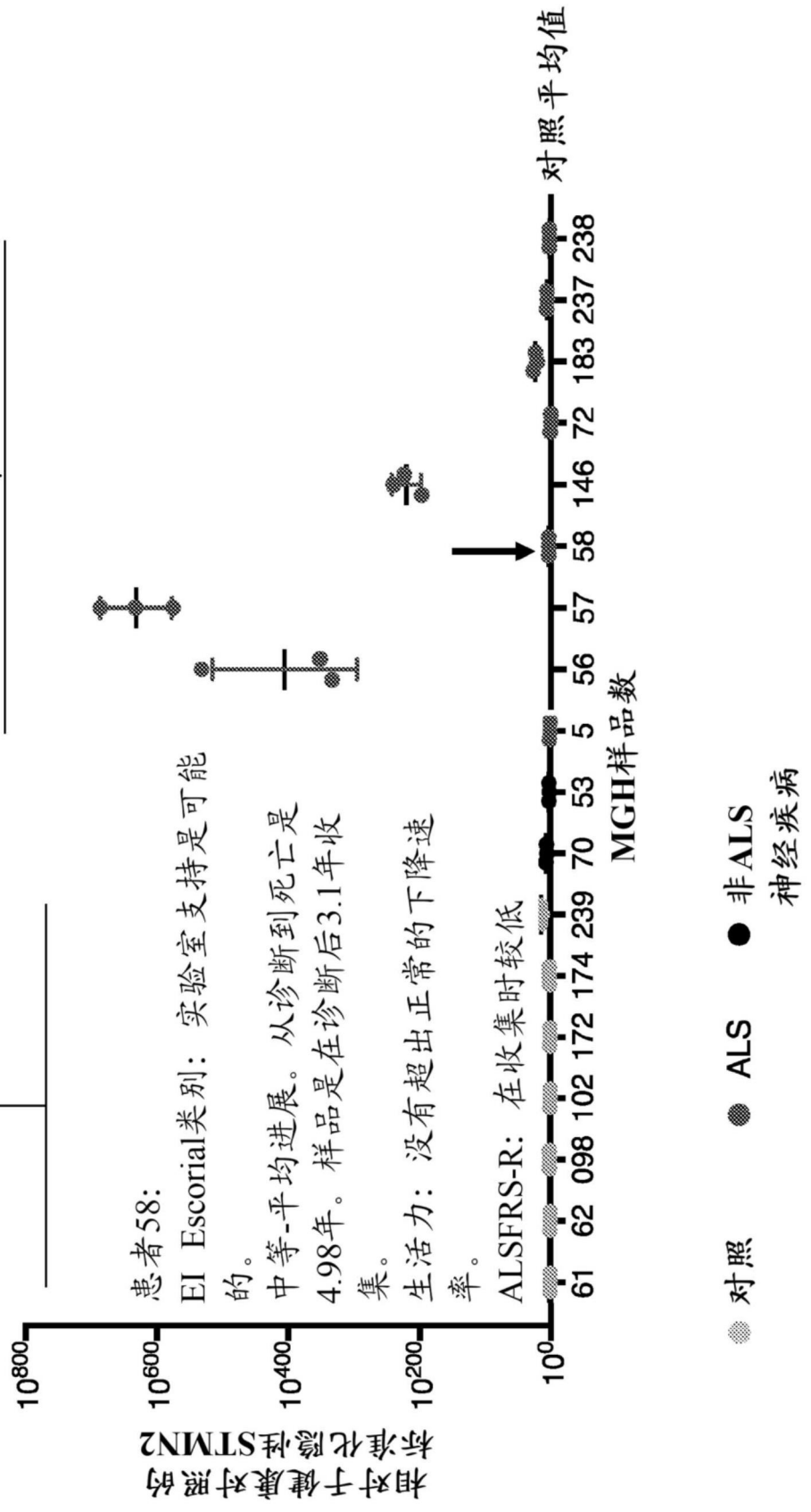

t测试 = 0.0016
相对于健康对照的
标准化感觉STMN2
10^{800}
10^{600}
10^{400}
10^{200}
10^{0}
患者58:
EI Escorial类别：实验室支持是可能的。
中等-平均进展。从诊断到死亡是4.98年。样品是在诊断后3.1年收集。
生活力：没有超出正常的下降速率。
ALSFRS-R：在收集时较低
61 62 098 102 172 174 239 70 53 5 56 57 58 146 72 183 237 238
MGH样品数
对照平均值
对照
ALS
非ALS
神经疾病

图16H

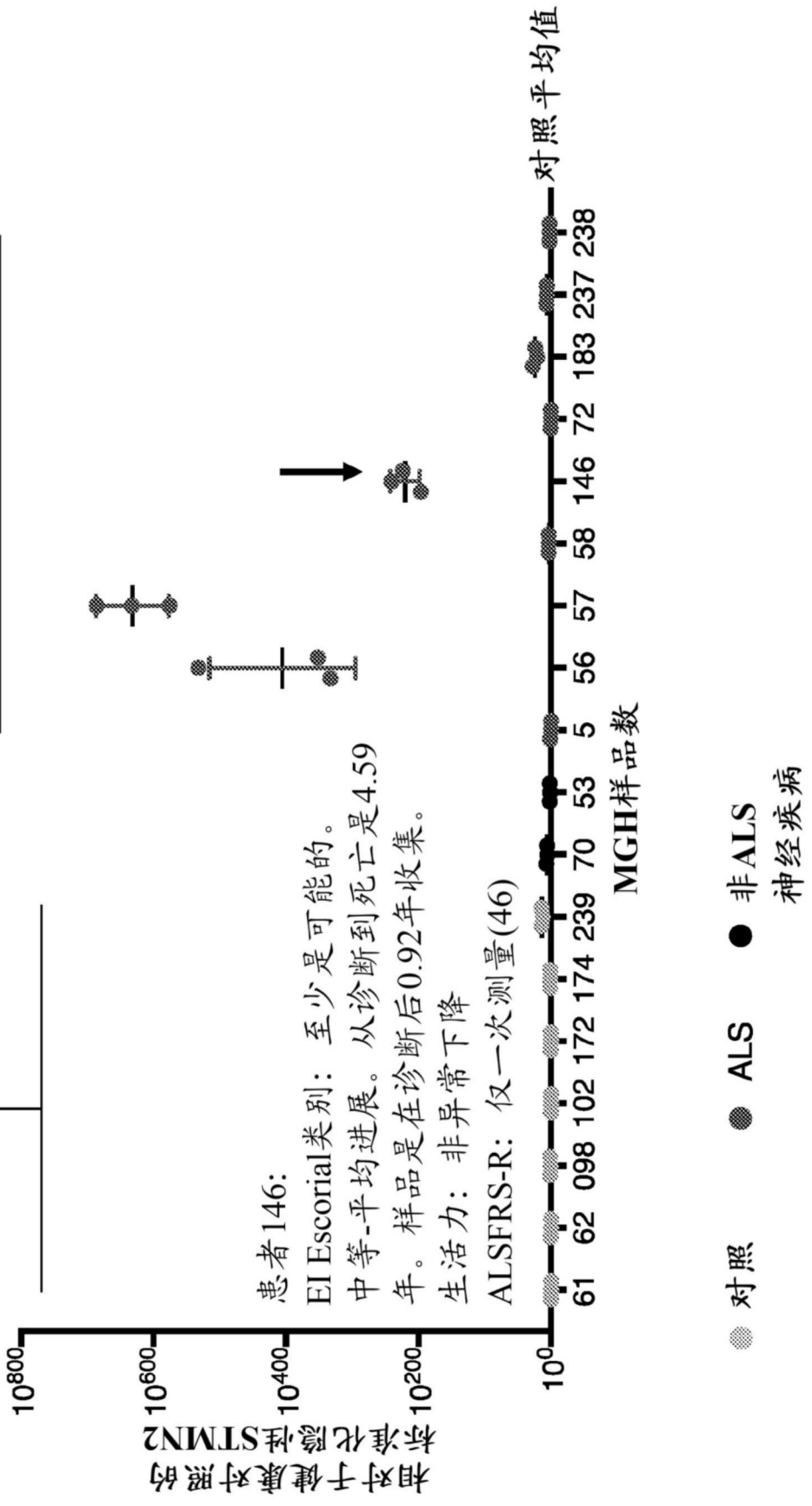

t测试 = 0.0016
患者146:
EI Escorial类别：至少是可能的。
中等-平均进展。从诊断到死亡是4.59
年。样品是在诊断后0.92年收集。
生活力：非异常下降
ALSFRS-R：仅一次测量(46)
相对于健康对照的
标准化隐性STMN2
10^{800}
10^{600}
10^{400}
10^{200}
10^{0}
61 62 098 102 172 174 239 70 53 5 56 57 58 146 72 183 237 238
MGH样品数
对照平均值
对照
ALS
非ALS
神经疾病

图16I

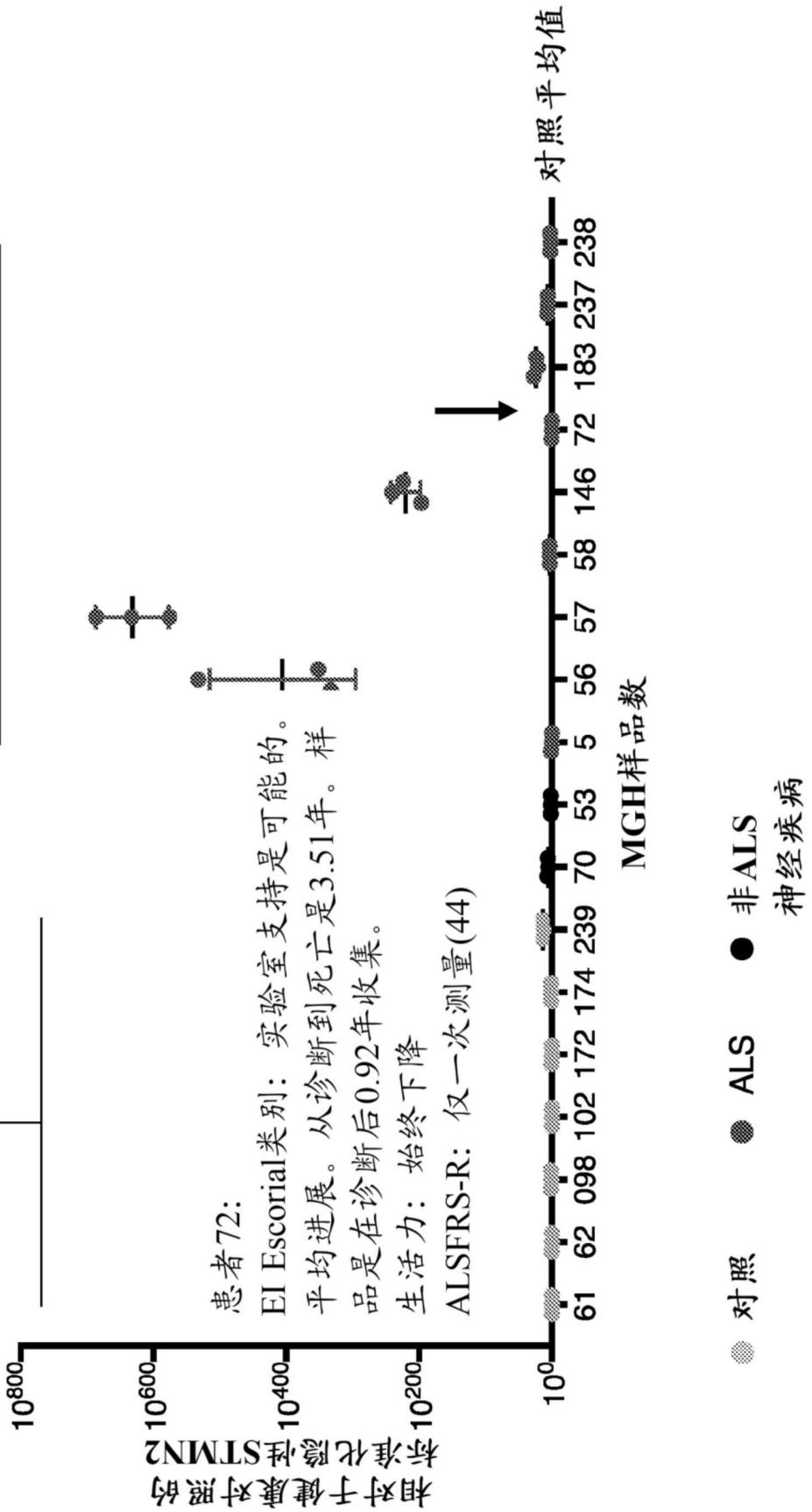

t测试 = 0.0016
患者72:
EI Escorial类别：实验室支持是可能的。
平均进展。从诊断到死亡是3.51年。样品是在诊断后0.92年收集。
生活力：始终下降
ALSFRS-R：仅一次测量(44)
相对于健康对照的标准化弱性STMN2
10^{800}
10^{600}
10^{400}
10^{200}
10^{0}
61 62 098 102 172 174 239 70 53 5 56 57 58 146 72 183 237 238
对照平均值
MGH样品数
对照
ALS
非ALS神经疾病

图16J

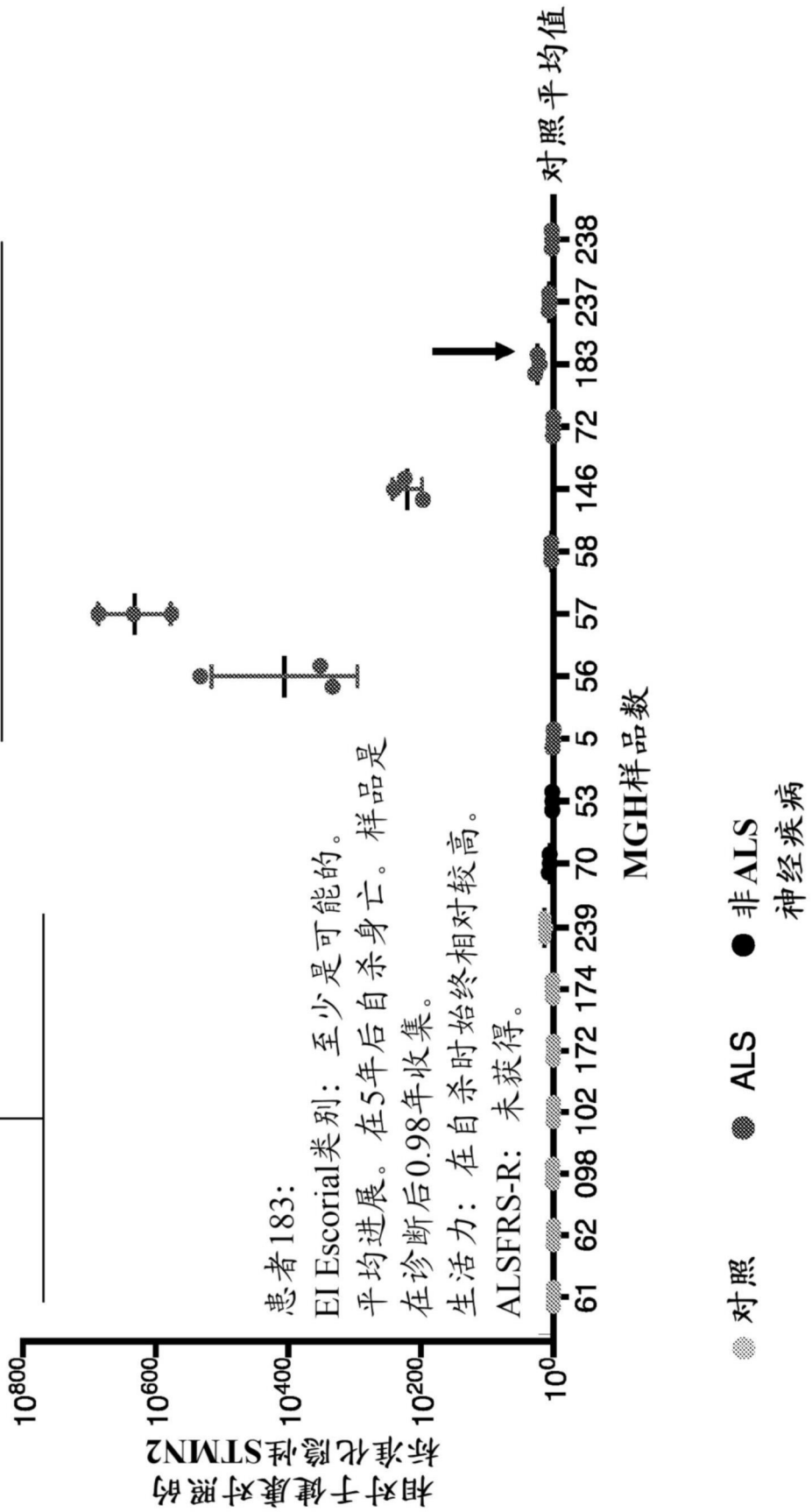

相对于健康对照的
标准化强度STMN2
10^{800}
10^{600}
10^{400}
10^{200}
10^{0}
t测试 = 0.0016
患者183:
EI Escorial类别：至少是可能的。
平均进展。在5年后自杀身亡。样品是
在诊断后0.98年收集。
生活力：在自杀时始终相对较高。
ALSFRS-R：未获得。
61 62 098 102 172 174 239 70 53 5 56 57 58 146 72 183 237 238
对照平均值
MGH样品数
对照
ALS
非ALS
神经疾病

图16K

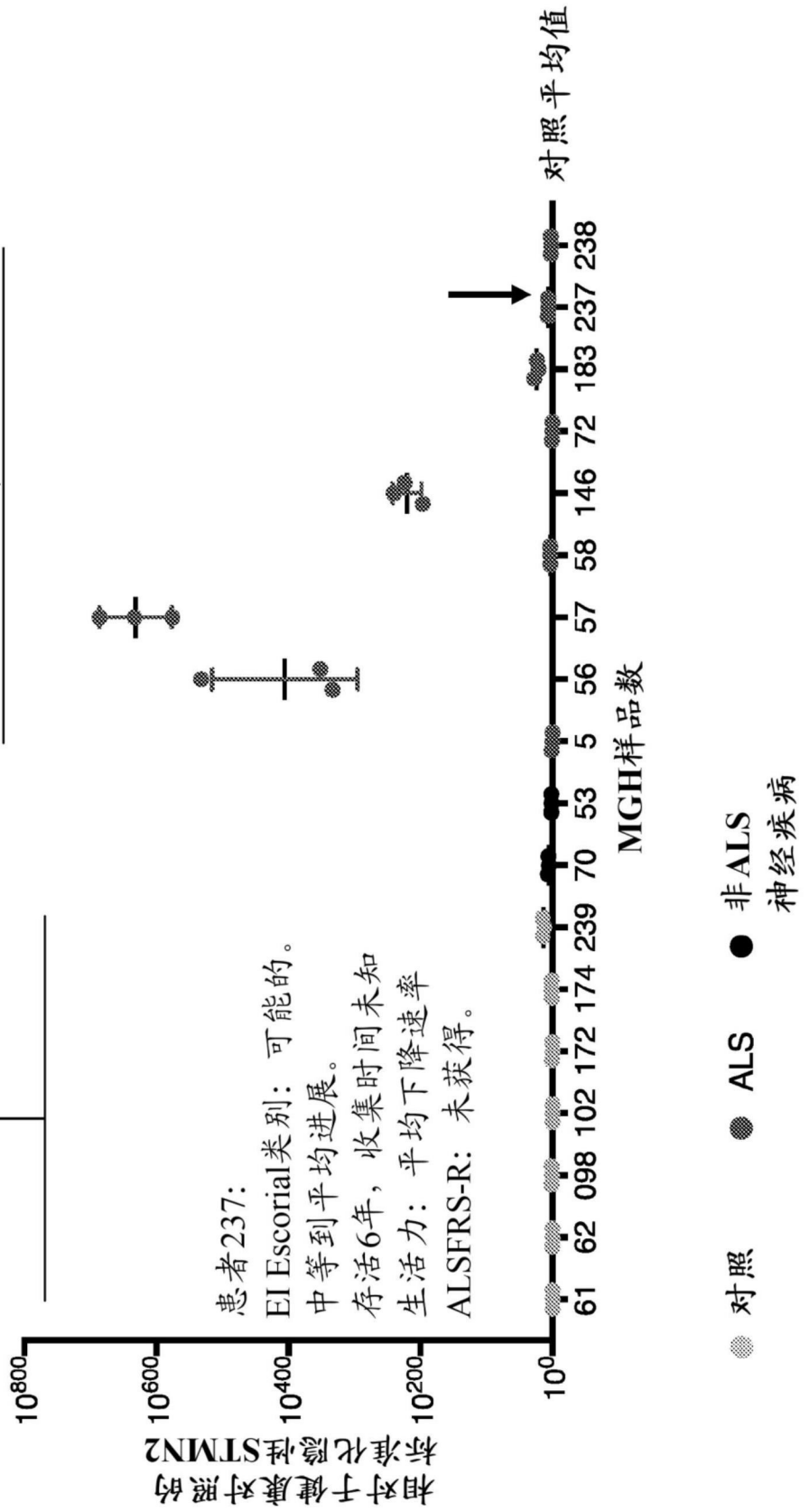

相对于健康对照的
标准化隐性STMN2
10^{800}
10^{600}
10^{400}
10^{200}
10^{0}
t测试 = 0.0016
患者237:
EI Escorial类别：可能的。
中等到平均进展。
存活6年，收集时间未知
生活力：平均下降速率
ALSFRS-R：未获得。
61 62 098 102 172 174 239 70 53 5 56 57 58 146 72 183 237 238
MGH样品数
对照平均值
对照
ALS
非ALS
神经疾病

图16L

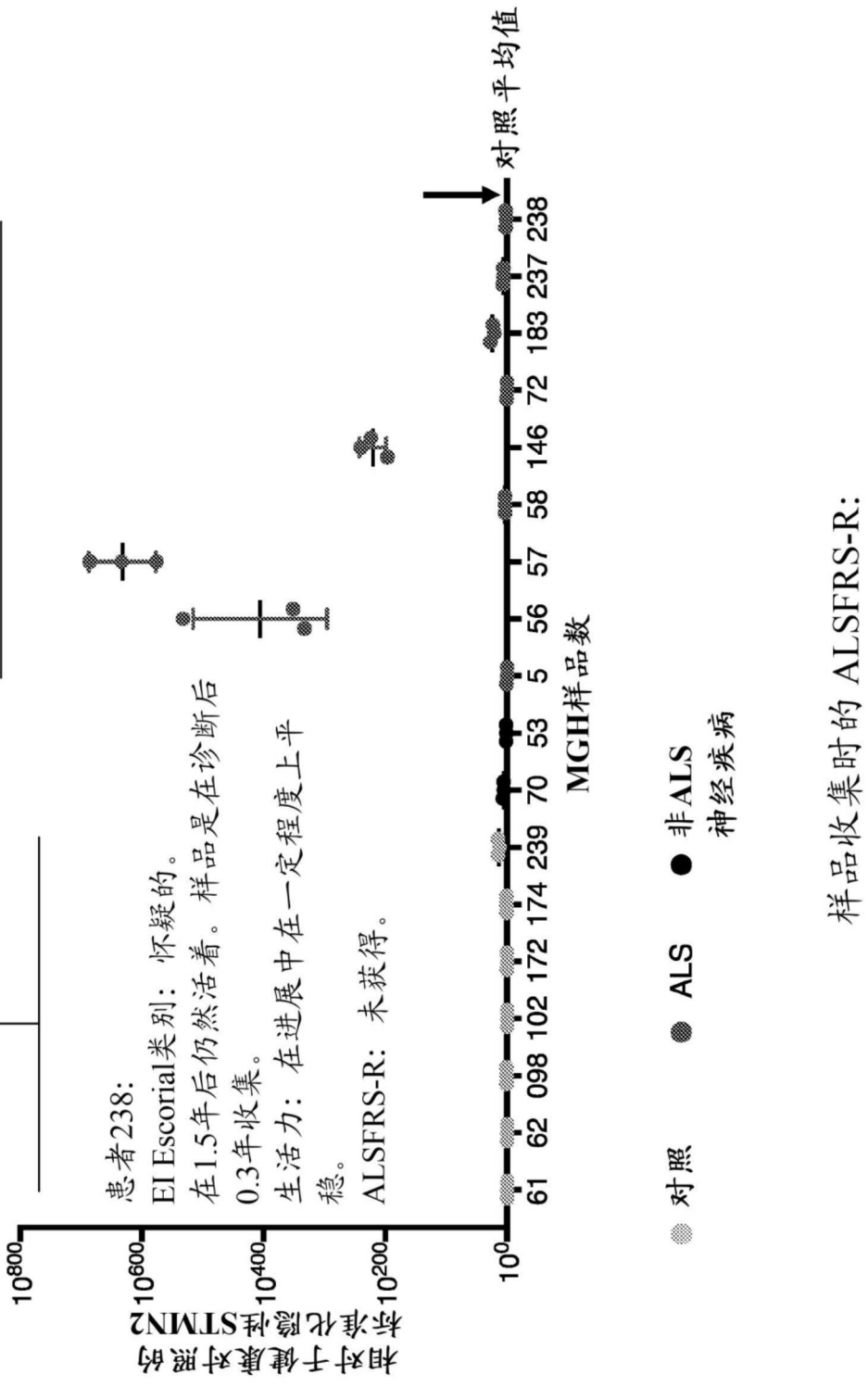

t测试 = 0.0016
患者238:
EI Escorial类别：怀疑的。
在1.5年后仍然活着。样品是在诊断后0.3年收集。
生活力：在进展中在一定程度上平稳。
ALSFRS-R：未获得。
相对于健康对照的标准化感觉STMN2
10^{800}
10^{600}
10^{400}
10^{200}
10^{0}
61 62 098 102 172 174 239 70 53 5 56 57 58 146 72 183 237 238
MGH样品数
对照平均值
对照
ALS
非ALS神经疾病
样品收集时的 ALSFRS-R:

图16M

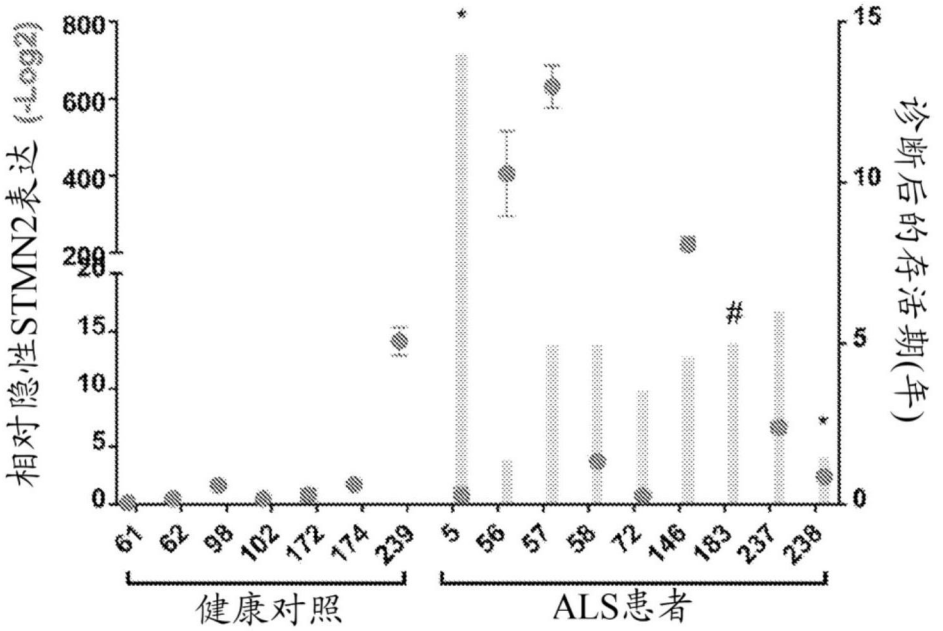


图 16N

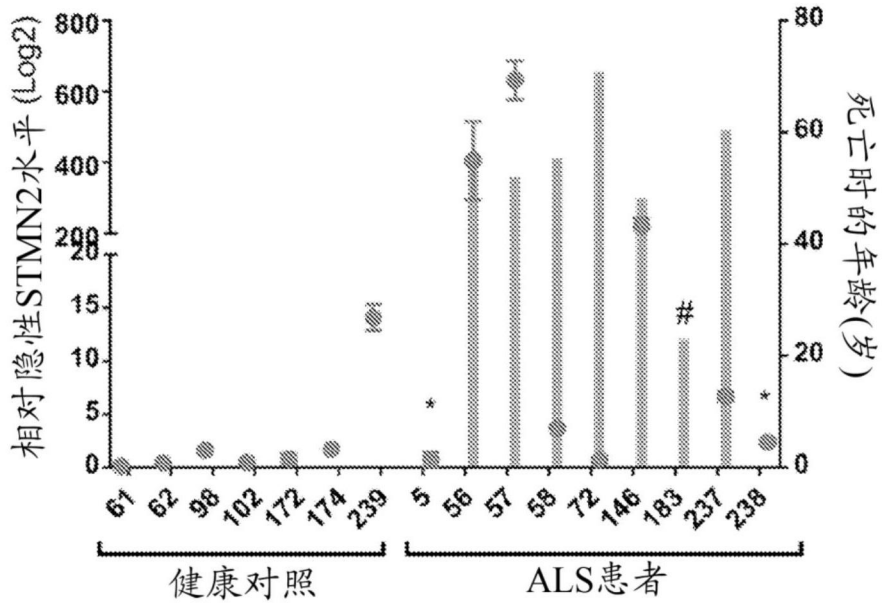


图 16O

*患者是活着的
#数据未获得

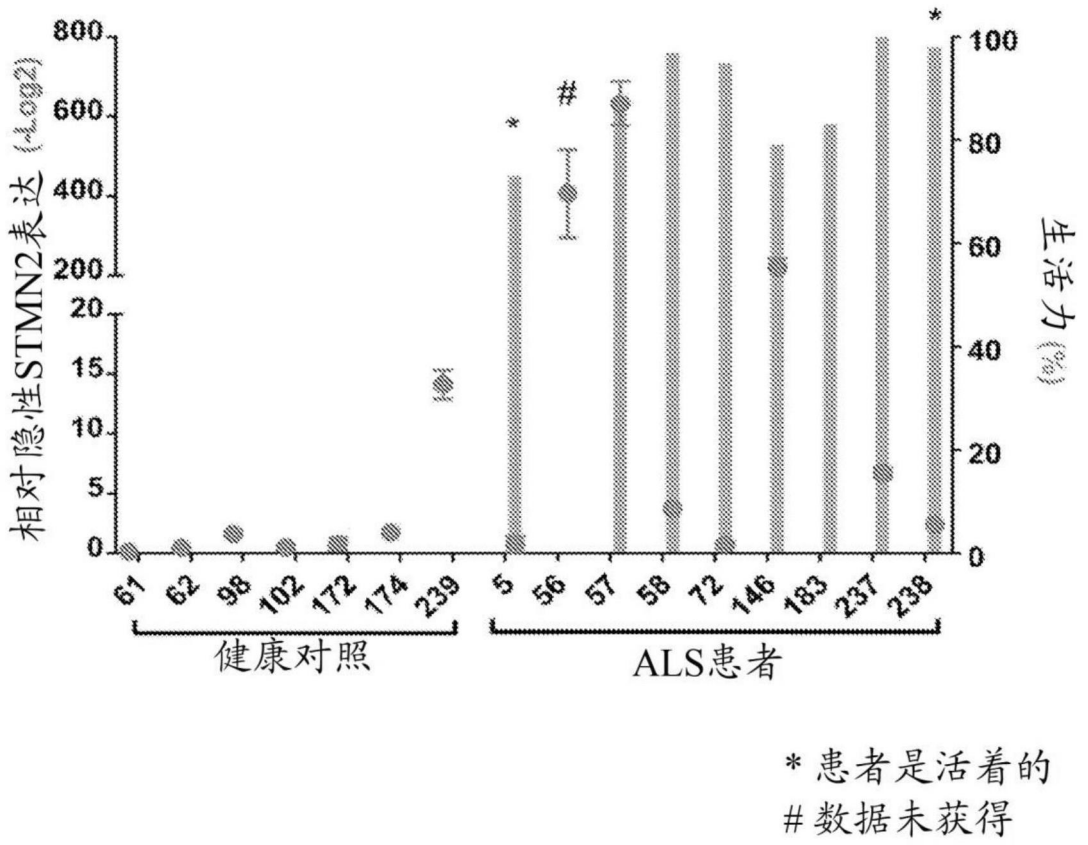
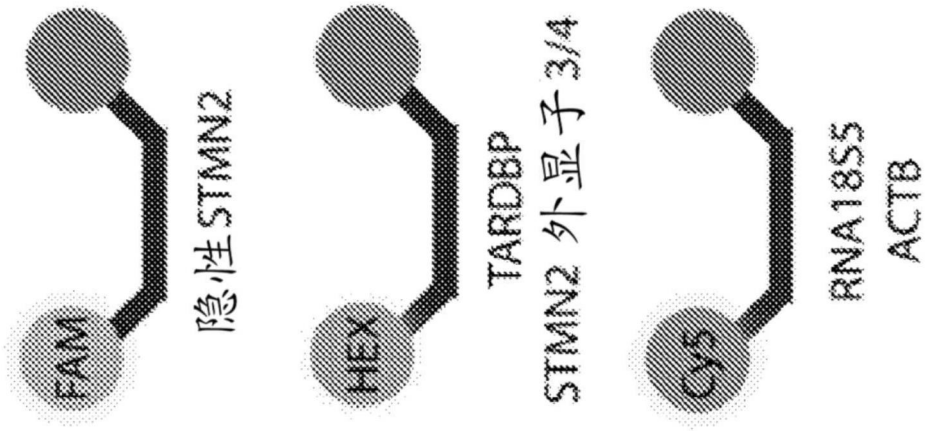

相对隐性STMN2表达 (Log2)
800
600
400
200
20
15
10
5
0
生活力 (%)
100
80
60
40
20
0
61
62
98
102
172
174
239
5
56
57
58
72
146
183
237
238
健康对照
ALS患者
*
#
*患者是活着的
#数据未获得

图16P


FAM
隐性STMN2
HEX
TARDBP
STMN2 外显子3/4
Cy5
RNA18S5
ACTB

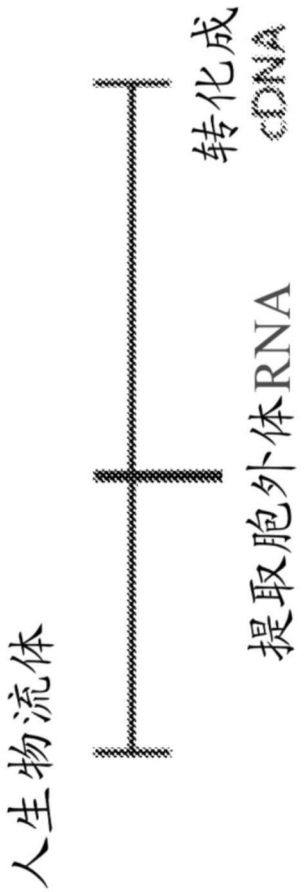

人生物流体
提取胞外体RNA
转化成
cDNA

图17A

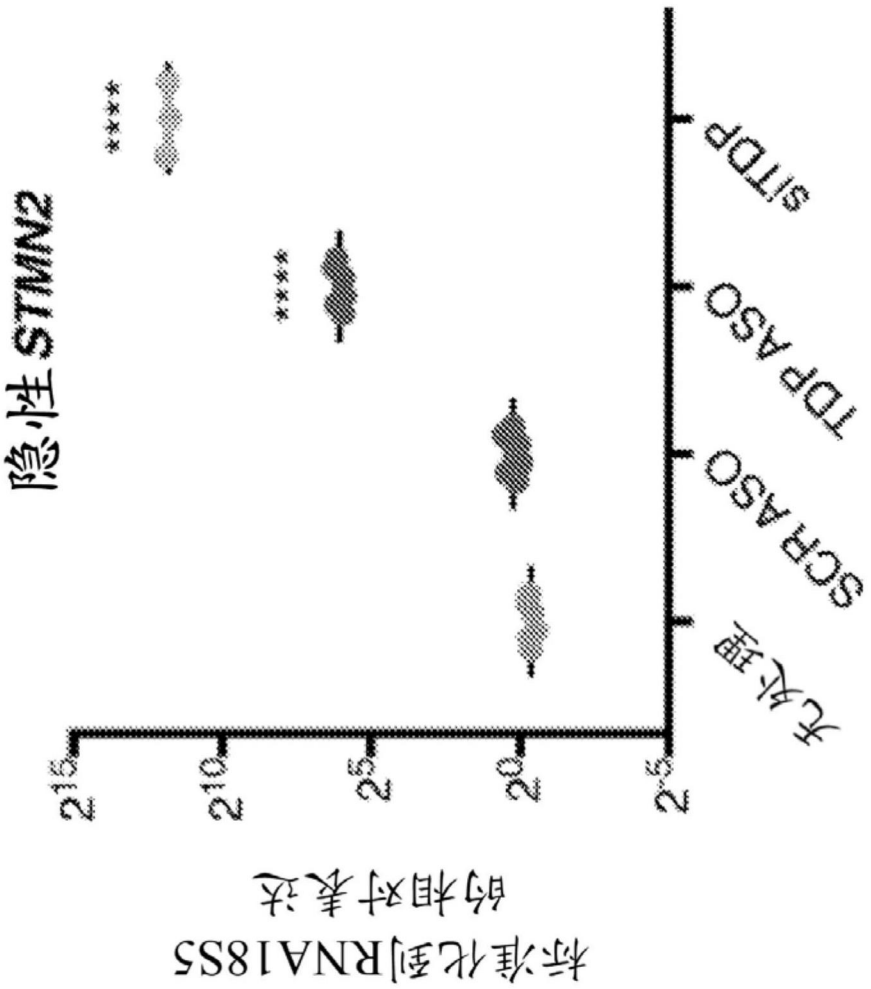

隐性 STMN2
****
****
siTDP
TDP ASO
SCR ASO
无处理
25
20
25
210
215
标准化到RNA18S5
的相对表达

图17B

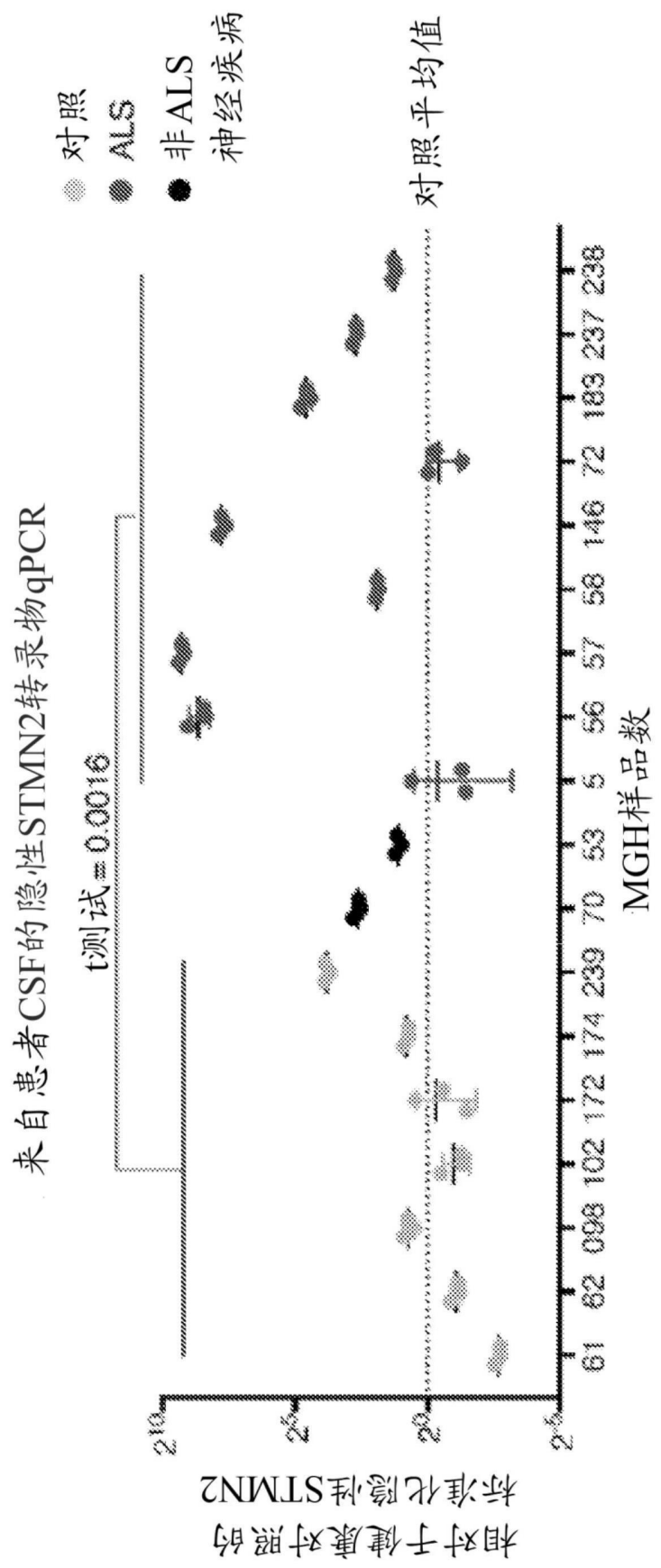

来自患者CSF的隐性STMN2转录物qPCR
t测试=0.0016
对照
ALS
非ALS
神经疾病
对照平均值
相对于健康对照的
标准化隐性STMN2
MGH样品数
61 82 008 102 172 174 239 70 53 5 56 57 58 146 72 183 237 238

图17C

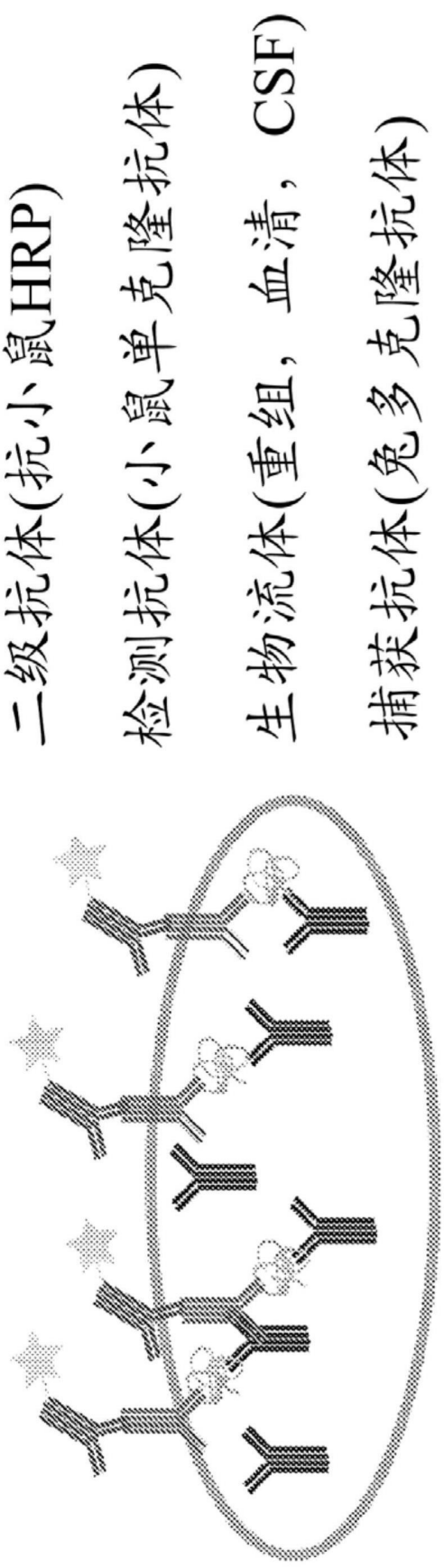


图18A

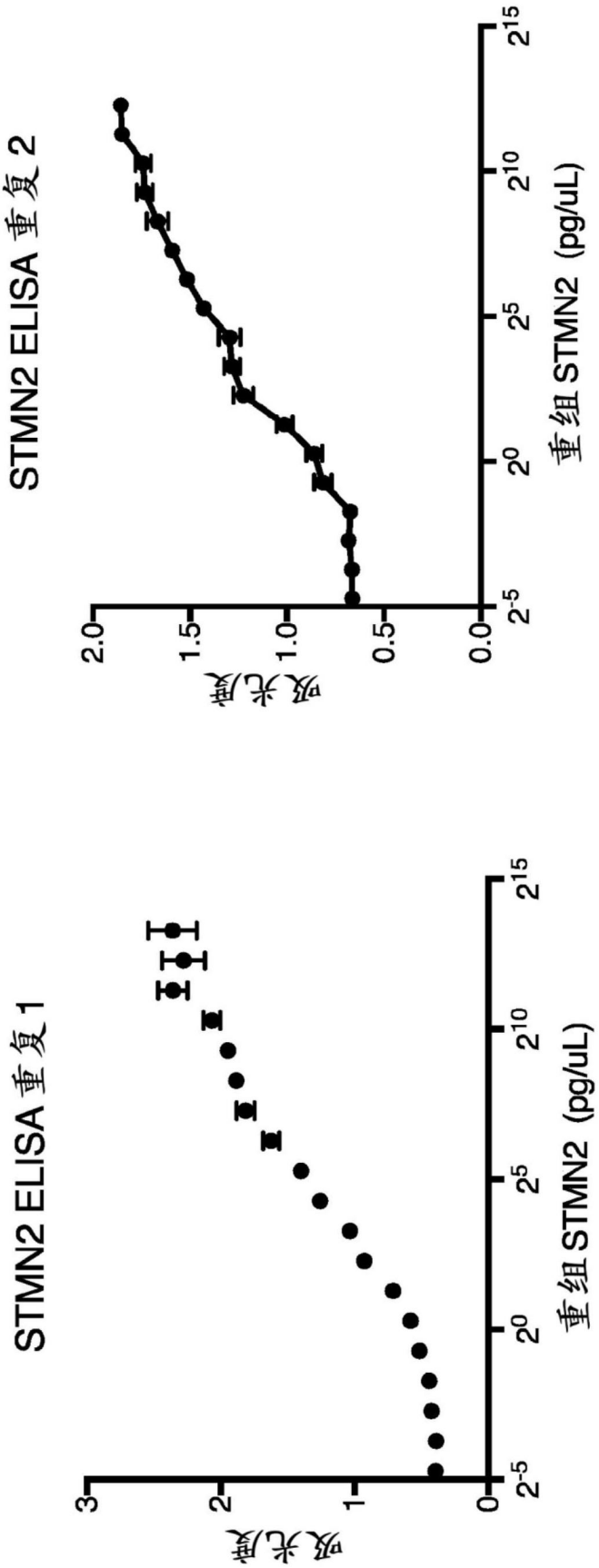

STMN2 ELISA 重复 2
吸光度
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
2^{-5}
2^{0}
2^{5}
2^{10}
2^{15}
重组 STMN2 (pg/uL)
STMN2 ELISA 重复 1
吸光度
3
2
1
0
2^{-5}
2^{0}
2^{5}
2^{10}
2^{15}
重组 STMN2 (pg/uL)

图18B

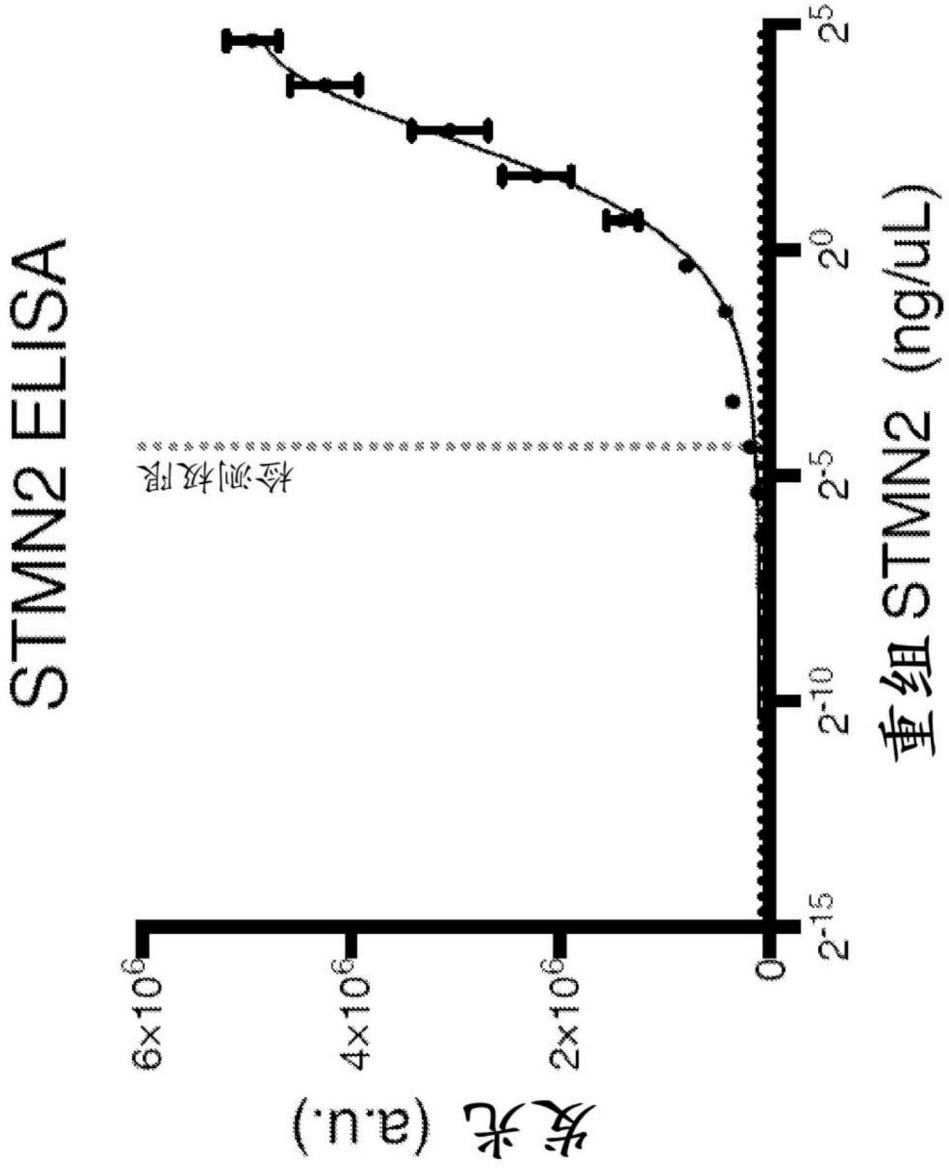

STMN2 ELISA
检测极限
发光 (a.u.)
6×10^6
4×10^6
2×10^6
0
2^-15
2^-10
2^-5
2^0
2^5
重组 STMN2 (ng/uL)

图18C

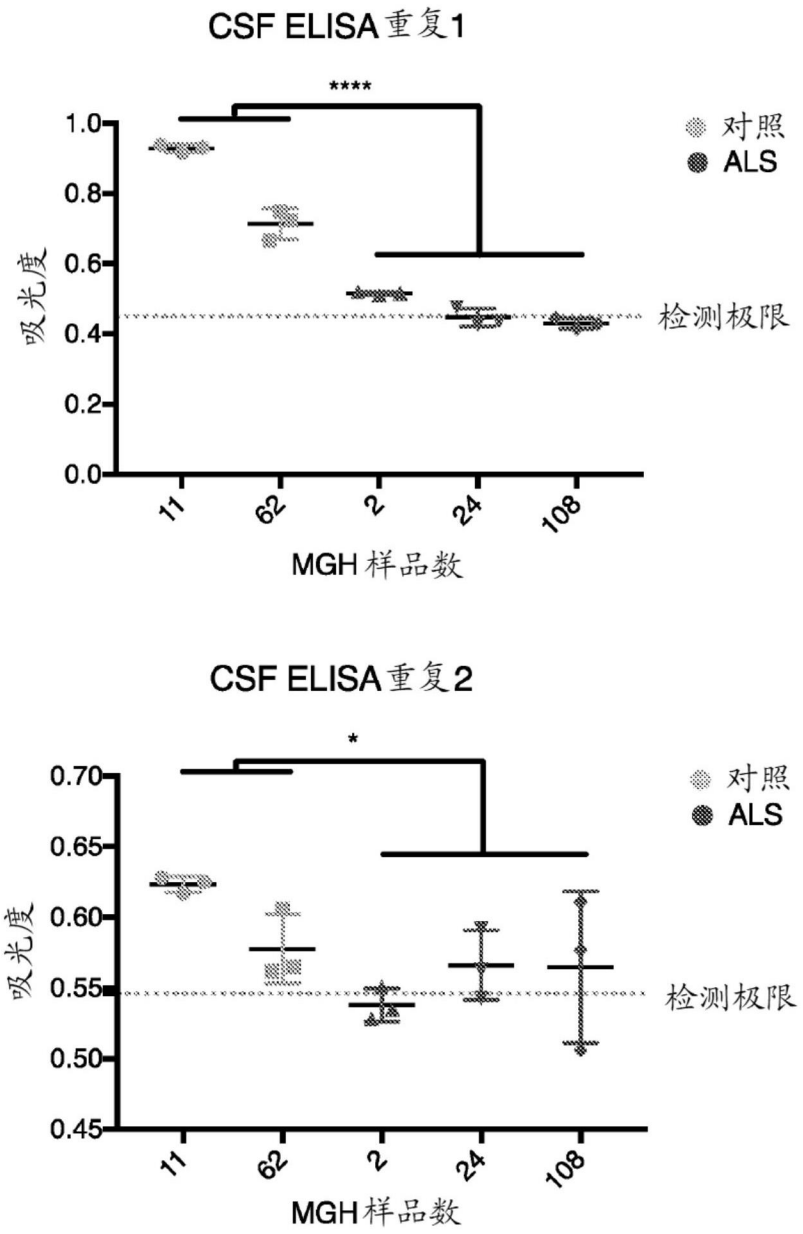
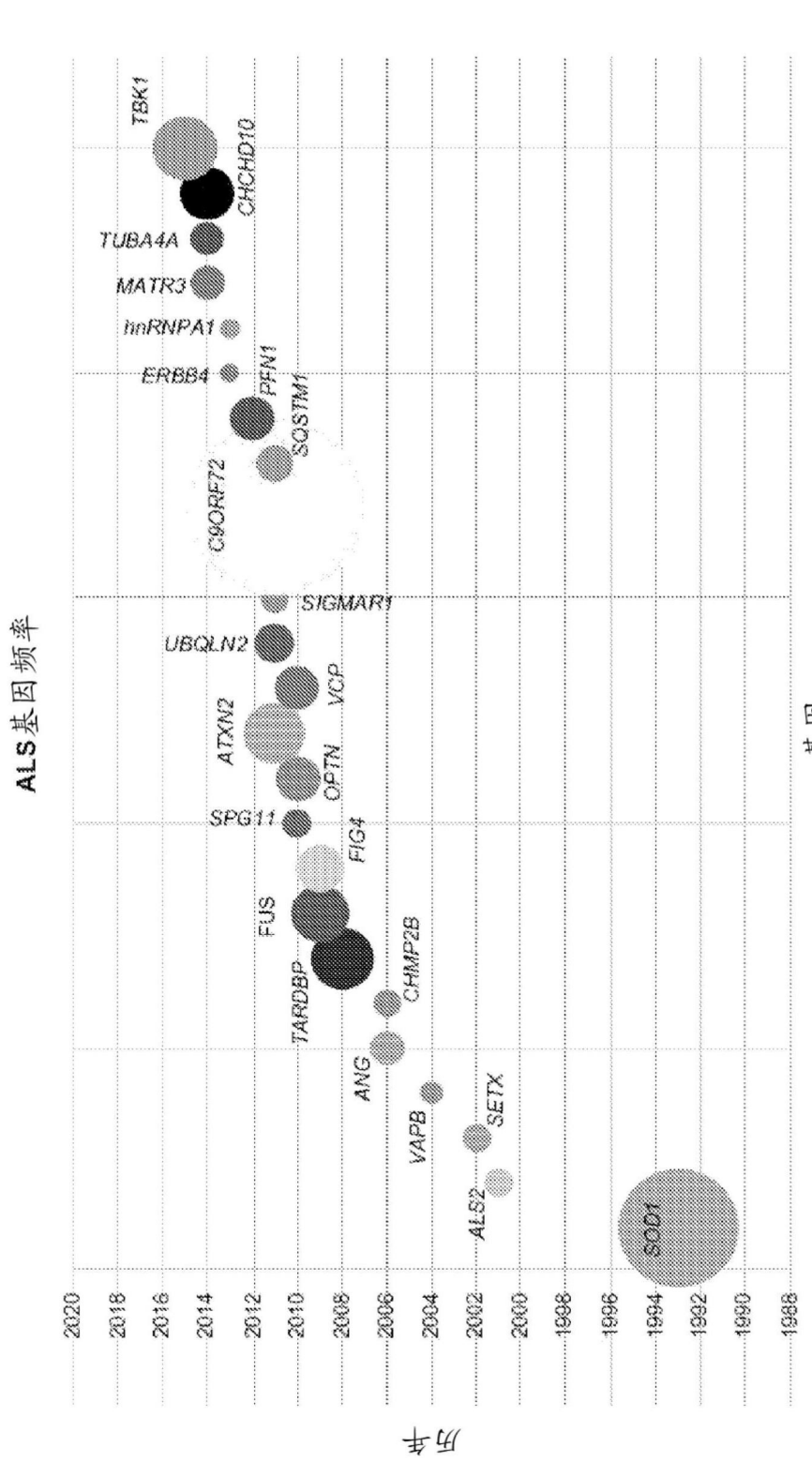
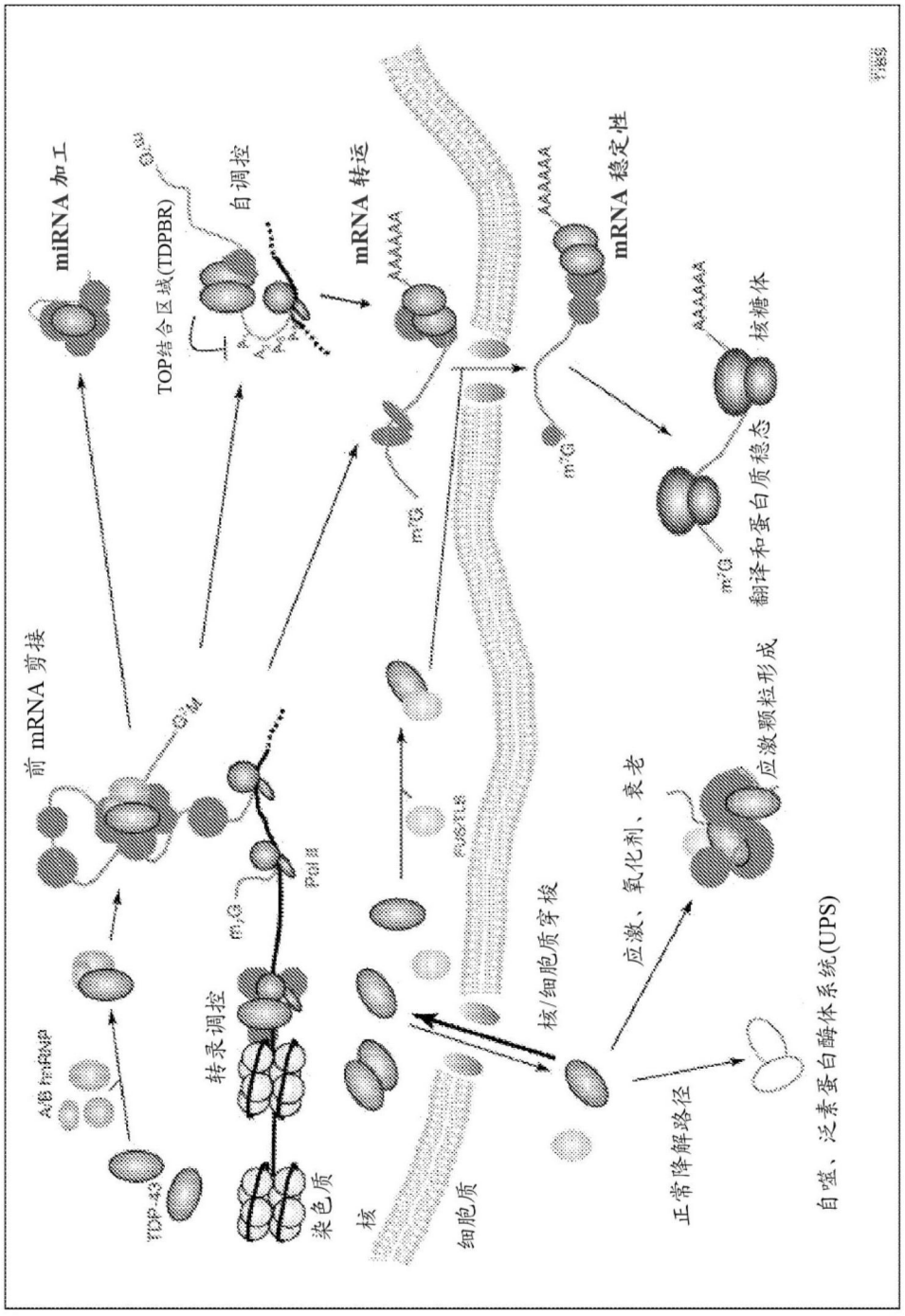

CSF ELISA重复1
****
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
吸光度
对照
ALS
检测极限
11
62
2
24
108
MGH样品数
CSF ELISA重复2
*
0.70
0.65
0.60
0.55
0.50
0.45
吸光度
对照
ALS
检测极限
11
62
2
24
108
MGH样品数

图18D



Alsultan等人, *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease*. **2016**, *6*, 49-64.

图19



Buratti和Baralle *Trends in Biochem. Sci.*. **2012**, *6*, 237-247.

图20

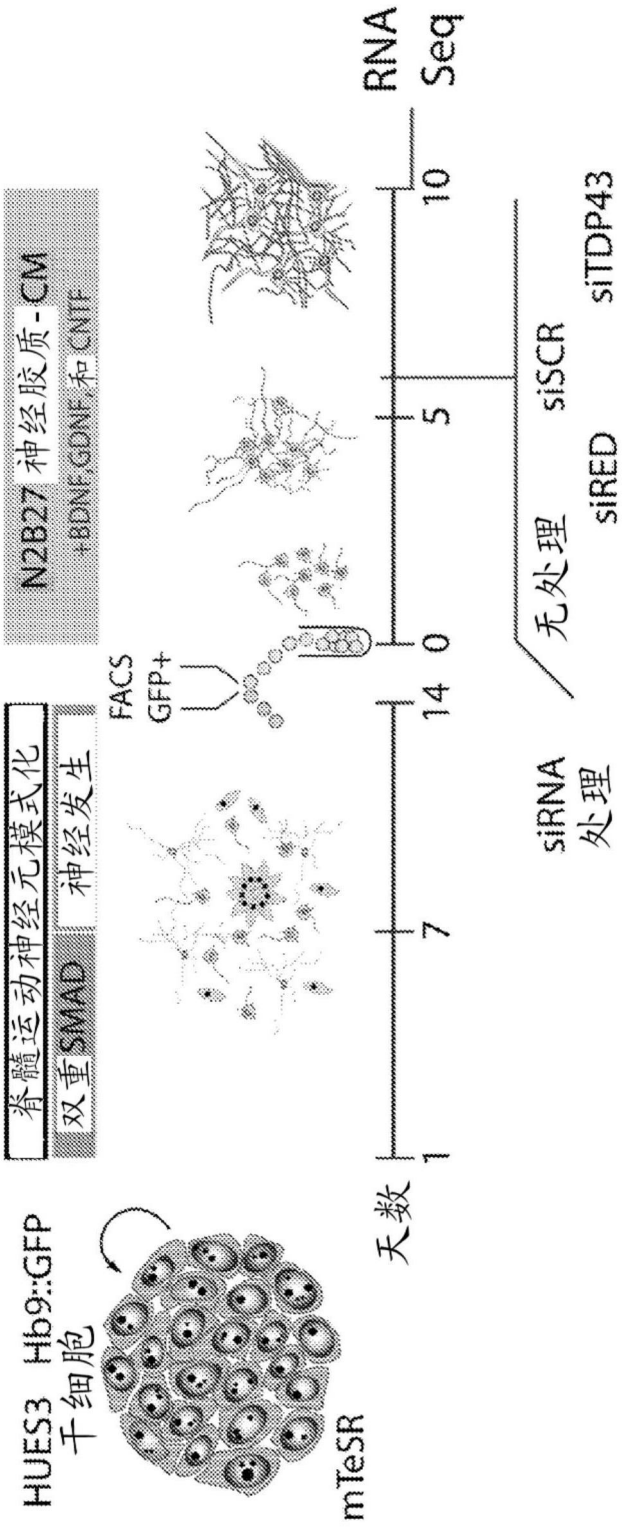
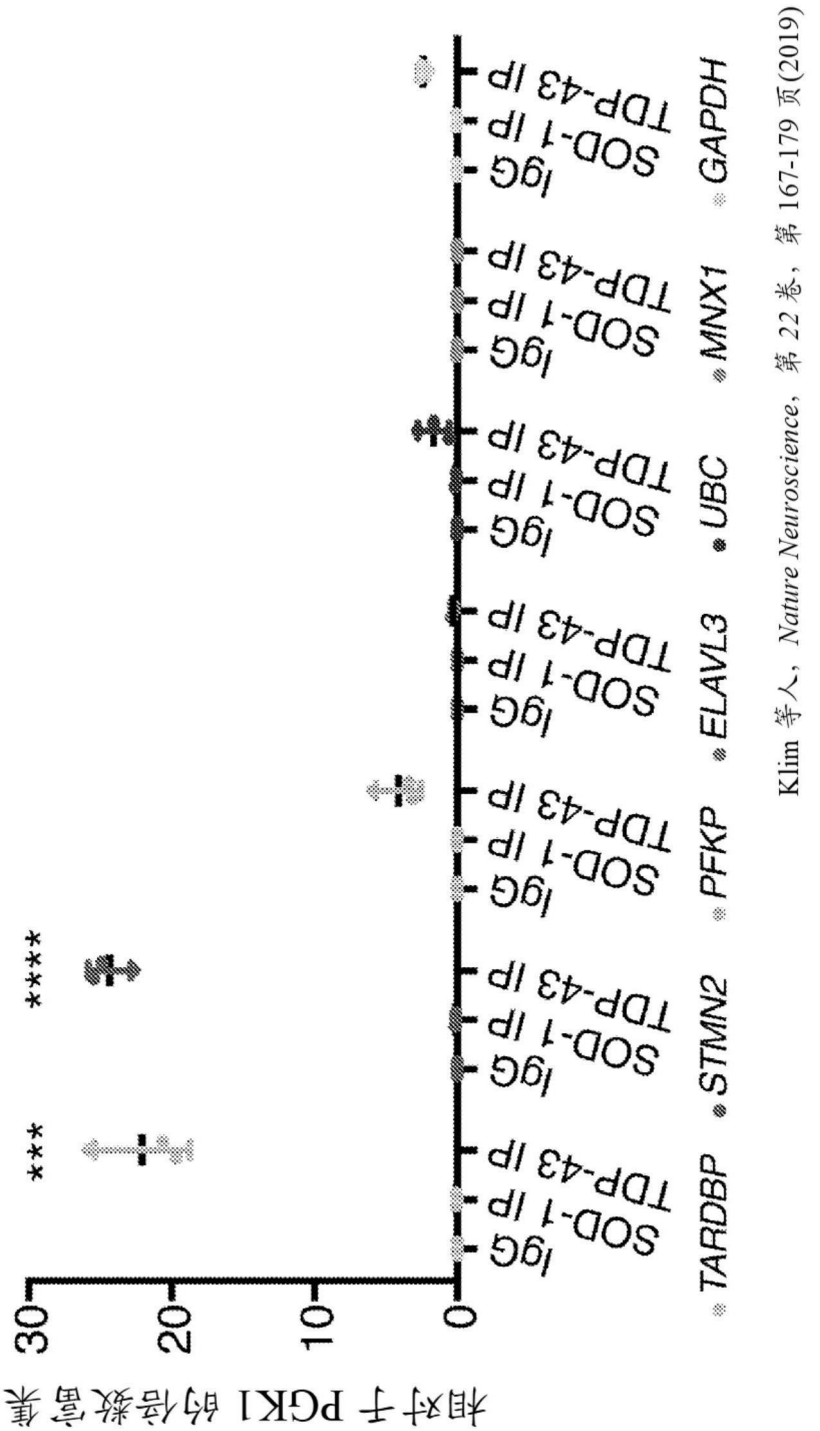

HUES3 Hb9::GFP
干细胞
mTeSR
定向分化
脊髓运动神经元模式化
双重SMAD
神经发生
运动神经元生长
N2B27 神经胶质-CM
+BDNF,GDNF,和 CNTF
FACS
GFP+
天数
1
7
14
0
5
10
siRNA
处理
无处理
siRED
siSCR
siTDP43
RNA
Seq

图21



Klim 等人，*Nature Neuroscience*，第 22 卷，第 167-179 页(2019)

图22

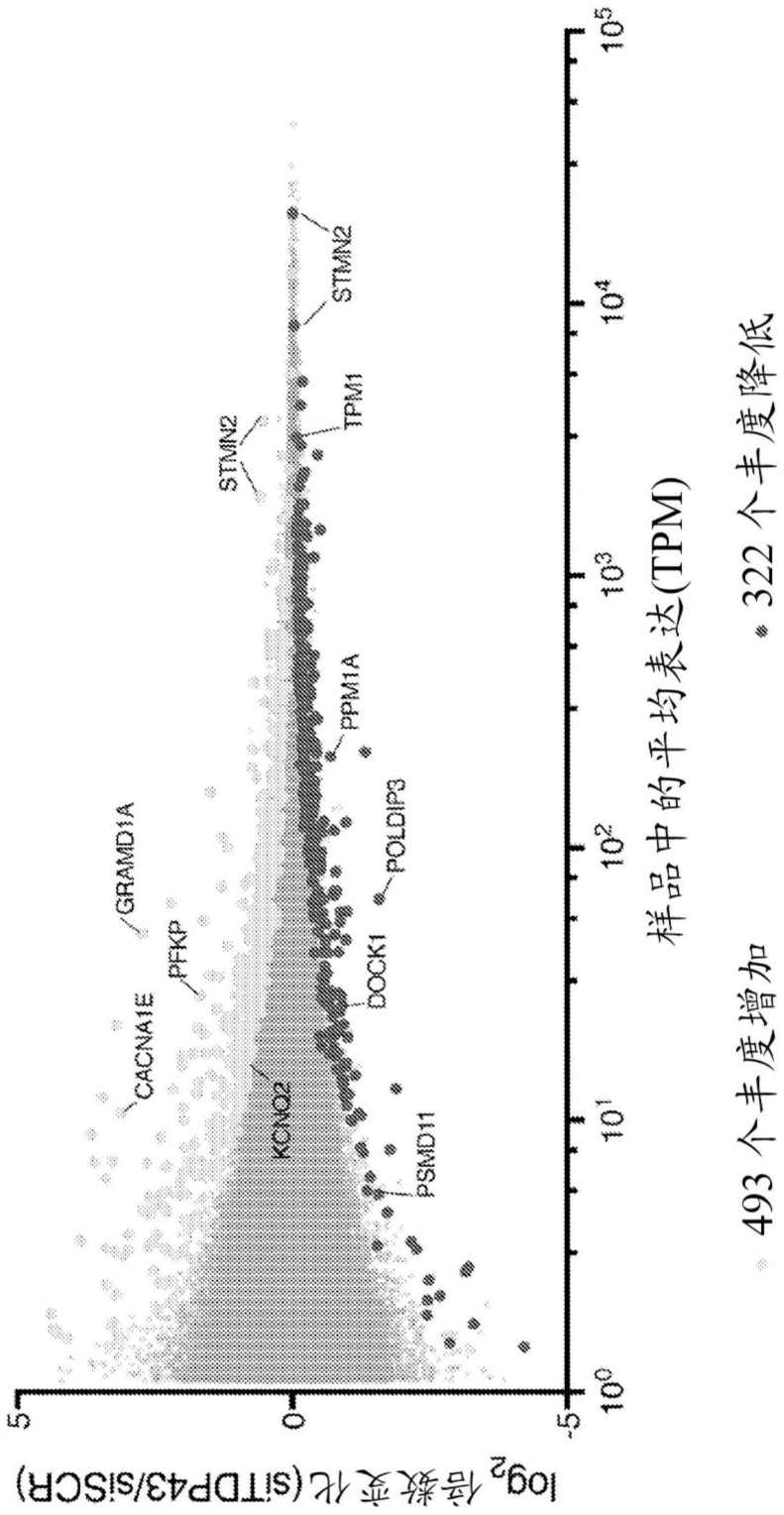

log2 倍数变化(siTDP43/siSCR)
5
0
-5
样品中的平均表达(TPM)
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
493 个丰度增加
322 个丰度降低
GRAMD1A
PFKP
CACNA1E
KCNQ2
PSMD11
DOCK1
POLDIP3
PPM1A
STMN2
TPM1
STMN2

图23

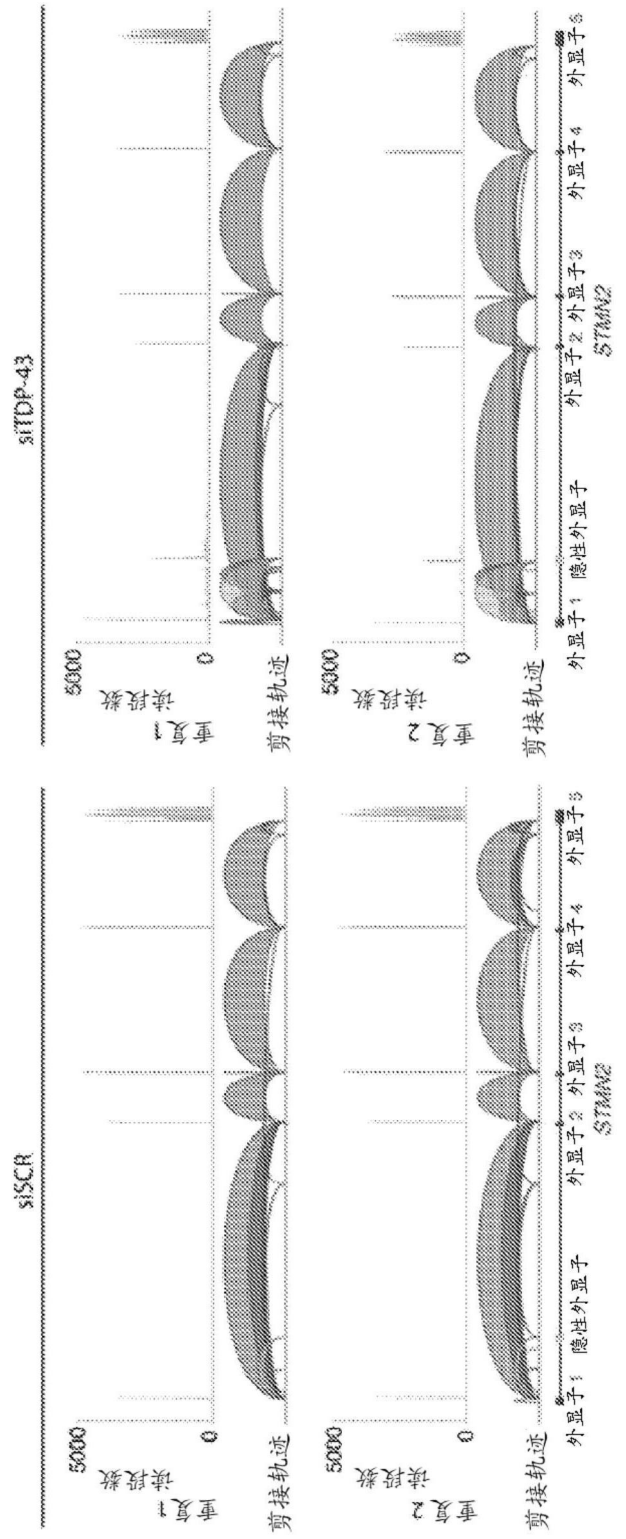

siTDP-43
siSCR
重复1
重复2
读段数
5000
0
剪接轨迹
隐性外显子
外显子1
外显子2
外显子3
外显子4
外显子5
STMN2

图24

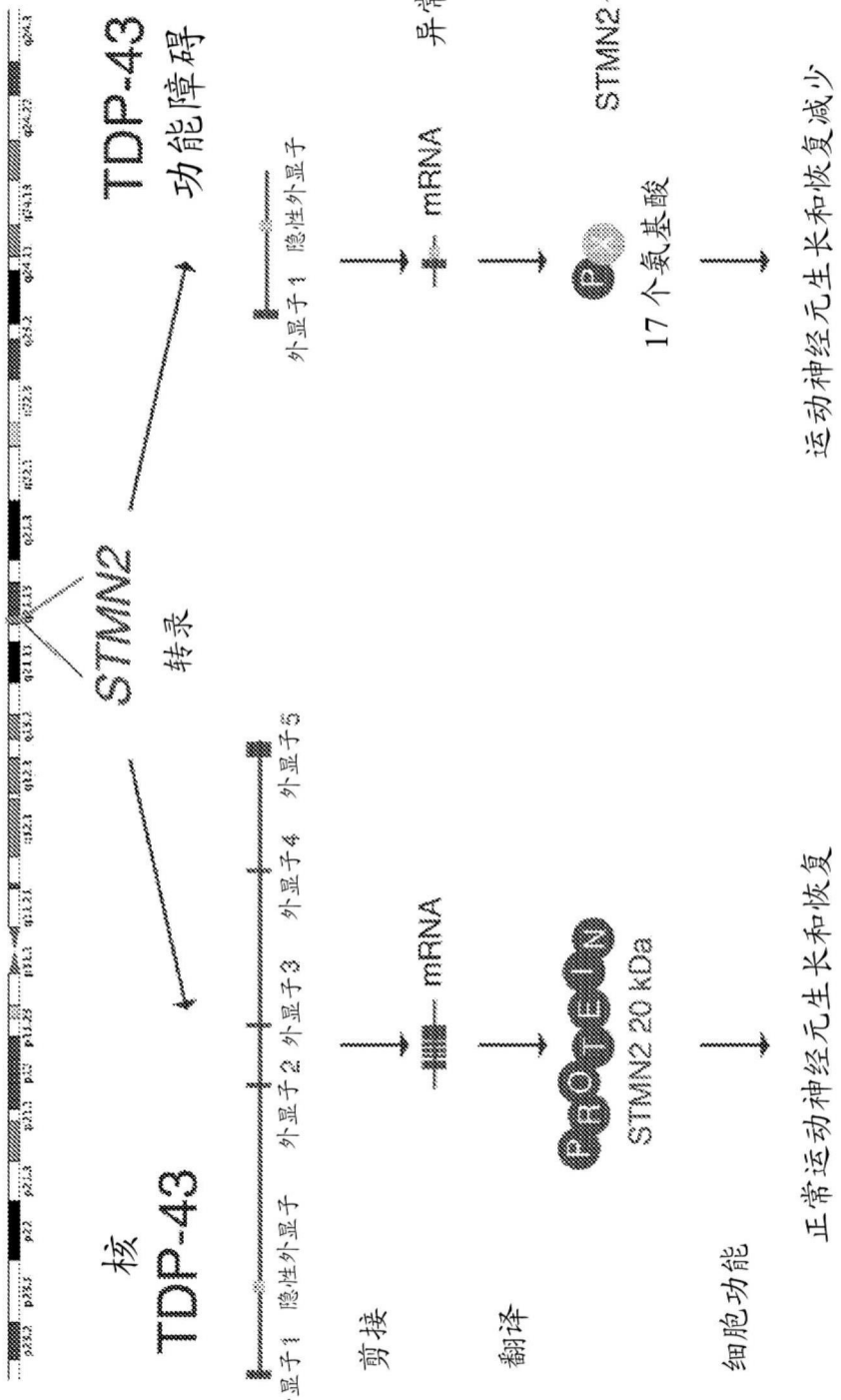

核
TDP-43
STMN2
转录
TDP-43
功能障碍
外显子1 隐性外显子
外显子2 外显子3 外显子4 外显子5
剪接
mRNA
翻译
PROTEIN
STMN2 20 kDa
细胞功能
正常运动神经元生长和恢复
外显子1 隐性外显子
mRNA
异常转录物
P
STMN2蛋白减少
17个氨基酸
运动神经元生长和恢复减少

图25

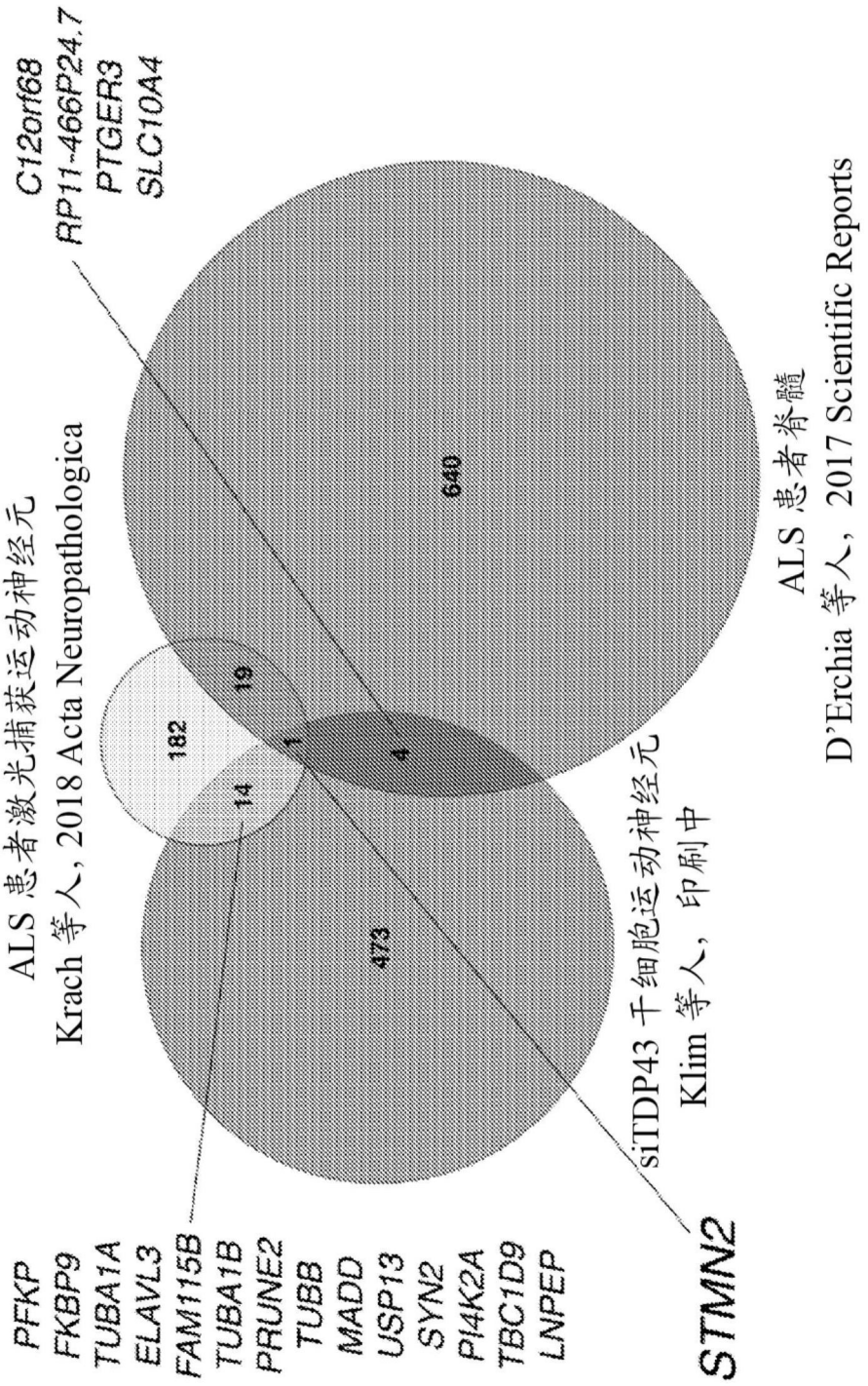

ALS 患者激光捕获运动神经元
Krach 等人，2018 Acta Neuropathologica
182
19
1
14
4
640
473
C12orf68
RP11-466P24.7
PTGER3
SLC10A4
PFKP
FKBP9
TUBA1A
ELAVL3
FAM115B
TUBA1B
PRUNE2
TUBB
MADD
USP13
SYN2
PI4K2A
TBC1D9
LNPEP
STMN2
siTDP43 干细胞运动神经元
Klim 等人，印刷中
ALS 患者脊髓
D'Erchia 等人，2017 Scientific Reports

图26

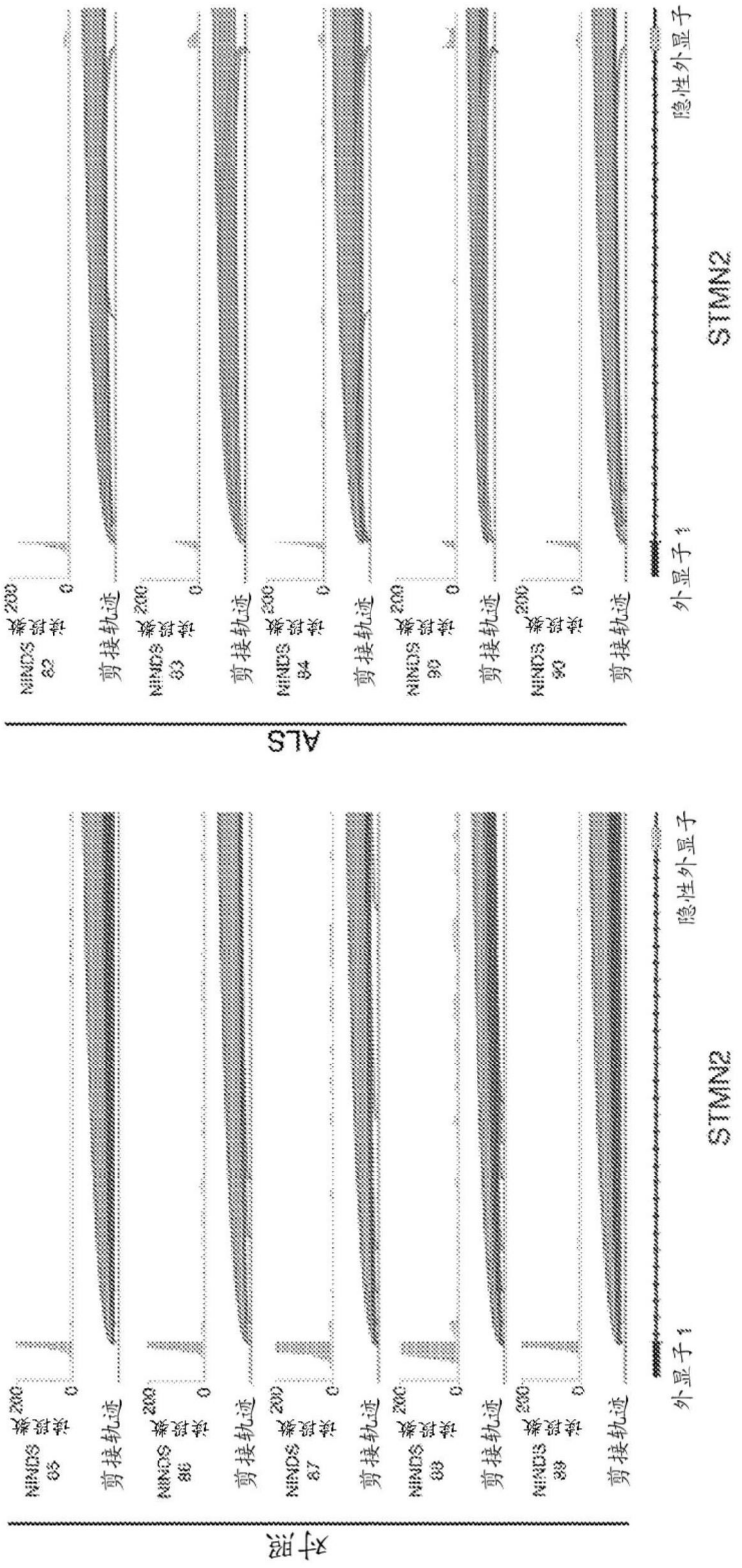

ALS
对照
NMDS 82
NMDS 83
NMDS 84
NMDS 90
NMDS 85
NMDS 86
NMDS 87
NMDS 88
NMDS 89
读段数
200
0
剪接轨迹
外显子1
隐性外显子
STMN2

图27

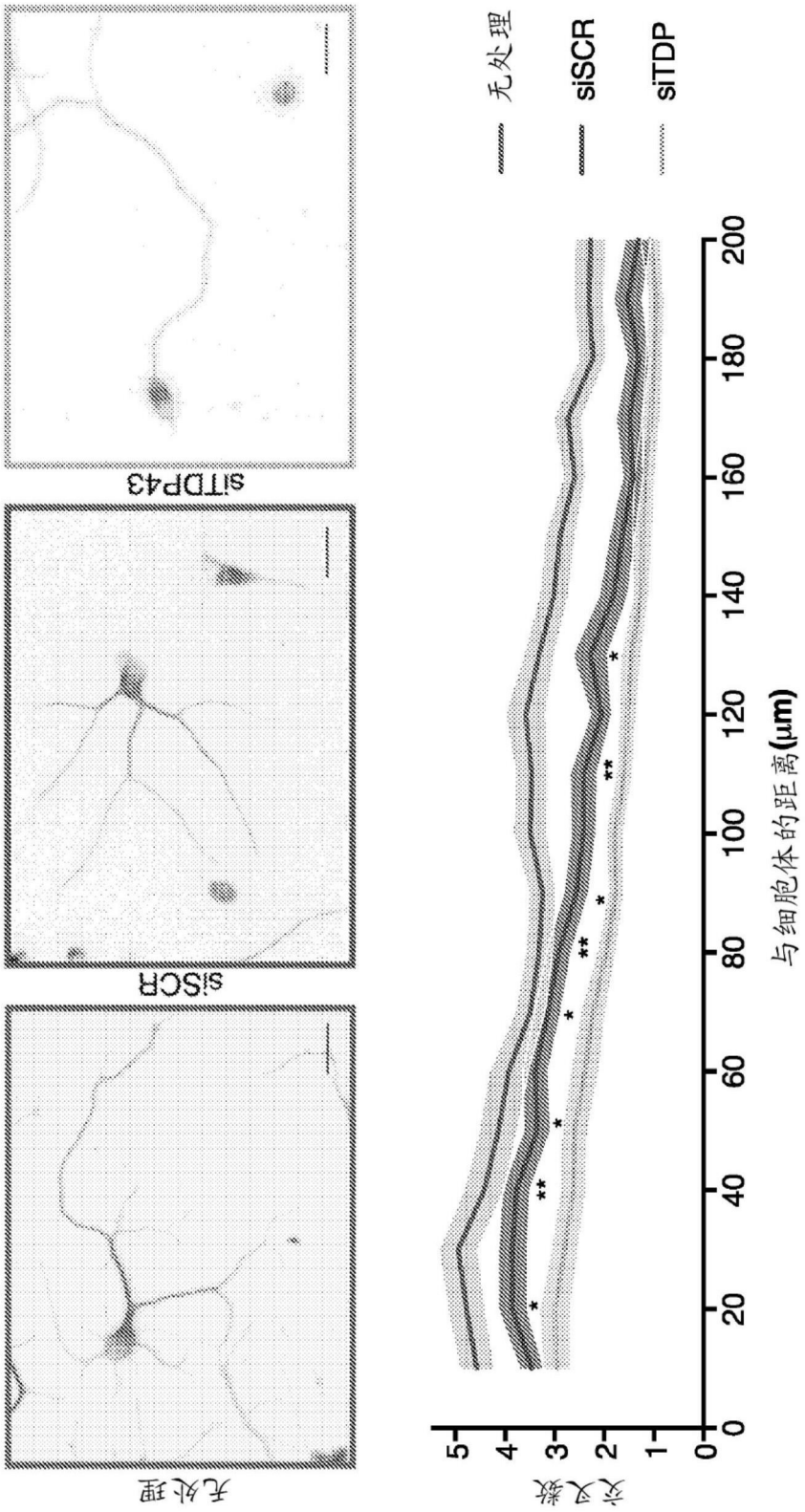

无处理
siSCR
siTDP43
交叉数
与细胞体的距离(μm)
无处理
siSCR
siTDP
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
1
2
3
4
5
*
**

图28

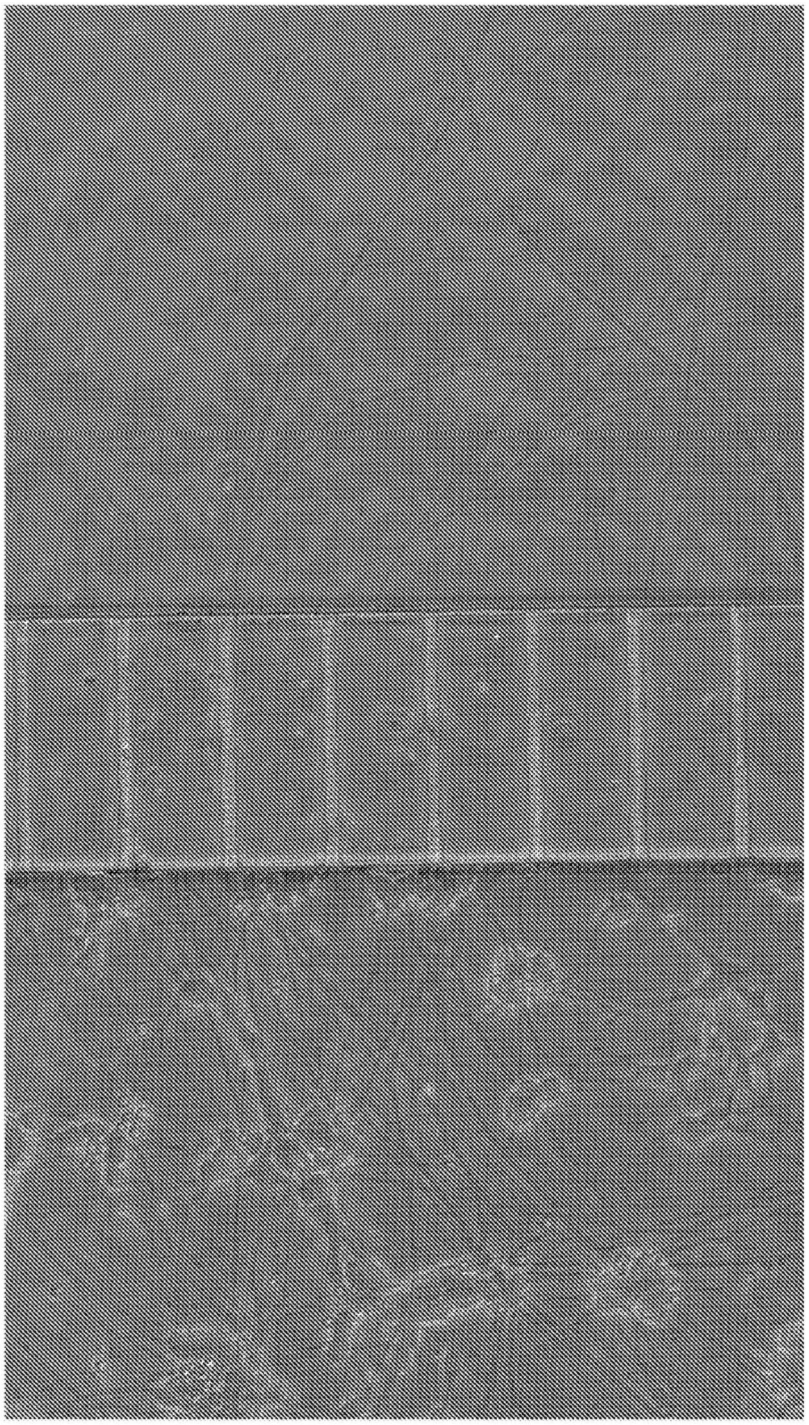


图29

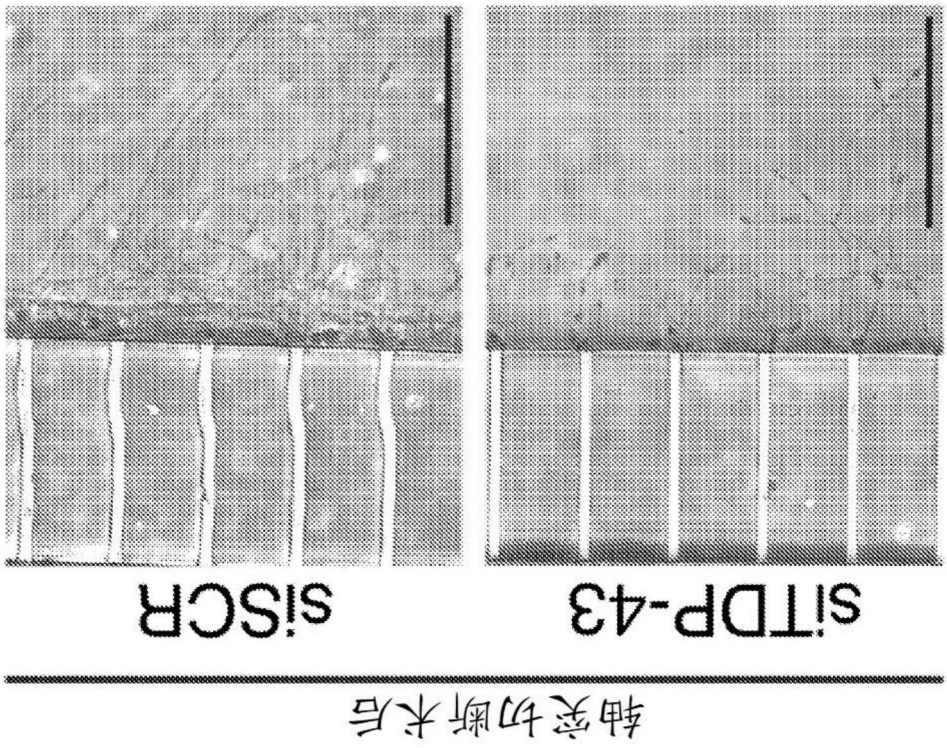

轴突切断术后
siTDP-43
siSCR

图30A

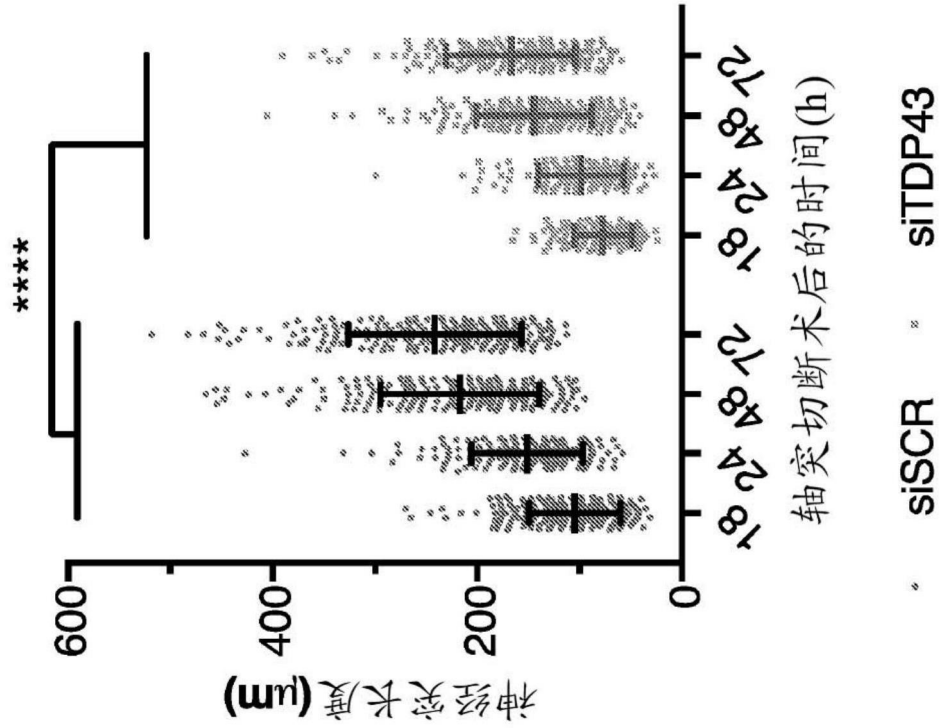
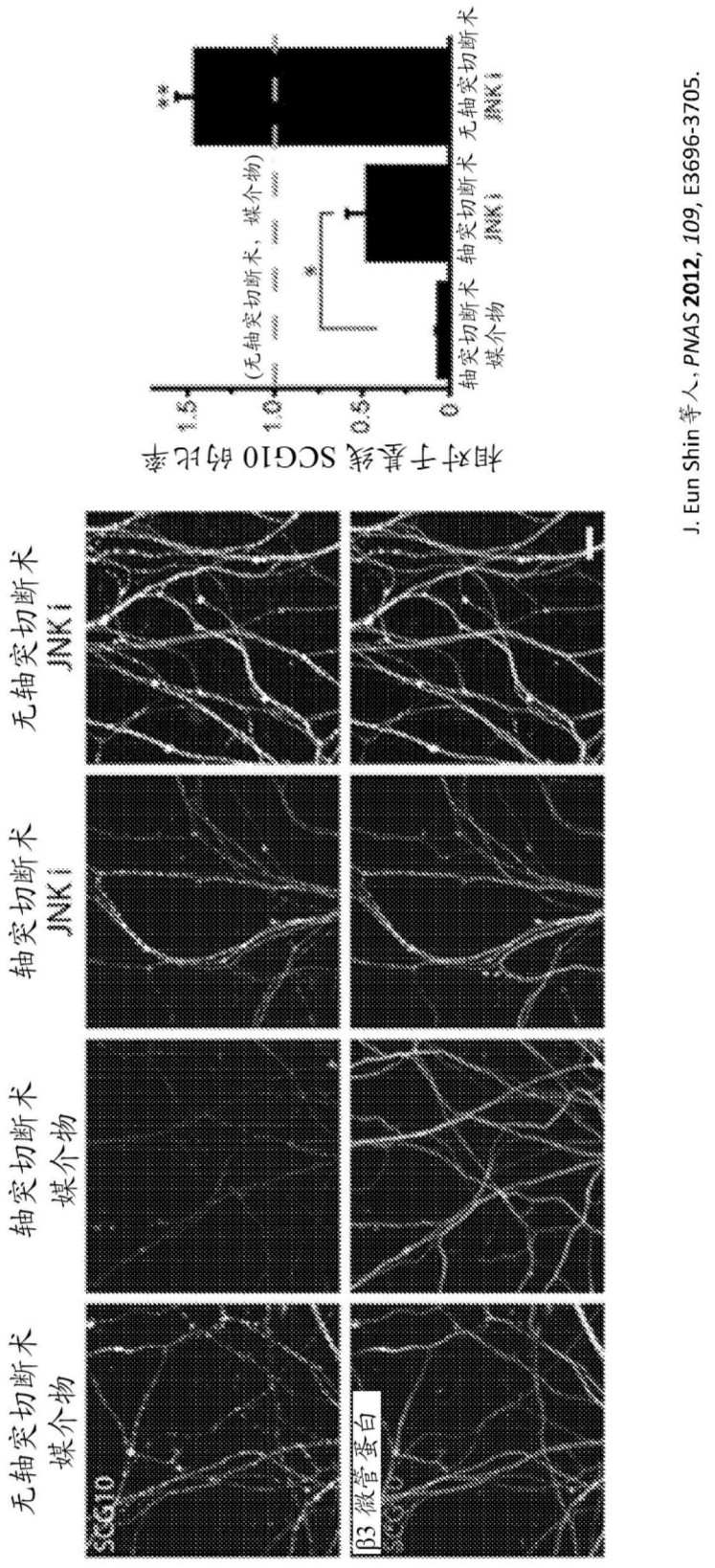

神经突长度(μm)
600
400
200
0
****
轴突切断术后的时间(h)
1
2
4
8
24
48
72
siSCR
siTDP43

图30B



J. Eun Shin 等人，*PNAS* **2012**, *109*, E3696-3705.

图31

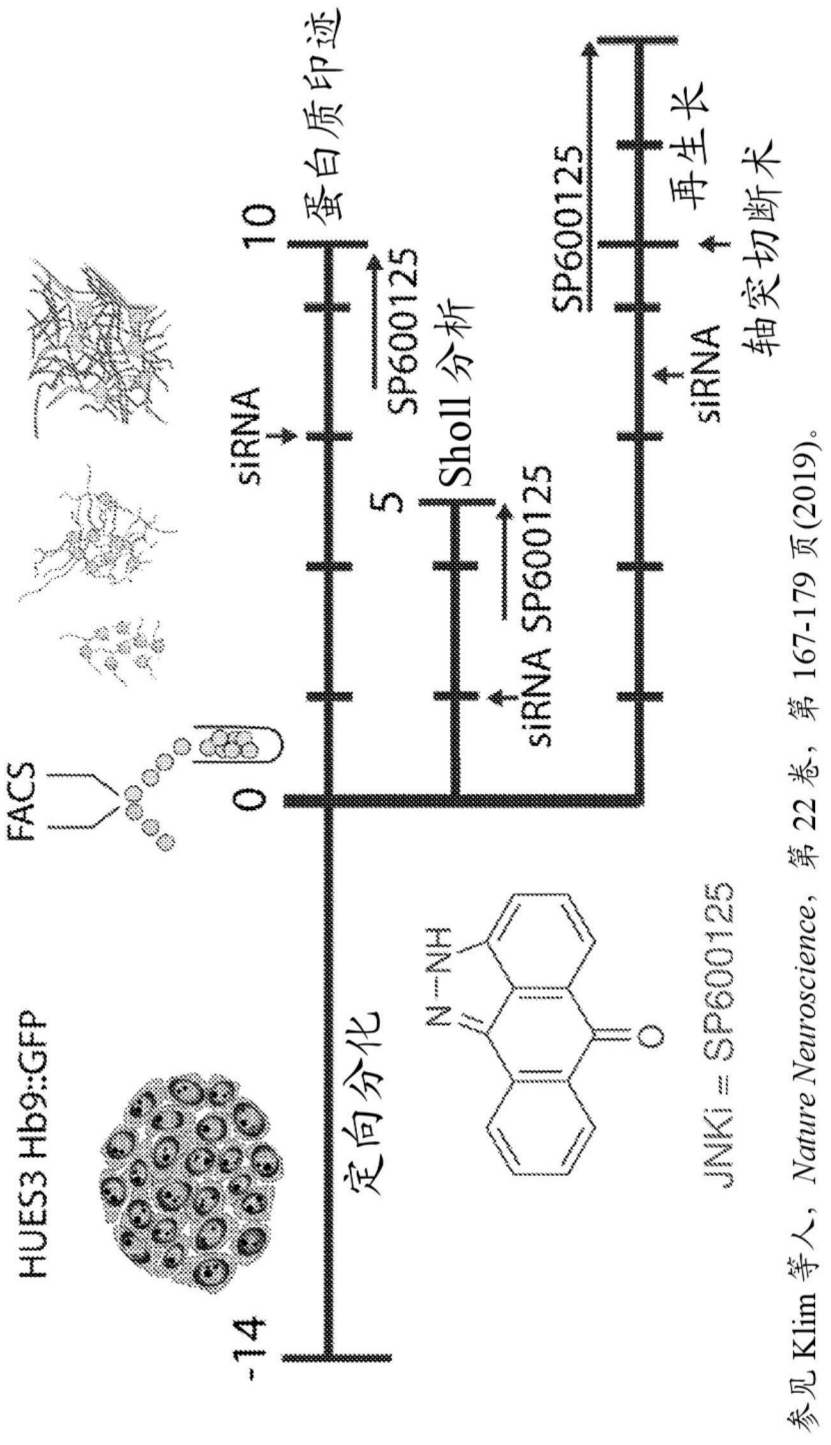

HUES3 Hb9::GFP
FACS
-14
定向分化
0
siRNA
10
蛋白质印迹
5
SP600125
Sholl 分析
siRNA SP600125
SP600125
siRNA
再生长
轴突切断术
N-NH
O
JNKi = SP600125
参见 Klim 等人，*Nature Neuroscience*，第 22 卷，第 167-179 页(2019)。

图32

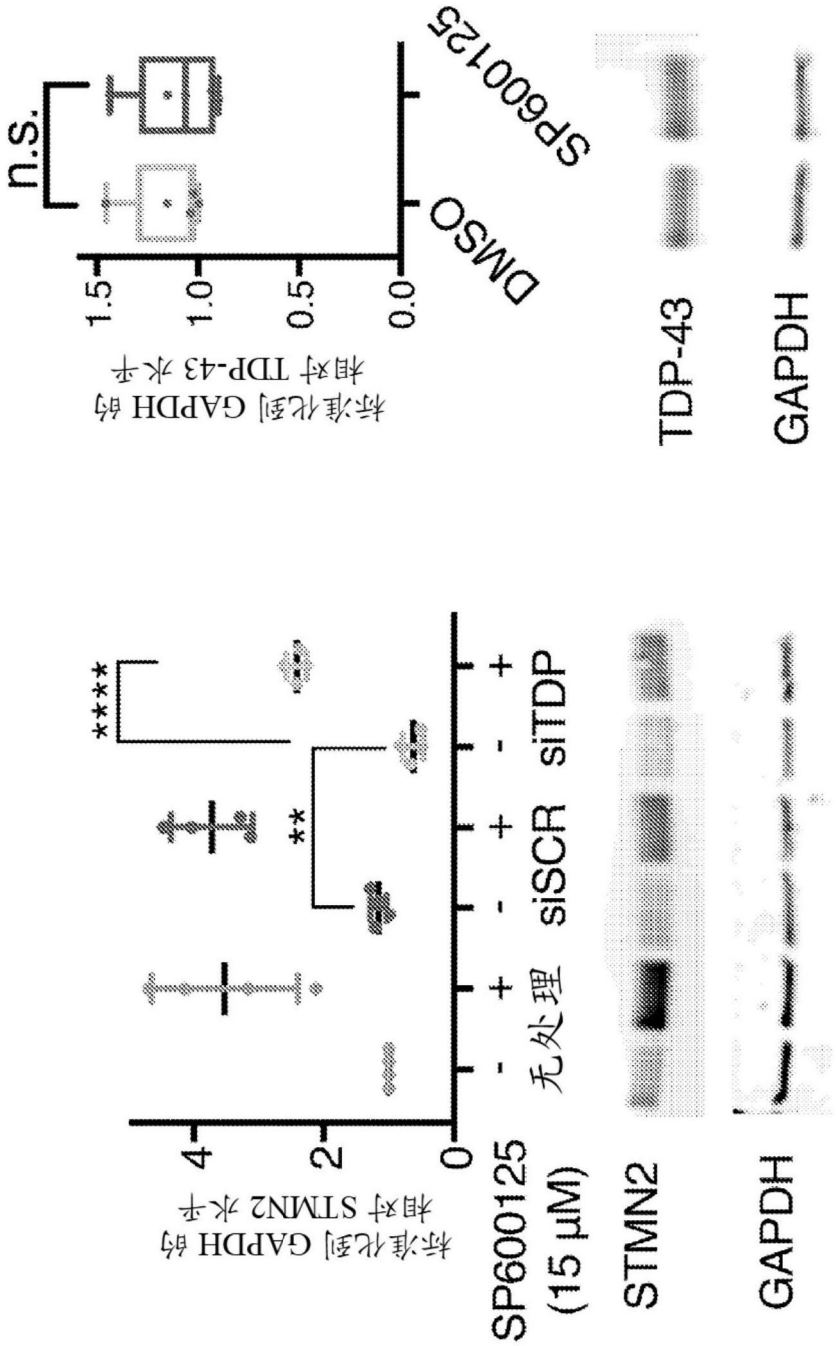

标准化到 GAPDH 的
相对 TDP-43 水平
1.5
1.0
0.5
0.0
n.s.
DMSO
SP600125
TDP-43
GAPDH
标准化到 GAPDH 的
相对 STMN2 水平
4
2
0
****
**
SP600125
(15 μM)
无处理
siSCR
siTDP
STMN2
GAPDH

图33

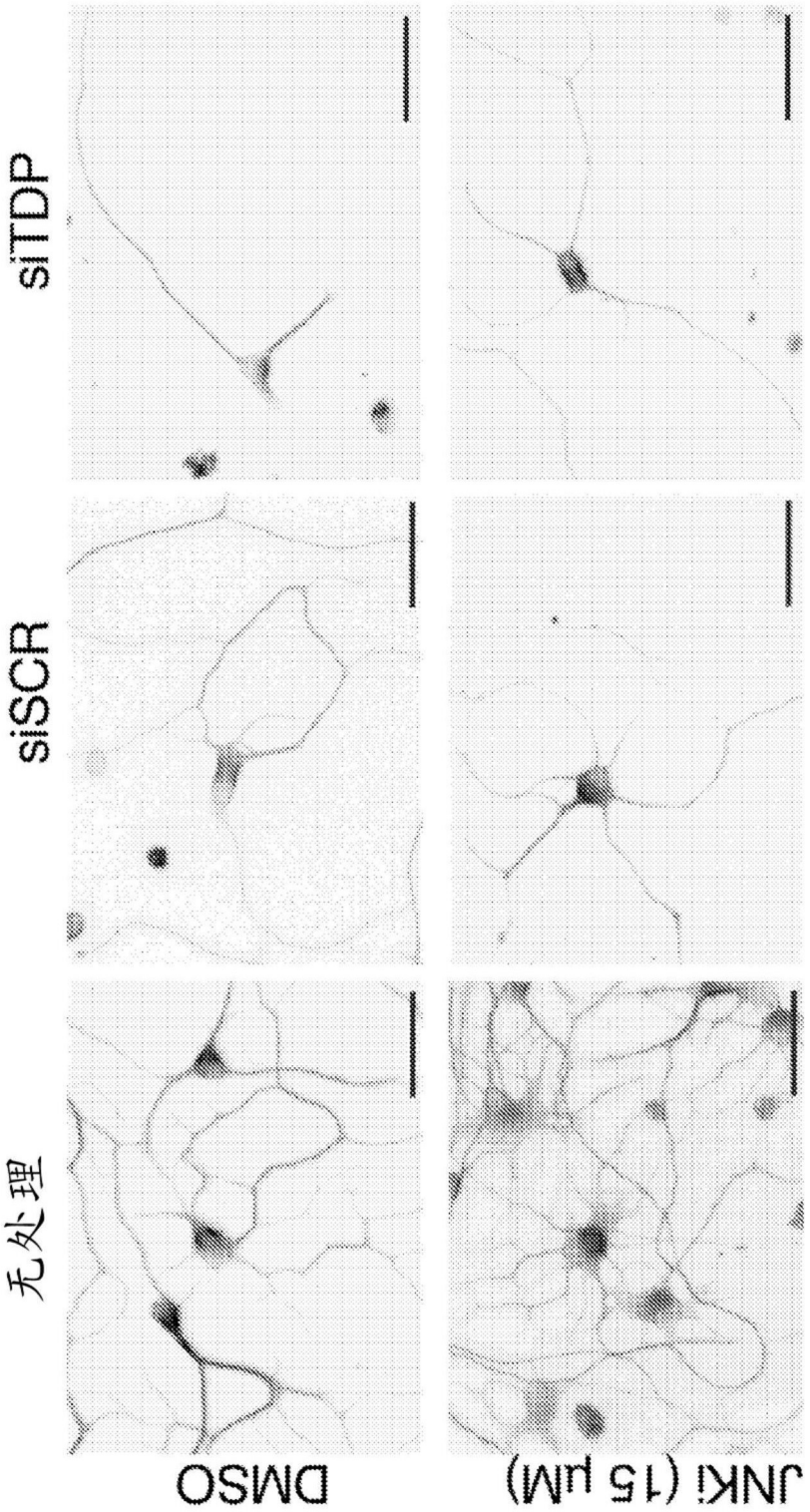


图34

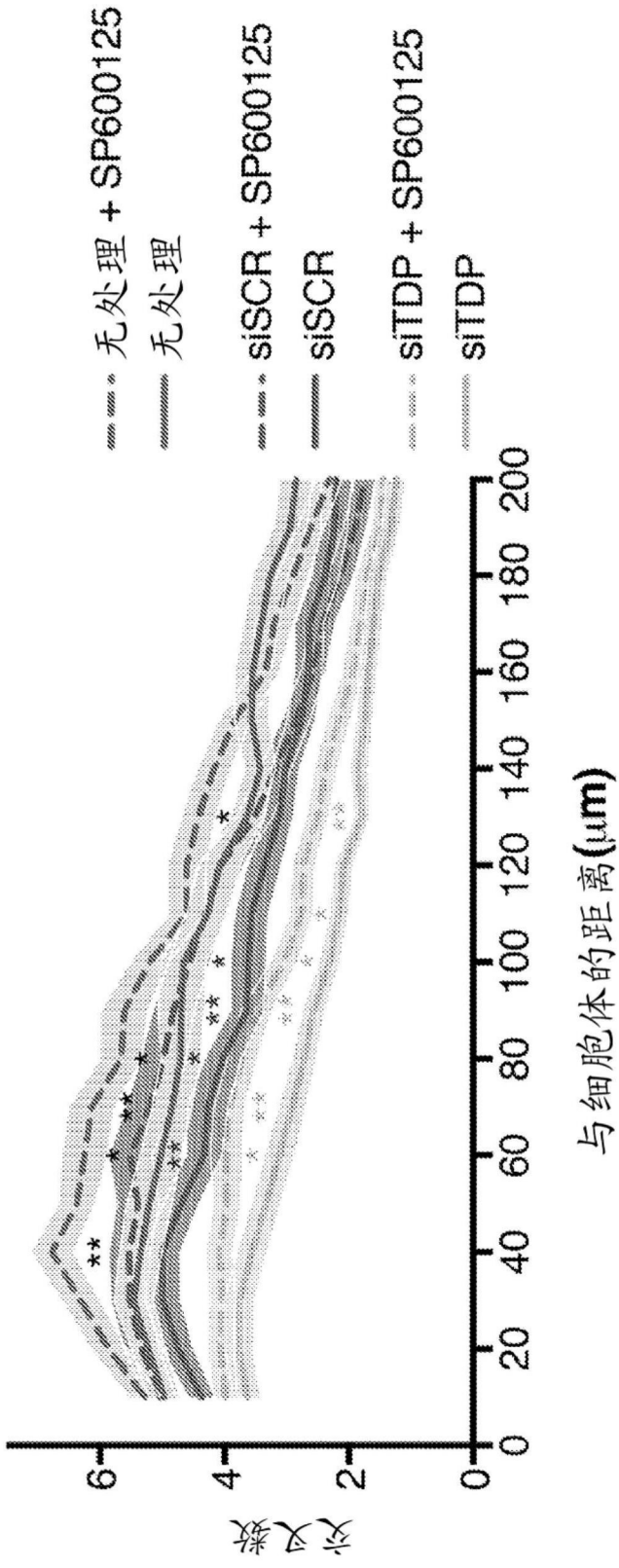

无处理 + SP600125
无处理
siSCR + SP600125
siSCR
siTDP + SP600125
siTDP
交叉数
0
2
4
6
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
与细胞体的距离(μm)

图35

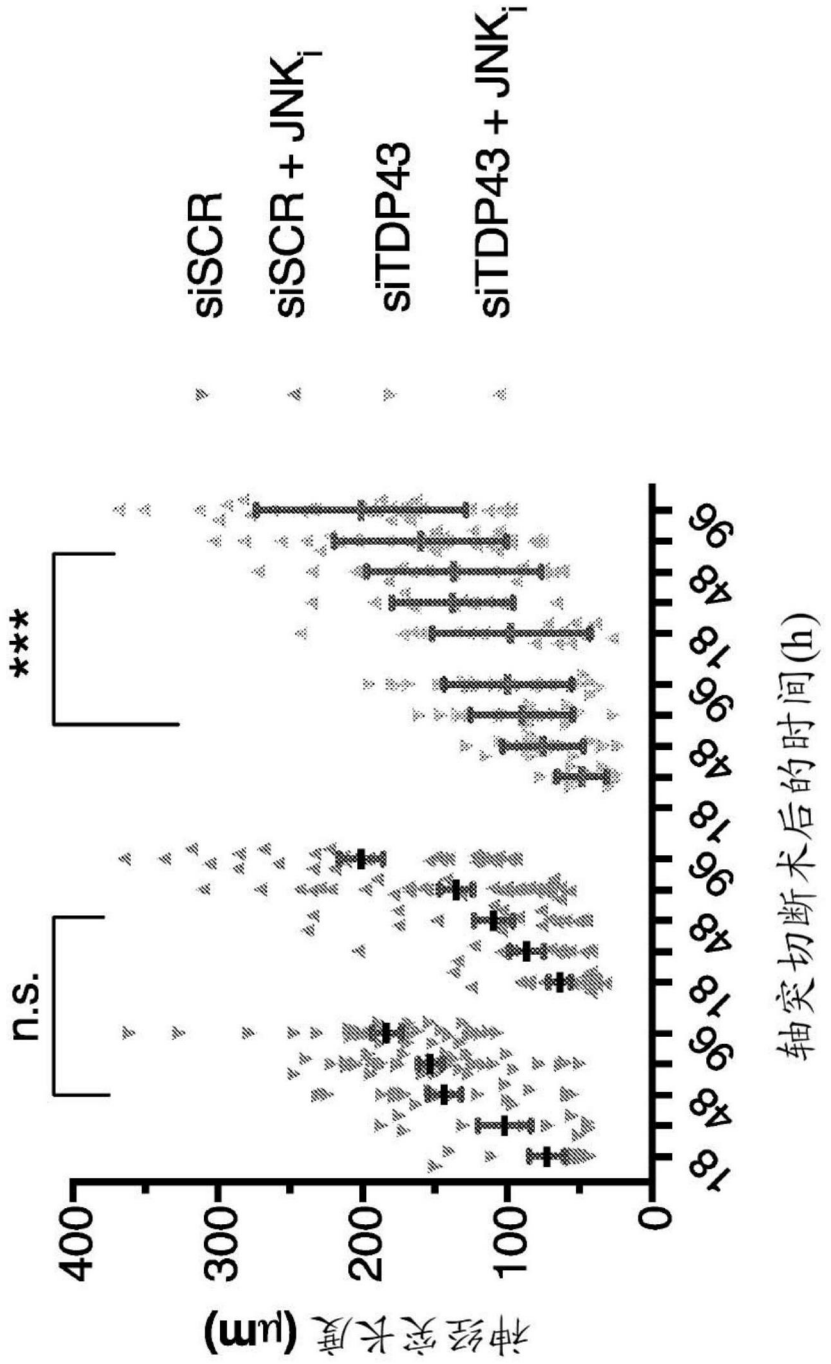

siSCR
siSCR + JNKi
siTDP43
siTDP43 + JNKi
***
n.s.
400
300
200
100
0
神经突长度 (μm)
18 48 96 18 48 96 18 48 96 18 48 96
轴突切断术后的时间(h)

图36

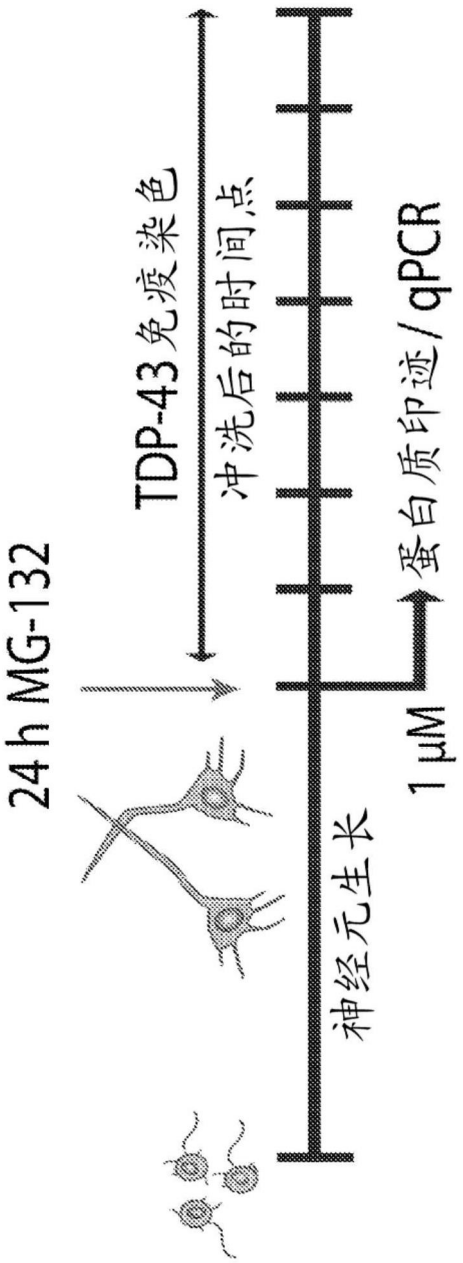


图37

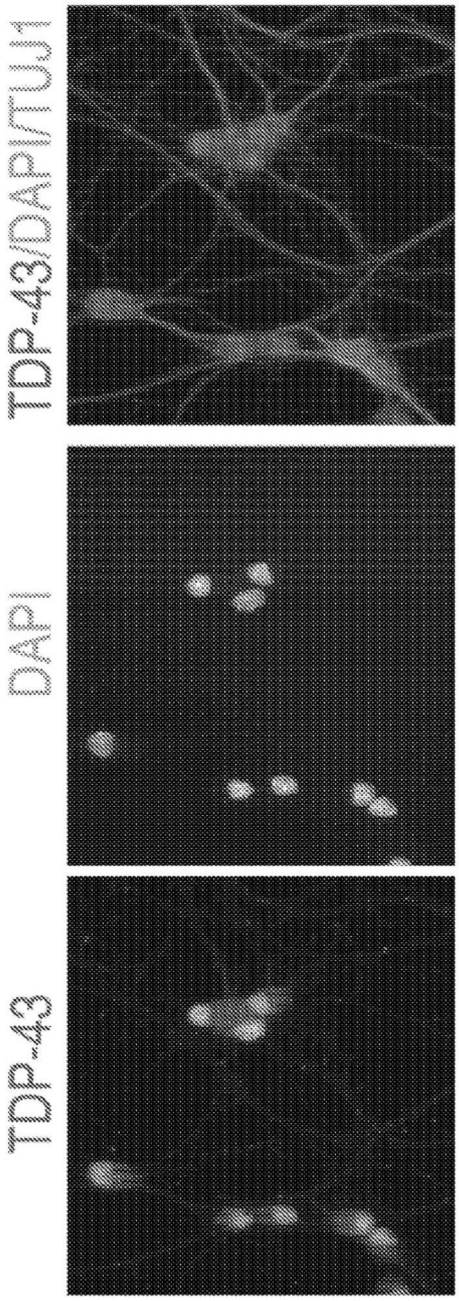


图38A

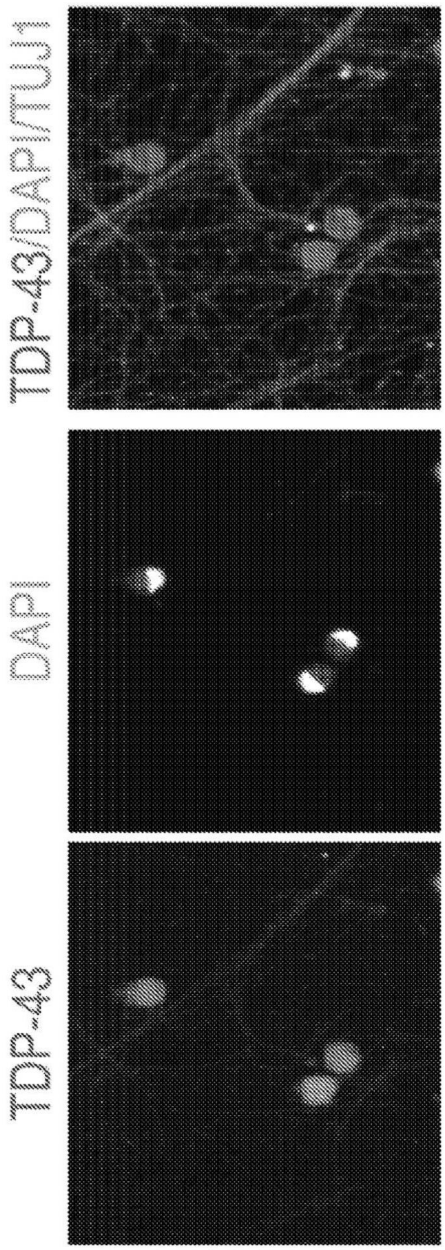


图38B

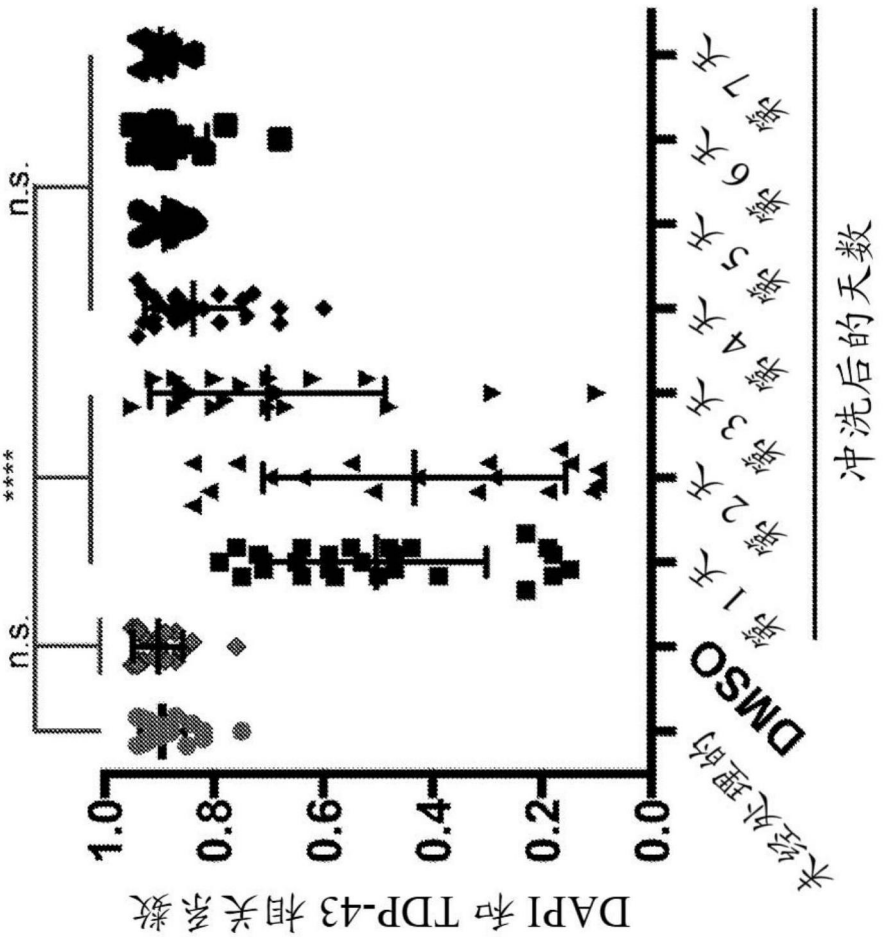

DAPI 和 TDP-43 相关系数
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
未经处理的
DMSO
1 天
2 天
3 天
4 天
5 天
6 天
7 天
冲洗后的天数
****
n.s.
n.s.

图39

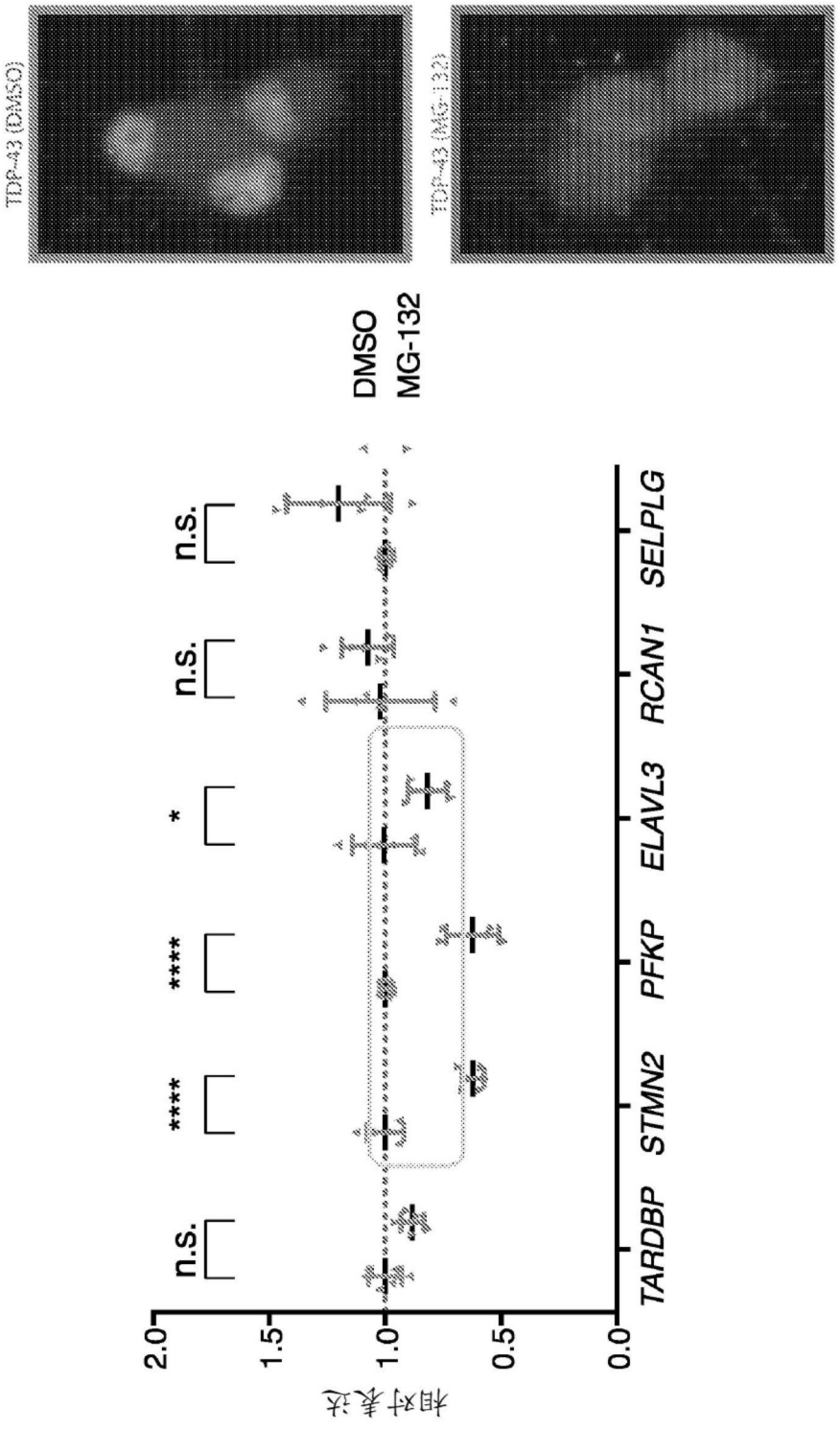

TDP-43 (DMSO)
TDP-43 (MG-132)
DMSO
MG-132
n.s.
****
****
*
n.s.
n.s.
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
相对表达
TARDBP
STMN2
PFKP
ELAVL3
RCAN1
SELPLG

图40

基因	基因座	遗传	证据水平	突变频率						TDP-43 病理	相关疾病路径
				总 ALS[%]	家族性 ALS[%]	散发性 ALS[%]	总 FTD[%]	家族性 FTD[%]	散发性 FTD[%]	ALS-FTD [%]	
TBK1[a]	12q14.2	AD[c]	已确立	1.3	3	<1	<1	2	1	3-4	+ 自噬、发炎
C9ORF10	22q11.23	AD	已确立	<1	2	<1	<1	<1	<1	<1	+ 线粒体功能障碍、突触完整性
TUBA4A	2q35	AD	待验证	<1	1	<1	<1	<1	~	~	+ 细胞骨架动力学、轴突转运
MATR3	5q31.2	AD	已确立	<1	1-2	1	~	~	~	~	+ RNA 代谢
CCNF	16p13.3	AD	已确立	<1	0.6-3.3	<1	4[c]	~	~	~	+ 蛋白质稳态
NEK1[a]	4q33	n.d.[c]	待验证	1	1-2	<1	~	~	~	~	n.d. DNA 损伤反应、细胞周期控制、细胞骨架组织、线粒体膜调控
C21orf2[b]	21q22.3	n.d.	待验证	<1	~	~	~	~	~	~	n.d. DNA 损伤反应、细胞骨架组织
ANXA11	10q22.3	AD	待验证	1.1	1	1.7	~	~	~	~	+ 蛋白质稳态
TIA1	2p13.3	AD	待验证	<1	2.2	<1	~	~	~	<1	+ RNA 代谢

-Nguyen 等人, Trends in Genetics, 2018

图41

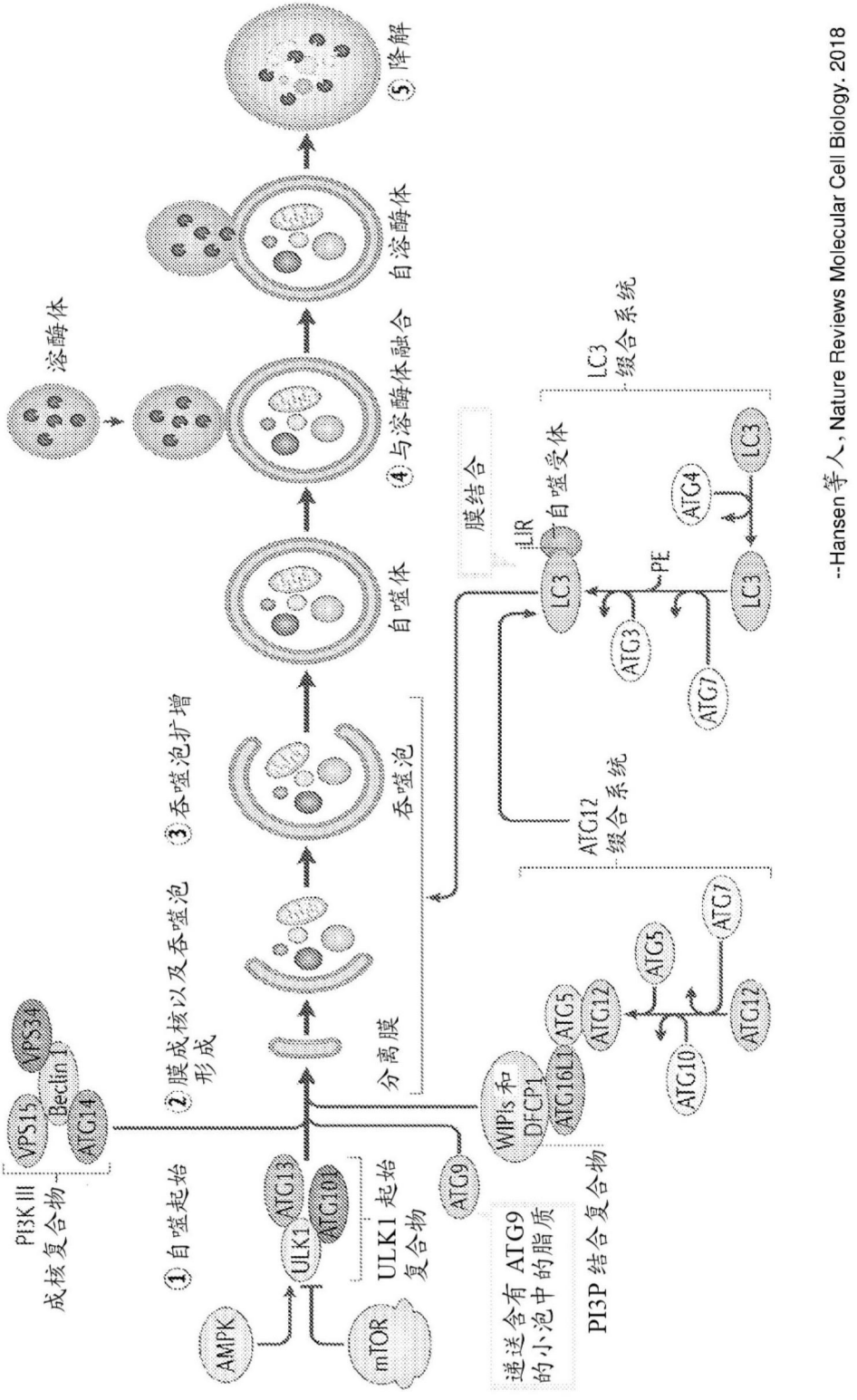

溶酶体
①自噬起始
②膜成核以及吞噬泡形成
③吞噬泡扩增
④与溶酶体融合
⑤降解
自噬体
自溶酶体
吞噬泡
分离膜
膜结合
PI3K III
成核复合物
VPS15
VPS34
Beclin 1
ATG14
ULK1
ATG13
ATG101
ULK1 起始
复合物
AMPK
mTOR
ATG9
递送含有 ATG9
的小泡中的脂质
WIPIs 和
DFCP1
ATG16L1
ATG5
ATG12
PI3P 结合复合物
ATG12
级合系统
ATG5
ATG7
ATG10
ATG12
LC3
自噬受体
LIR
PE
ATG3
ATG7
LC3
级合系统
ATG4
LC3
LC3
--Hansen 等人, Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2018

图42

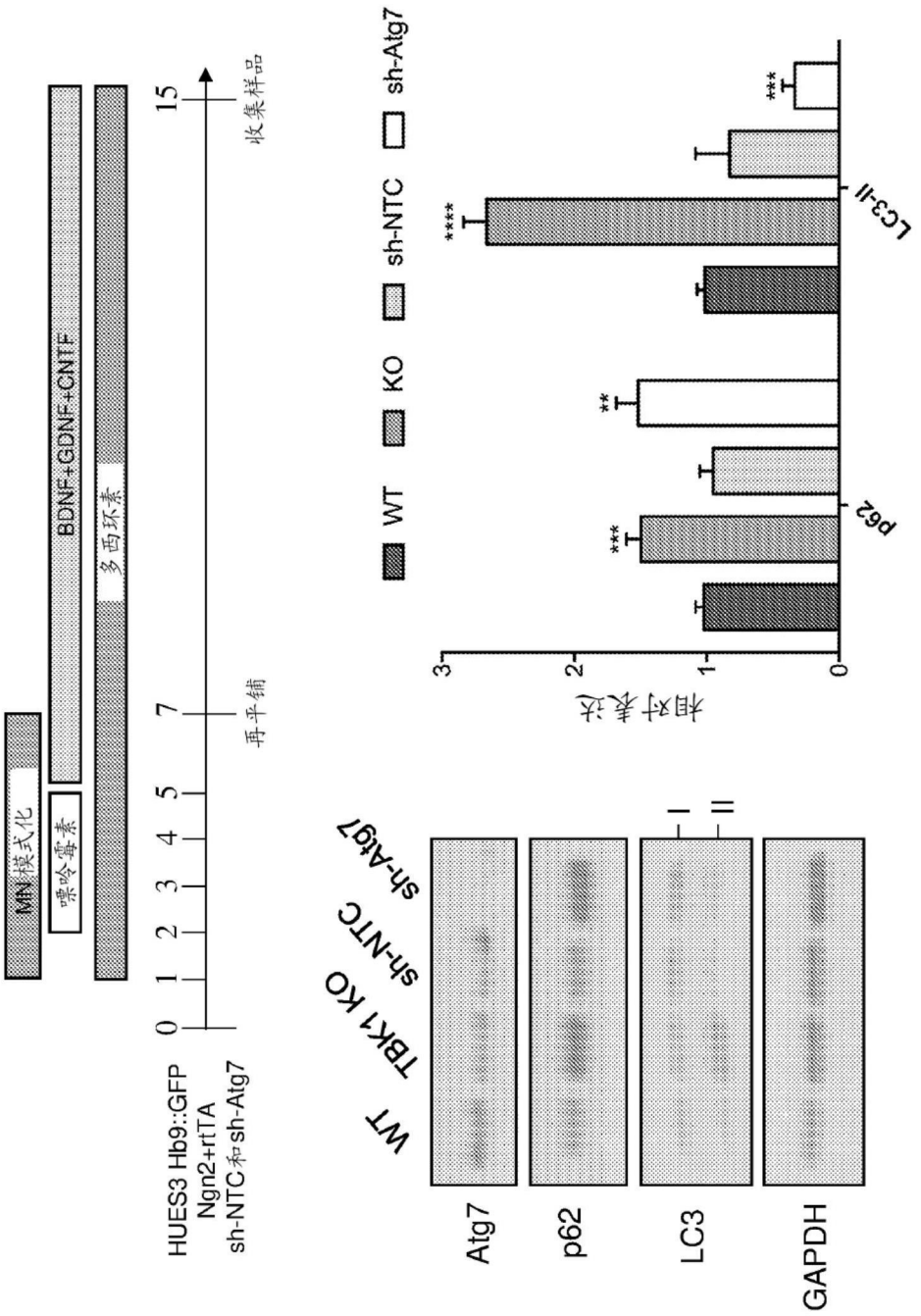

MN模式化
喋呤霉素
BDNF+GDNF+CNTF
多西环素
0 1 2 3 4 5 7 15
再平铺
收集样品
HUES3 Hb9::GFP
Ngn2+rtTA
sh-NTC和sh-Atg7
WT
TBK1 KO
sh-NTC
sh-Atg7
Atg7
p62
LC3
GAPDH
I
II
WT
KO
sh-NTC
sh-Atg7
相对表达
p62
LC3-II
***
**
****
***

图43

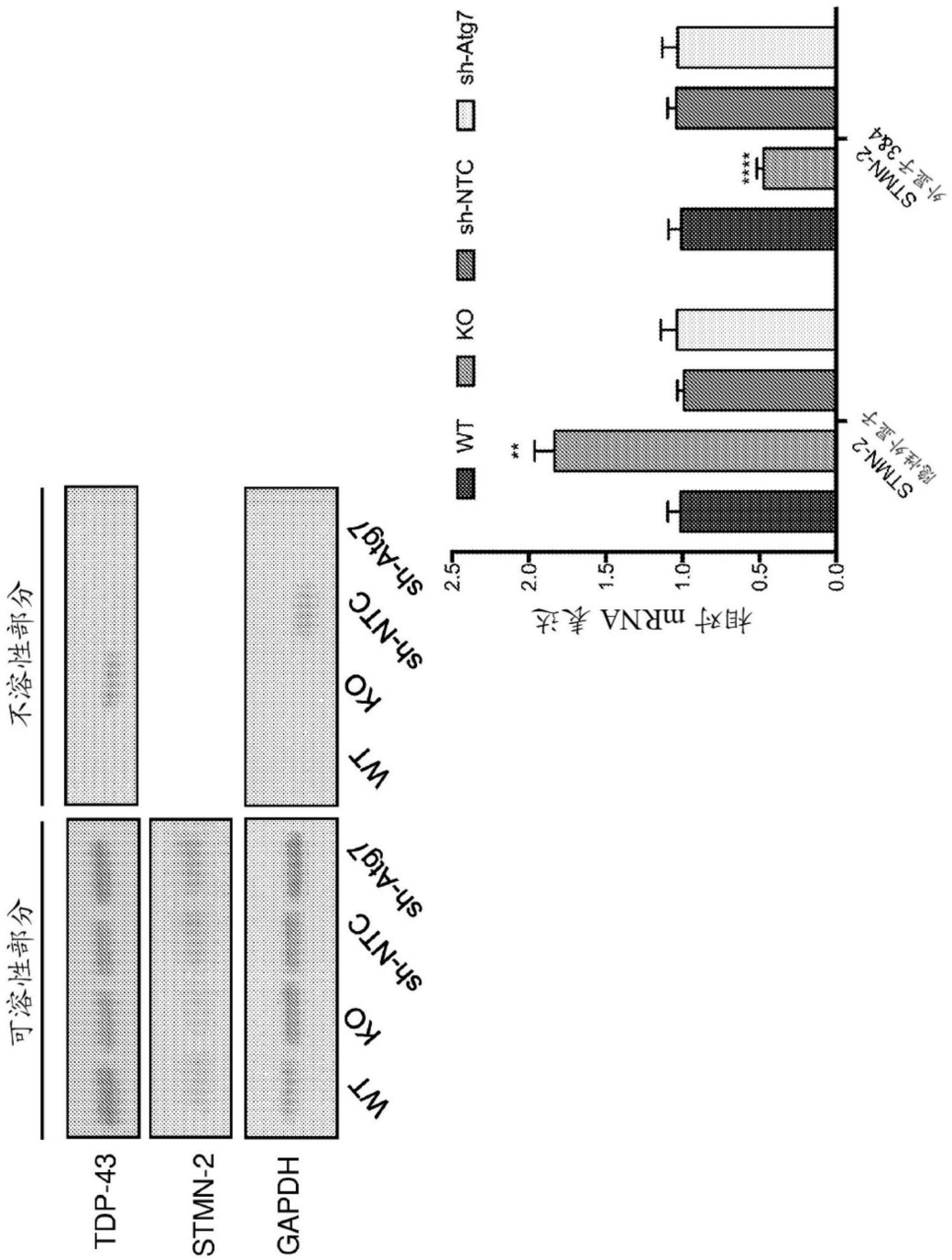

可溶性部分
不溶性部分
WT
KO
sh-NTC
sh-Atg7
TDP-43
STMN-2
GAPDH
相对 mRNA 表达
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
****
隐性外显子
外显子3&4
STMN-2
STMN-2
WT
KO
sh-NTC
sh-Atg7

图44

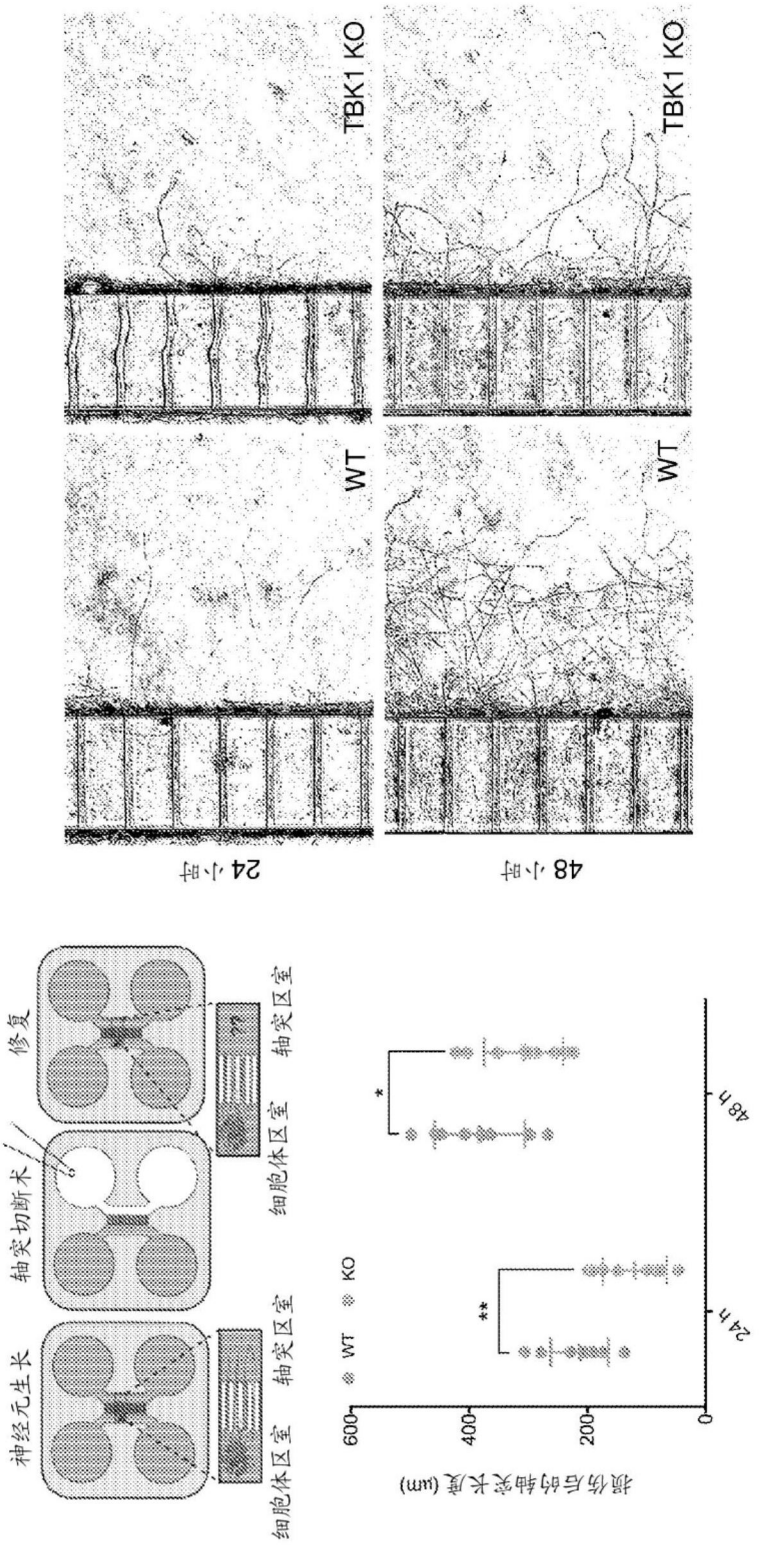

TBK1 KO
WT
TBK1 KO
WT
24 小时
48 小时
神经元生长
细胞体区室
轴突区室
轴突切断术
细胞体区室
轴突区室
修复
WT
KO
**
*
损伤后的轴突长度 (μm)
600
400
200
0
24h
48h

图45

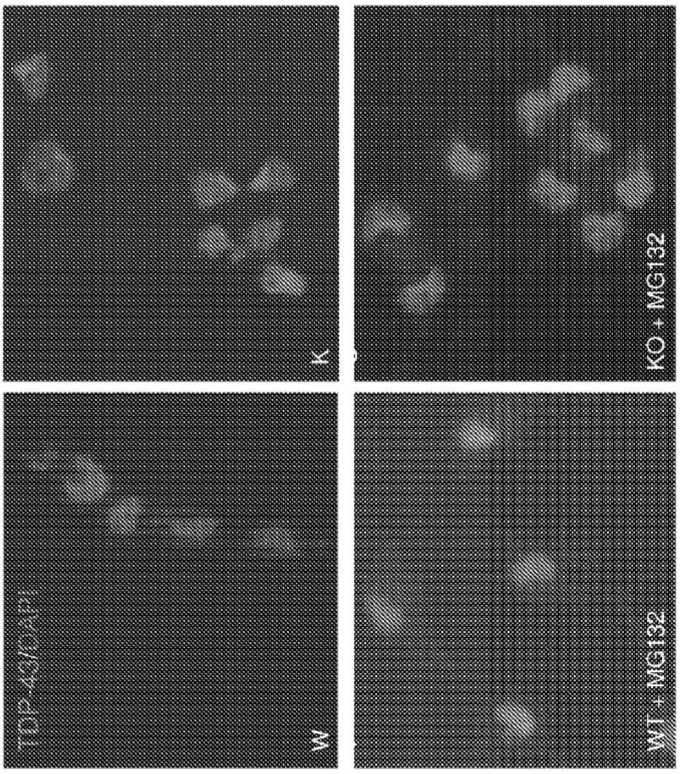


图46

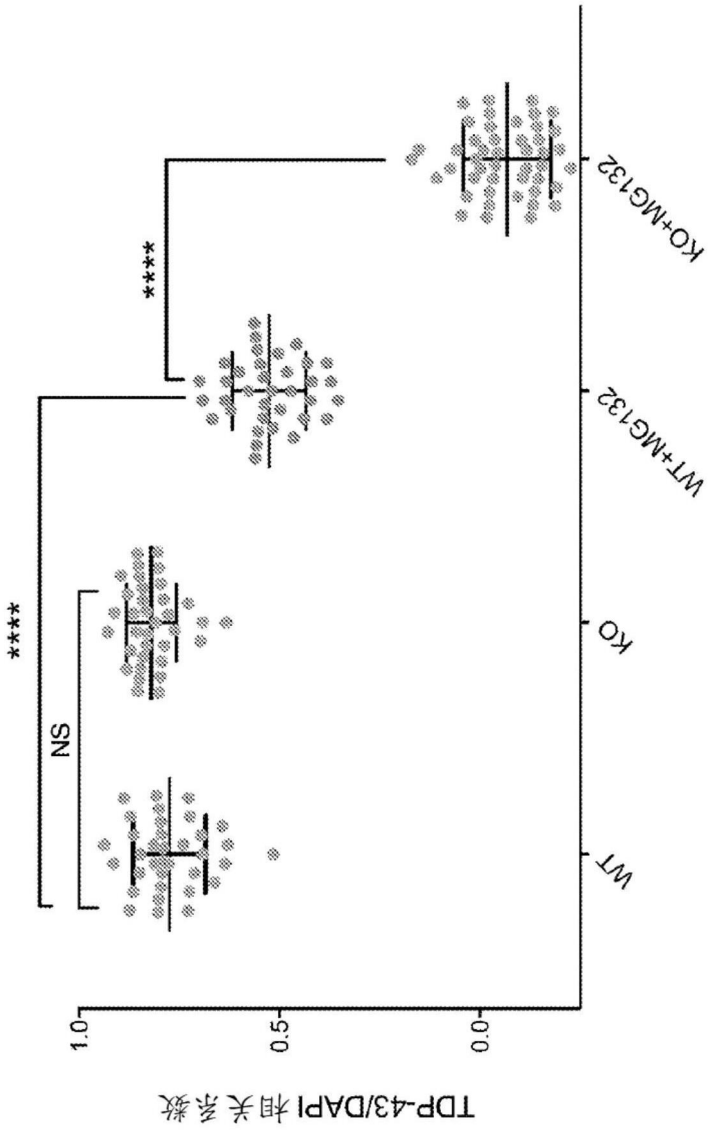


图46续

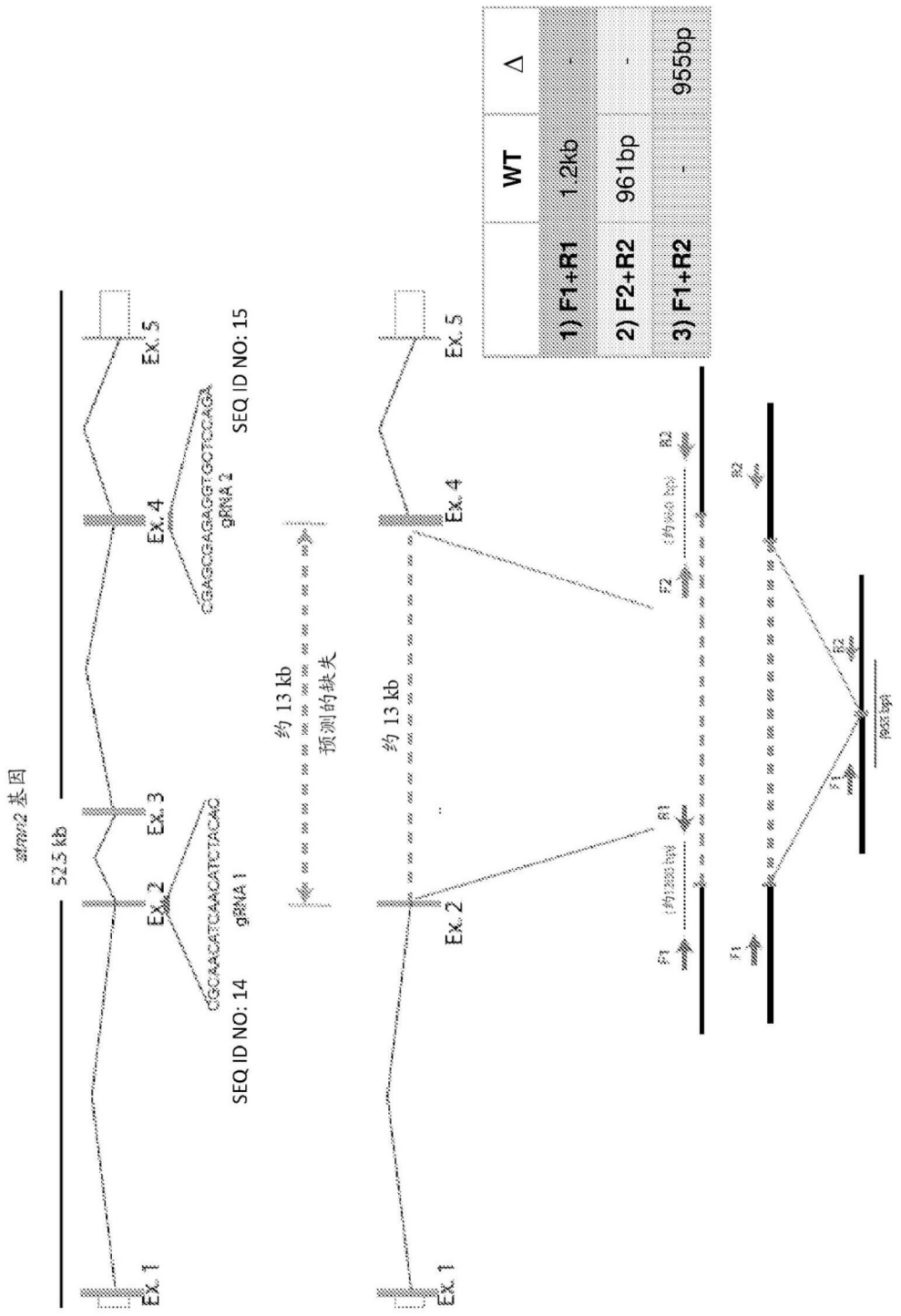

Smn2 基因
52.5 kb
Ex. 1
Ex. 2
Ex. 3
Ex. 4
Ex. 5
SEQ ID NO: 14
gRNA 1
SEQ ID NO: 15
gRNA 2
约 13 kb
预测的缺失
WT
Δ
1) F1+R1
1.2kb
-
2) F2+R2
961bp
-
3) F1+R2
-
955bp

图47A

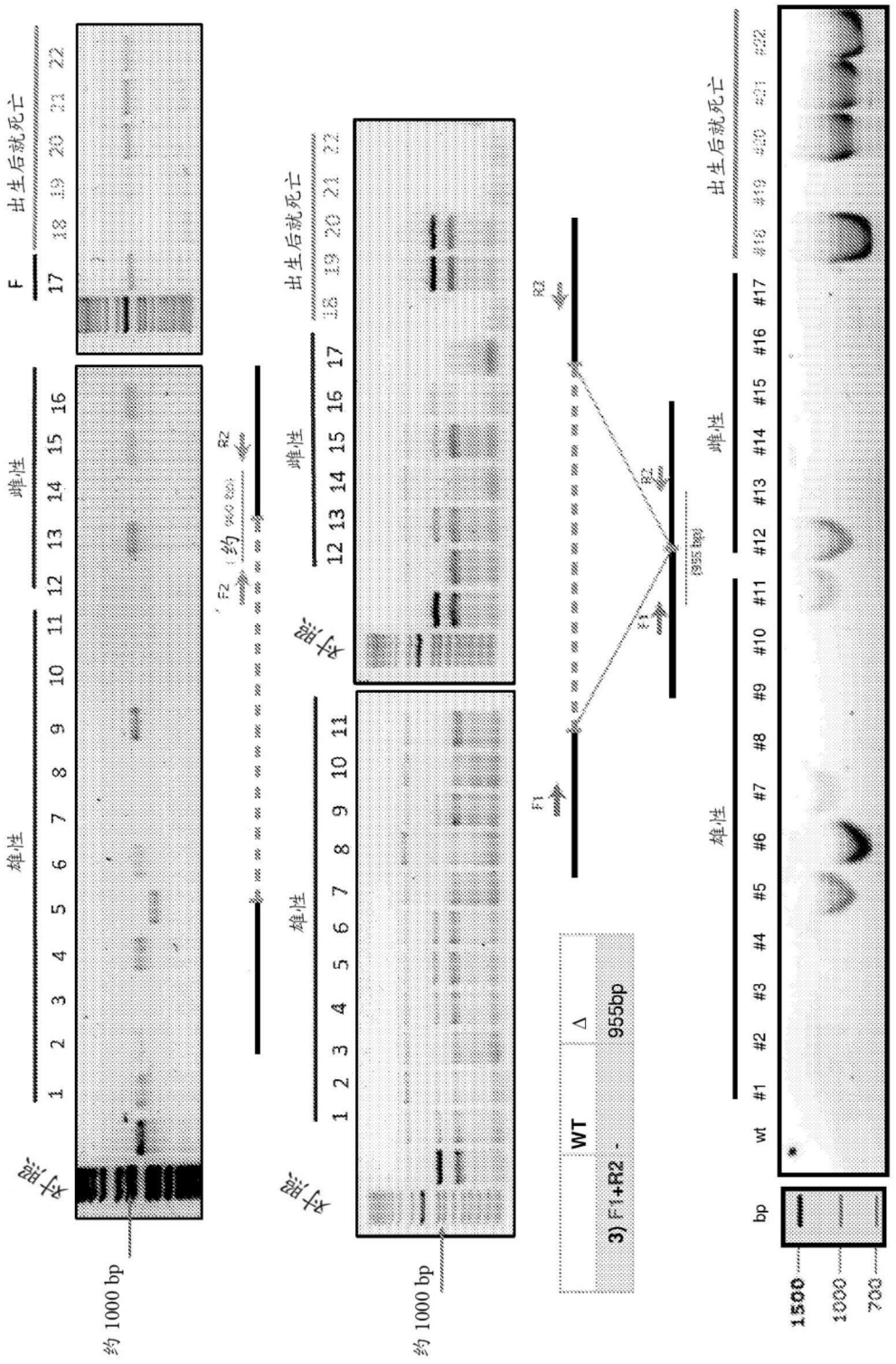


图47B

小鼠ID和性别	引导基因靶位点?	PCR条带分析			序列分析		注释
		WT条带	条带位移或无条带	13Kb缺失?	WT序列%	插入/缺失频率%	
1-M	外显子2	Y				27 (-6 nt) 21 (-3 nt) 18.7 (-1 nt)	
	外显子4	Y				28 (-14 nt) 28 (-12 nt) 9.40 (-9 nt)	
2-M	外显子2	Y				0.84 (+1 nt)	
	外显子4	Y				0.82 (-12 nt)	
3-M	外显子2	N	Y		失败	失败	
	外显子4	Y			失败	失败	
4-M	外显子2	Y				23.4 (-27 nt)22 (-9 nt)	
	外显子4	Y				0.98 (-12 nt)	
5-M	外显子2	N	Y	Y		0	
	外显子4	Y				0.97 (-1 nt)	
6-M	外显子2	Y		Y		0.94 (-17 nt)	
	外显子4	Y				0.97 (-12 nt)	
7-M	外显子2	N	Y	Y	失败	失败	
	外显子4	Y			失败	失败	
8-M	外显子2	Y	Y			58 (-28 nt) 11 (-22 nt) 3 (-3 nt) 0.8 (+26 nt)	
	外显子4	Y				0.95 (-11 nt)	
9-M	外显子2	Y				5.3 85 (+1 nt)	
	外显子4	Y				38 (-12 nt) 38 (-11 nt) 0.20 (-9 nt)	
10-M	外显子2	N	Y		?	?	
	外显子4	N	Y		?	?	
11-M	外显子2	N	Y	Y			
	外显子4	N	Y				
12-F	外显子2	N	Y	Y			
	外显子4	N	Y				
13-F	外显子2	Y	Y			23.72 (+1 nt)	
	外显子4	N	Y			0.98 (-12 nt)	
14-F	外显子2	N	Y			0.55 (-28 nt)23 (-10 nt)23 (+1 nt)	
	外显子4	Y					
15-F	外显子2	Y				0.96 (+1 nt)	
	外显子4	Y				0.98 (-12 nt)	
16-F	外显子2	Y				4 混合	
	外显子4	Y				0.93 (-11 nt)	
17-F	外显子2	N	Y				
	外显子4	N	Y				
18-	外显子2	Y		Y		97-	
	外显子4	N					
19-	外显子2	Y				30 56 (+1 nt)	
	外显子4	Y				0.96 (-1 nt)	
20-	外显子2	Y		Y		0.97 (+2 nt)	
	外显子4	Y				0.96 (-11 nt)	
21-	外显子2	Y		Y		0.95 (-6 nt)	
	外显子4	Y				0.96 (-11 nt)	
22-	外显子2	Y		Y		0.96 (-3 nt)	
	外显子4	N					

图47C

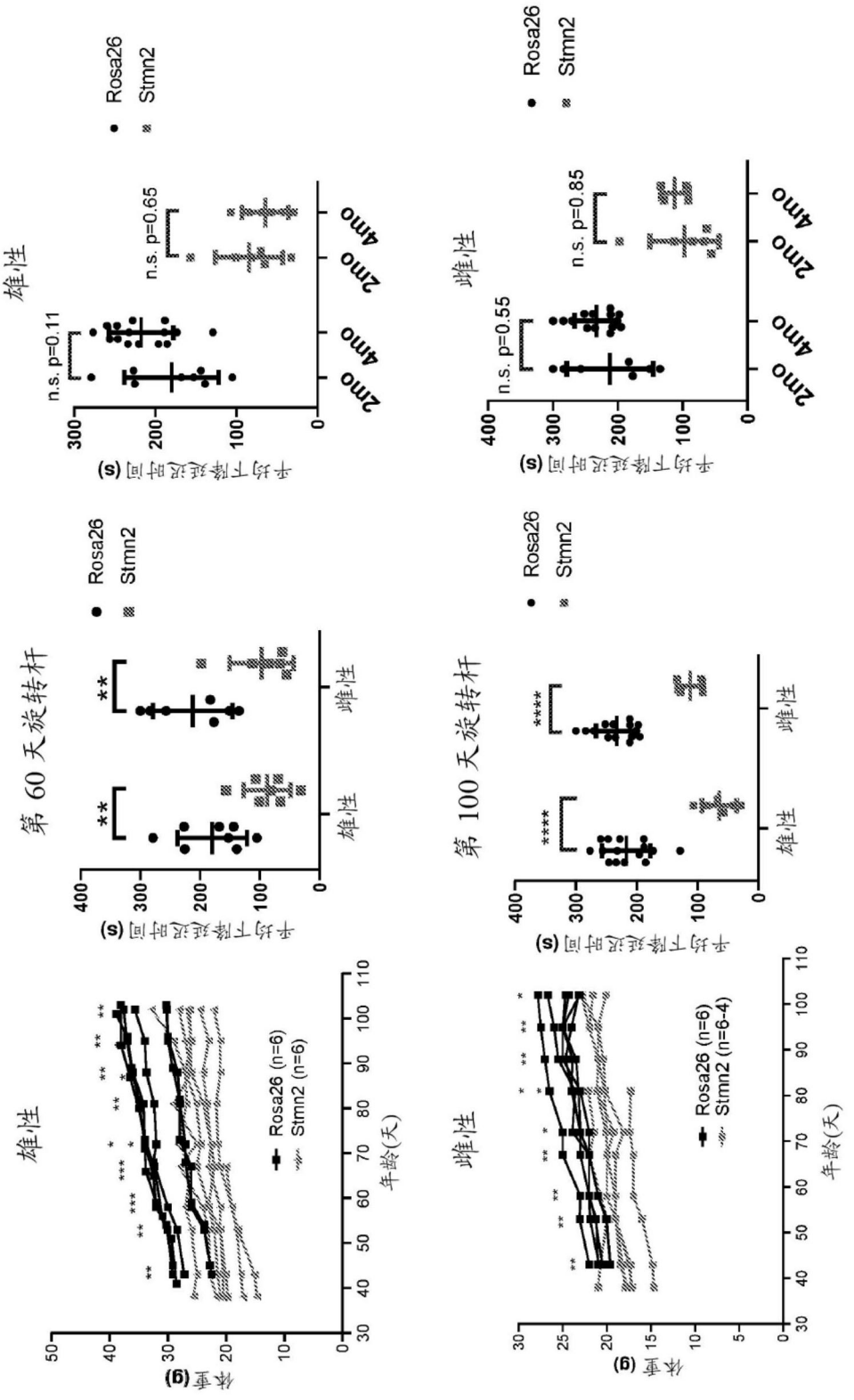

雄性
雌性
Rosa26
Stmn2
n.s. p=0.11
n.s. p=0.65
n.s. p=0.55
n.s. p=0.85
2mo
4mo
平均下降延迟时间 (s)
第 60 天旋转杆
第 100 天旋转杆
体重 (g)
Rosa26 (n=6)
Stmn2 (n=6)
Rosa26 (n=6)
Stmn2 (n=6-4)
年龄(天)

图48

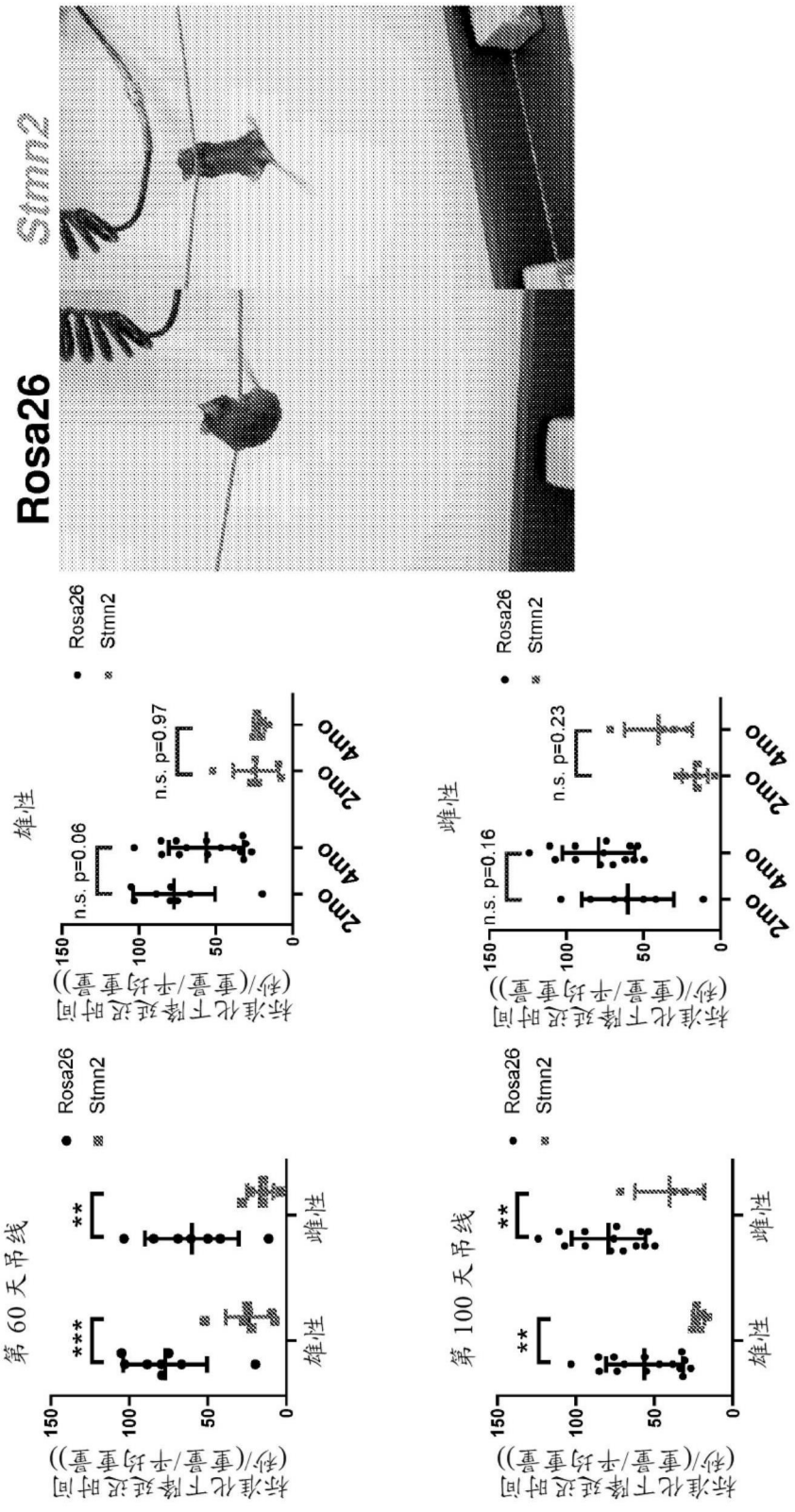

Rosa26
Stmn2
第 60 天吊线
第 100 天吊线
雄性
雌性
Rosa26
Stmn2
标准化下降延迟时间
(秒/(重量/平均重量))
***
**
n.s. p=0.06
n.s. p=0.97
n.s. p=0.16
n.s. p=0.23
2mo
4mo

图49

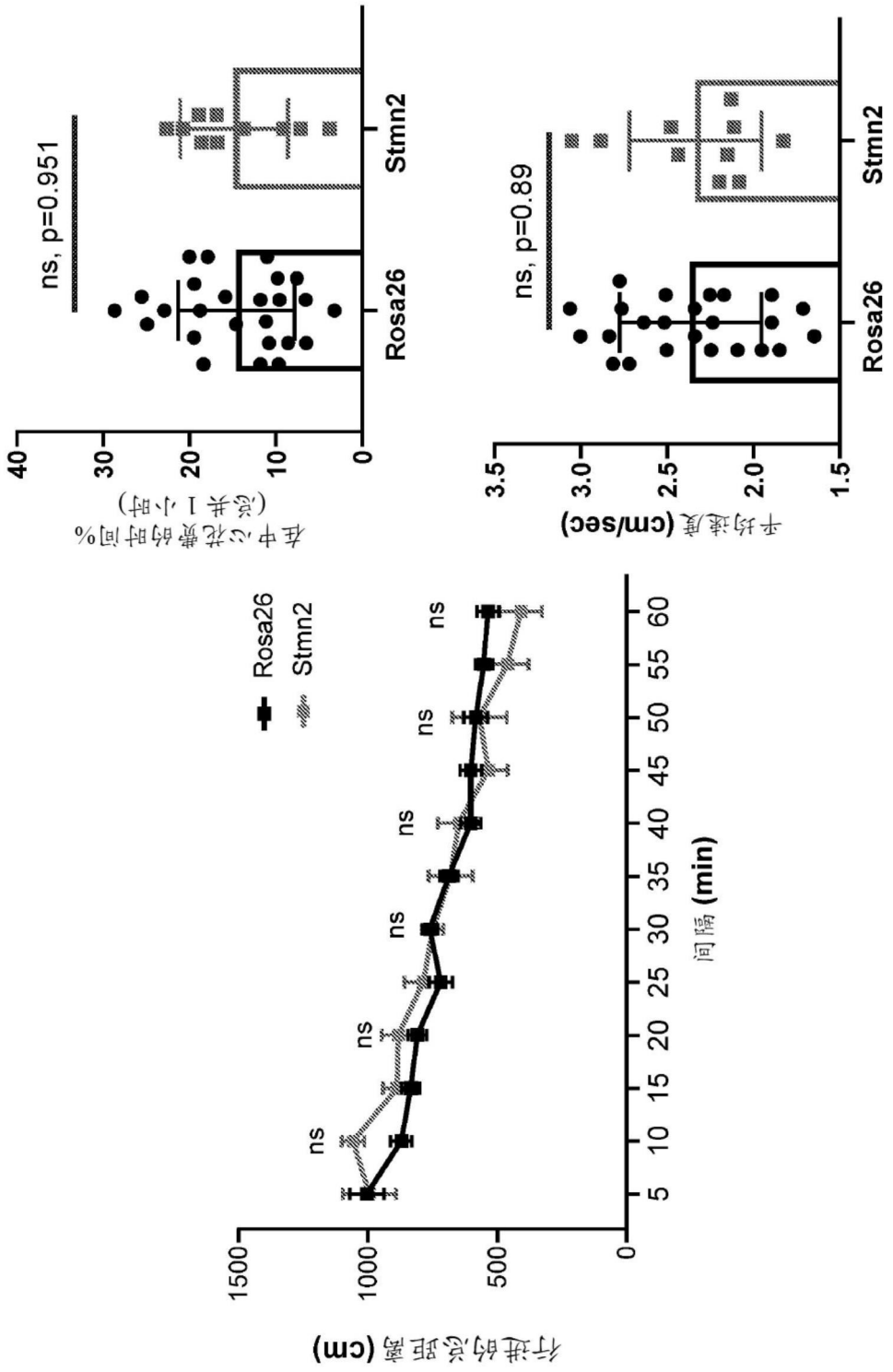

行进的总距离 (cm)
1500
1000
500
0
Rosa26
Stmn2
ns
5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
间隔 (min)
平均速度 (cm/sec)
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
ns, p=0.89
Rosa26
Stmn2
在中心花费的时间%
(总共 1 小时)
40
30
20
10
0
ns, p=0.951
Rosa26
Stmn2

图50

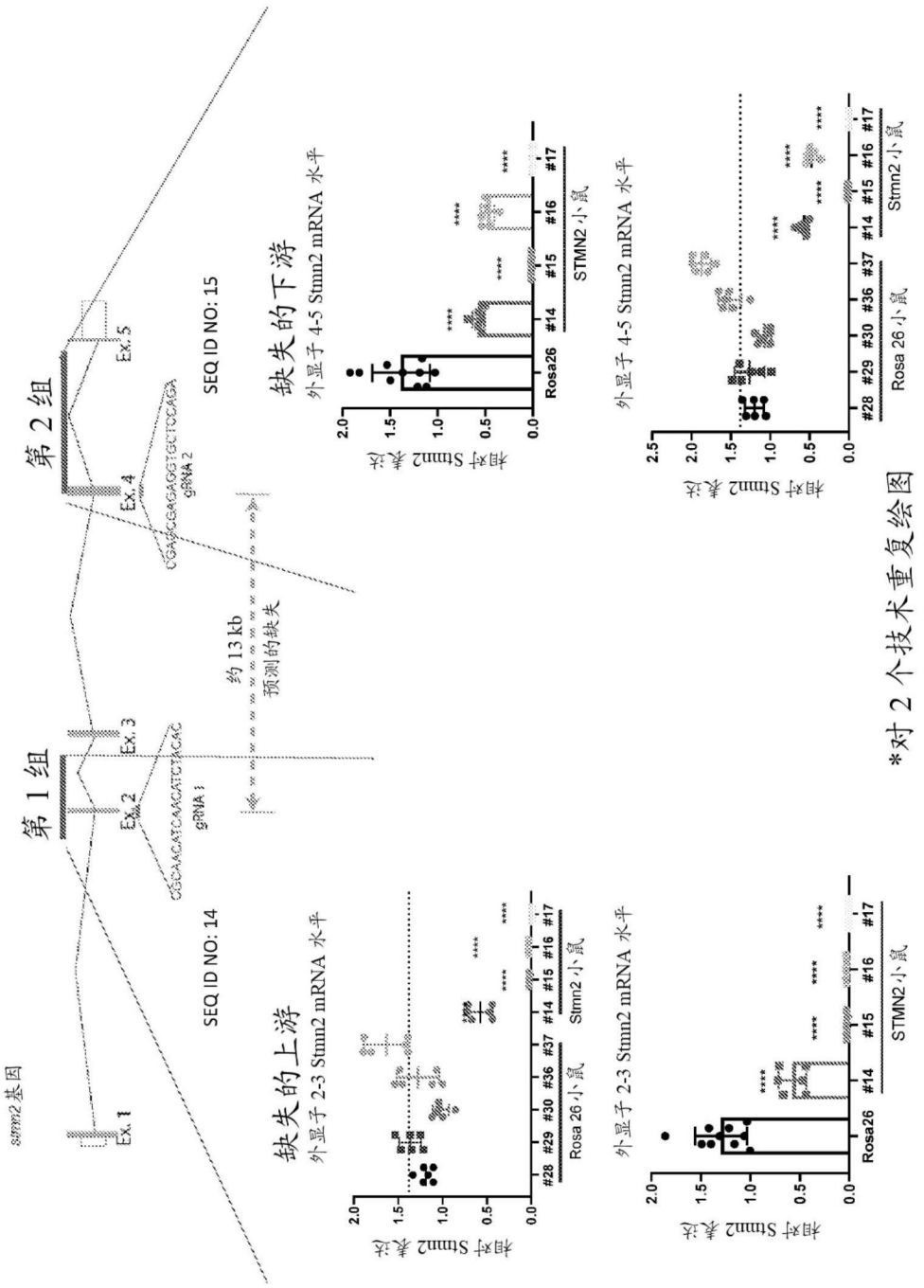

Stmn2 基因
第 1 组
第 2 组
Ex. 1
Ex. 2
Ex. 3
Ex. 4
Ex. 5
SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 15
约 13 kb
预测的缺失
缺失的上游
缺失的下游
外显子 2-3 Stmn2 mRNA 水平
外显子 4-5 Stmn2 mRNA 水平
相对 Stmn2 表达
Rosa26
STMN2 小鼠
Rosa 26 小鼠
Stmn2 小鼠
*对 2 个技术重复绘图

图51

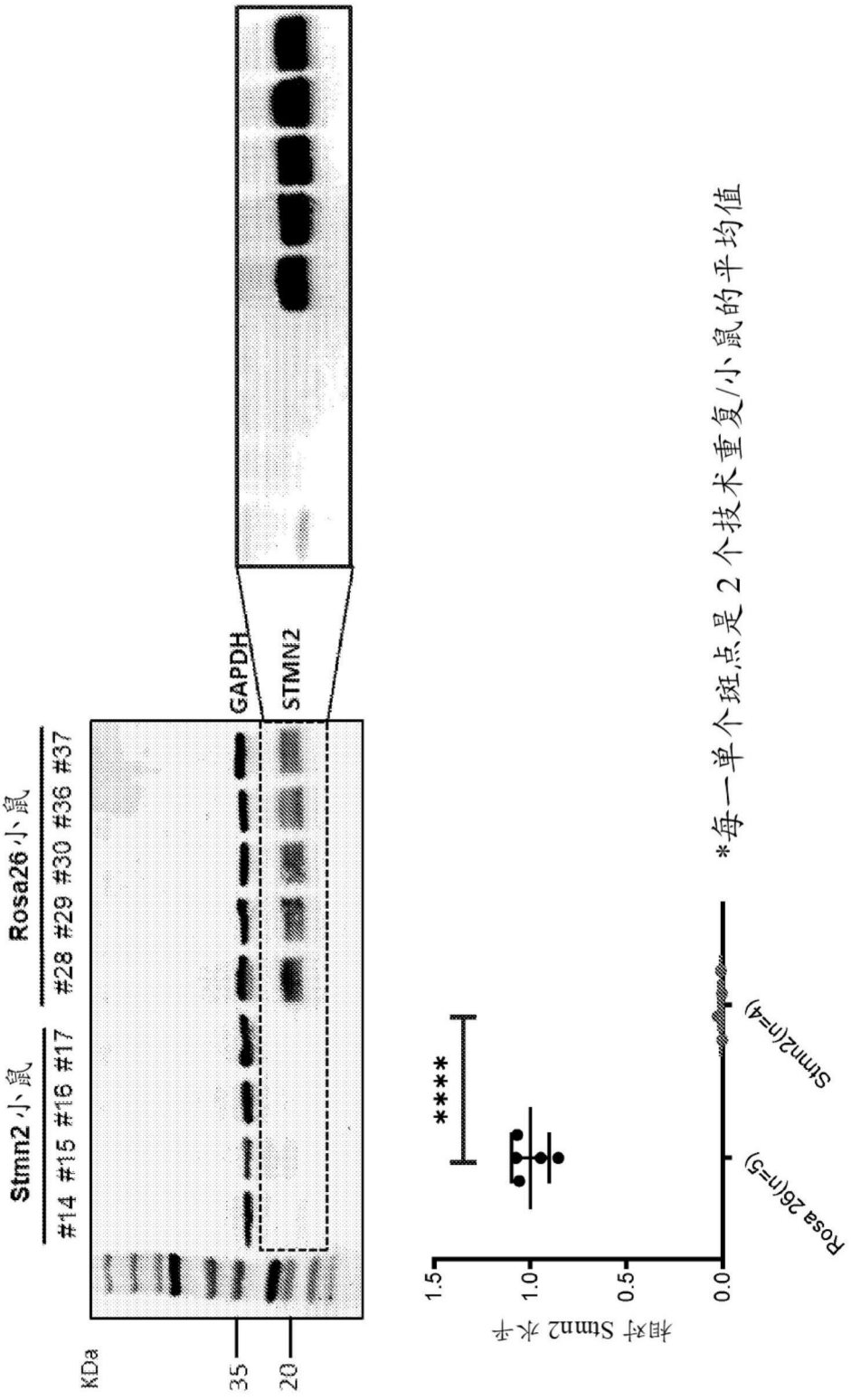

Stmn2小鼠
#14 #15 #16 #17
Rosa26小鼠
#28 #29 #30 #36 #37
GAPDH
STMN2
KDa
35
20
****
相对 Stmn2 水平
1.5
1.0
0.5
0.0
Rosa 26(n=5)
Stmn2(n=4)
*每一单个斑点是 2 个技术重复/小鼠的平均值

图52

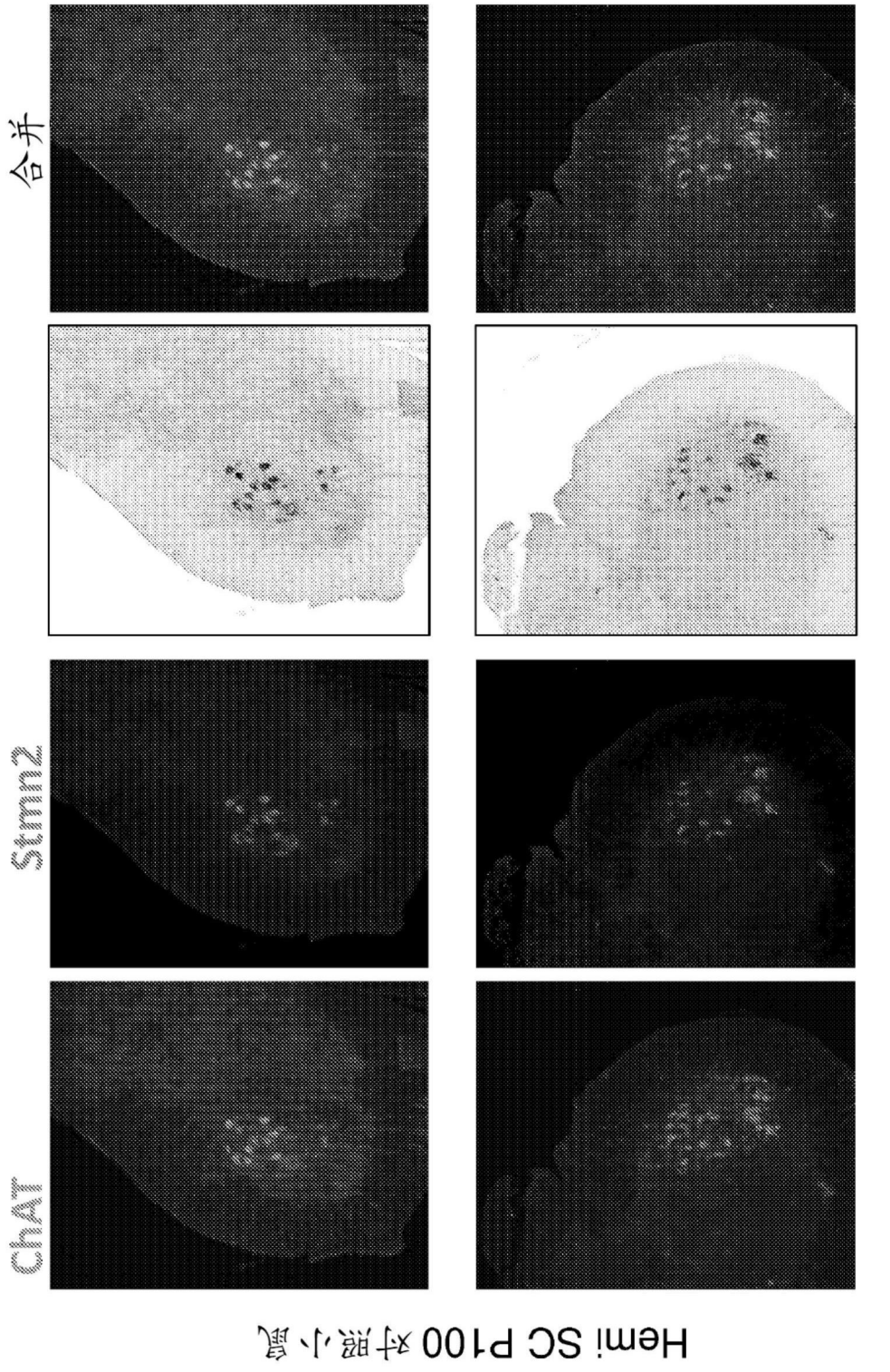


图53

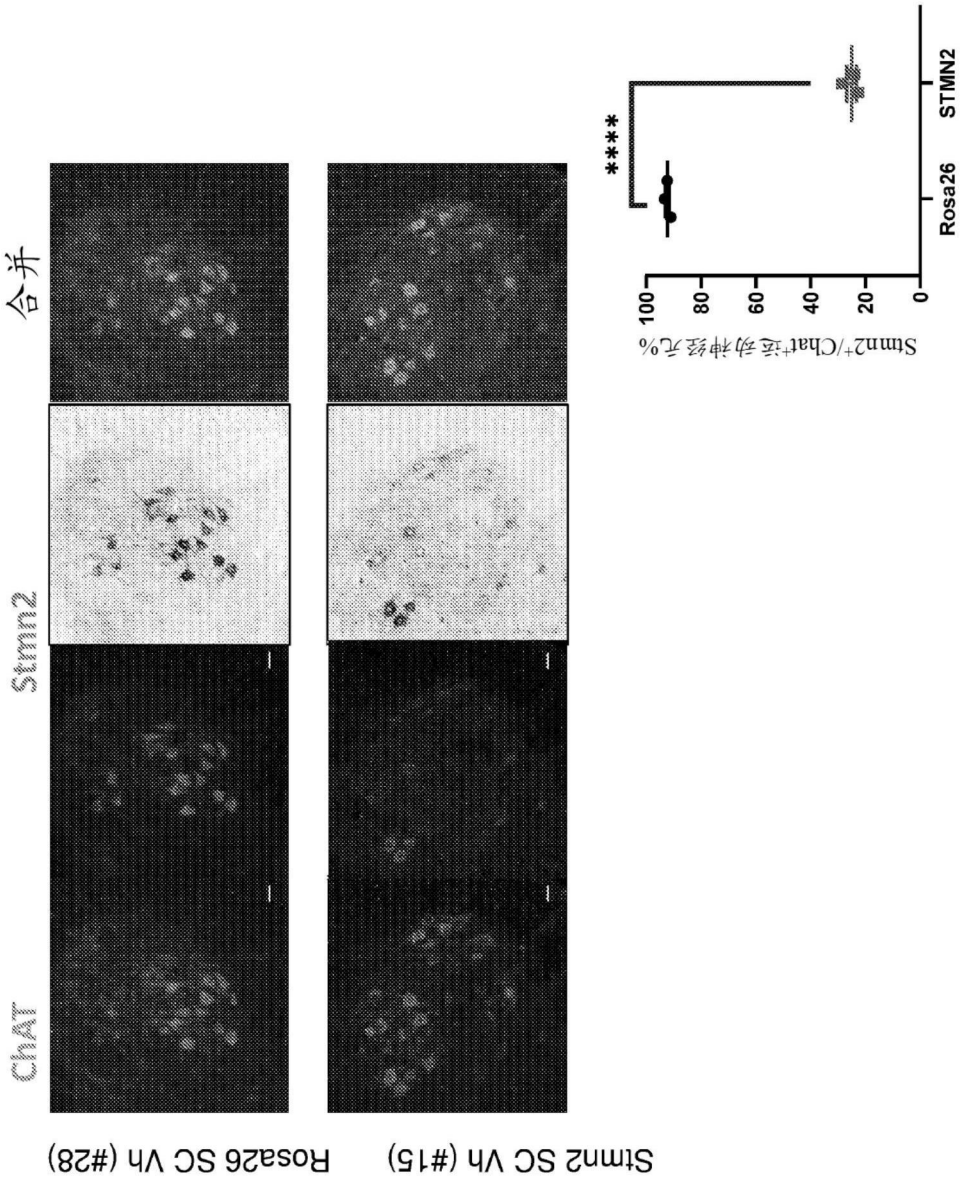

Stmn2 SC Vh (#15)
Rosa26 SC Vh (#28)
ChAT
Stmn2
合并
Stmn2+/Chat+运动神经元%
100
80
60
40
20
0
****
Rosa26
STMN2

图54

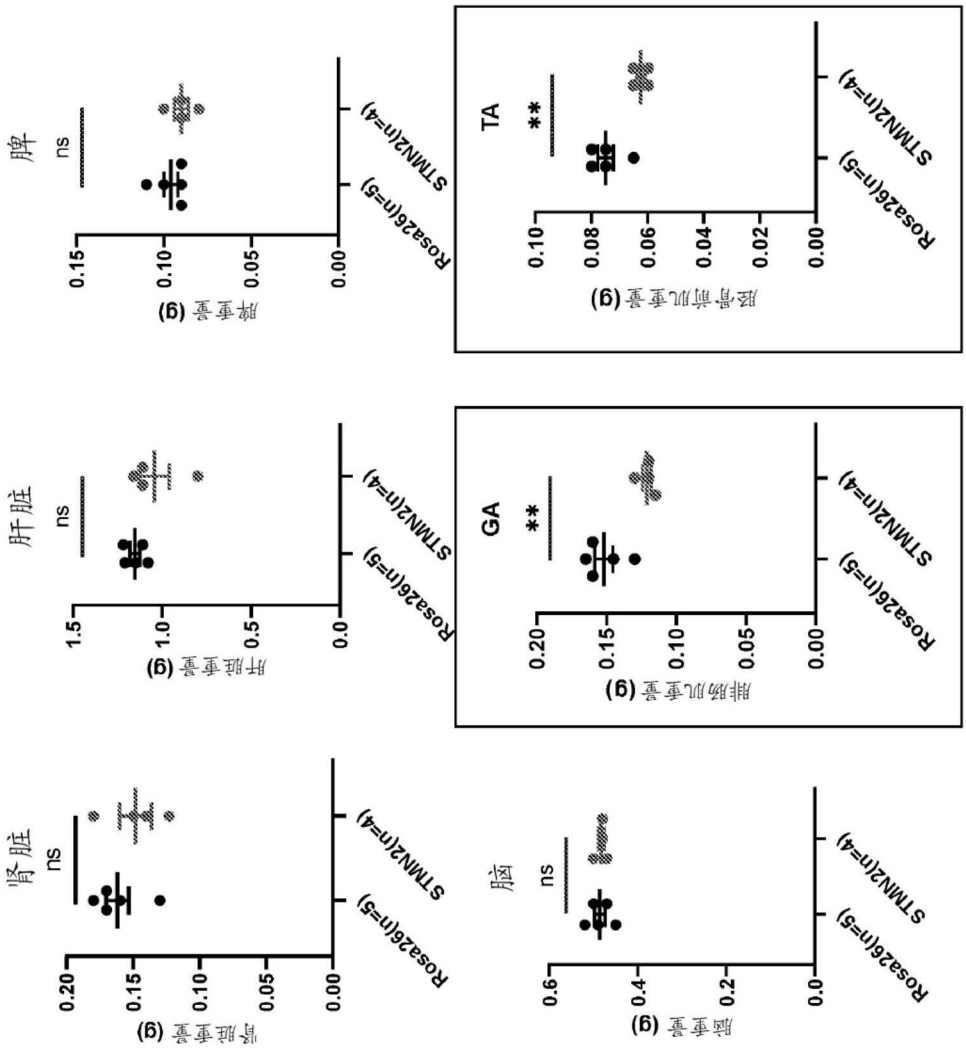

脾
ns
脾重量 (g)
0.15
0.10
0.05
0.00
Rosa26(n=5)
STMN2(n=4)
TA
**
胫骨前肌重量 (g)
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
肝脏
ns
肝脏重量 (g)
1.5
1.0
0.5
0.0
GA
**
腓肠肌重量 (g)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
肾脏
ns
肾脏重量 (g)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
脑
ns
脑重量 (g)
0.6
0.4
0.2
0.0

图55

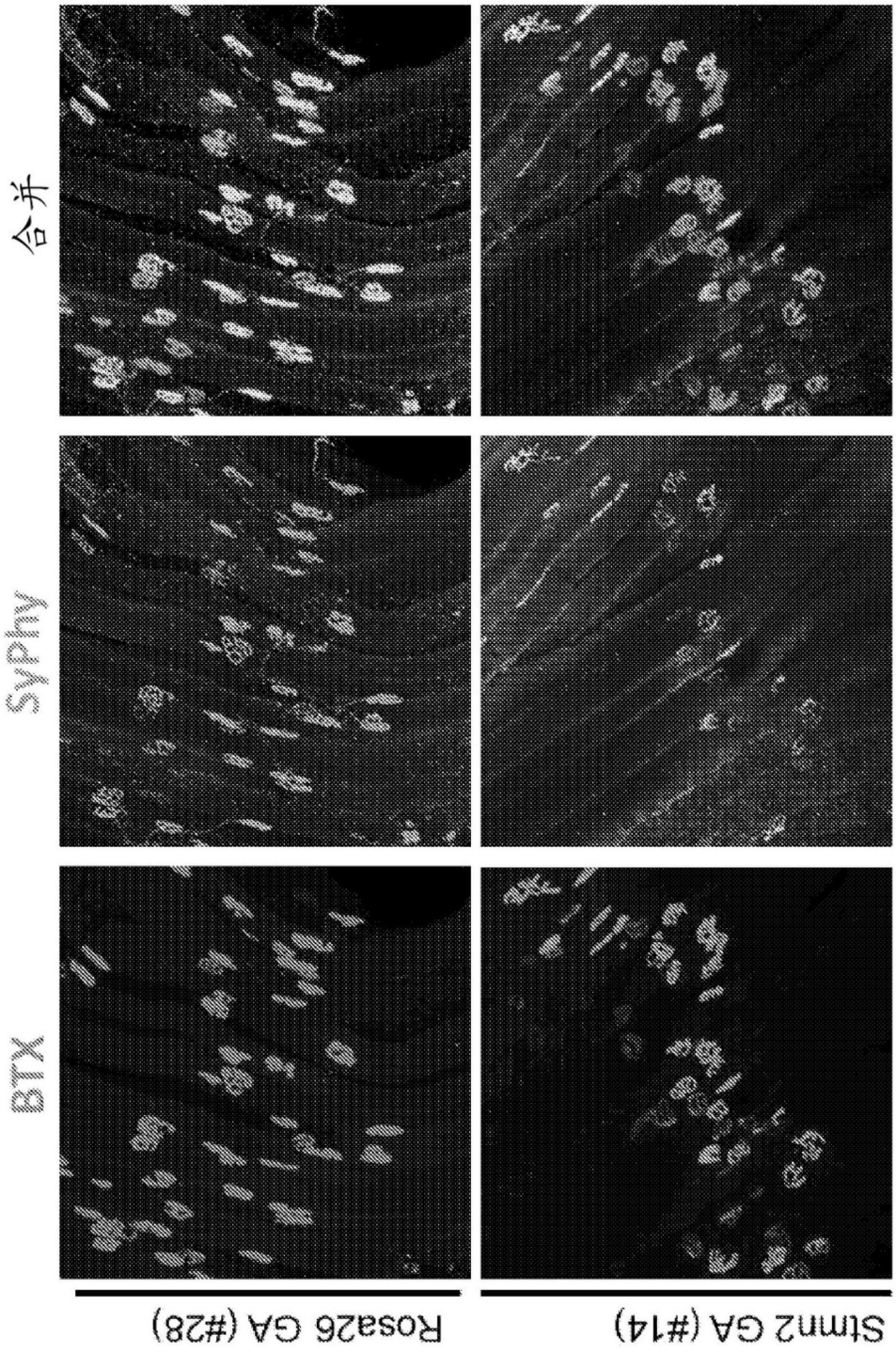


图56

分组的(4-5 只小鼠/基因型)
NMJ 的神经支配%
100%
50%
0%
Rosa26
STMN2
无
部分
完全
每只小鼠
NMJ 的神经支配%
Rosa #28
Rosa #29
Rosa #30
Rosa #36
Rosa #37
STMN2 #14
STMN2 #15
STMN2 #16
STMN2 #17
完全被神经支配的 NMJ%
***, p=0.0009
Rosa26
STMN2
不被神经支配的 NMJ%
**,p=0.0055
部分被神经支配的 NMJ%
***, p=0.0002
约 100 个 NMJ/小鼠

图57

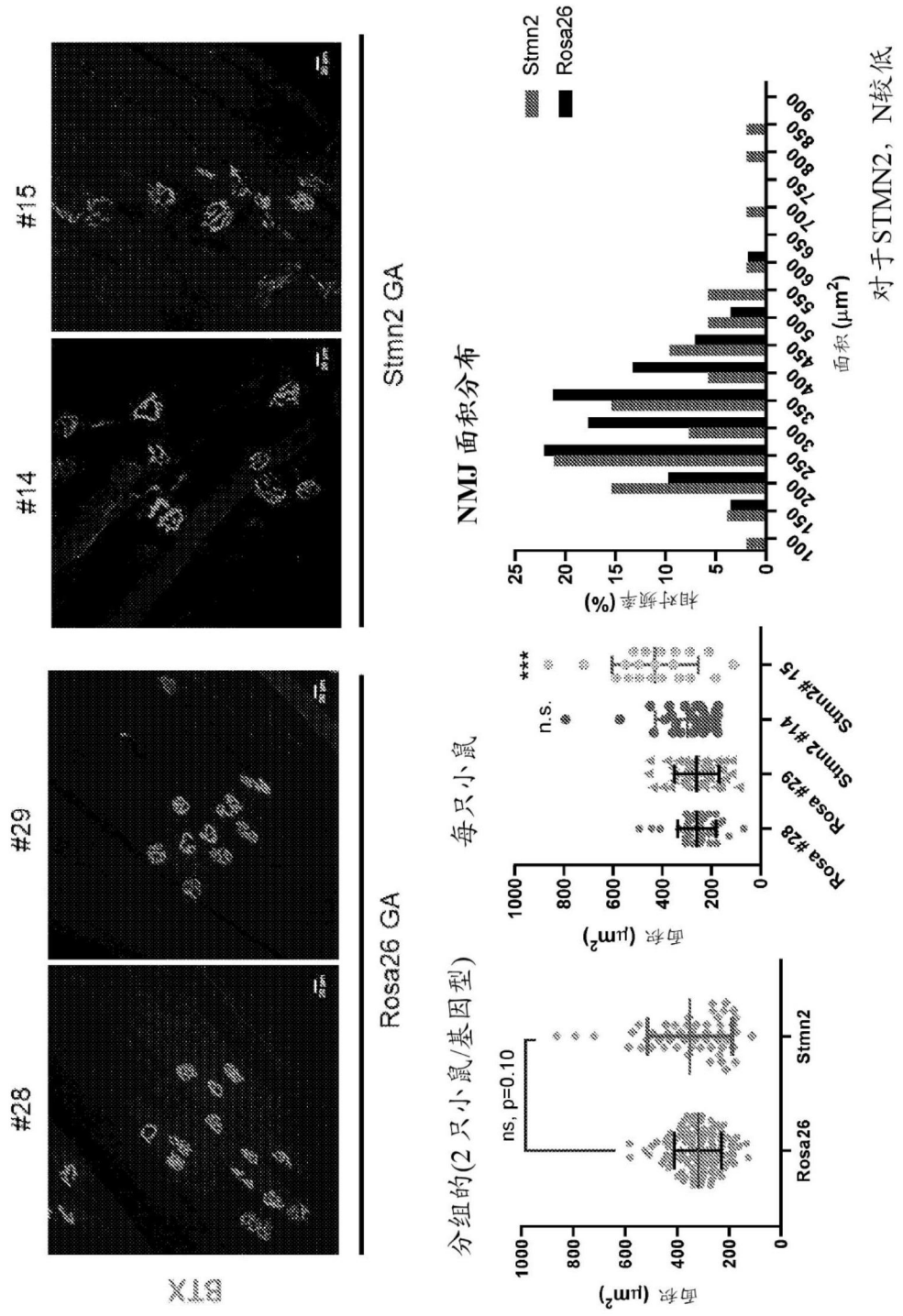

#28
#29
#14
#15
BTX
Rosa26 GA
Stmn2 GA
分组的(2 只小鼠/基因型)
每只小鼠
ns, p=0.10
面积 (μm²)
Rosa26
Stmn2
n.s.
***
Rosa #28
Rosa #29
Stmn2 #14
Stmn2# 15
NMJ 面积分布
Stmn2
Rosa26
相对频率 (%)
面积 (μm²)
对于STMN2，N较低

图58

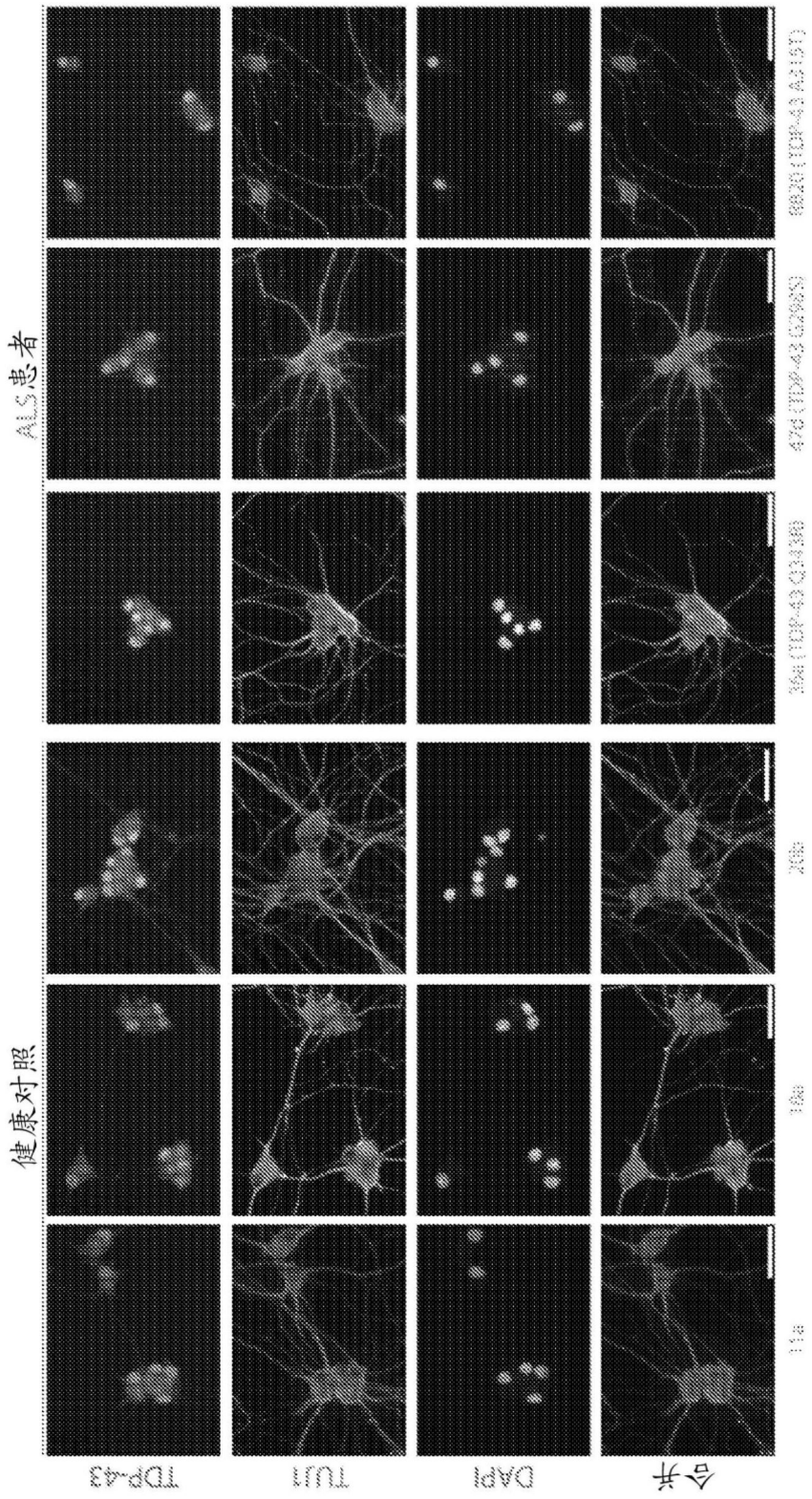

TDP-43
TUJ1
DAPI
合并
健康对照
ALS患者
11a
16a
26a
16a (TDP-43 Q343R)
47d (TDP-43 G298S)
68a (TDP-43 A315T)

图59

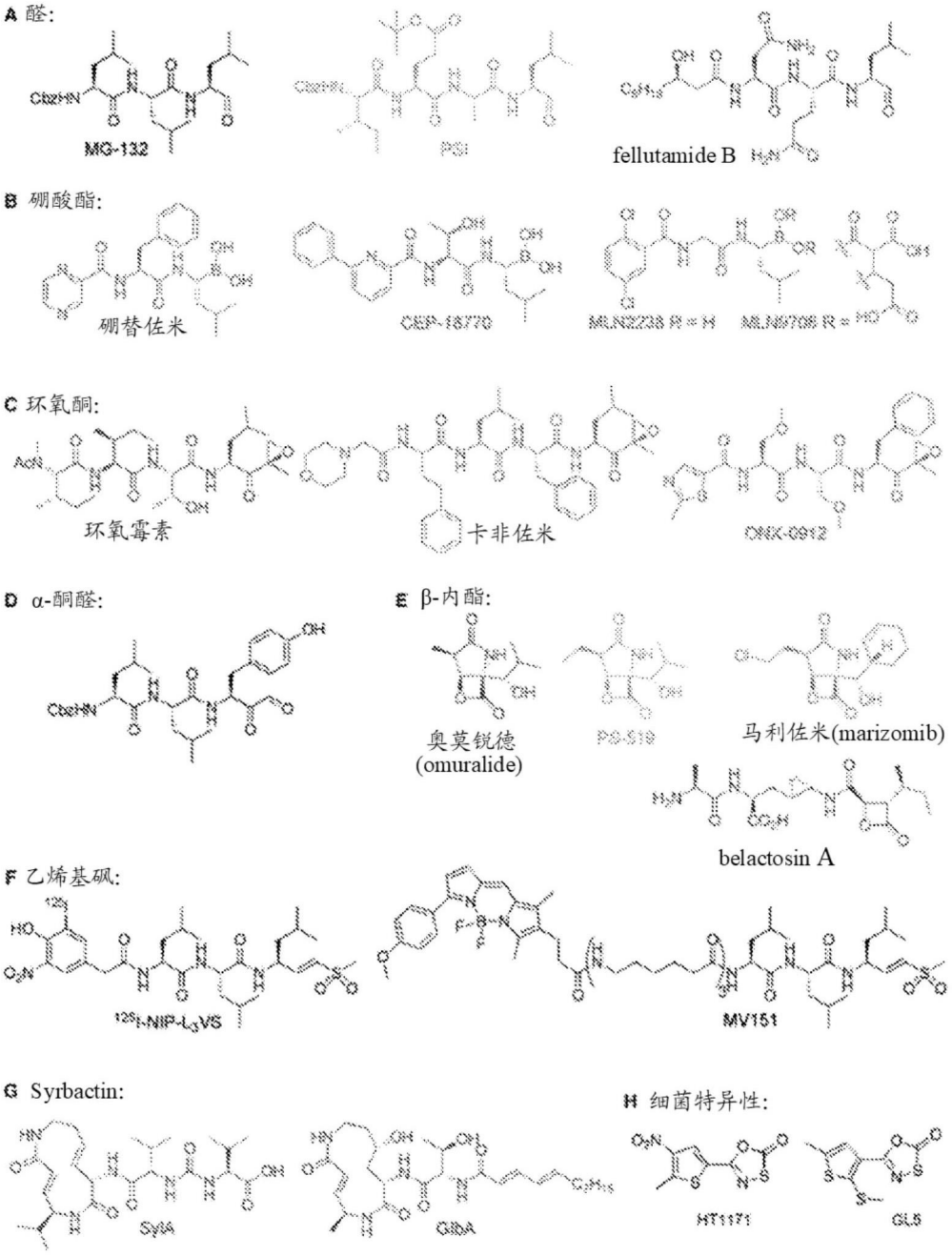

A 醛:
MG-132
PSI
fellutamide B
B 硼酸酯:
硼替佐米
CEP-18770
C 环氧酮:
环氧霉素
卡非佐米
ONX-0912
D α-酮醛:
E β-内酯:
奥莫锐德
(omuralide)
PS-519
马利佐米(marizomib)
belactosin A
F 乙烯基砜:
MV151
G Syrbactin:
SyA
GlbA
H 细菌特异性:
HT1171
GL5

图60

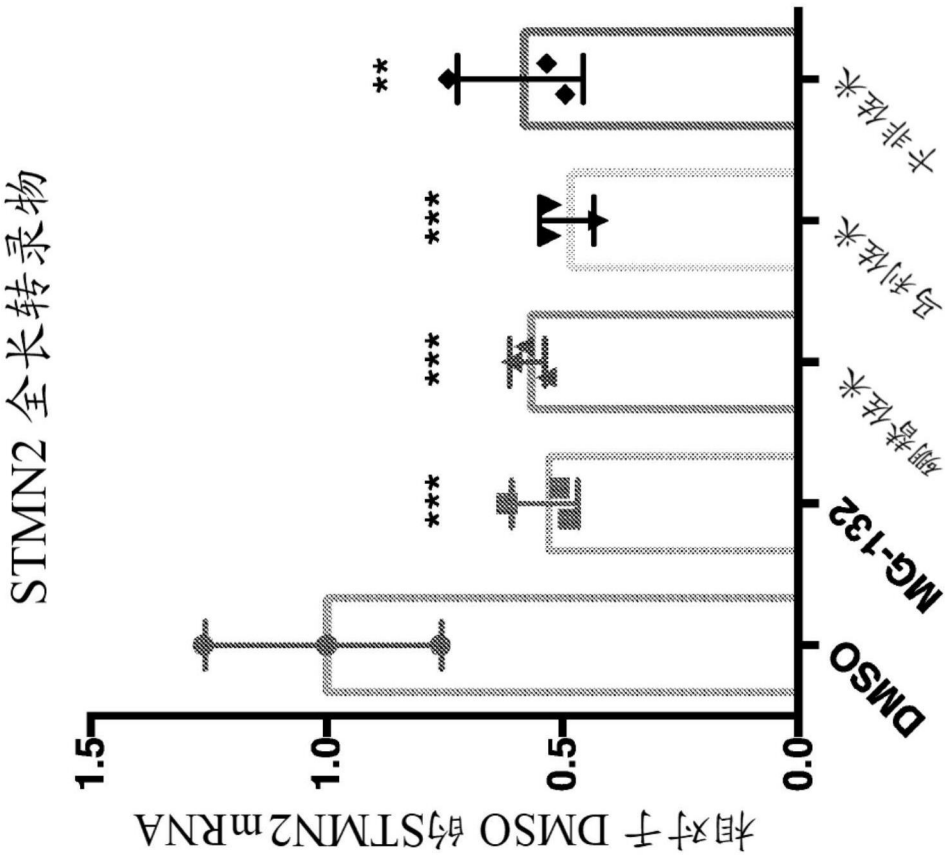

STMN2 全长转录物
相对于 DMSO 的STMN2 mRNA
1.5
1.0
0.5
0.0
DMSO
MG-132
硼替佐米
马利佐米
卡非佐米
**
***
***
***

图61

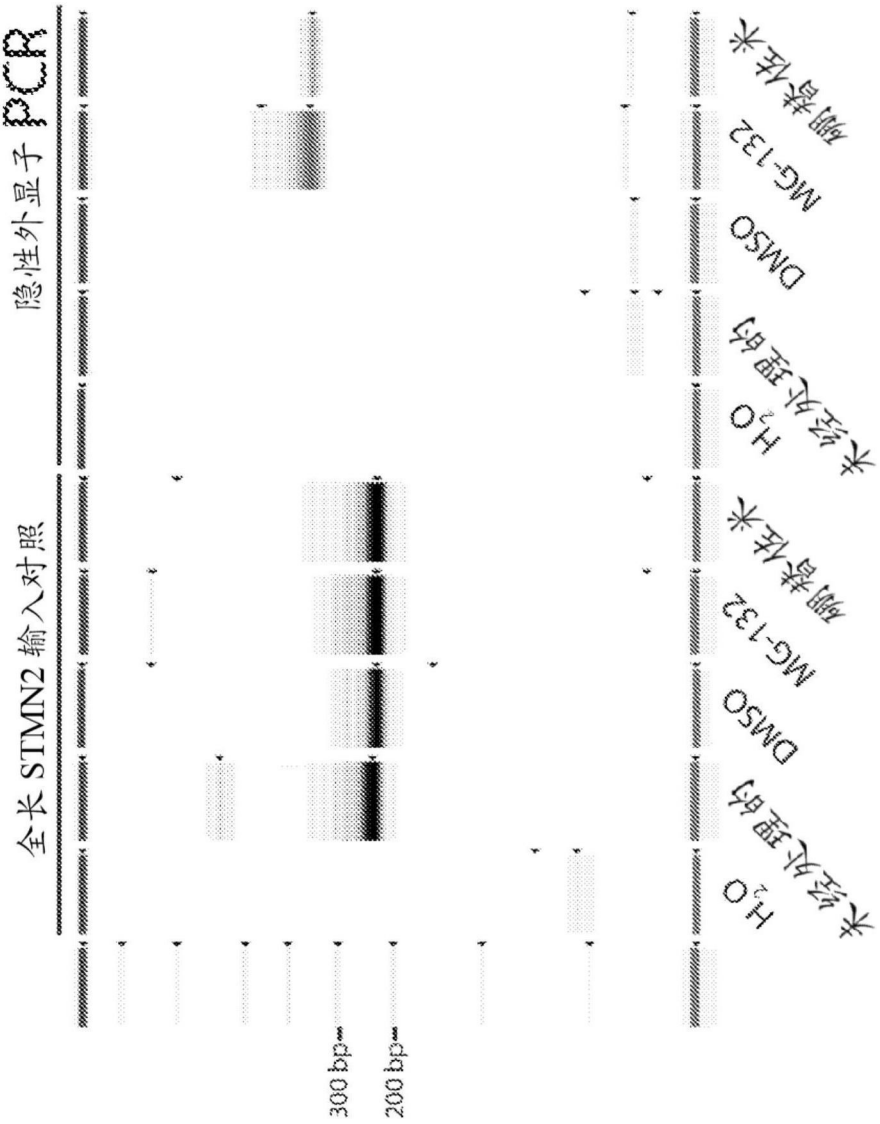

全长 STMN2 输入对照
隐性外显子 PCR
300 bp
200 bp
未经处理的
H2O
DMSO
MG-132
硼替佐米
未经处理的
H2O
DMSO
MG-132
硼替佐米

图62

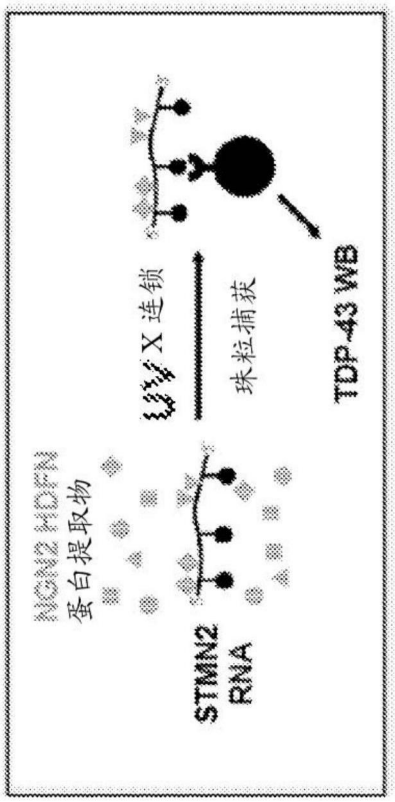


图63A

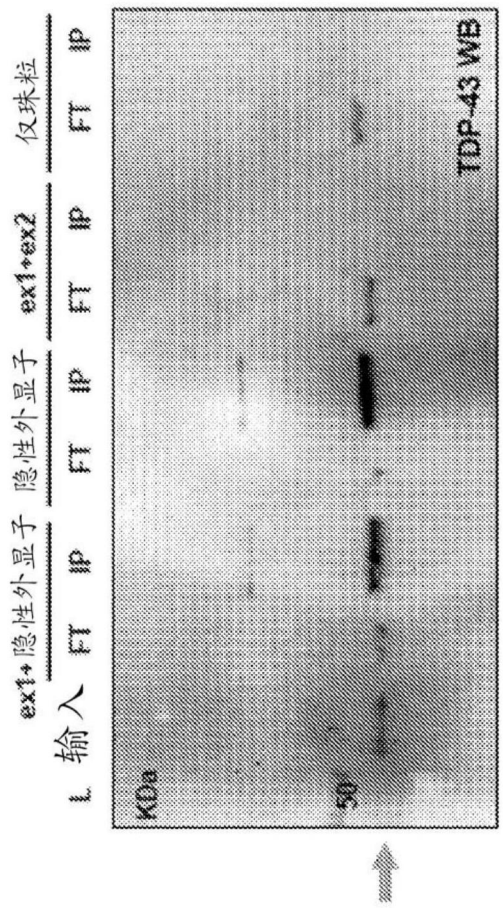

L 输入 FT IP FT IP FT IP FT IP
ex1+隐性外显子
隐性外显子
ex1+ex2
仅珠粒
KDa
50
TDP-43 WB

图63B

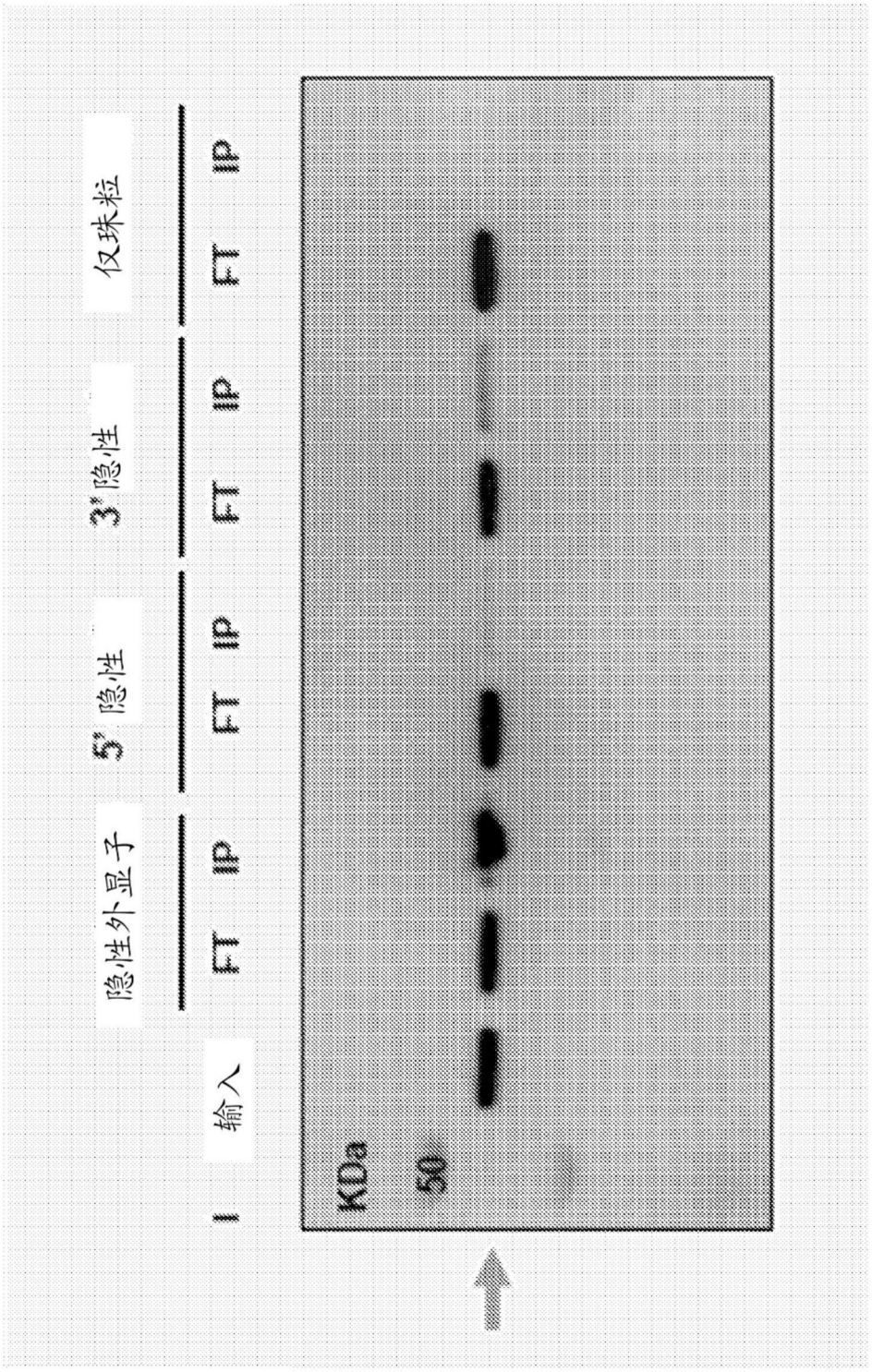


图64

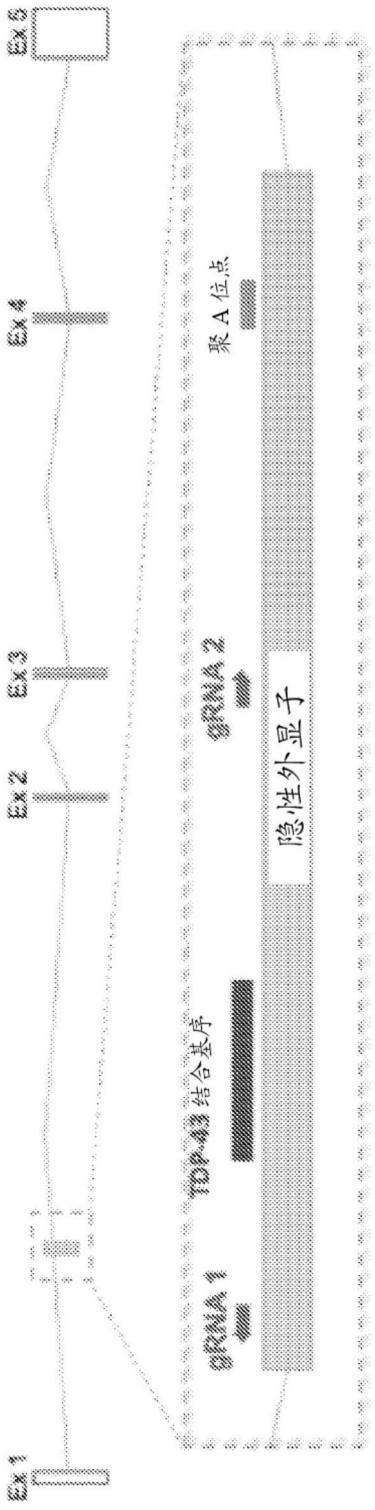


图65

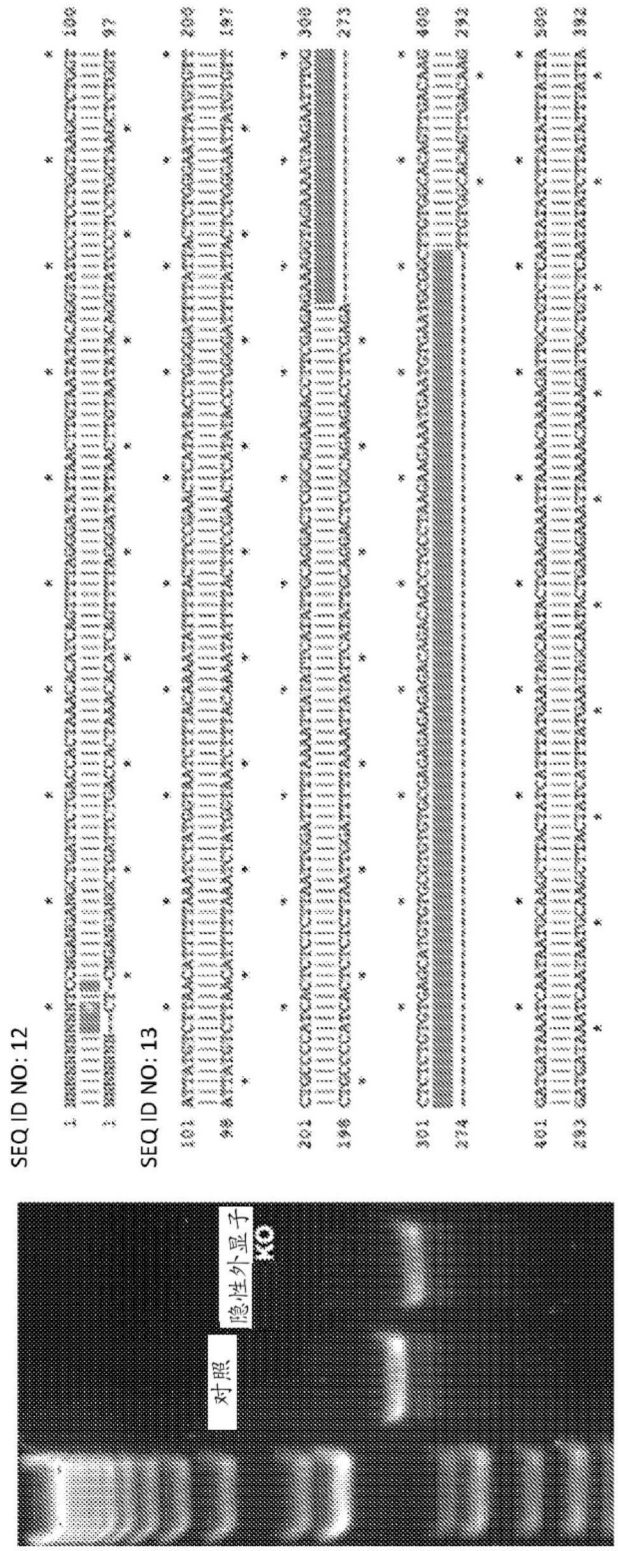


图66

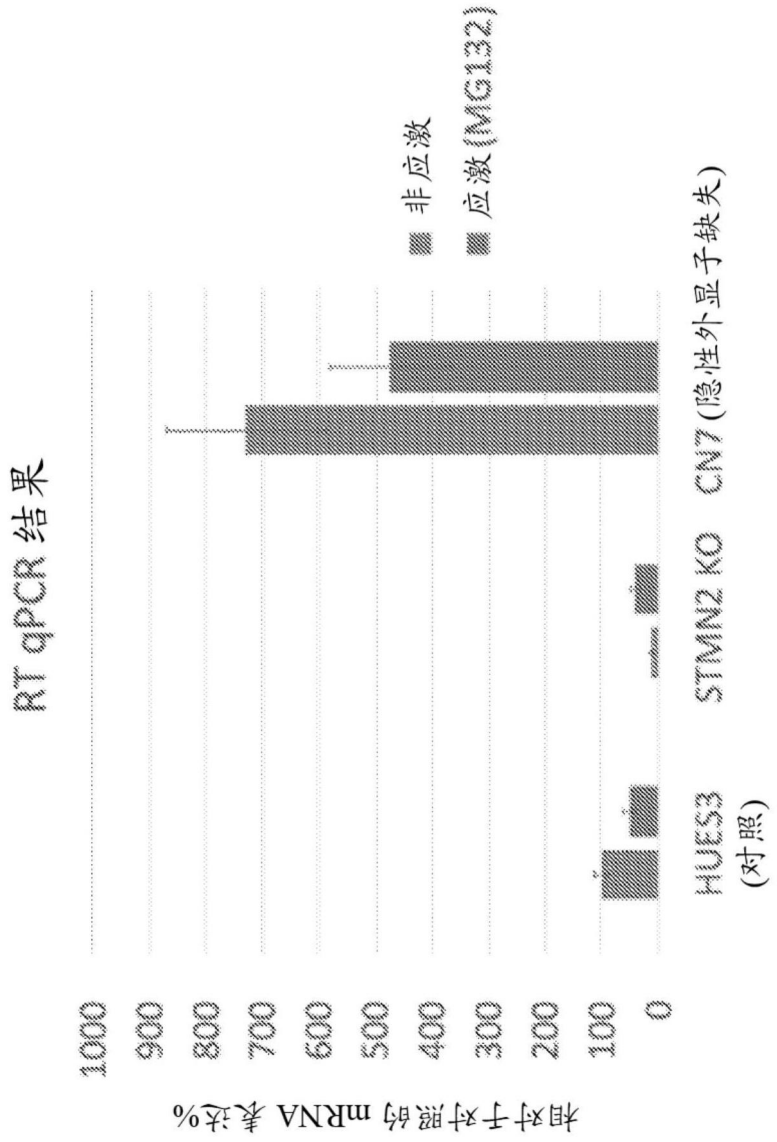

RT qPCR 结果
非应激
应激(MG132)
相对于对照的 mRNA 表达%
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
HUES3 (对照)
STMN2 KO
CN7 (隐性外显子缺失)

图67

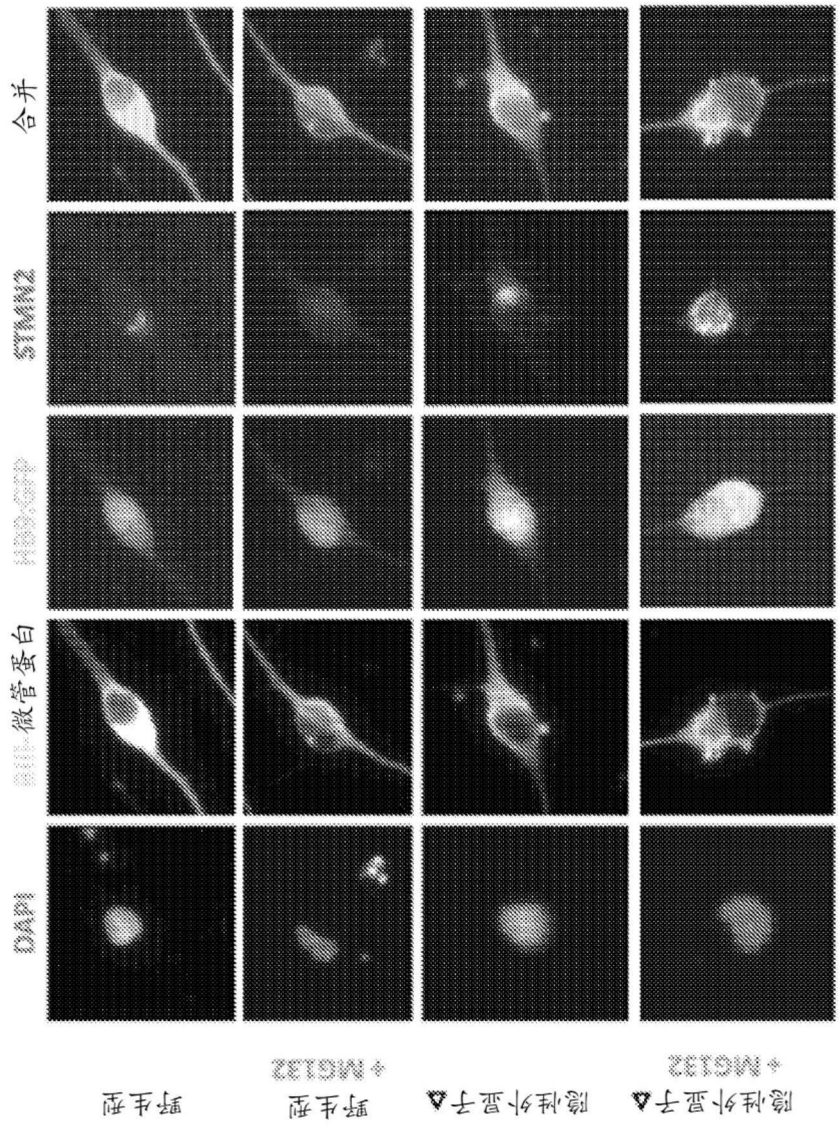


图68A

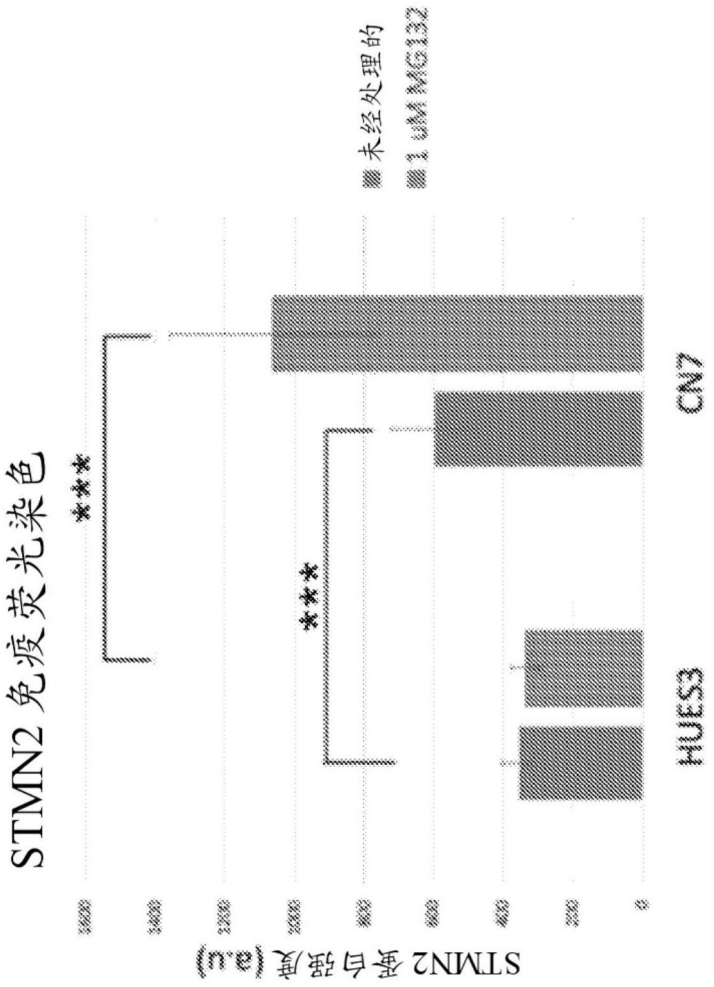

未经处理的
1 uM MG132
STMN2 免疫荧光染色
***
***
CN7
HUES3
STMN2 荧光强度 (a.u.)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0

图68B

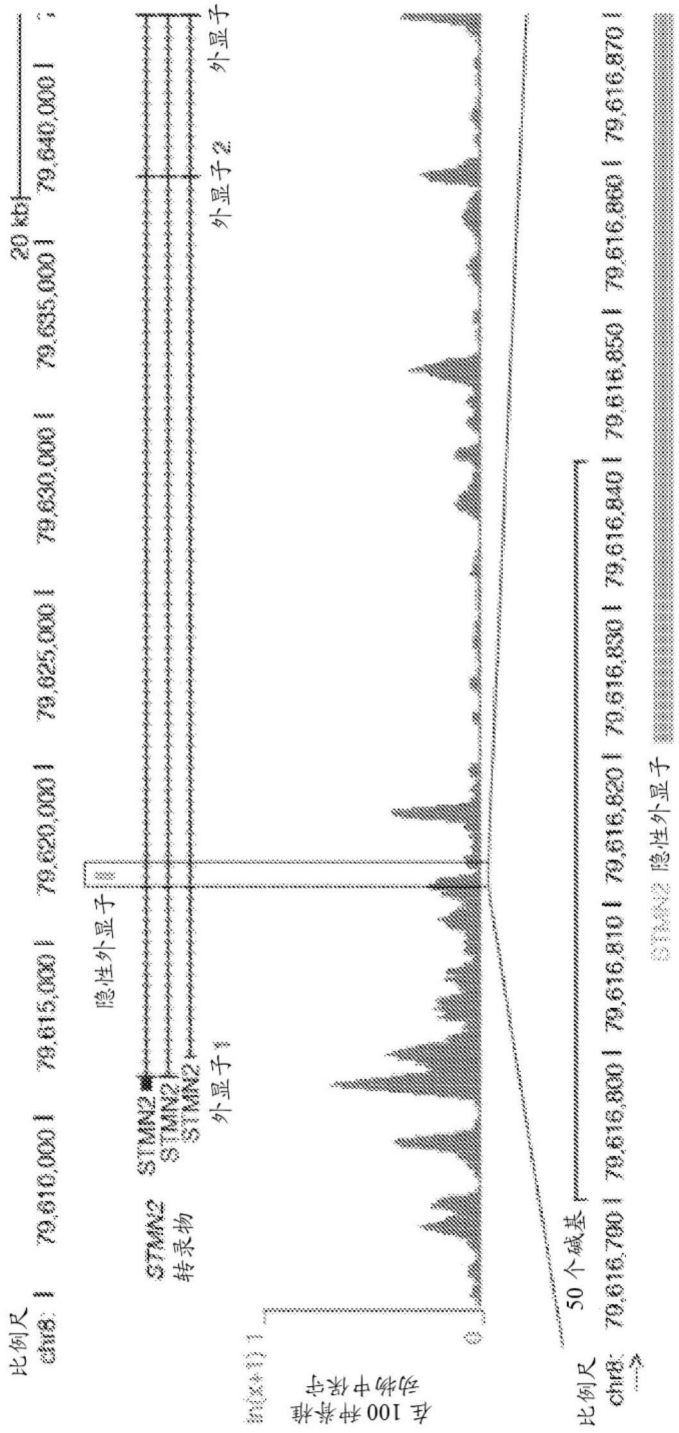

比例尺
chr8: 1
79,610,000 |
79,615,000 |
79,620,000 |
79,625,000 |
79,630,000 |
79,635,000 |
79,640,000 |
20 kb
隐性外显子
STMN2
转录物
STMN2
STMN2
外显子 1
外显子 2
外显子
在 100 种脊椎
动物中保守
比例尺
chr8:
79,616,790 |
79,616,800 |
79,616,810 |
79,616,820 |
79,616,830 |
79,616,840 |
79,616,850 |
79,616,860 |
79,616,870 |
50 个碱基
STMN2 隐性外显子

图69A

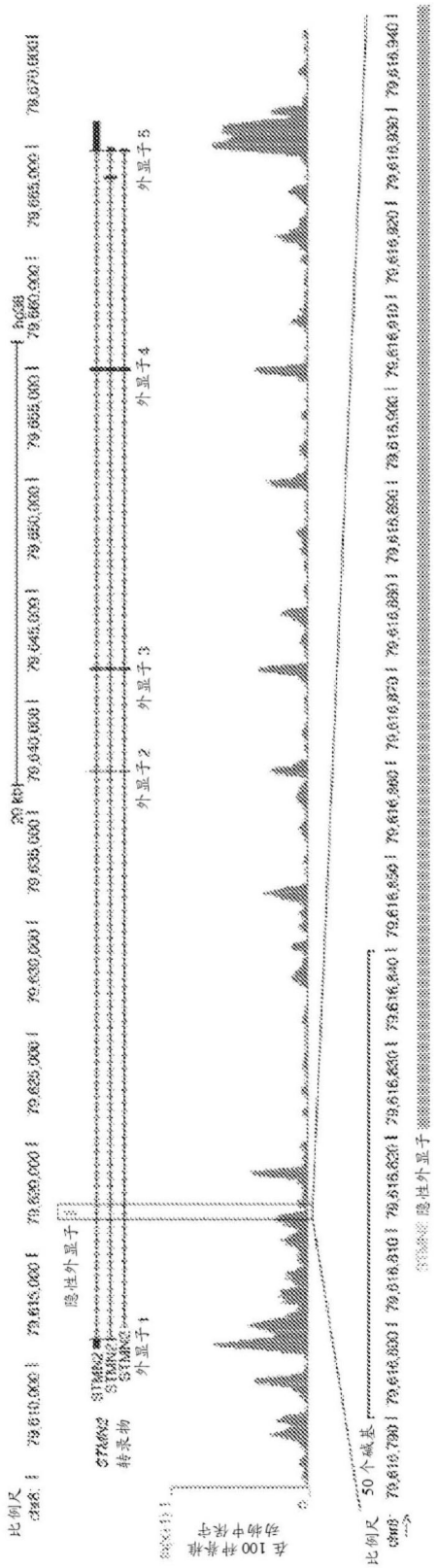

隐性外显子
外显子 1
外显子 2
外显子 3
外显子 4
外显子 5
转录物
在 100 种脊椎动物中保守
50 个碱基
隐性外显子

图69A续

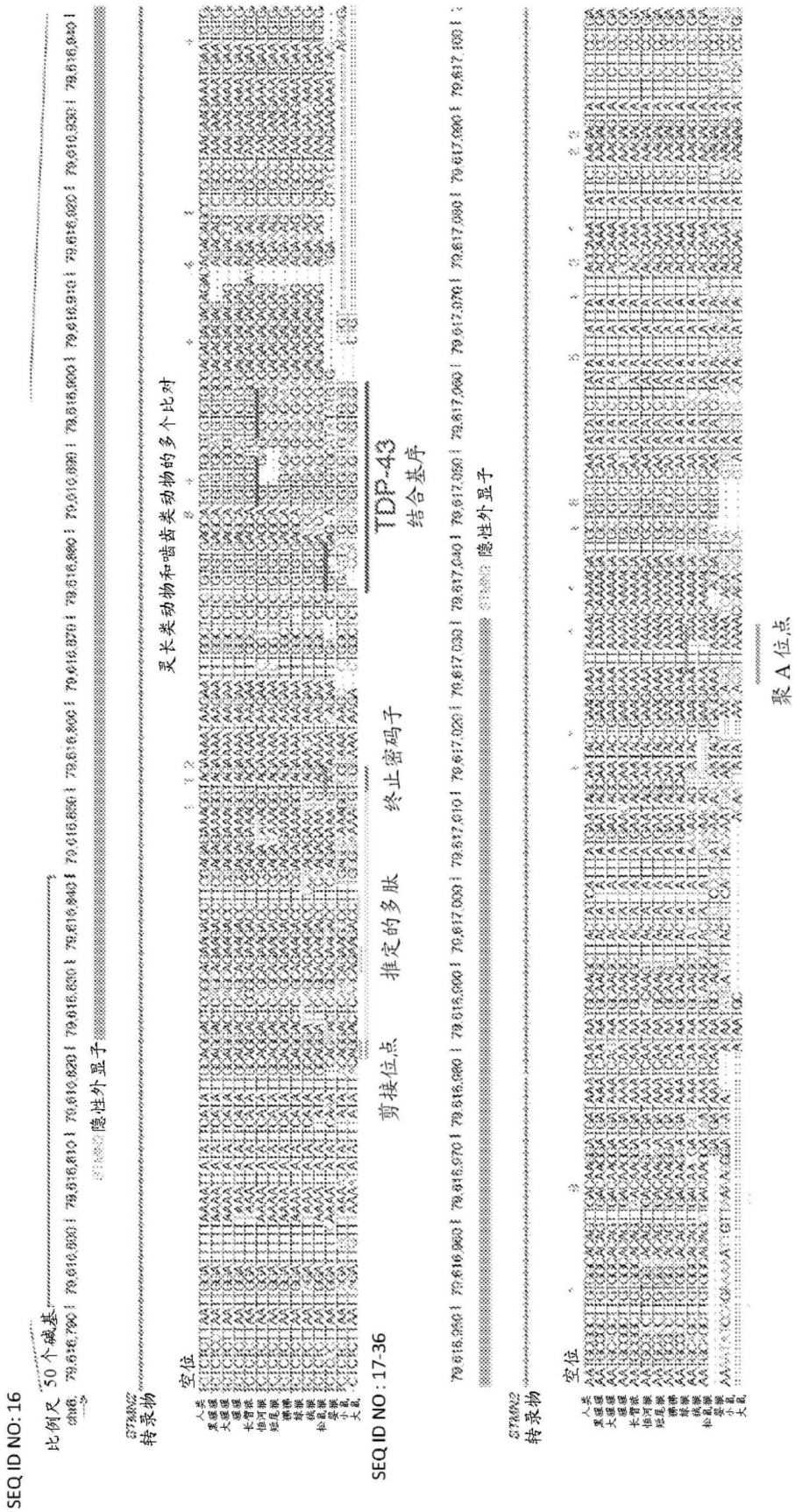

SEQ ID NO: 16
比例尺 50 个碱基
隐性外显子
转录物
空位
灵长类动物和啮齿类动物的多个比对
SEQ ID NO : 17-36
剪接位点
推定的多肽
终止密码子
TDP-43
结合基序
隐性外显子
转录物
空位
聚 A 位点

图69B

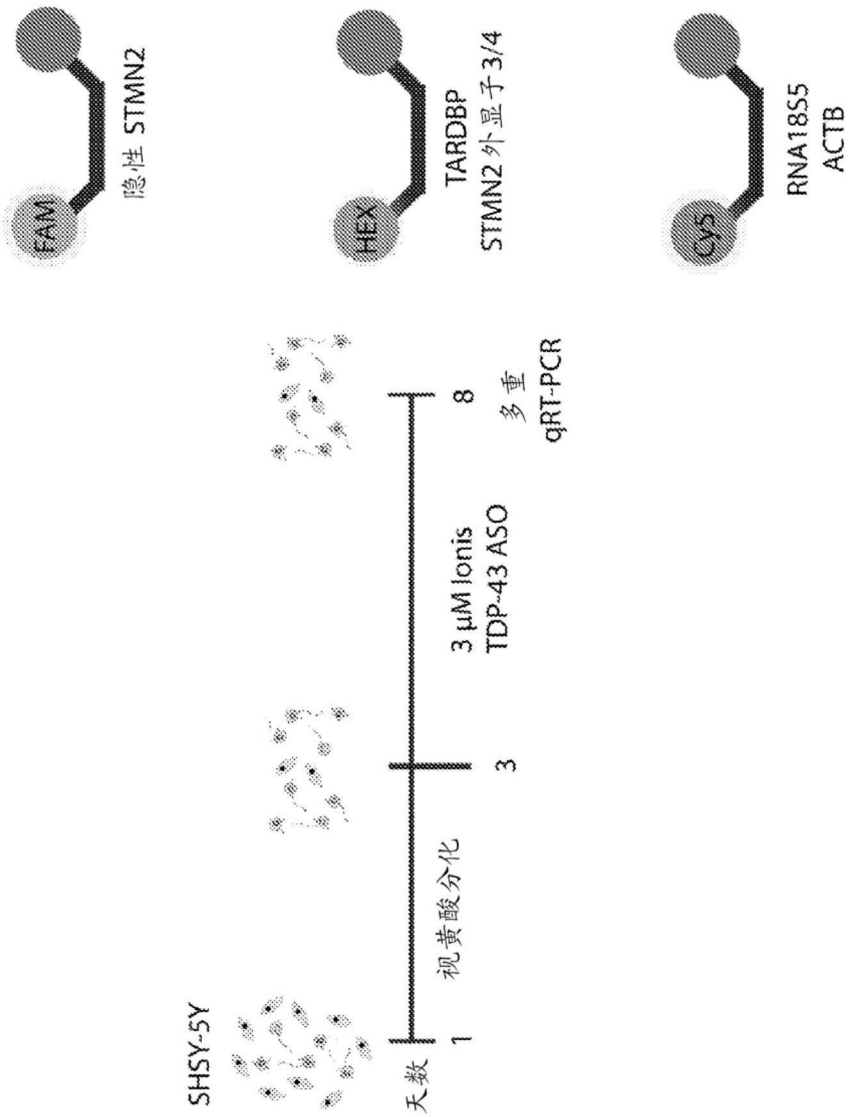

FAM
隐性 STMN2
HEX
TARDBP
STMN2 外显子3/4
Cy5
RNA18S5
ACTB
SHSY-5Y
天数
1
视黄酸分化
3
3 μM Ionis
TDP-43 ASO
8
多重
qRT-PCR

图70

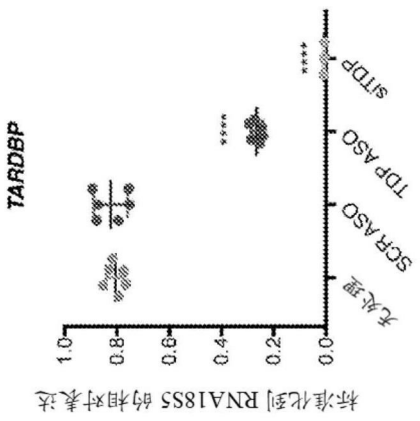

TARDBP
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
****
****
未处理
SCR ASO
TDP ASO
siTDP
标准化到 RNA18S5 的相对表达

图71A

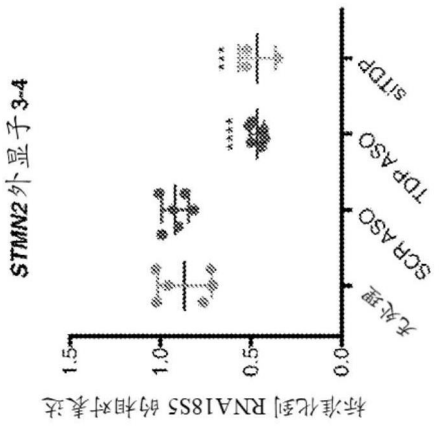

STMN2外显子3-4
标准化到 RNA18S5 的相对表达
1.5
1.0
0.5
0.0
无处置
SCR ASO
TDP ASO
siTDP
****
***

图71B

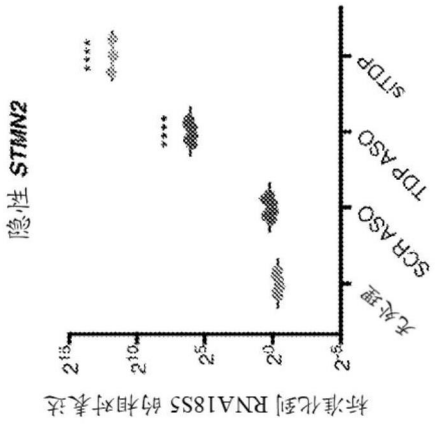

隐性 STMN2
标准化到 RNA18S5 的相对表达
2^{15}
2^{10}
2^{5}
2^{0}
2^{-5}
无处置
SCR ASO
TDP ASO
siTDP
****
****

图71C

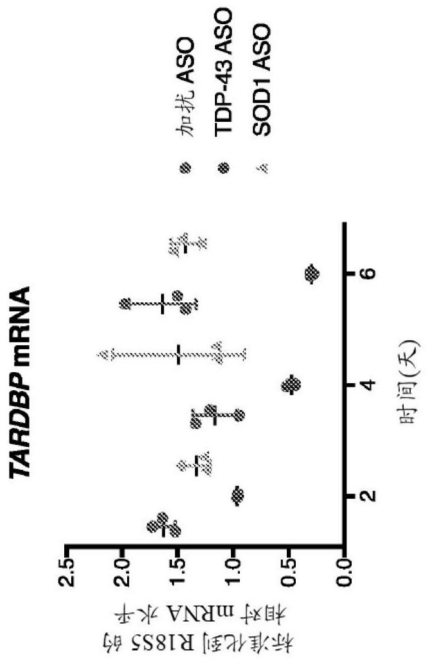

TARDBP mRNA
加扰 ASO
TDP-43 ASO
SOD1 ASO
标准化到 R18S5 的
相对 mRNA 水平
时间(天)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
2
4
6

图72A

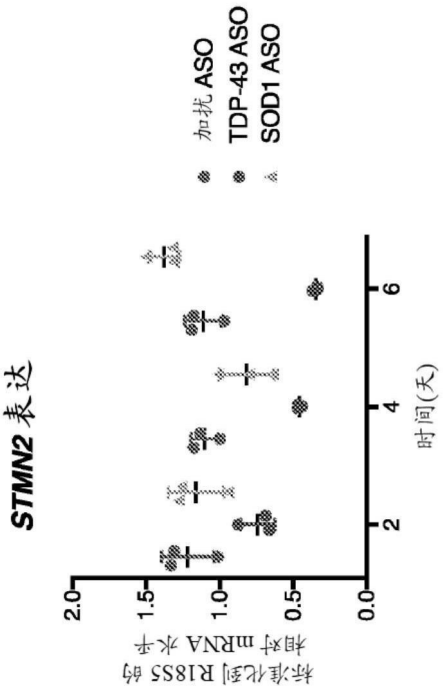

STMN2 表达
加扰 ASO
TDP-43 ASO
SOD1 ASO
标准化到 R18S5 的
相对 mRNA 水平
时间(天)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2
4
6

图72B

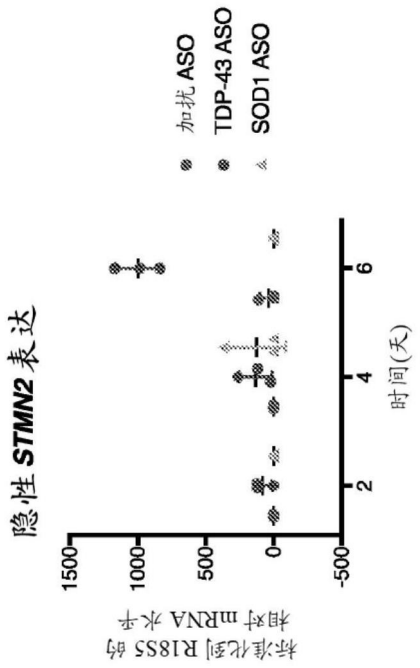

隐性 STMN2 表达
标准化到 R18S5 的
相对 mRNA 水平
1500
1000
500
0
-500
2
4
6
时间(天)
加扰 ASO
TDP-43 ASO
SOD1 ASO

图72C

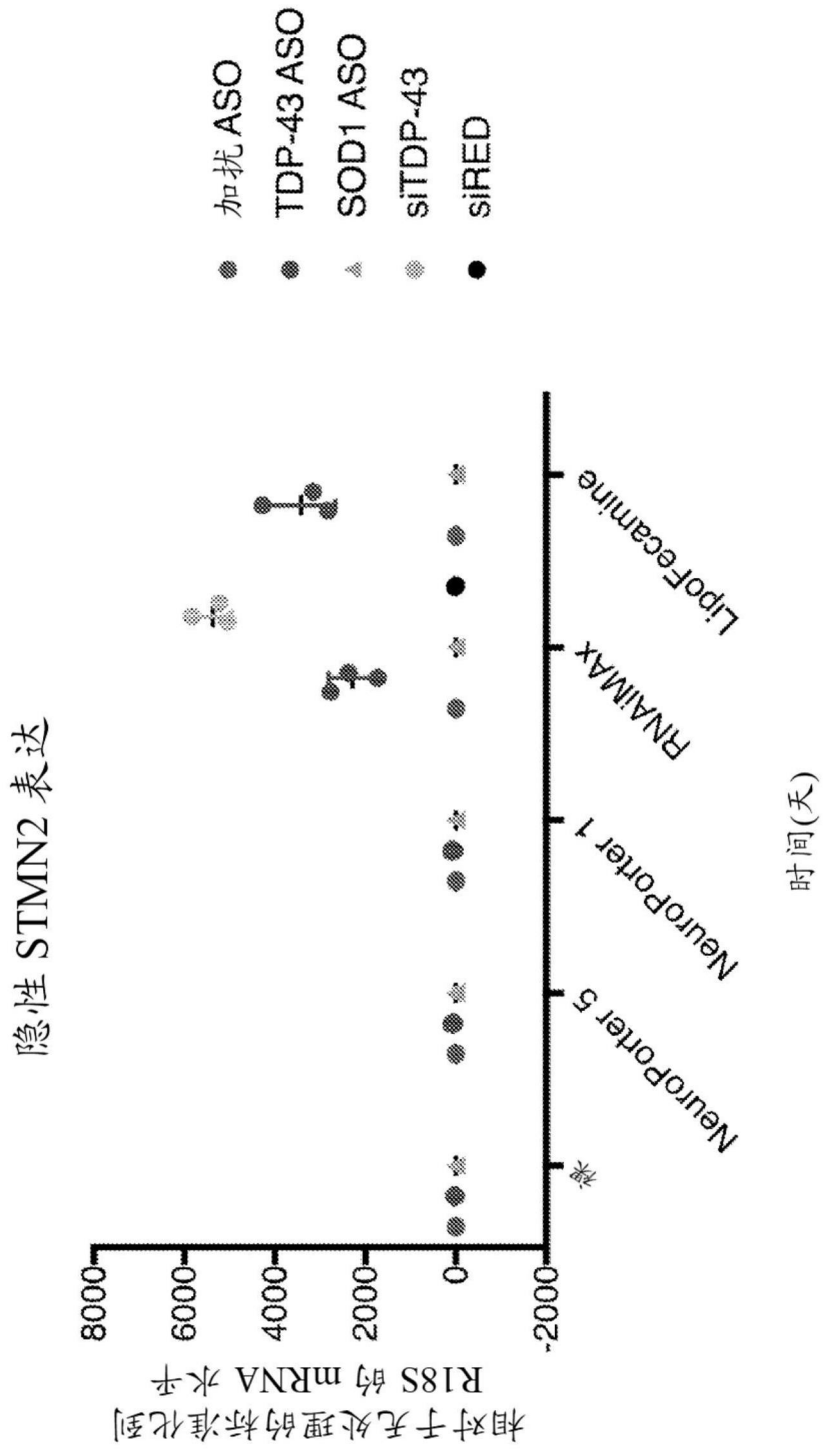

加扰 ASO
TDP-43 ASO
SOD1 ASO
siTDP-43
siRED
隐性 STMN2 表达
相对于无处理的标准化到
R18S 的 mRNA 水平
8000
6000
4000
2000
0
-2000
*
NeuroPorter 5
NeuroPorter 1
RNAiMAX
LipoFecamine
时间(天)

图73

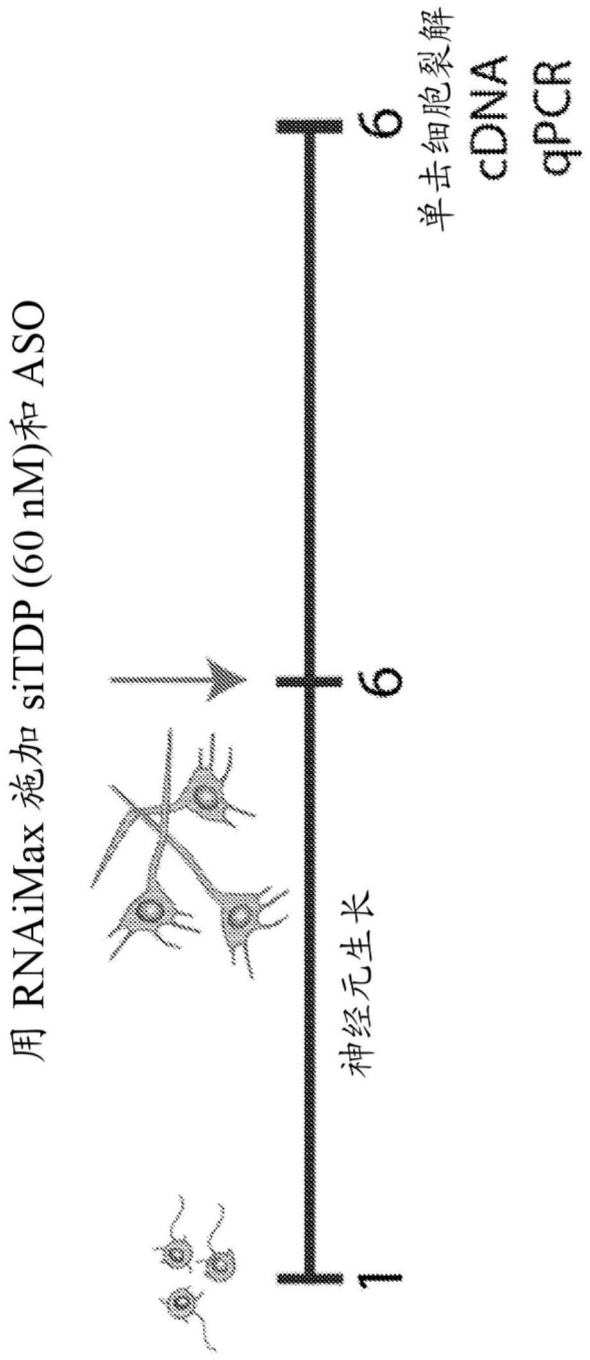


图74

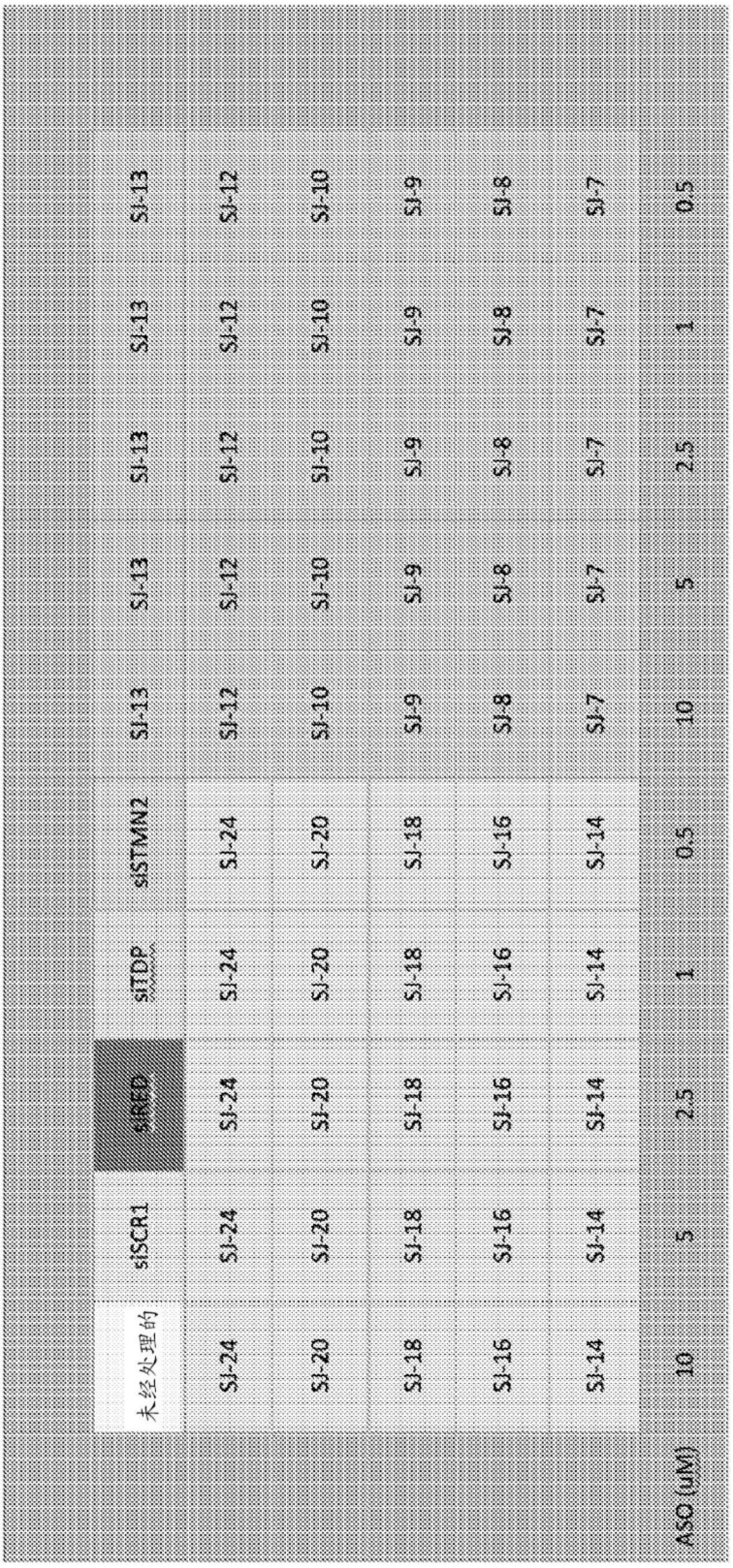

未经处理的
siSCR1
siRED
siTDP
siSTMN2
SJ-24
SJ-20
SJ-18
SJ-16
SJ-14
SJ-13
SJ-12
SJ-10
SJ-9
SJ-8
SJ-7
ASO (uM)
10
5
2.5
1
0.5
10
5
2.5
1
0.5

图75A

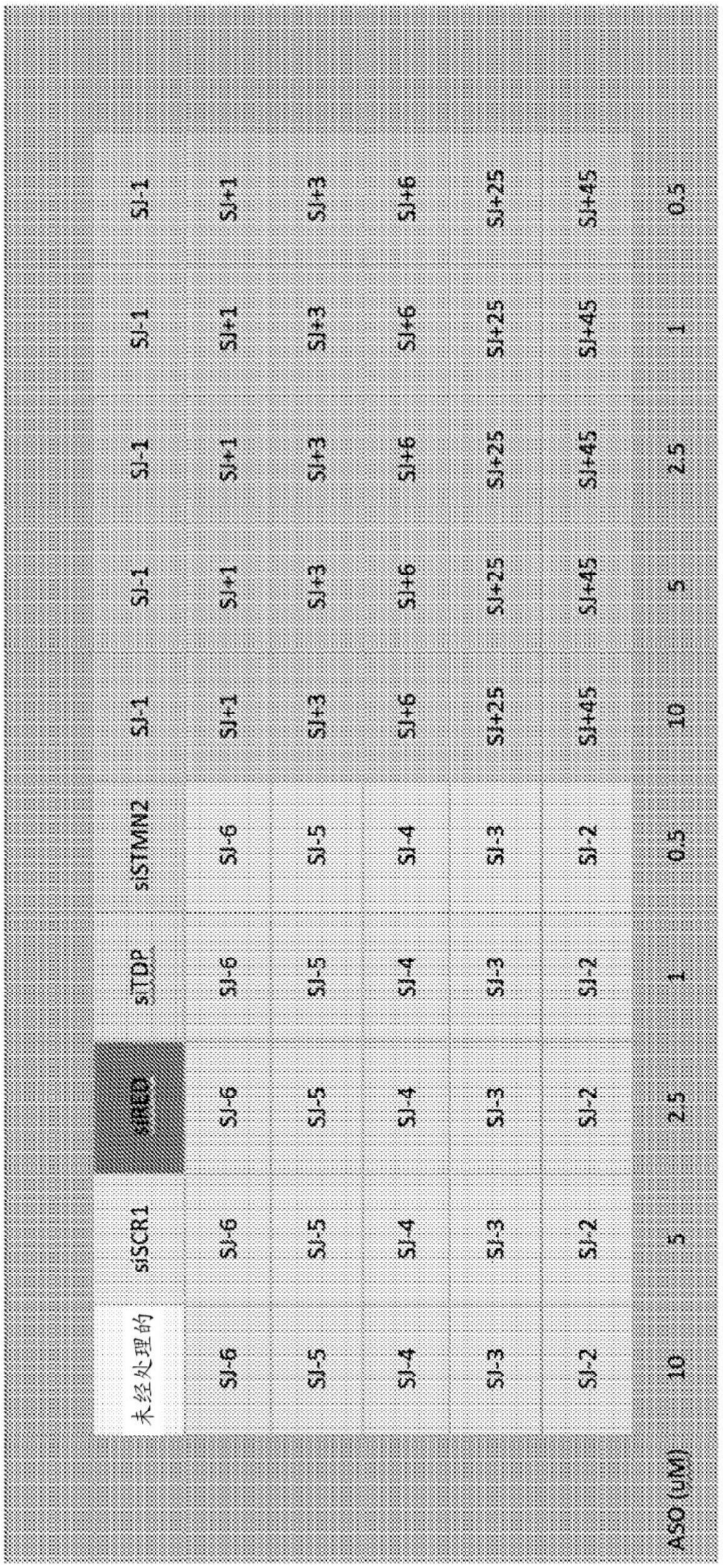

未经处理的
siSCR1
siRED3
siTDP
siSTMN2
SJ-6
SJ-5
SJ-4
SJ-3
SJ-2
SJ-1
SJ+1
SJ+3
SJ+6
SJ+25
SJ+45
ASO (uM)
10
5
2.5
1
0.5
2.5
1
0.5

图75B

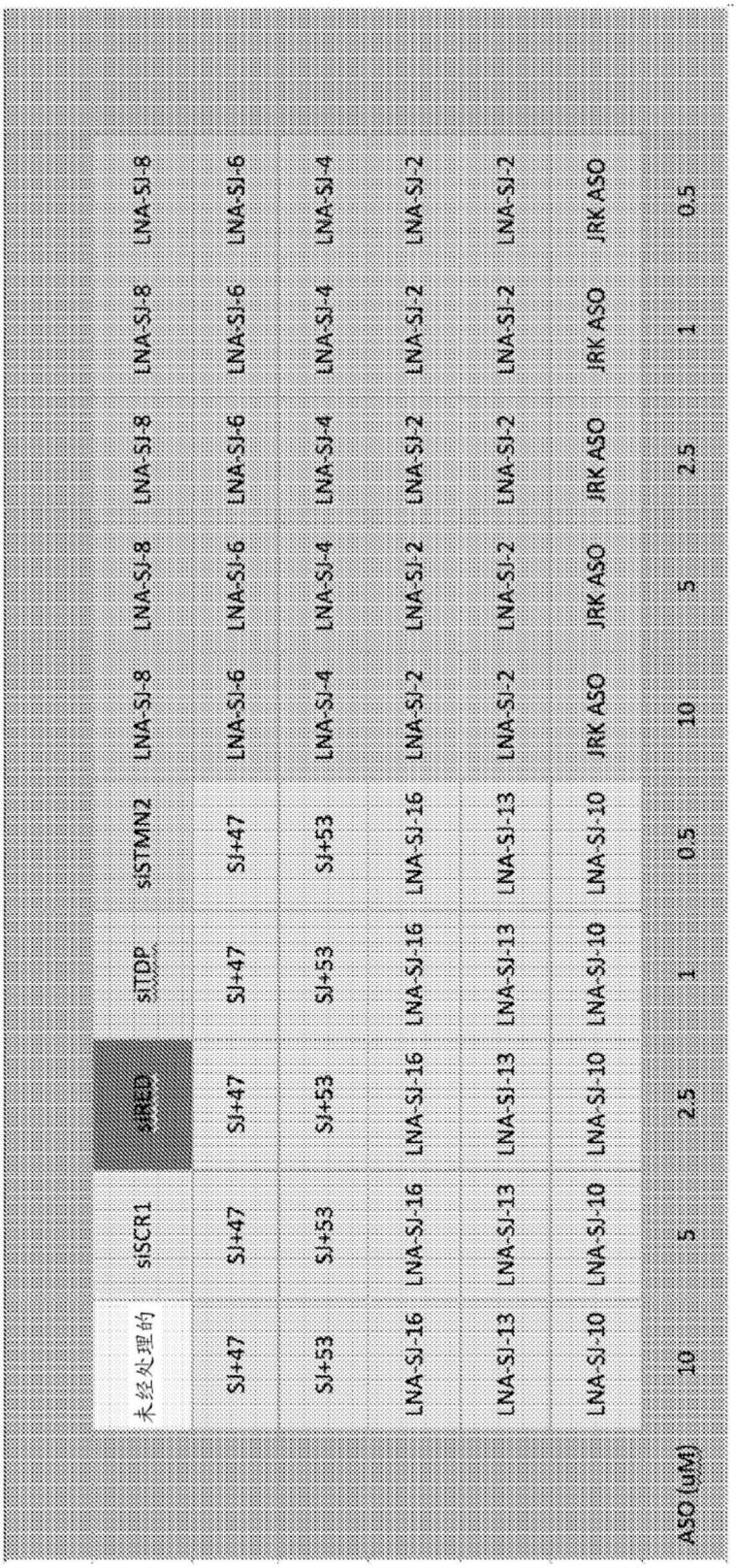

未经处理的
siSCR1
siRED3
siTDP
siSTMN2
ASO (uM)
10
5
2.5
1
0.5
SJ+47
SJ+53
LNA-SJ-16
LNA-SJ-13
LNA-SJ-10
LNA-SJ-8
LNA-SJ-6
LNA-SJ-4
LNA-SJ-2
JRK ASO

图75C

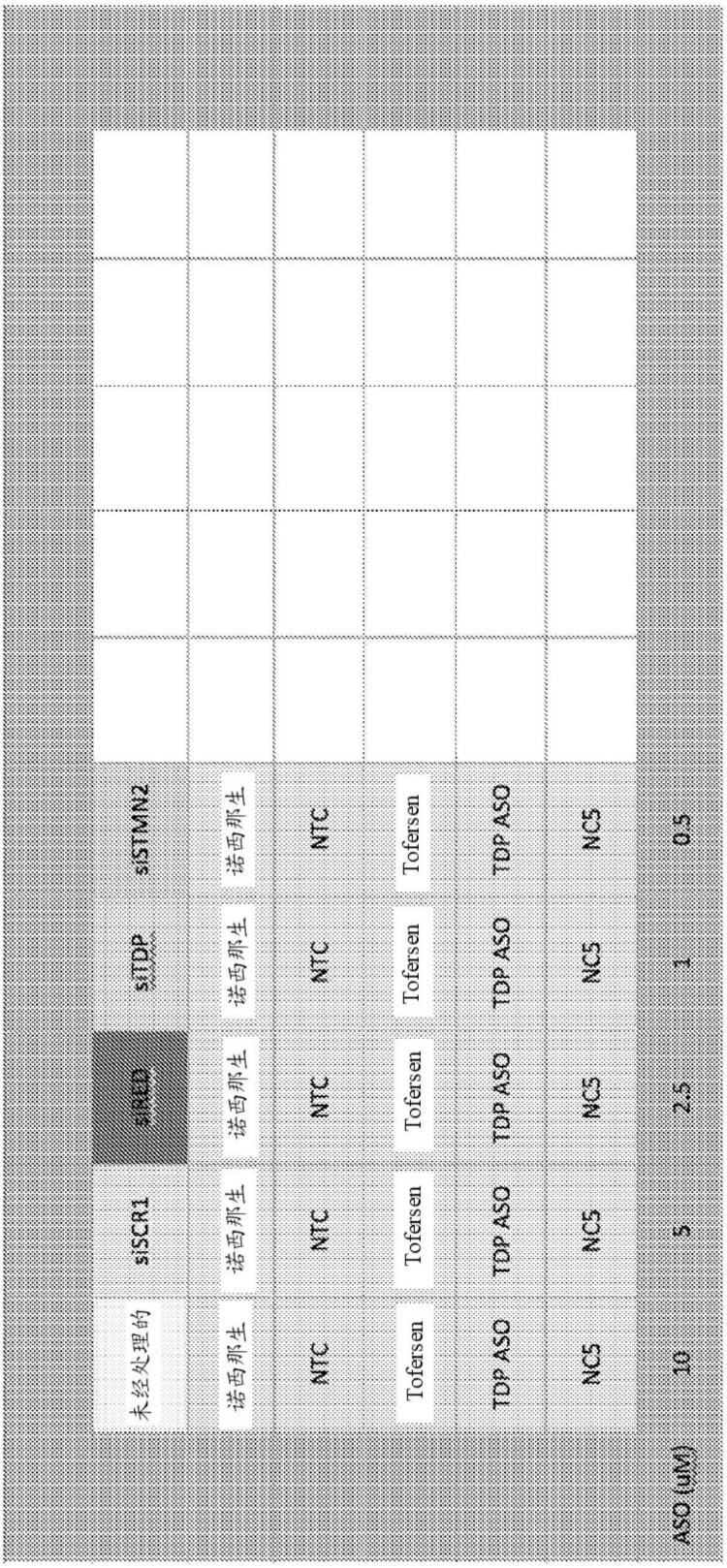

未经处理的
siSCR1
siRED
siTDP
siSTMN2
ASO (uM)
10
5
2.5
1
0.5
诺西那生
NTC
Tofersen
TDP ASO
NC5

图75D

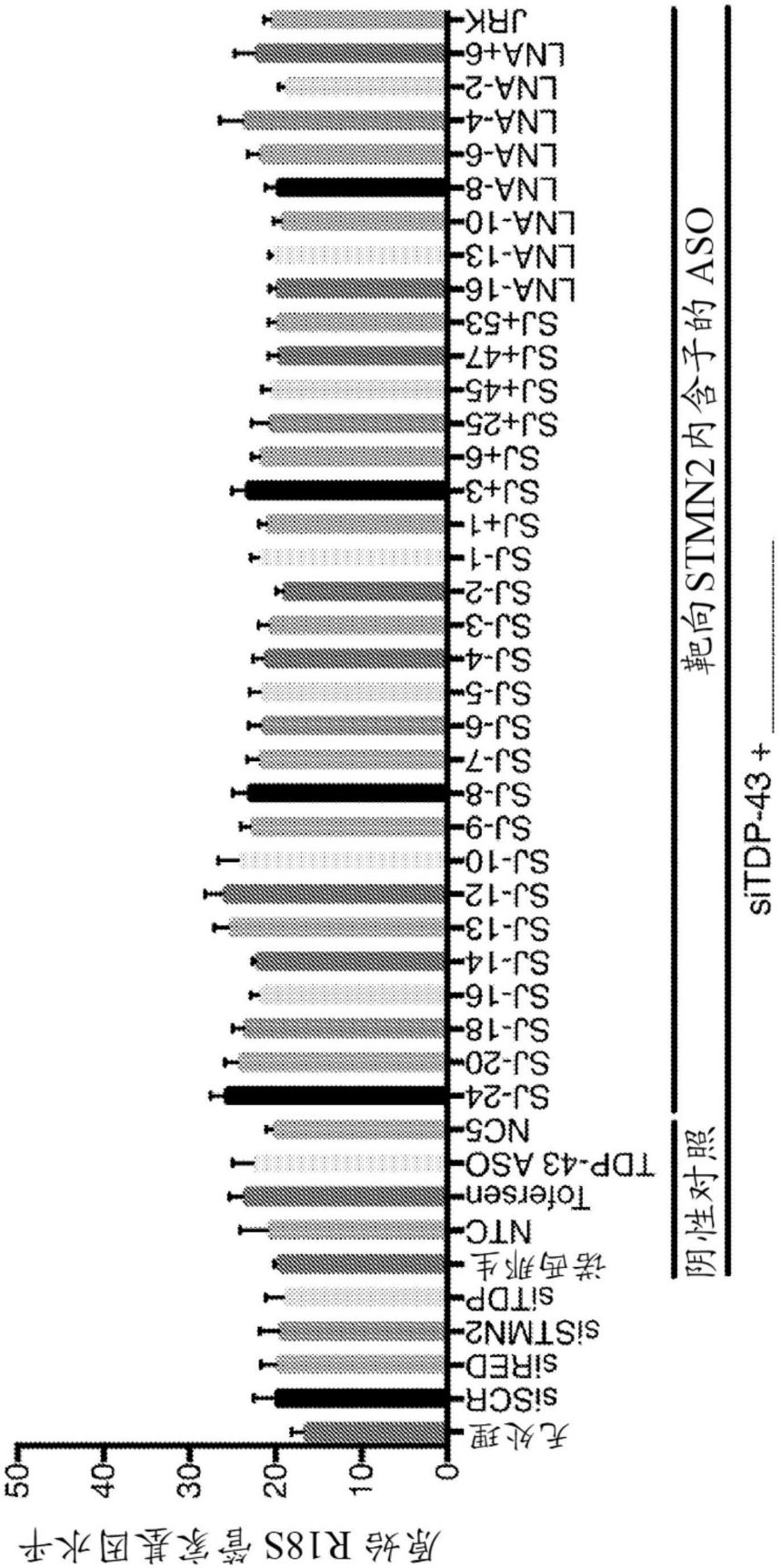

原始 R18S 管家基因水平
0
10
20
30
40
50
无处理
siSCR
siRED
siSTMN2
siTDP
诺西那生
NTC
Tofersen
TDP-43 ASO
NC5
SJ-24
SJ-20
SJ-18
SJ-16
SJ-14
SJ-13
SJ-12
SJ-10
SJ-9
SJ-8
SJ-7
SJ-6
SJ-5
SJ-4
SJ-3
SJ-2
SJ-1
SJ+1
SJ+3
SJ+6
SJ+25
SJ+45
SJ+47
SJ+53
LNA-16
LNA-13
LNA-10
LNA-8
LNA-6
LNA-4
LNA-2
LNA+6
JRK
阴性对照
靶向STMN2内含子的 ASO
siTDP-43 +

图76

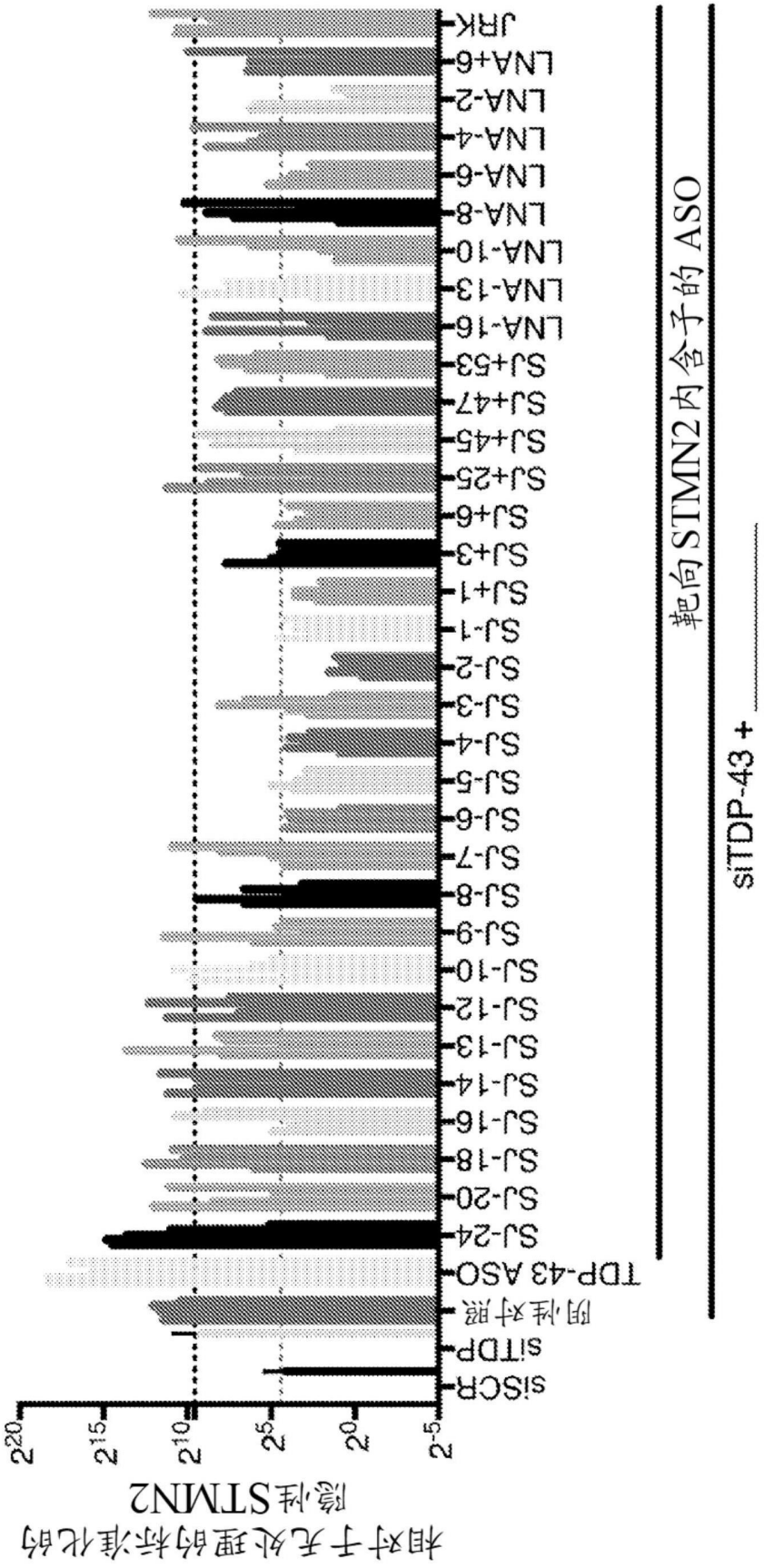

相对于无处理的标准化的
隐性STMN2
2^{20}
2^{15}
2^{10}
2^{5}
2^{0}
2^{-5}
siSCR
siTDP
阴性对照
TDP-43 ASO
SJ-24
SJ-20
SJ-18
SJ-16
SJ-14
SJ-13
SJ-12
SJ-10
SJ-9
SJ-8
SJ-7
SJ-6
SJ-5
SJ-4
SJ-3
SJ-2
SJ-1
SJ+1
SJ+3
SJ+6
SJ+25
SJ+45
SJ+47
SJ+53
LNA-16
LNA-13
LNA-10
LNA-8
LNA-6
LNA-4
LNA-2
LNA+6
JRK
siTDP-43 + _____
靶向STMN2内含子的 ASO

图77

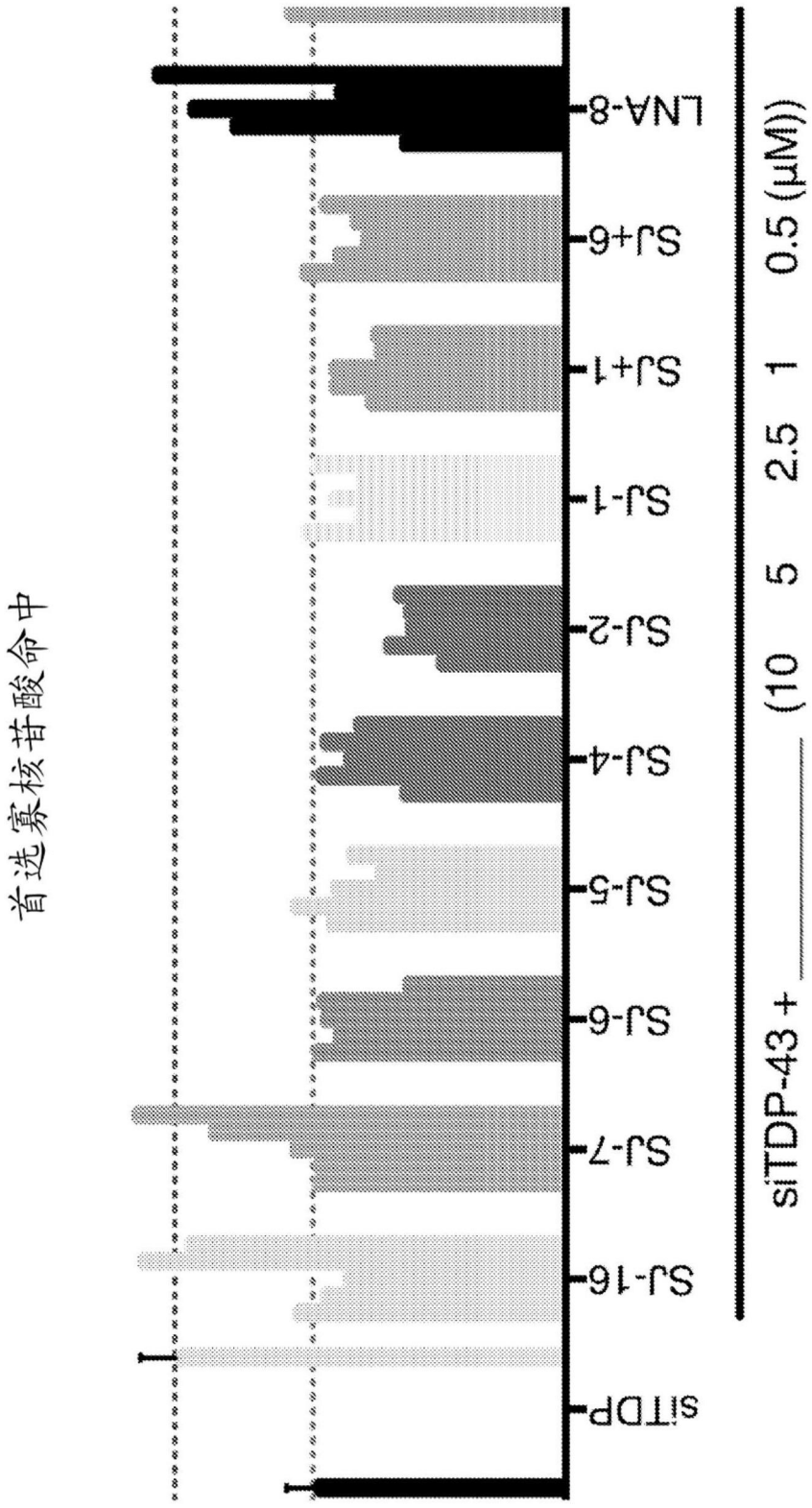

首选寡核苷酸命中
siTDP
SJ-16
SJ-7
SJ-6
SJ-5
SJ-4
SJ-2
SJ-1
SJ+1
SJ+6
LNA-8
siTDP-43 + _____ (10 5 2.5 1 0.5 (μM))

图78

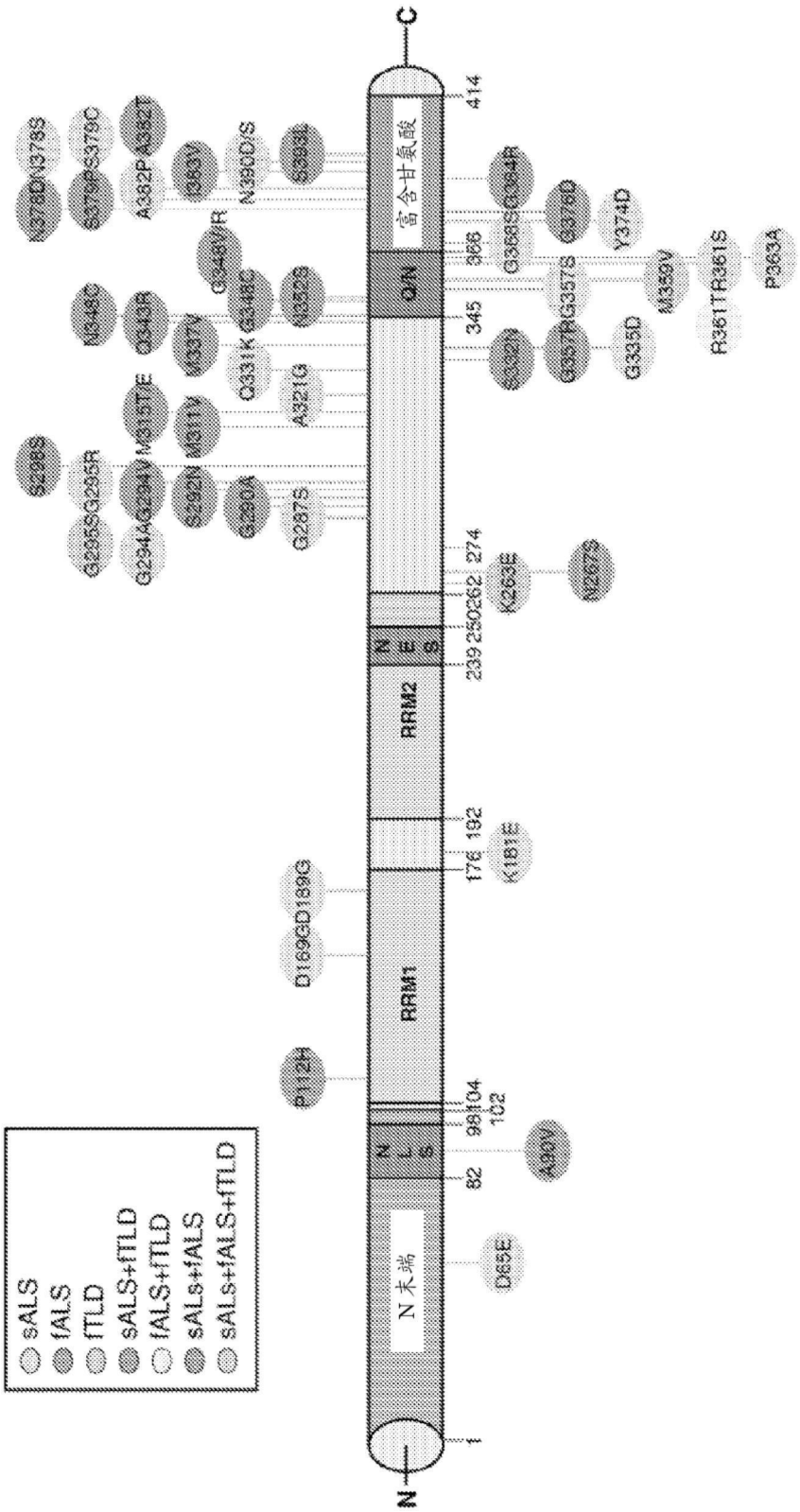

C
N
1
82
98
104
102
176
192
239
250
262
274
345
368
414
N末端
NLS
RRM1
RRM2
NES
QN
富含甘氨酸
sALS
fALS
fTLD
sALS+fTLD
fALS+fTLD
sALs+fALS
sALs+fALS+fTLD

图79A

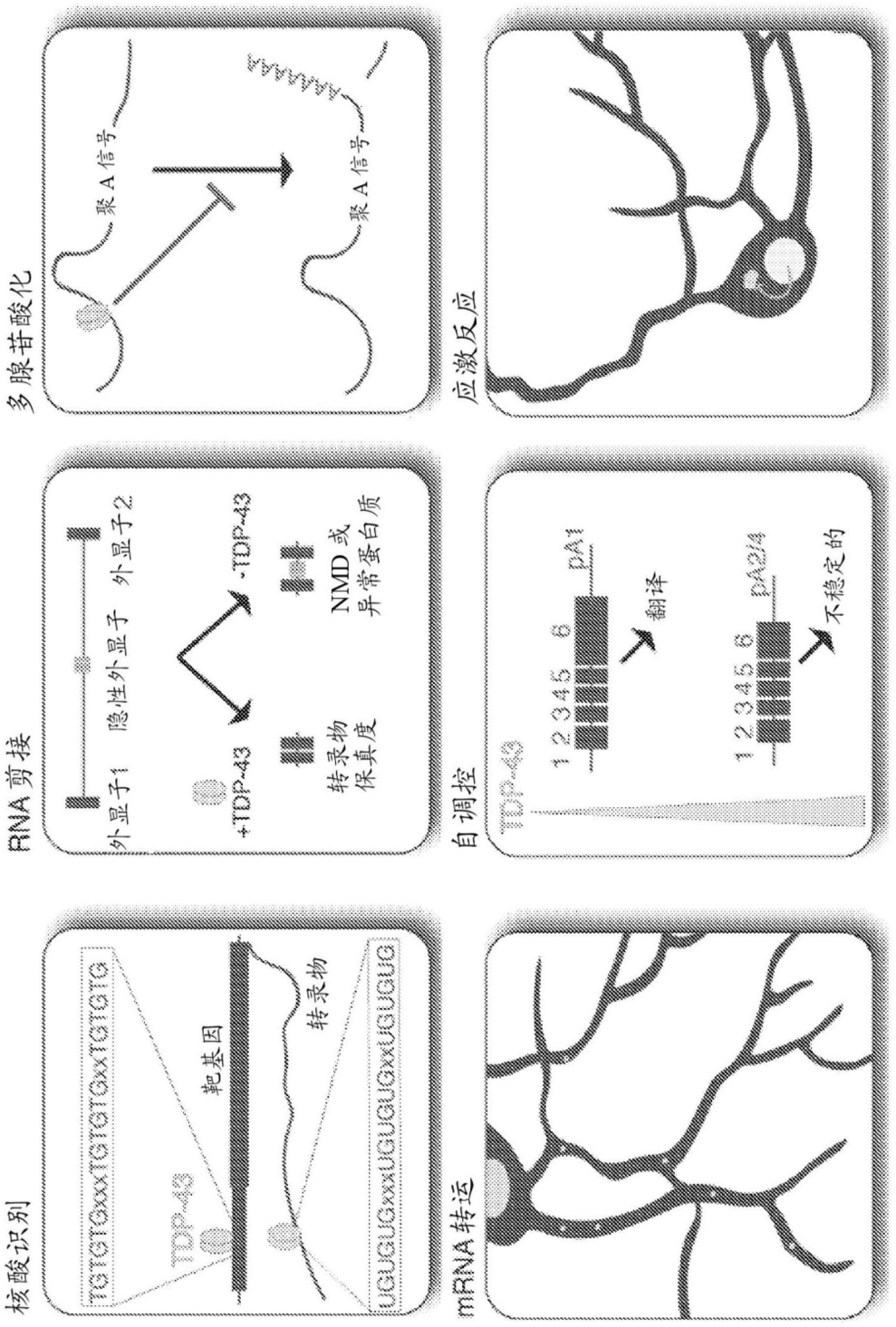

核酸识别
TGTGTGxxxTGTGTGxxTGTGTG
TDP-43
靶基因
转录物
UGUGUGxxxUGUGUGxxUGUGUG
RNA 剪接
外显子1
隐性外显子
外显子2
+TDP-43
-TDP-43
转录物
保真度
NMD 或
异常蛋白质
多腺苷酸化
聚 A 信号
聚 A 信号
mRNA 转运
自调控
TDP-43
1 2 3 4 5 6
pA1
翻译
1 2 3 4 5 6
pA2/4
不稳定的
应激反应

图79B

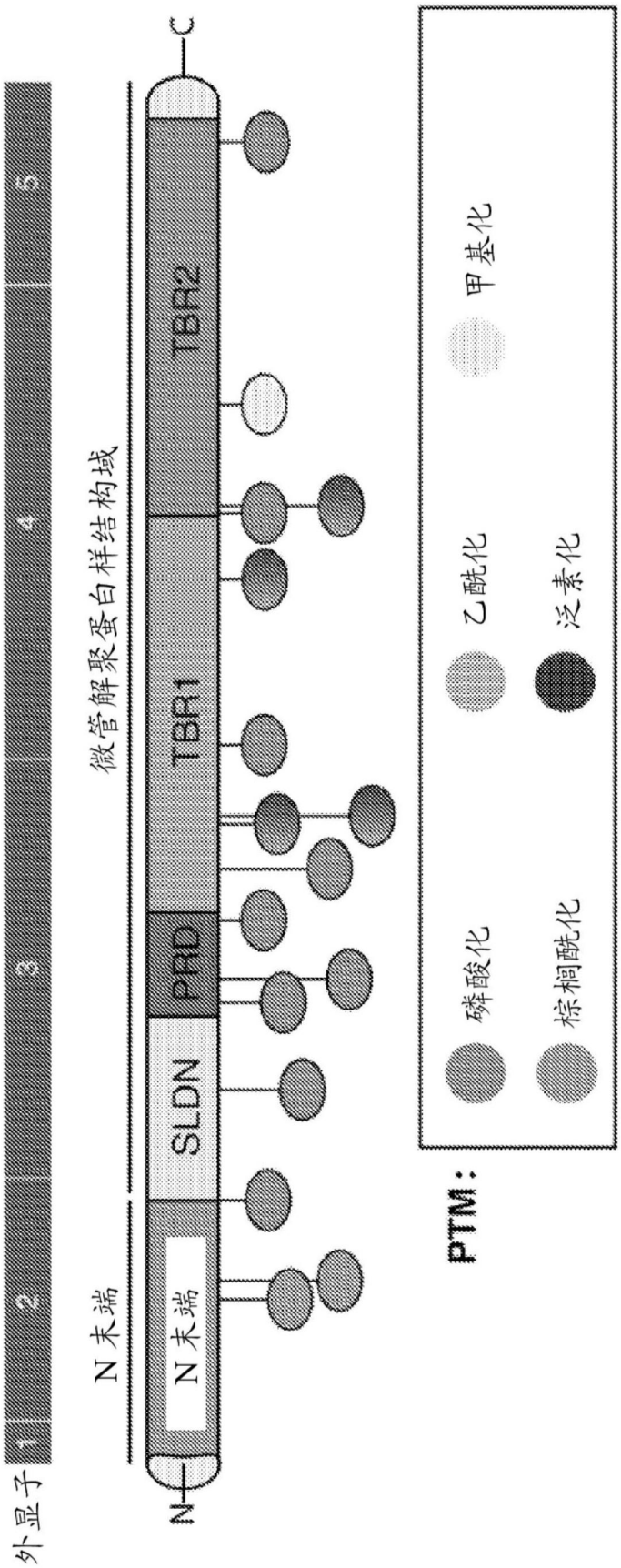

外显子
1
2
3
4
5
N
N末端
N末端
SLDN
PRD
TBR1
TBR2
C
微管解聚蛋白样结构域
PTM:
磷酸化
乙酰化
甲基化
棕榈酰化
泛素化

图80A

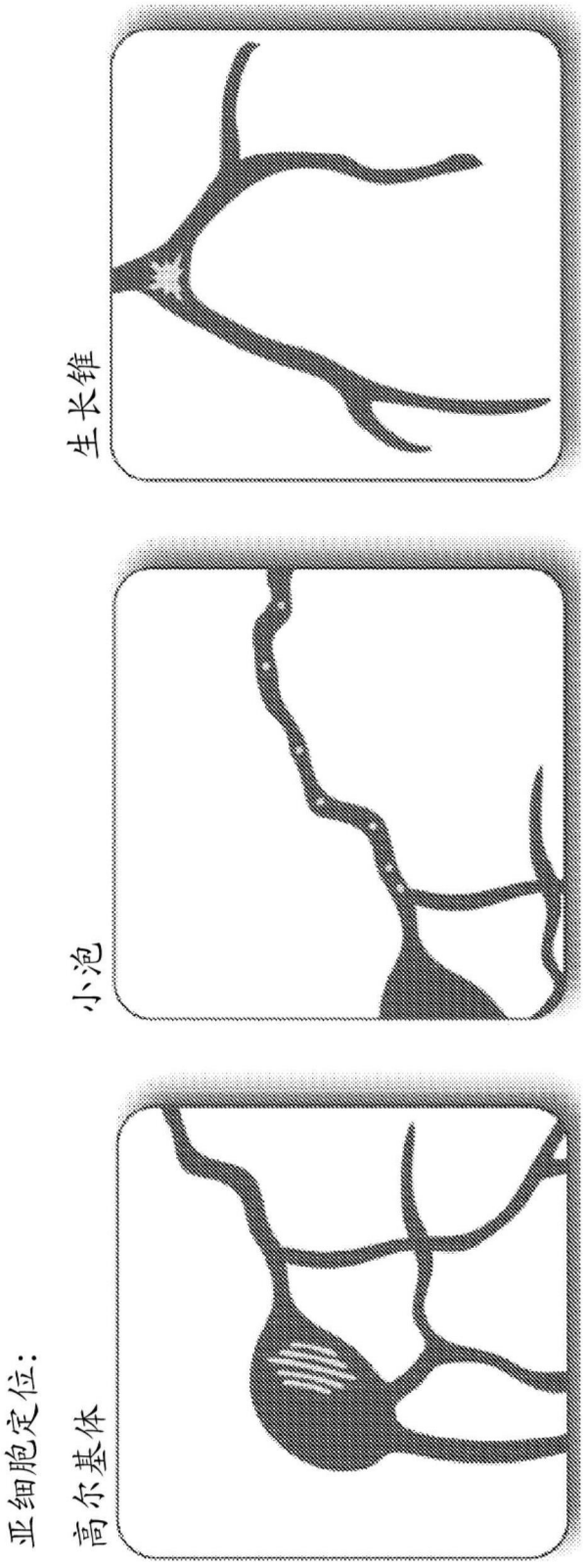


图80B

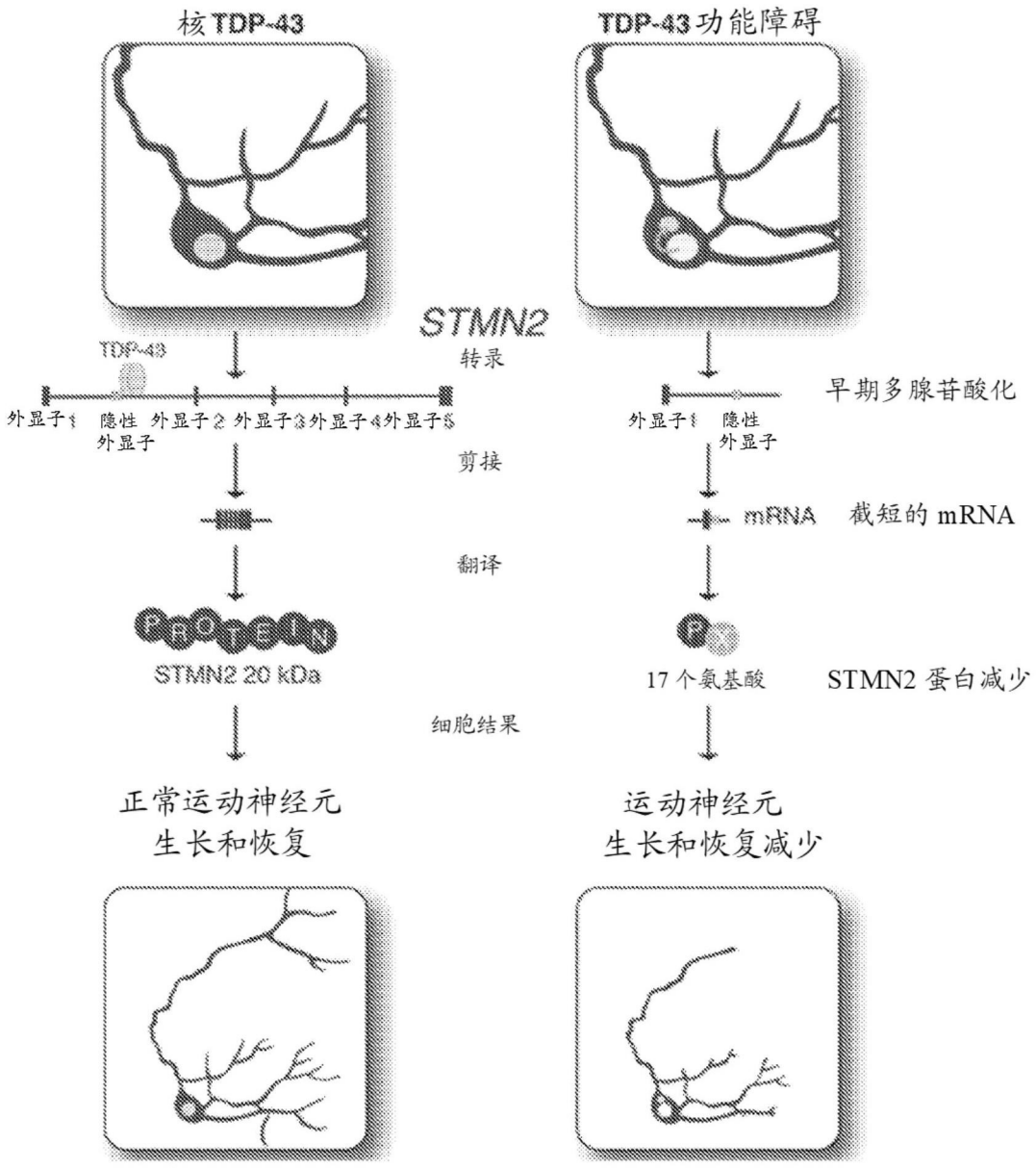

核TDP-43
TDP-43功能障碍
STMN2
转录
TDP-43
外显子1
隐性外显子
外显子2
外显子3
外显子4
外显子5
剪接
早期多腺苷酸化
mRNA
截短的 mRNA
翻译
PROTEIN
STMN2 20 kDa
17 个氨基酸
STMN2 蛋白减少
细胞结果
正常运动神经元
生长和恢复
运动神经元
生长和恢复减少

图81

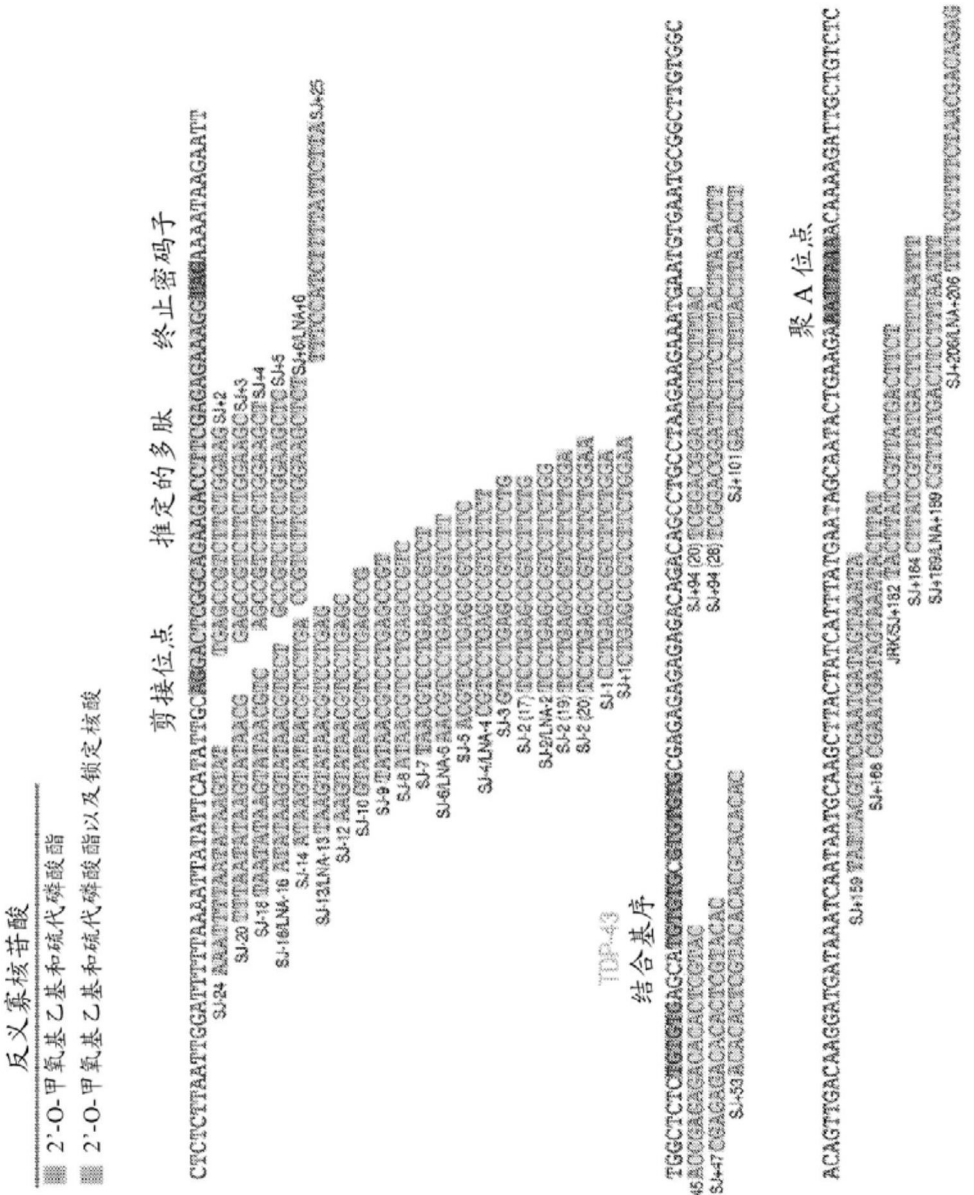

反义寡核苷酸
2'-O-甲氧基乙基和硫代磷酸酯
2'-O-甲氧基乙基和硫代磷酸酯以及锁定核酸
剪接位点
推定的多肽
终止密码子
TDP-43
结合基序
聚A位点

图82

CTCTTAATTGGATTTTTAAAATTATATTCATATTGCAGGACTCGGCAGAAGACCTTCGAGAGAA

AGGTAGAAAATAAGAATTTGGCTCTCTTGTGTGAGCATGTGTGGCGTGTGCGAGAGAGAGAC

AGACAGCCTGCCTAAGAAGAAATGTGAATGTGCGGCTTGTGGCACAGTTGACAAGGATGATA

AATCAATAATGCAAGCTTACTATCATTTATGAATAGCAATACTGAAGAAATTAAAACAAAAGAT

TGCTGTCTCAATATATCTTATATTTATTTACCAAATTA

序列注释的颜色代码:

侧接隐性剪接位点的核苷酸

预测的 TDP-43 结合位点

紧邻 TDP-43 结合位点下游的预测的动态区域

推定的早熟多腺苷酸化信号

不包括在截短的 RNA 亚型中的核苷酸

图83A

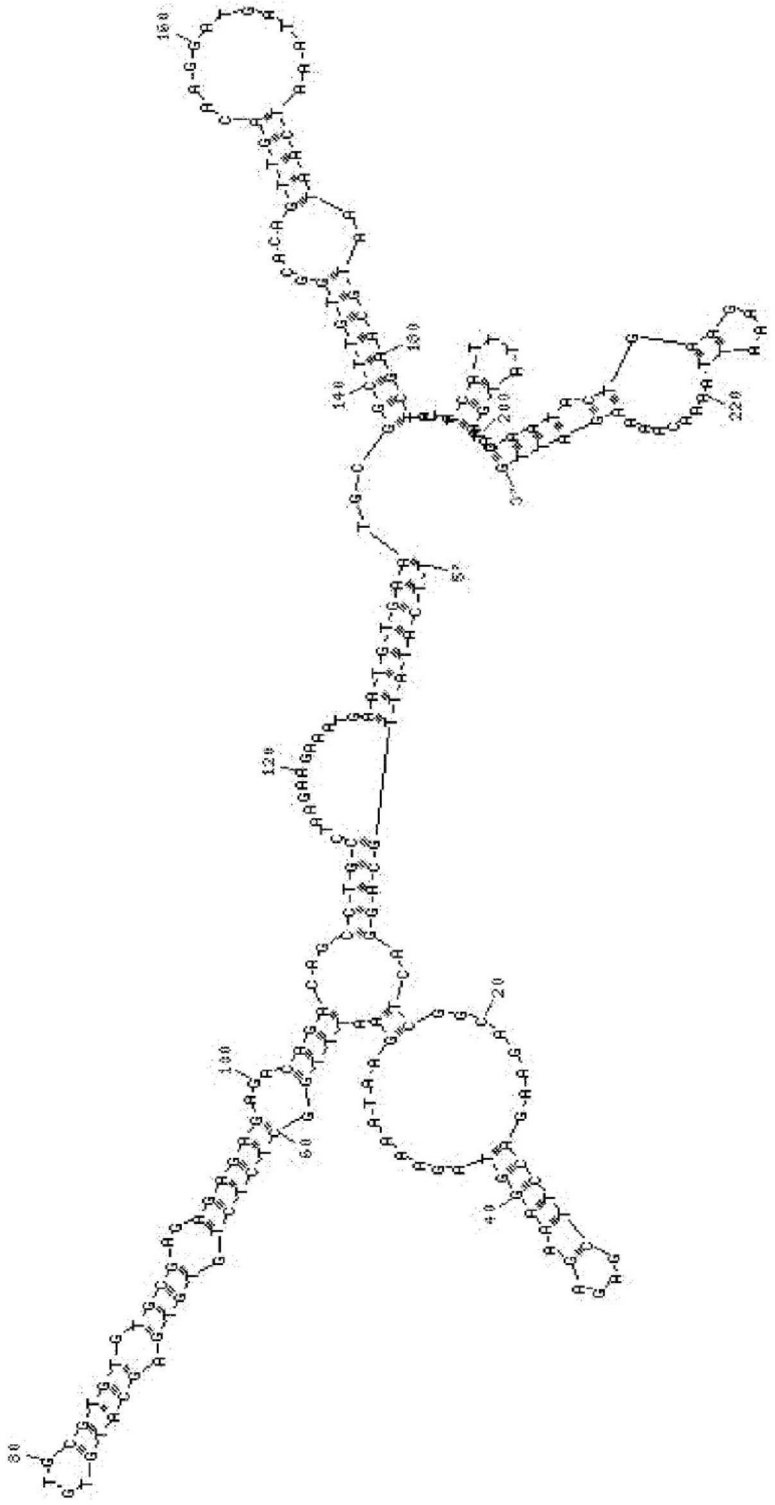


图83B

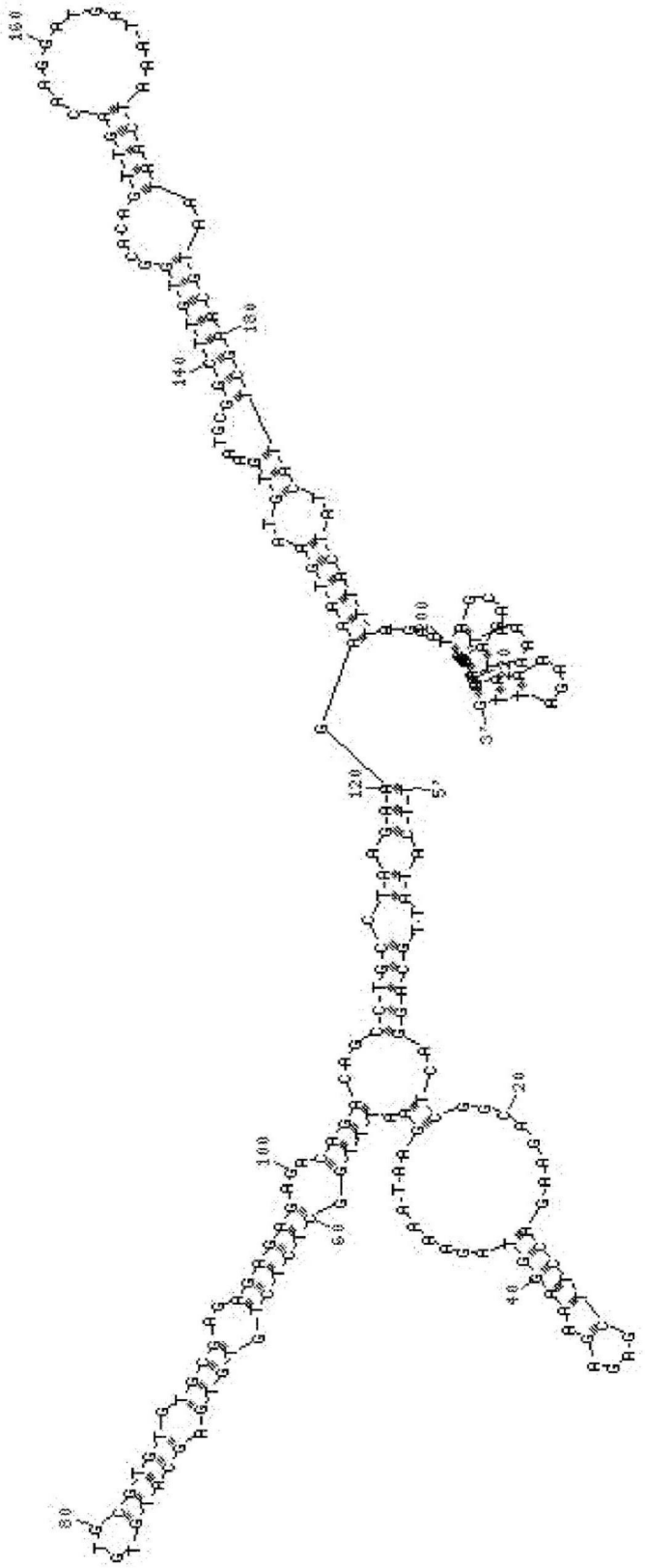


图83C

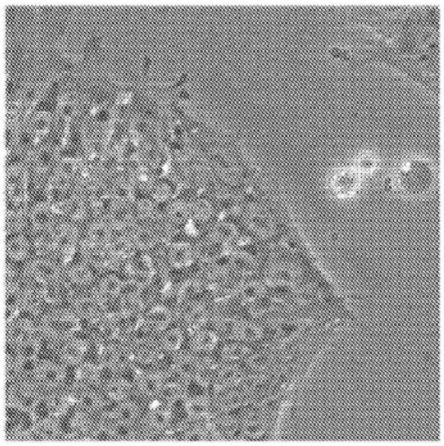


图84A

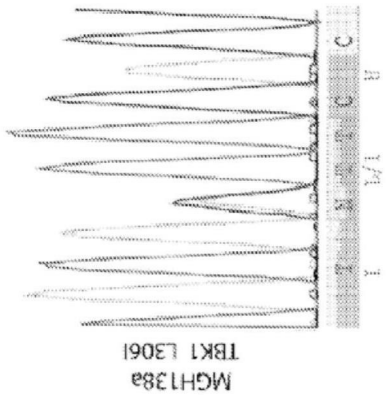


图84B

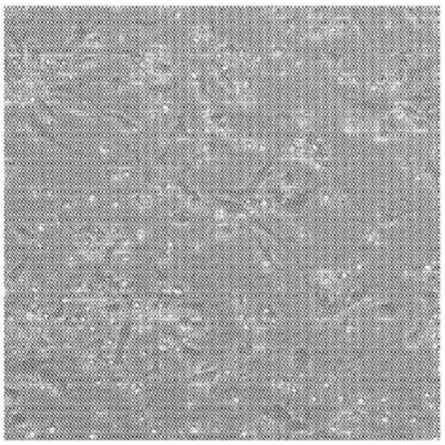


图84C

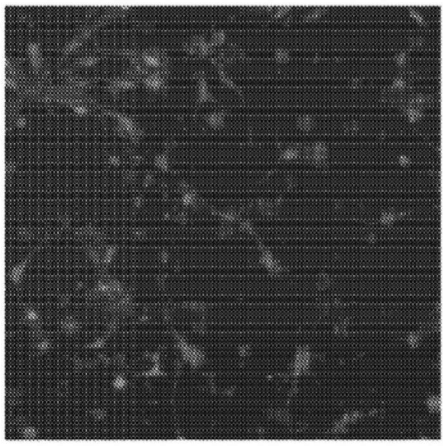


图84D

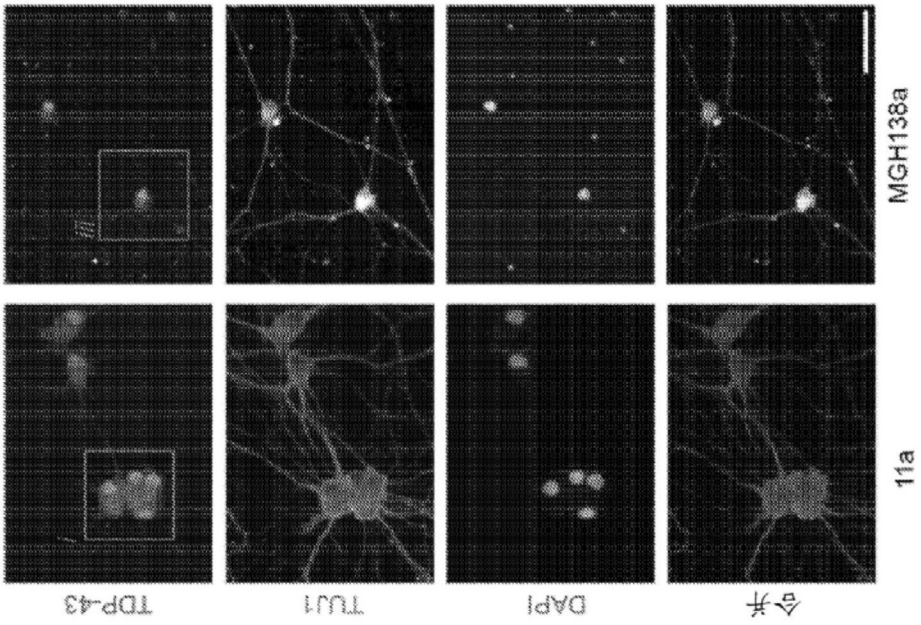


图85A

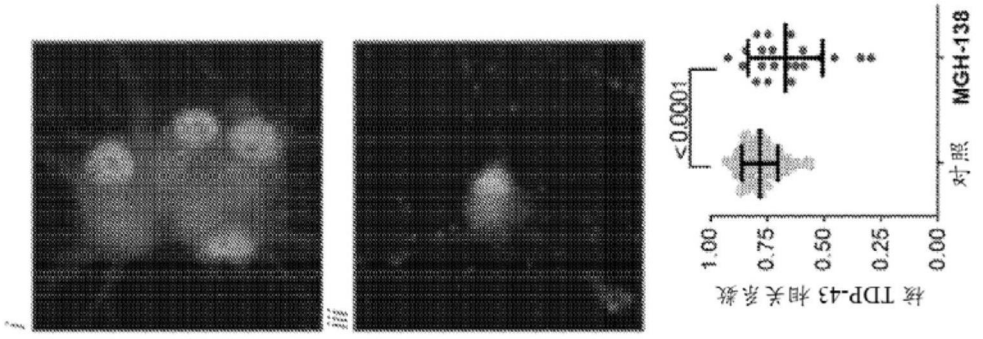


图85B

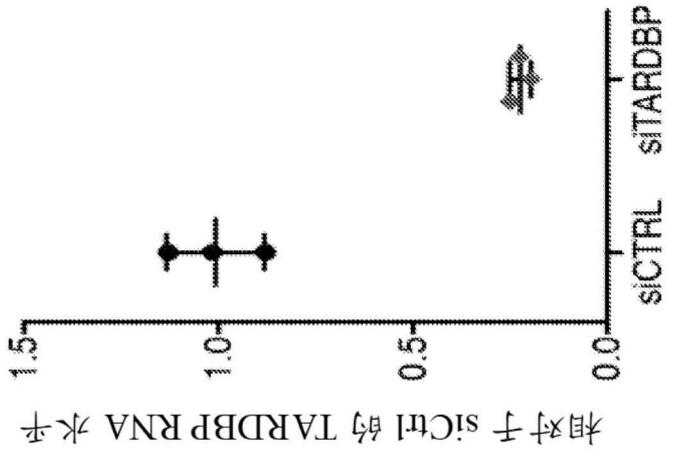


图86A

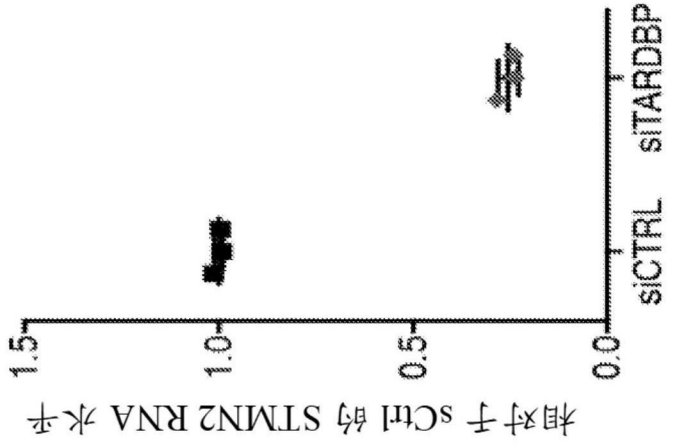


图86B

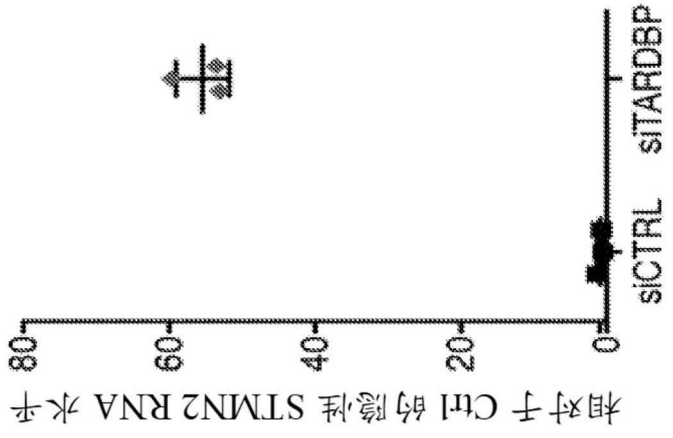


图86C

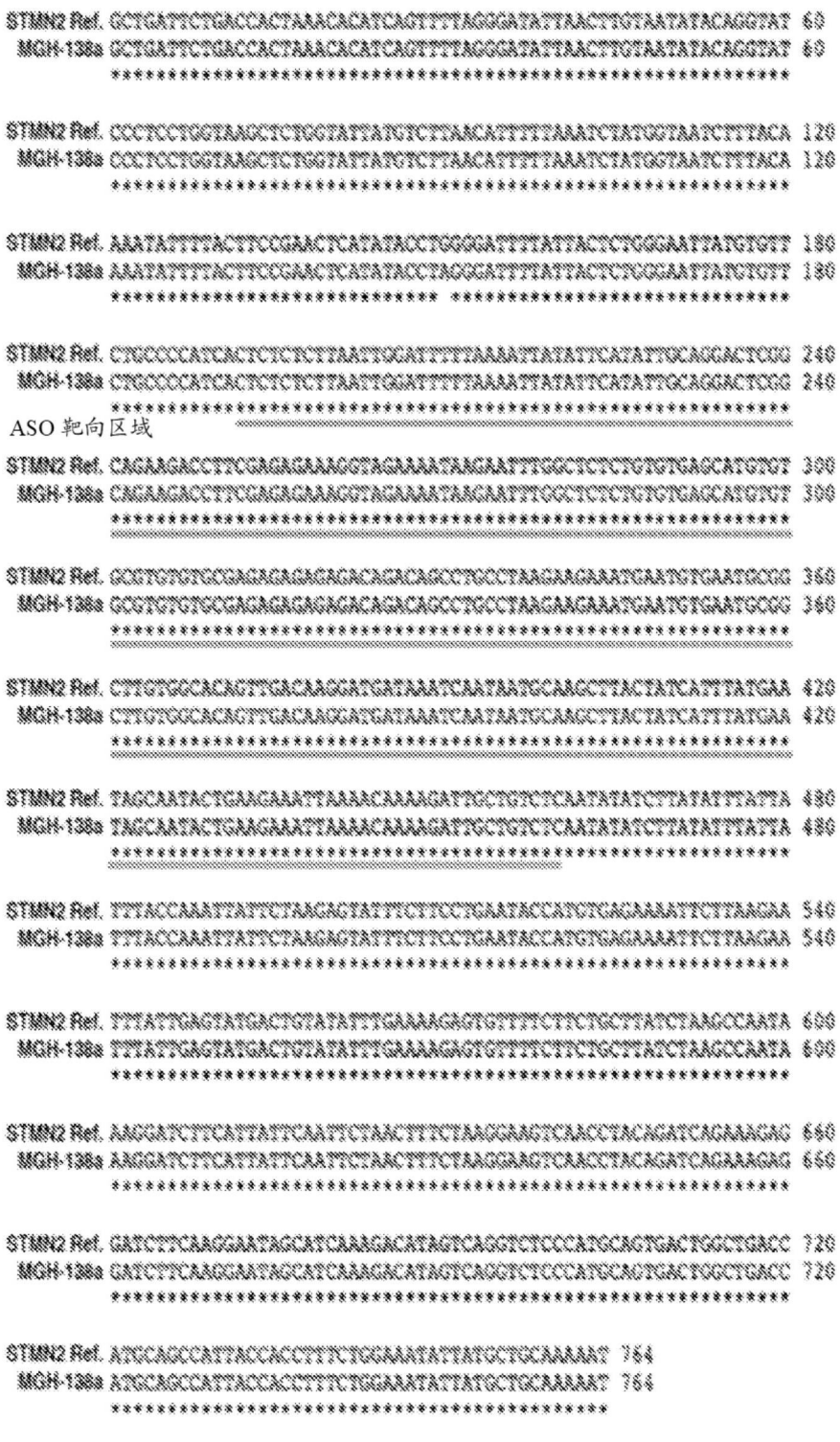

STMN2 Ref. GCTGATTCTGACCACTAAACACATCAGTTTTAGGGATATTAACTTGTAATATACAGGTAT 60
MGH-138a GCTGATTCTGACCACTAAACACATCAGTTTTAGGGATATTAACTTGTAATATACAGGTAT 60
STMN2 Ref. CCCTCCTGGTAAGCTCTGGTATTATGTCTTAACATTTTAAATCTATGGTAATCTTTACA 120
MGH-138a CCCTCCTGGTAAGCTCTGGTATTATGTCTTAACATTTTAAATCTATGGTAATCTTTACA 120
STMN2 Ref. AAATATTTTACTTCCGAACTCATATACCTGGGGATTTTATTACTCTGGGAATTATGTGTT 180
MGH-138a AAATATTTTACTTCCGAACTCATATACCTAGGGATTTTATTACTCTGGGAATTATGTGTT 180
STMN2 Ref. CTGCCCCATCACTCTCTCTTAATTGCATTTTTAAAATTATATTCATATTGCAGGACTCGG 240
MGH-138a CTGCCCCATCACTCTCTCTTAATTGCATTTTTAAAATTATATTCATATTGCAGGACTCGG 240
ASO 靶向区域
STMN2 Ref. CAGAAGACCTTCGAGAGAAGGTAGAAAATAAGAATTTGGCTCTCTGTGTGAGCATGTGT 300
MGH-138a CAGAAGACCTTCGAGAGAAGGTAGAAAATAAGAATTTGGCTCTCTGTGTGAGCATGTGT 300
STMN2 Ref. GCGTGTGTGCGAGAGAGAGACAGACAGCCTGCCTAAGAAGAAATGAATGTGAATGCGG 360
MGH-138a GCGTGTGTGCGAGAGAGAGACAGACAGCCTGCCTAAGAAGAAATGAATGTGAATGCGG 360
STMN2 Ref. CTTGTGGCACAGTTGACAAGGATGATAAATCAATAATGCAAGCTTACTATCATTTATGAA 420
MGH-138a CTTGTGGCACAGTTGACAAGGATGATAAATCAATAATGCAAGCTTACTATCATTTATGAA 420
STMN2 Ref. TAGCAATACTGAAGAAATTAAAACAAAAGATTGCTGTCTCAATATATCTTATATTTATTA 480
MGH-138a TAGCAATACTGAAGAAATTAAAACAAAAGATTGCTGTCTCAATATATCTTATATTTATTA 480
STMN2 Ref. TTTACCAAATTATTCTAAGAGTATTTCTTCCTGAATACCATGTGAGAAAATTCTTAAGAA 540
MGH-138a TTTACCAAATTATTCTAAGAGTATTTCTTCCTGAATACCATGTGAGAAAATTCTTAAGAA 540
STMN2 Ref. TTTATTGAGTATGACTGTATATTTGAAAAGAGTGTTTTCTTCTGCTTATCTAAGCCAATA 600
MGH-138a TTTATTGAGTATGACTGTATATTTGAAAAGAGTGTTTTCTTCTGCTTATCTAAGCCAATA 600
STMN2 Ref. AAGGATCTTCATTATTCAATTCTAACTTTCTAAGCAAGTCAACCTACAGATCAGAAAGAG 660
MGH-138a AAGGATCTTCATTATTCAATTCTAACTTTCTAAGCAAGTCAACCTACAGATCAGAAAGAG 660
STMN2 Ref. GATCTTCAAGGAATAGCATCAAAGACATAGTCAGGTCTCCCATGCAGTGACTGGCTGACC 720
MGH-138a GATCTTCAAGGAATAGCATCAAAGACATAGTCAGGTCTCCCATGCAGTGACTGGCTGACC 720
STMN2 Ref. ATGCAGCCATTACCACCTTTCTGGAAATATTATGCTGCAAAAAT 764
MGH-138a ATGCAGCCATTACCACCTTTCTGGAAATATTATGCTGCAAAAAT 764

图87A

图 87B

位置: chr8:79616738 (GRCh38.p12)
变化类型: 单核苷酸变体
GnomAD 频率: A=0.48670 (15261/31356)

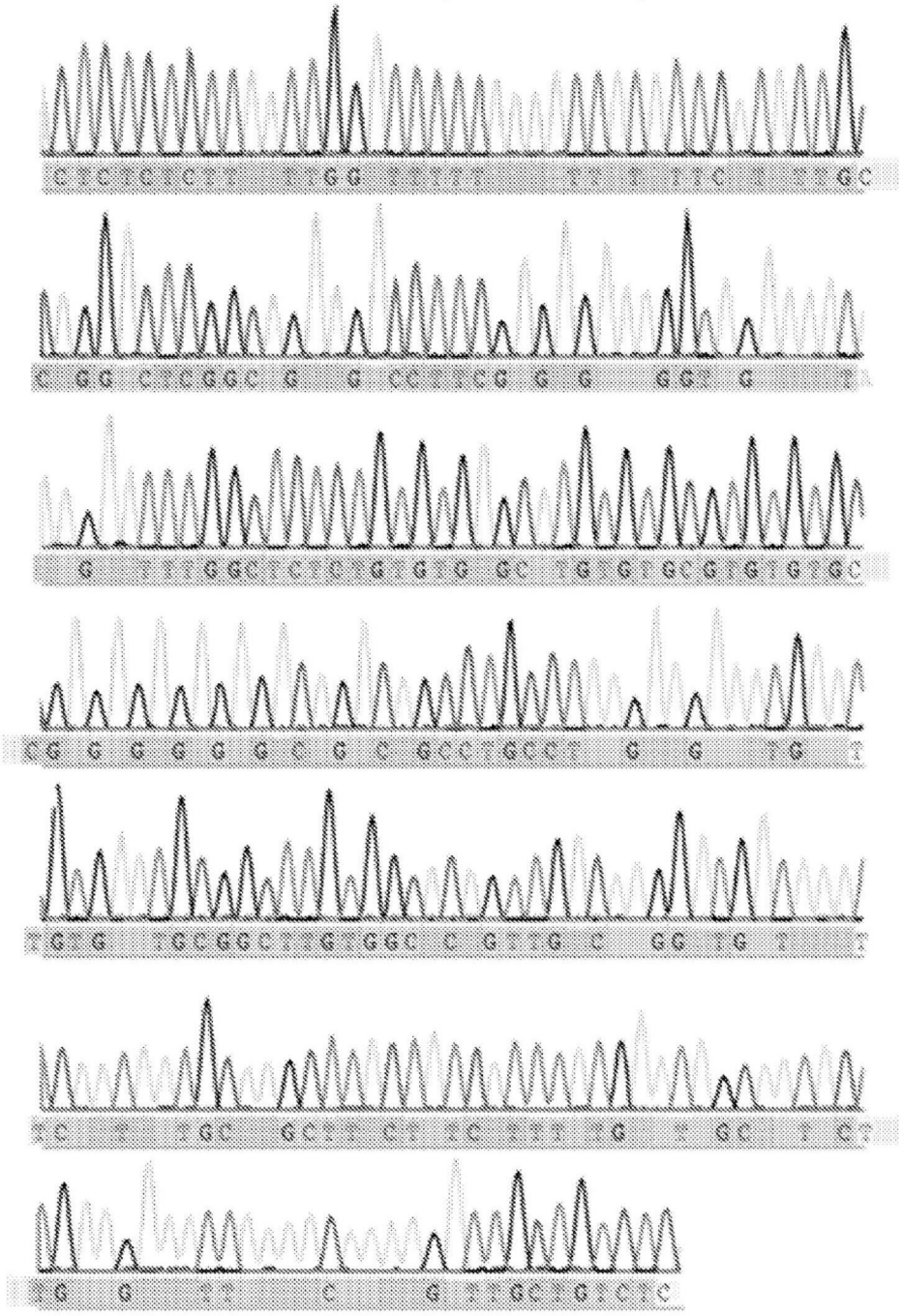


图 87C

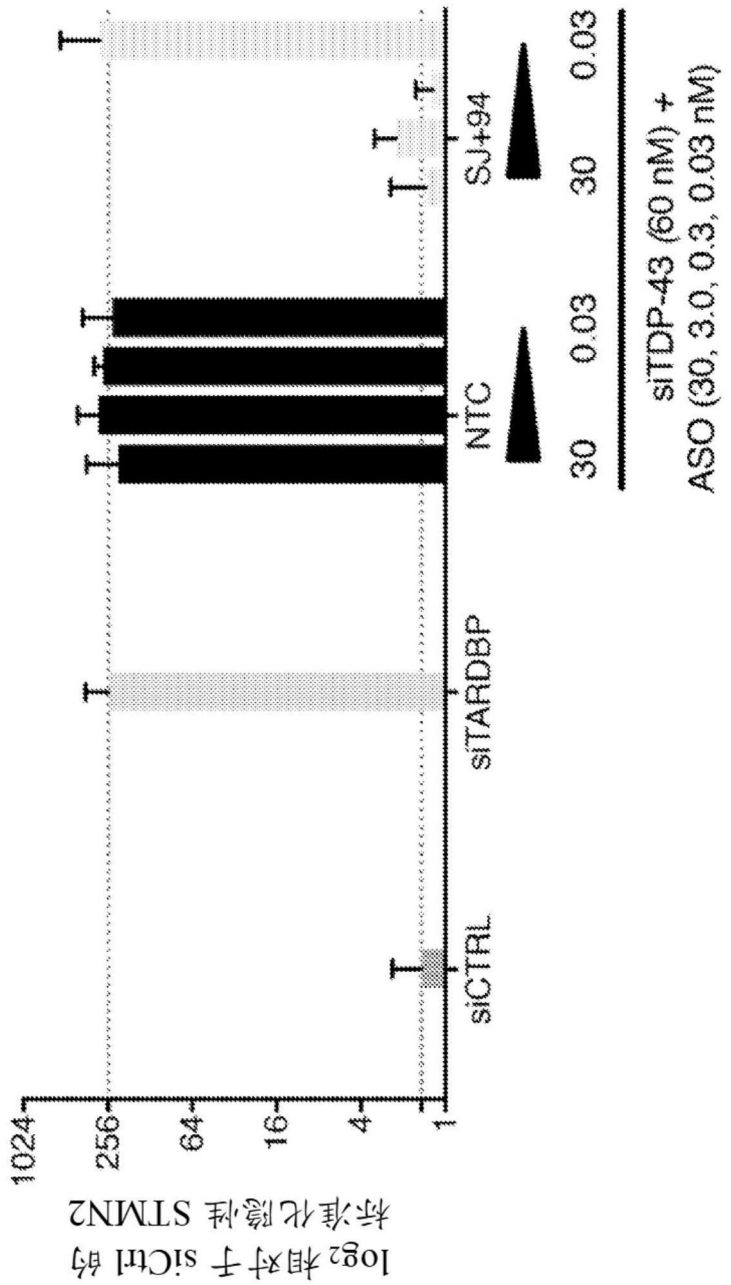

log2 相对于 siCtrl 的
标准化隐性 STMN2
1024
256
64
16
4
1
siCTRL
siTARDBP
NTC
SJ+94
30
0.03
30
0.03
30
siTDP-43 (60 nM) +
ASO (30, 3.0, 0.3, 0.03 nM)

图88A

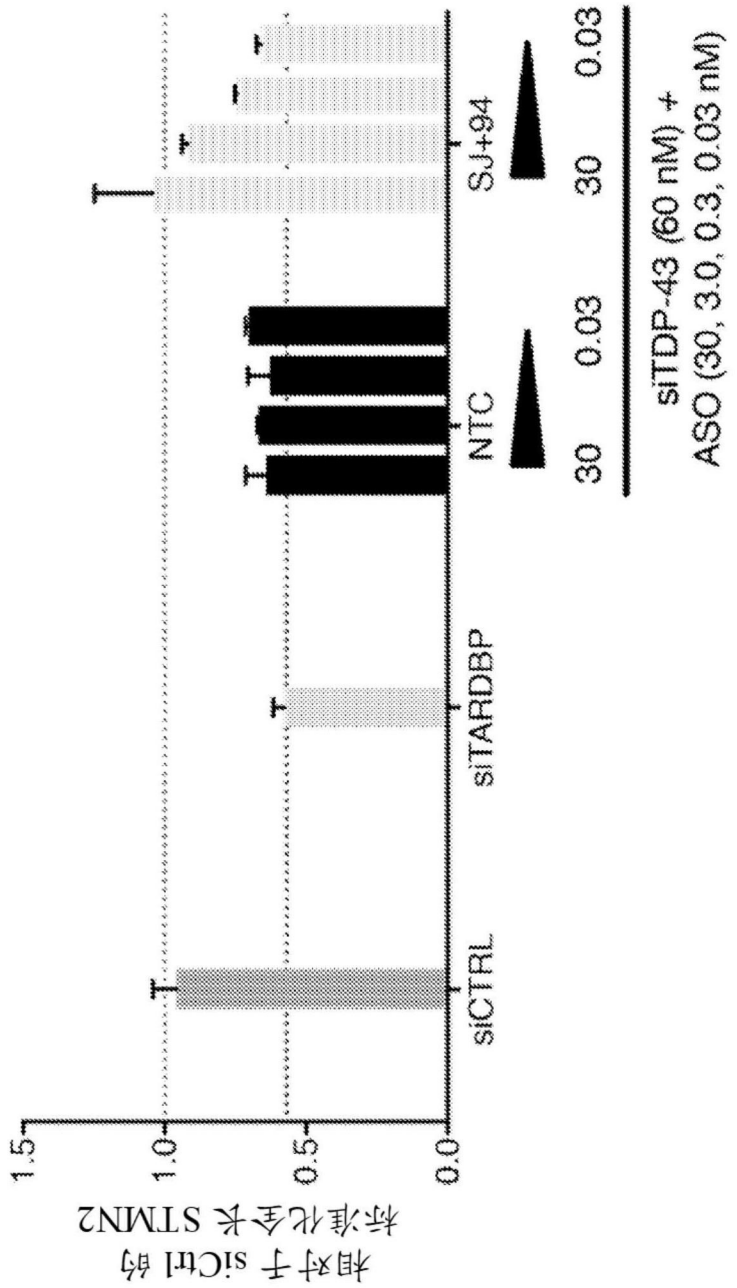

相对于 siCtrl 的
标准化全长 STMN2
1.5
1.0
0.5
0.0
siCTRL
siTARDBP
NTC
SJ+94
siTDP-43 (60 nM) +
ASO (30, 3.0, 0.3, 0.03 nM)
30
0.03
30
0.03
30
0.03

图88B

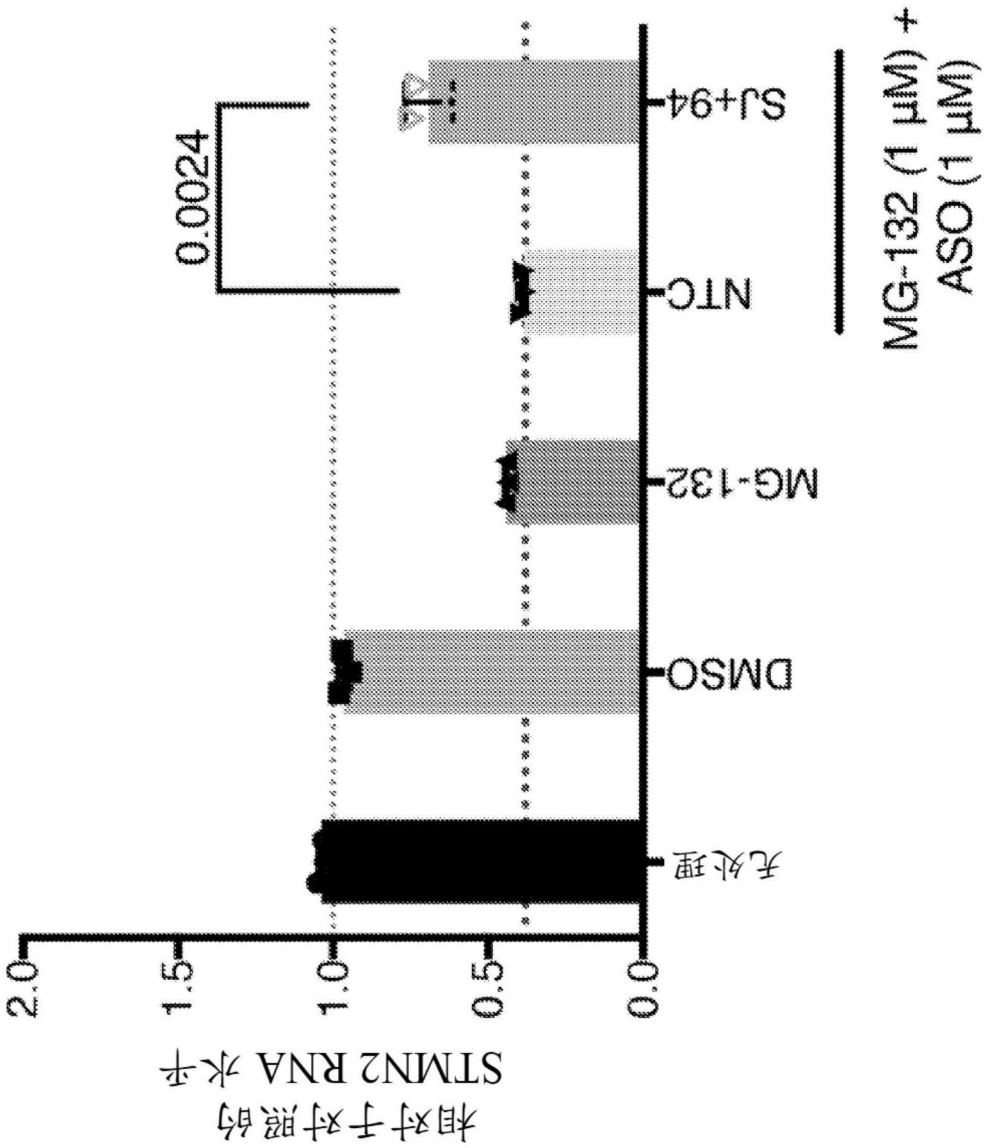

相对于对照的
STMN2 RNA 水平
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
无处理
DMSO
MG-132
NTC
SJ+94
0.0024
MG-132 (1 μM) +
ASO (1 μM)

图89

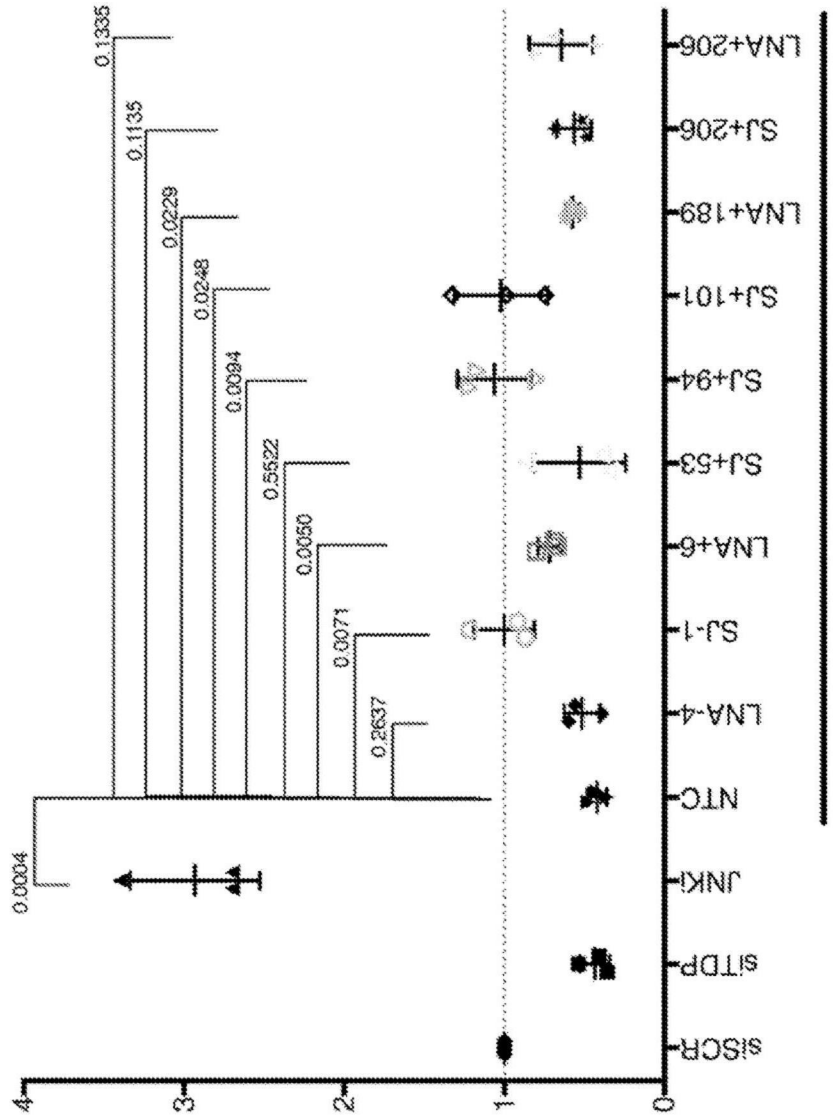

LNA+206
SJ+206
LNA+189
SJ+101
SJ+94
SJ+53
LNA+6
SJ-1
LNA-4
NTC
JNK1
siTDP
siSCR
0.1335
0.1135
0.0229
0.0248
0.0094
0.5522
0.0050
0.0071
0.2637
0.0004
4
3
2
1
0
相对于 siCtl 的 STMN2 蛋白水平

图90

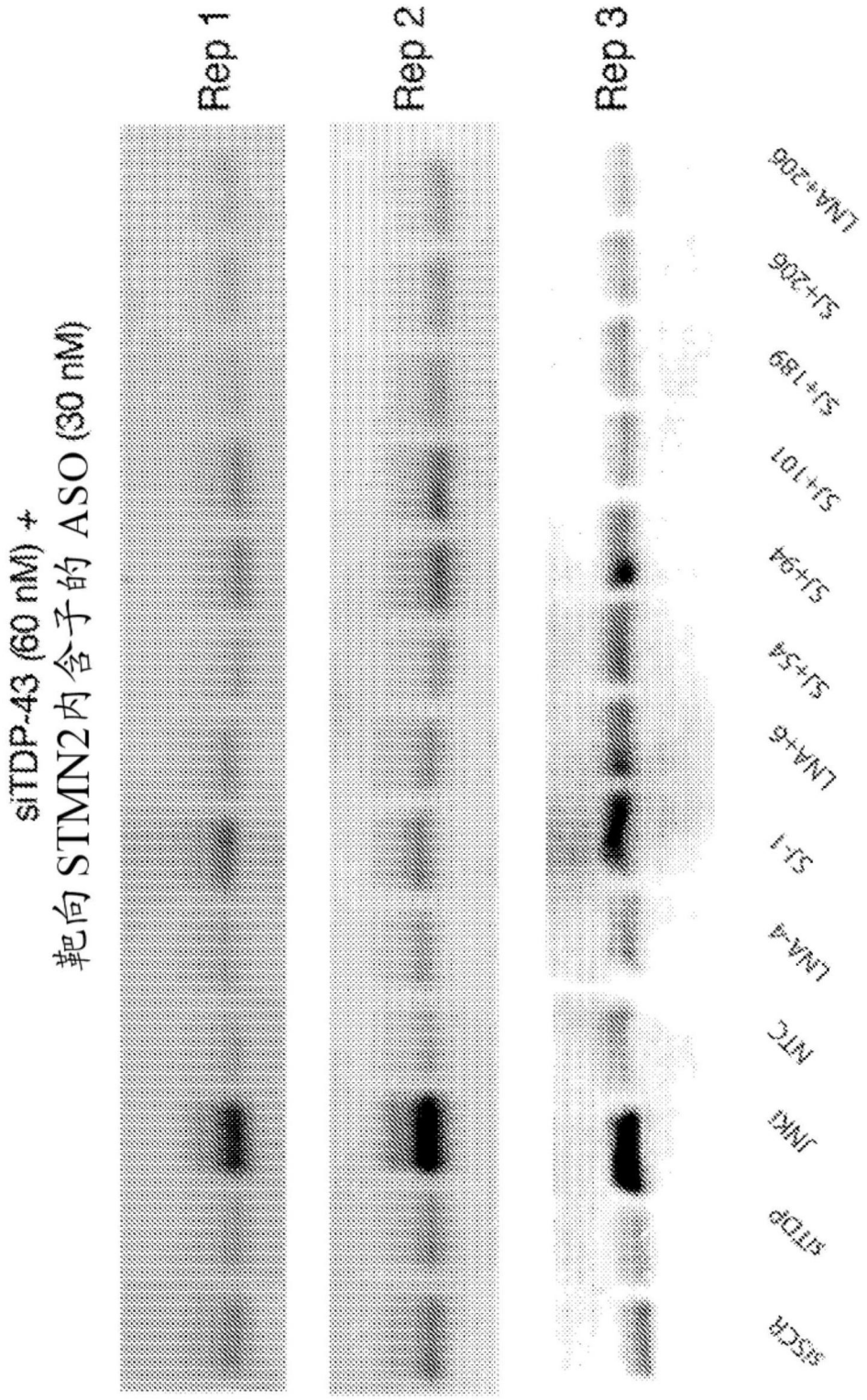

siTDP-43 (60 nM) +
靶向 STMN2 内含子的 ASO (30 nM)
Rep 1
Rep 2
Rep 3
siSCR
siTDP
JNK1
NTC
LNA-4
SJ-1
LNA+6
SJ+54
SJ+94
SJ+107
SJ+189
SJ+206
LNA+206

图90续

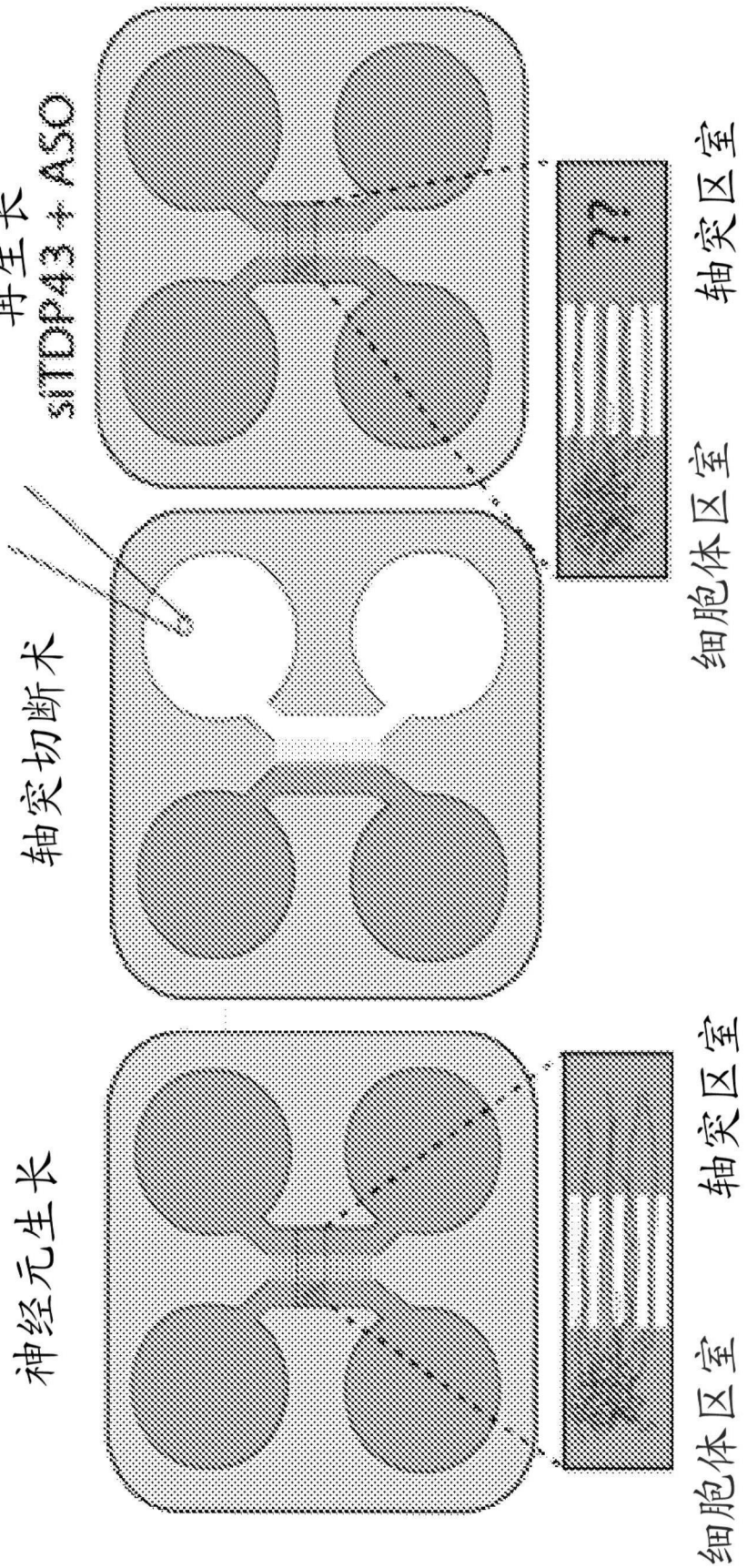


图91A

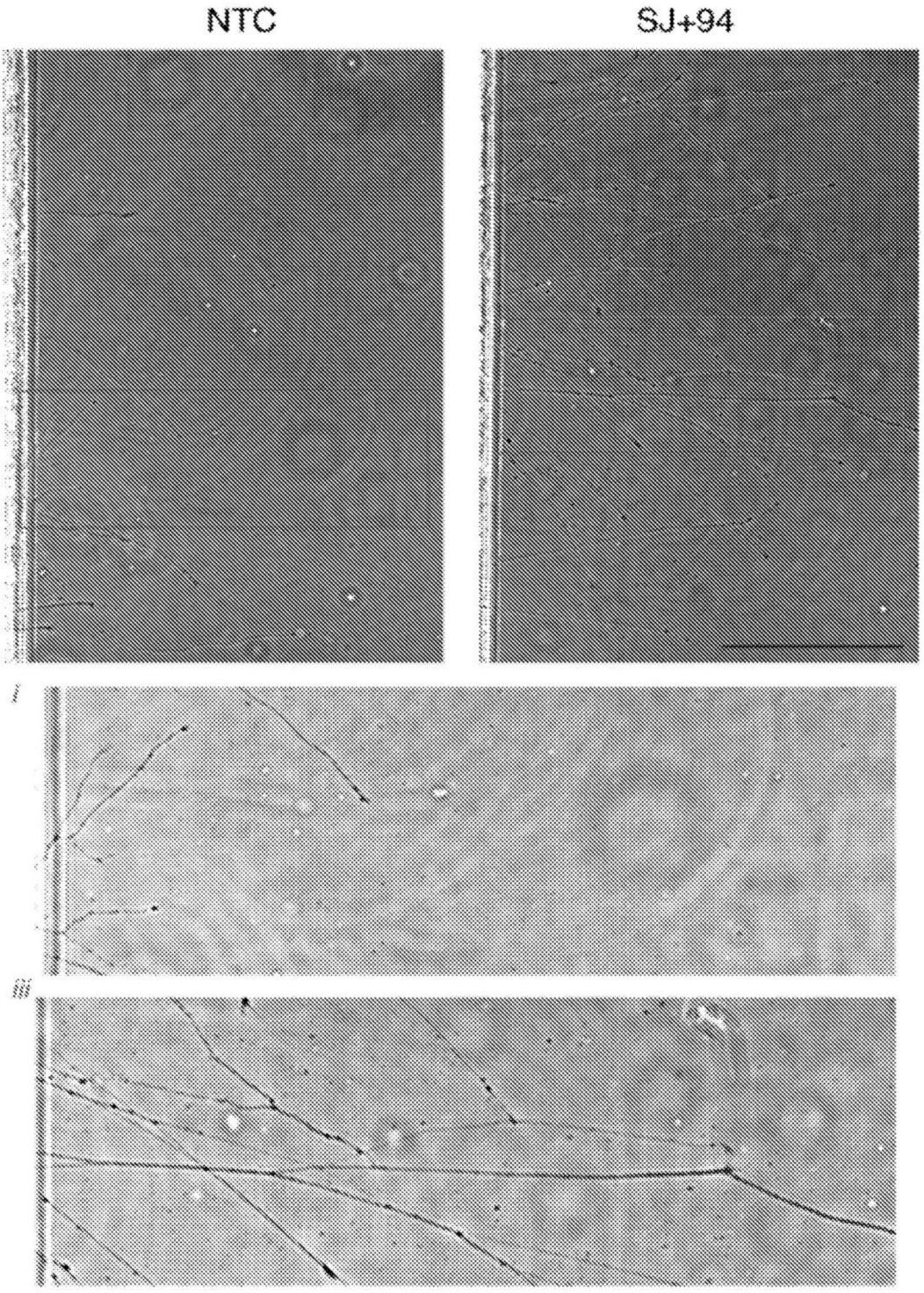


图91B

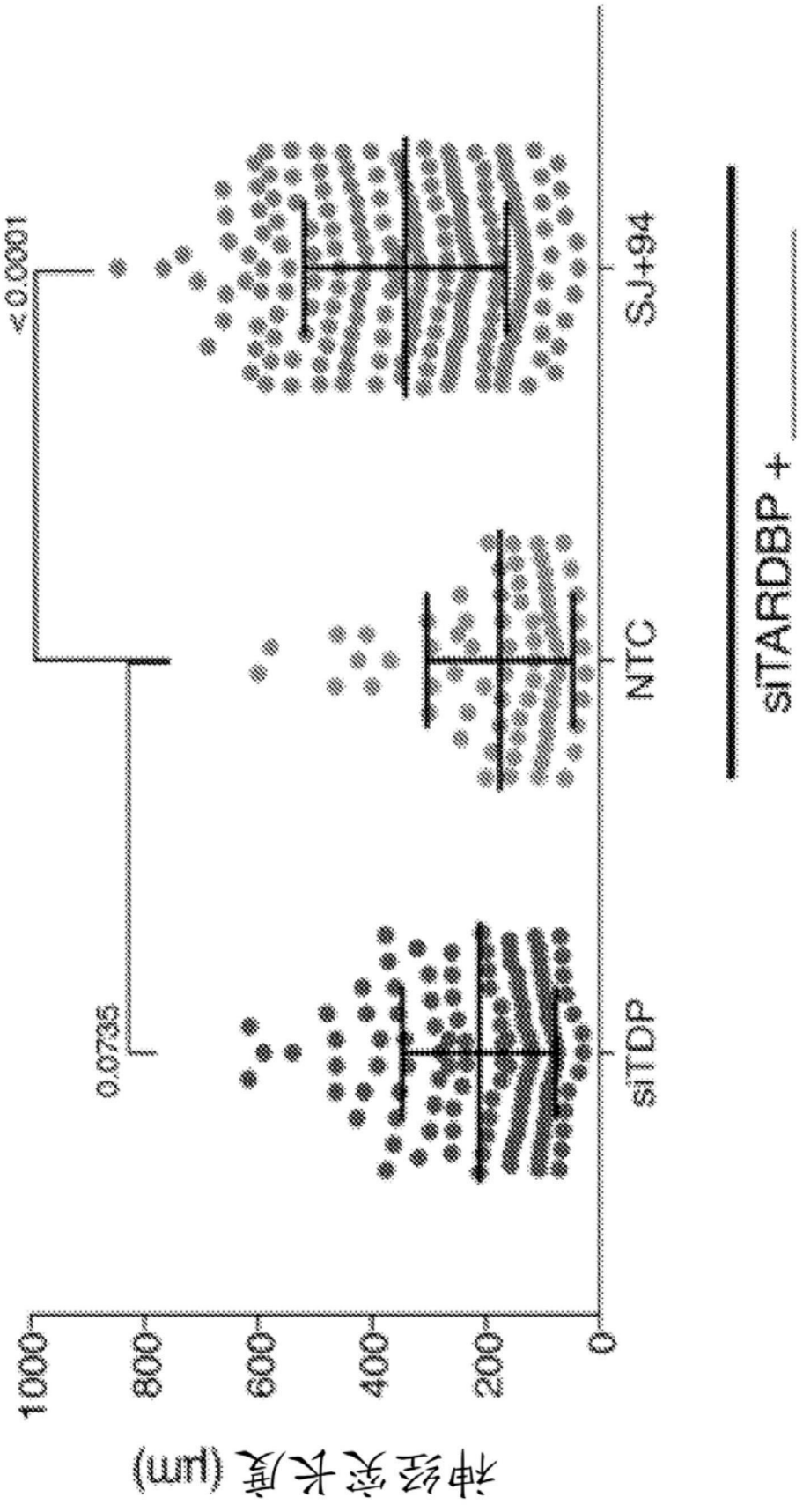

神经突长度 (μm)
1000
800
600
400
200
0
siTDP
NTC
SJ+94
0.0735
<0.0001
siTARDBP +

图91C

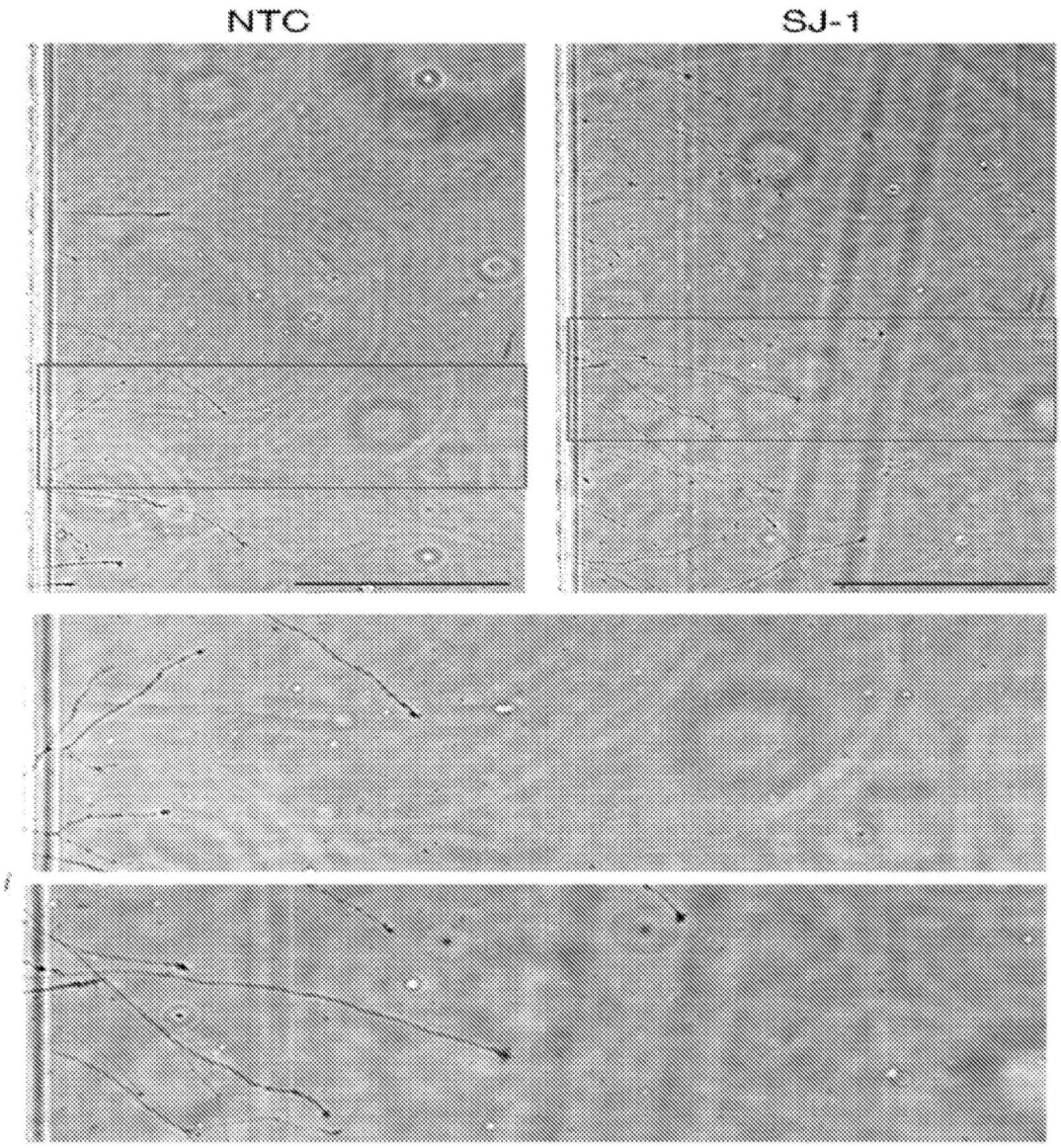


图91D

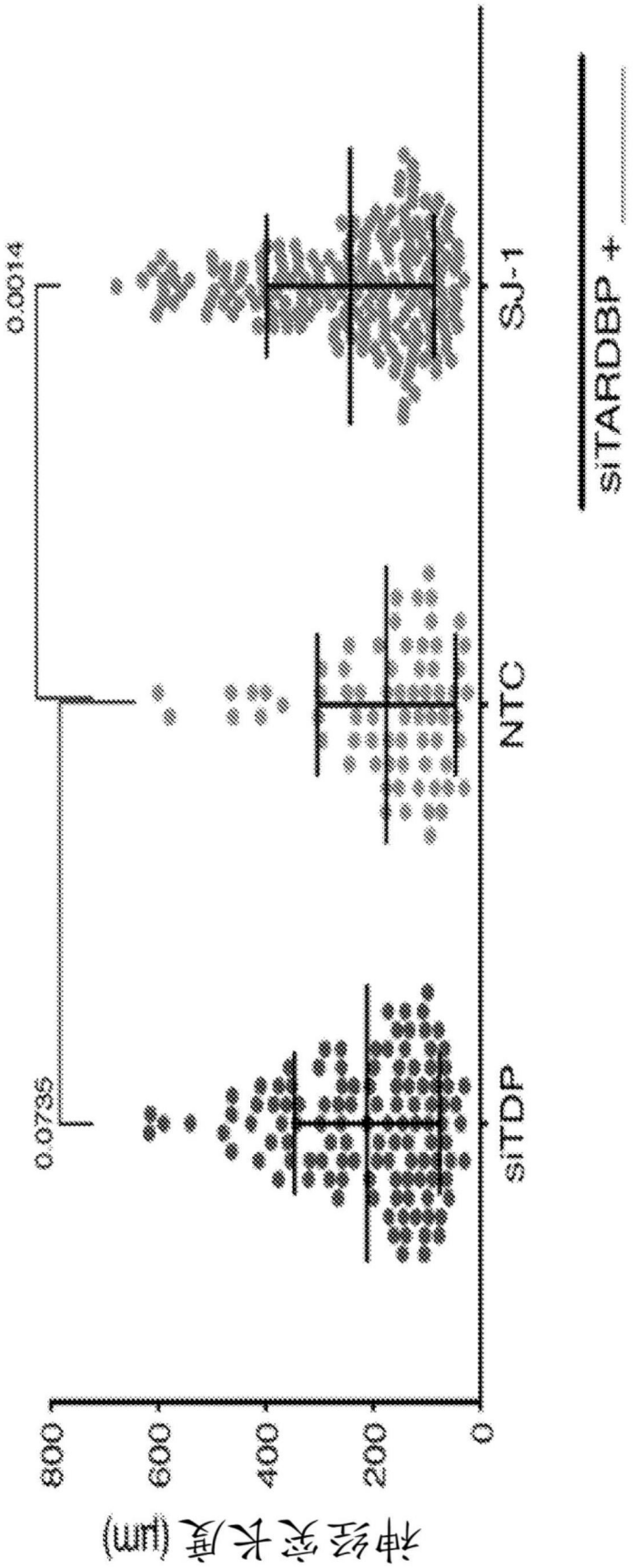


图91E

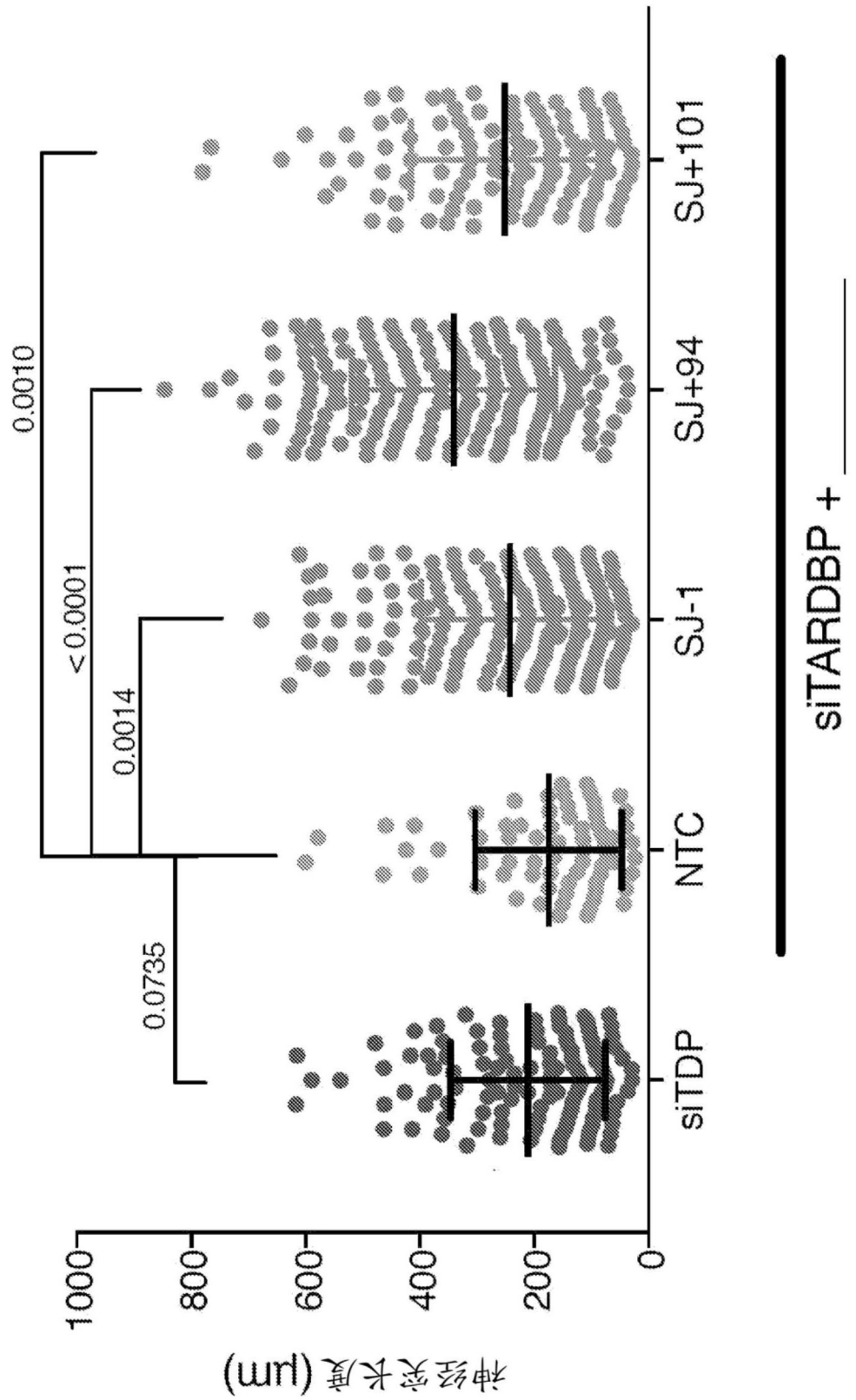

神经突长度 (μm)
1000
800
600
400
200
0
siTDP
NTC
SJ-1
SJ+94
SJ+101
0.0735
0.0014
<0.0001
0.0010
siTARDBP +

图92

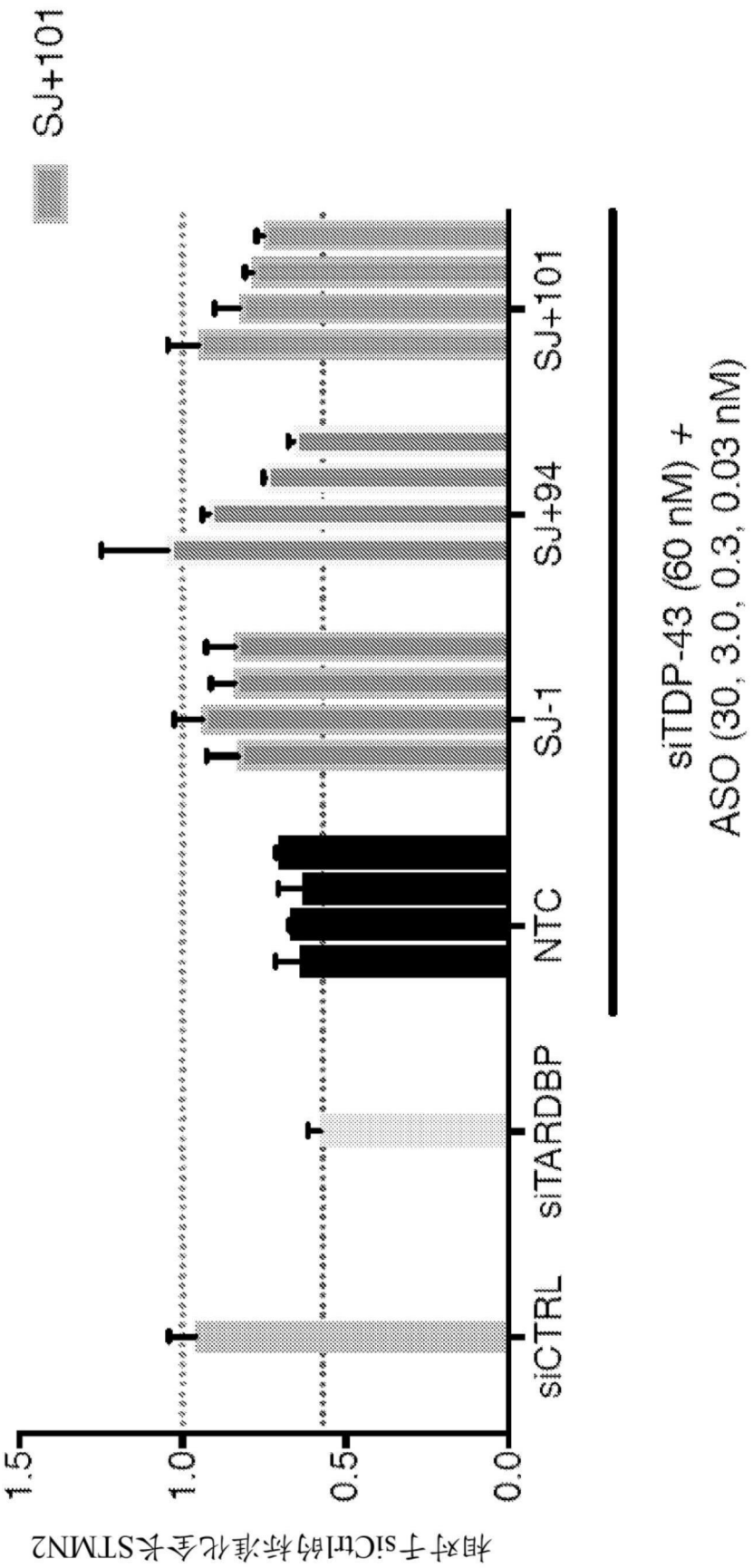

SJ+101
1.5
1.0
0.5
0.0
siCTRL
siTARDBP
NTC
SJ-1
SJ+94
SJ+101
siTDP-43 (60 nM) +
ASO (30, 3.0, 0.3, 0.03 nM)
相对于siCtrl的标准化全长STMN2

图93

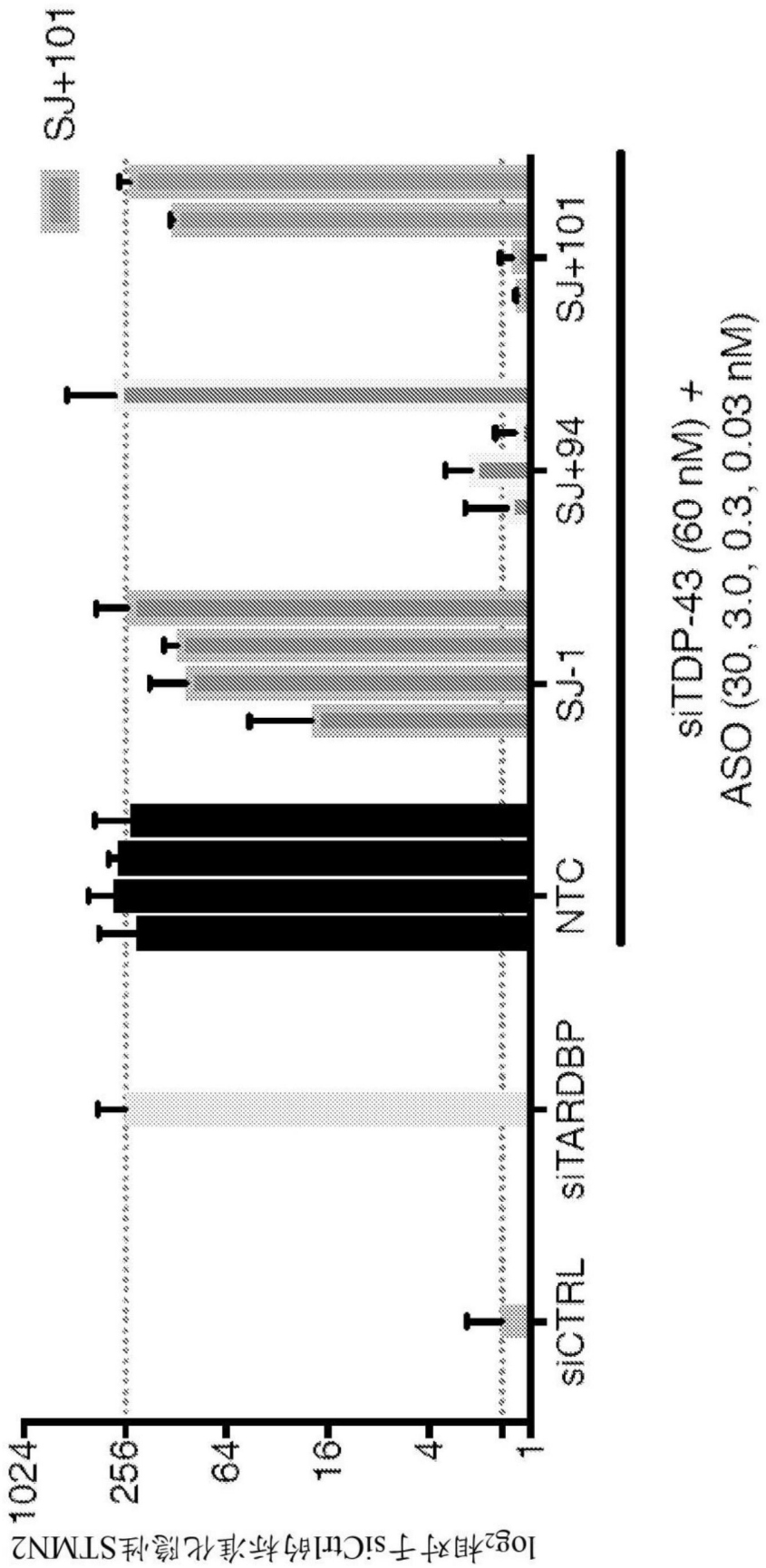

SJ+101
1024
256
64
16
4
1
log2相对于siCtrl的标准化隐性STMN2
siCTRL
siTARDBP
NTC
SJ-1
SJ+94
SJ+101
siTDP-43 (60 nM) +
ASO (30, 3.0, 0.3, 0.03 nM)

图94

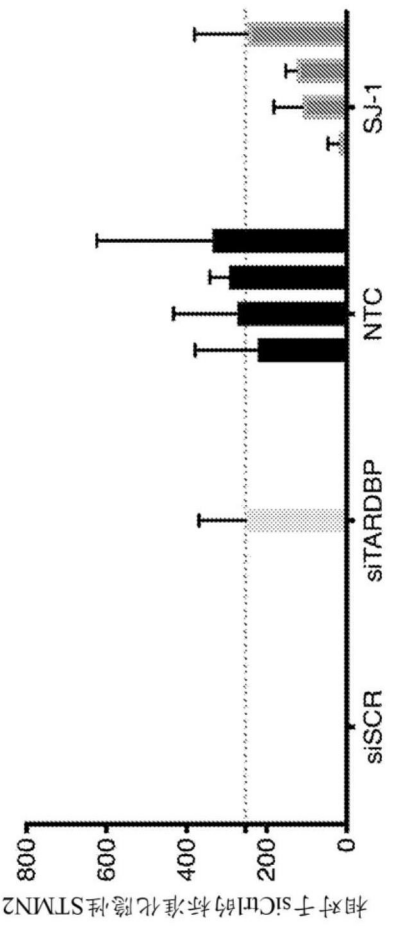

相对于siCtrl的标准化隐性STMN2
800
600
400
200
0
siSCR
siTARDBP
NTC
SJ-1
siTARDBP (60 nM) +
AASO (30-3.0-0.3-0.03 nM)

图 95A

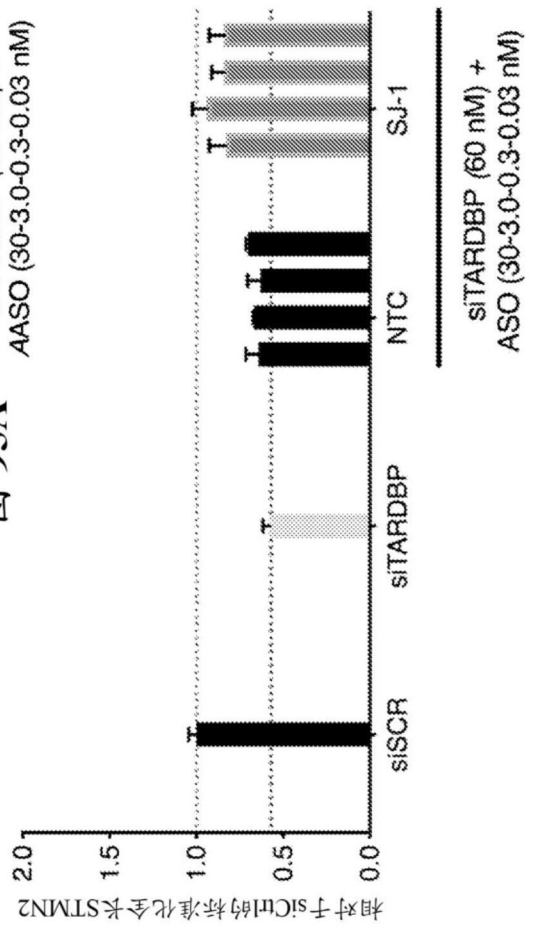

相对于siCtrl的标准化全长STMN2
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
siSCR
siTARDBP
NTC
SJ-1
siTARDBP (60 nM) +
ASO (30-3.0-0.3-0.03 nM)

图 95B

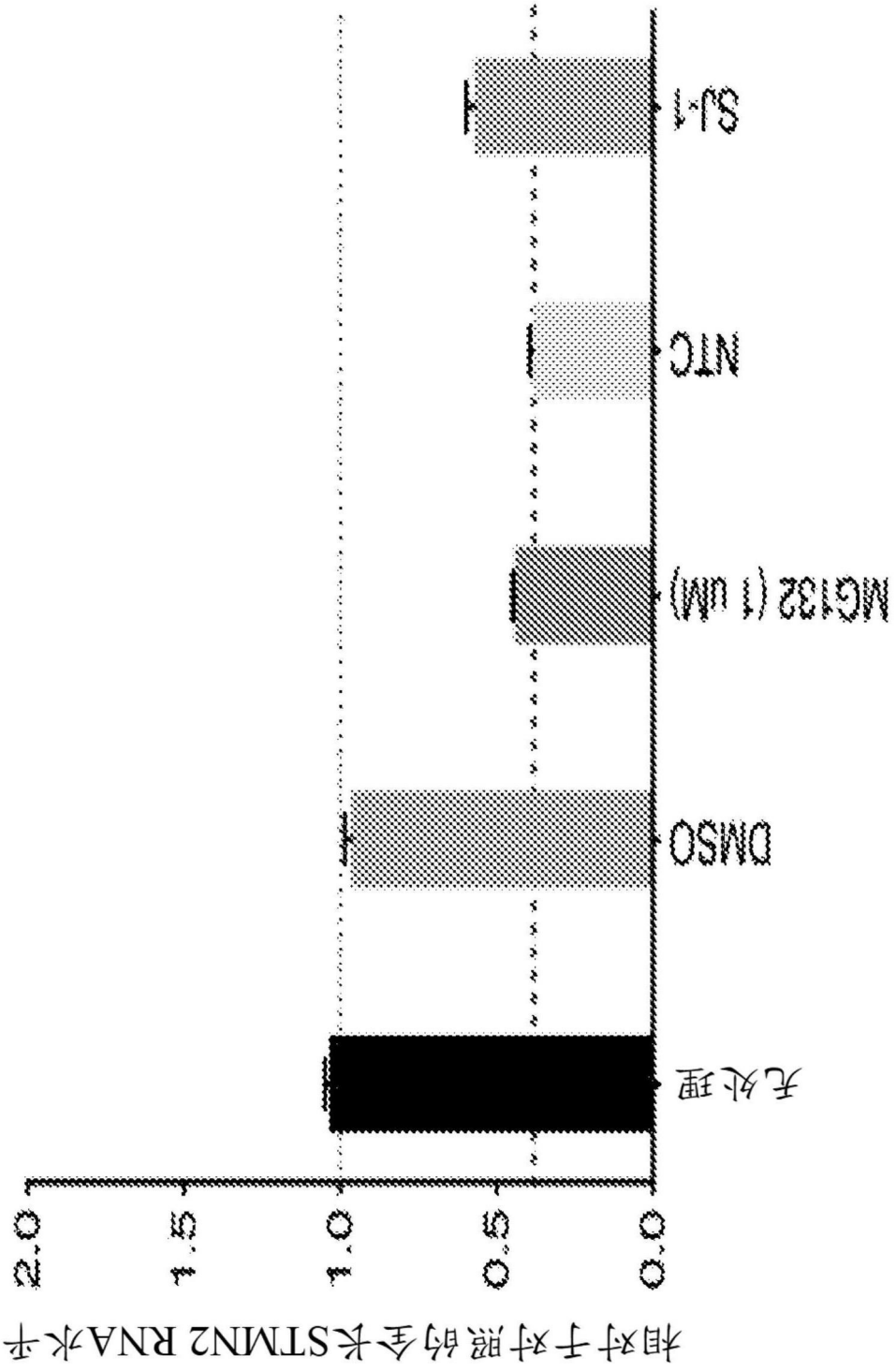


图96

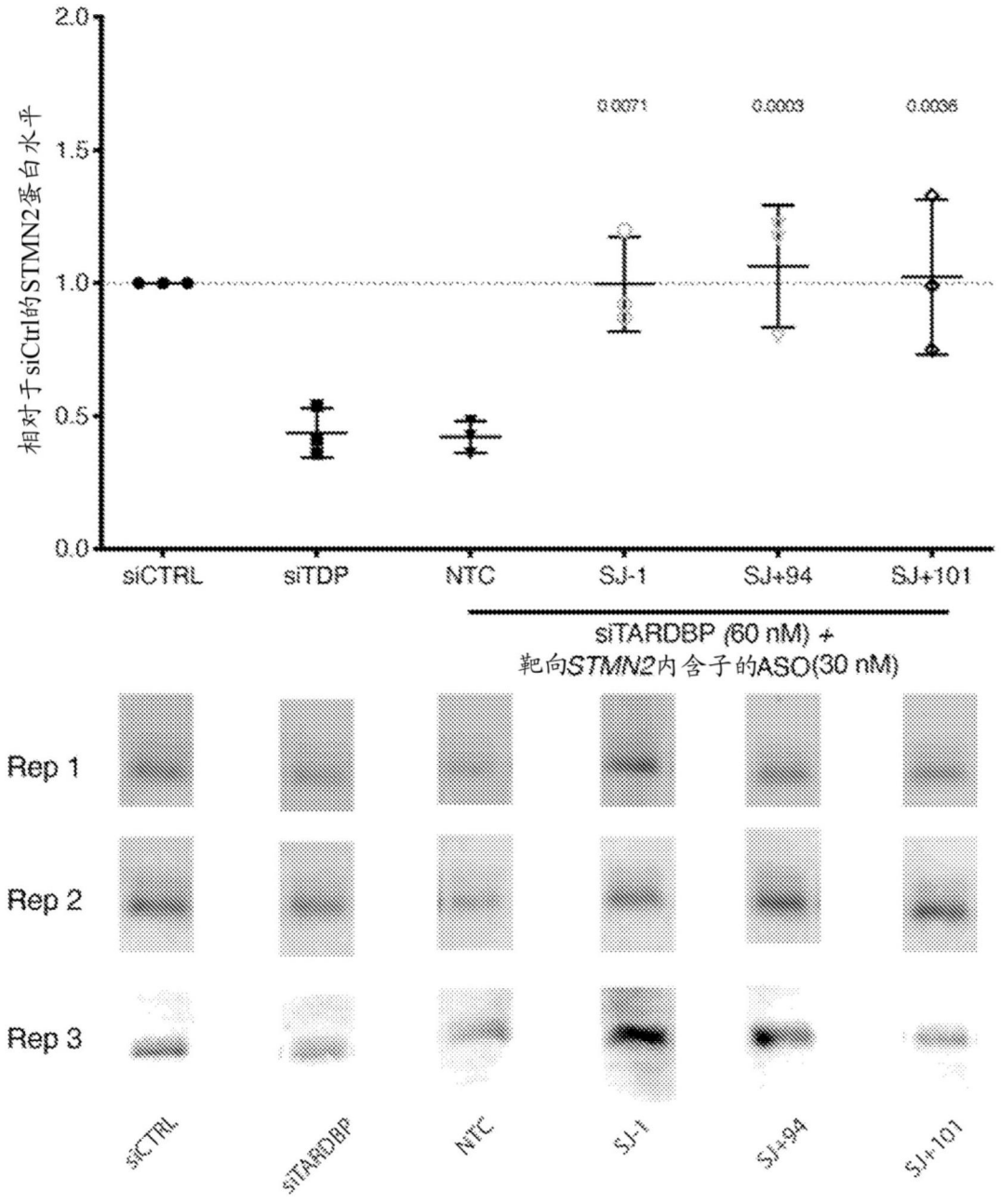

2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
相对于siCtrl的STMN2蛋白水平
0.0071
0.0003
0.0036
siCTRL
siTDP
NTC
SJ-1
SJ+94
SJ+101
siTARDBP (60 nM) +
靶向STMN2内含子的ASO(30 nM)
Rep 1
Rep 2
Rep 3
siCTRL
siTARDBP
NTC
SJ-1
SJ+94
SJ+101

图97