



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114364436 A

(43) 申请公布日 2022. 04. 15

(21) 申请号 202080060115.3

(22) 申请日 2020.10.16

(30) 优先权数据

62/916713 2019.10.17 US

63/040989 2020.06.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.02.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/056108 2020.10.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/076983 EN 2021.04.22

(71) 申请人 宾州研究基金会

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 陈功

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 罗文锋 初明明

(51) Int.Cl.

A61P 25/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

权利要求书2页 说明书64页 附图86页

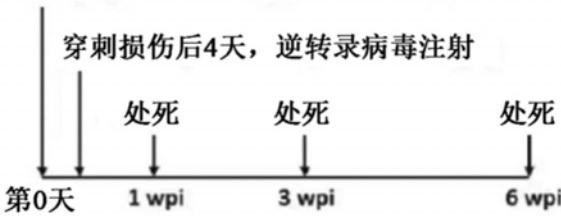
(54) 发明名称

再生功能神经元以用于治疗脊髓损伤和ALS

(57) 摘要

本文档提供了参与治疗患有脊髓损伤(SCI)的哺乳动物的方法和材料。例如,提供了用于向患有SCI的哺乳动物单独施用含有编码NeuroD1多肽(或其生物活性片段)的外源性核酸的组合物或与Dlx2多肽(或其生物活性片段)的组合物和方法。本文档还提供了参与治疗患有肌萎缩性侧索硬化症(ALS)的哺乳动物的方法和材料。例如,提供了用于向患有ALS的哺乳动物单独施用含有编码NeuroD1多肽(或其生物活性片段)的外源性核酸的组合物或与Isl1多肽(或其生物活性片段)的组合物和方法。

用于诱导组织中的细胞增殖的穿刺损伤



1. 一种用于治疗患有脊髓损伤 (SCI) 的哺乳动物的方法, 其中所述方法包括向所述哺乳动物施用包括编码神经元分化1 (NeuroD1) 多肽或其生物活性片段的外源性核酸的组合物。

2. 一种治疗患有脊髓损伤的哺乳动物的方法, 其中所述方法包括向所述哺乳动物的脊髓施用包括含有腺相关病毒颗粒的药理学上可接受的载体的药物组合物, 所述腺相关病毒颗粒包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸。

3. 一种用于治疗患有脊髓损伤的哺乳动物的方法, 其中所述方法包括向所述哺乳动物的脊髓施用包括以下的组合物: 编码mir124的外源性核酸、编码ISL LIM同源盒1 (Isl1) 多肽或其生物活性片段的外源性核酸以及编码LIM同源盒3 (Lhx3) 多肽或其生物活性片段的外源性核酸。

4. 一种用于治疗患有肌萎缩性侧索硬化症 (ALS) 的哺乳动物的方法, 其中所述方法包括向所述哺乳动物的中枢神经系统施用包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸的组合物。

5. 一种治疗患有ALS的哺乳动物的方法, 其中所述方法包括向所述哺乳动物的中枢神经系统施用包括含有腺相关病毒颗粒的药理学上可接受的载体的药物组合物, 所述腺相关病毒颗粒包括编码NeuroD1的核酸。

6. 一种用于治疗患有肌萎缩性侧索硬化症 (ALS) 的哺乳动物的方法, 其中所述方法包括向所述哺乳动物的中枢神经系统施用包括以下的组合物: 编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸、编码Isl1多肽或其生物活性片段的外源性核酸以及编码Lhx3多肽或其生物活性片段的外源性核酸。

7. 一种用于在患有SCI并且需要 (1) 再生脊髓背侧神经元; (2) 产生新的谷氨酸能神经元; 或 (3) 增加在脊髓中的循环的哺乳动物体内进行所述 (1)、(2) 或 (3) 的方法, 其中所述方法包括向所述哺乳动物施用包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸的组合物, 其中 (a) 所述脊髓神经元得以再生; (b) 新的谷氨酸能神经元得以产生; 或 (c) 脊髓循环得以增加。

8. 一种用于在患有ALS疾病并且需要 (1) 产生运动神经元; (2) 减少小胶质细胞的数量; 或 (3) 减少反应性星形胶质细胞的数量; 的哺乳动物体内进行所述 (1)、(2) 或 (3) 的方法, 其中所述方法包括向所述哺乳动物施用包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸的组合物, 其中 (a) 所述运动神经元得以产生; (b) 小胶质细胞的数量得以减少; 或 (c) 反应性星形胶质细胞的数量得以减少。

9. 一种用于在患有SCI并且需要 (1) 再生脊髓背侧神经元; (2) 产生新的谷氨酸能神经元; 或 (3) 增加在脊髓中的循环的哺乳动物体内进行所述 (1)、(2) 或 (3) 的方法, 其中所述方法包括向所述哺乳动物施用包括以下的组合物: 编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸、编码Isl1多肽或其生物活性片段的外源性核酸或编码Lhx3多肽或其生物活性片段的外源性核酸, 其中 (a) 所述脊髓神经元得以再生; (b) 新的谷氨酸能神经元得以产生; 或 (c) 脊髓循环得以增加。

10. 一种用于治疗患有脊髓损伤的哺乳动物的方法, 其中所述方法包括向所述哺乳动物的脊髓施用包括以下的组合物: (a) 编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸; 以及 (b) 编码远端缺失同源盒2 (Dlx2) 多肽或其生物活性片段的外源性核酸。

11. 一种用于在患有SCI并且需要(1)再生脊髓背侧神经元;(2)产生新神经元;或(3)增加在脊髓中的循环的哺乳动物体内进行所述(1)、(2)或(3)的方法,其中所述方法包括施用包括以下的组合物:(i)编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸;以及(ii)编码Dlx2多肽或其生物活性片段的外源性核酸,其中(a)所述脊髓神经元得以再生;(b)新神经元得以产生;或(c)脊髓循环得以增加。

12. 一种用于治疗患有ALS的哺乳动物的方法,其中所述方法包括向所述哺乳动物施用包括以下的组合物:(a)编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸;以及(b)编码Isl1多肽或其生物活性片段的外源性核酸。

13. 一种用于治疗患有脊髓损伤的哺乳动物的方法,其中所述方法包括向所述哺乳动物的脊髓施用包括以下的组合物:(a)编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸;以及(b)编码Isl1多肽或其生物活性片段的外源性核酸。

再生功能神经元以用于治疗脊髓损伤和ALS

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年10月17日提交的美国专利申请序列第62/916,713号和于2020年6月18日提交的美国专利申请序列第63/040,989号的权益。在先申请的公开内容被视为本申请的公开内容的一部分(并且通过引用并入本申请的公开内容中)。

[0003] 政府支持

[0004] 本发明是根据美国陆军(United States Army)/MRMC授予的授权号W81XWH-16-1-0163在政府支持下进行的。政府拥有本发明的某些权利。

技术领域

[0005] 本文档涉及参与治疗患有脊髓损伤(SCI)的哺乳动物的方法和材料。例如,本文档提供了用于向患有SCI的哺乳动物单独施用含有编码NeuroD1多肽(或其生物活性片段)的外源性核酸的组合物或与编码Dlx2多肽(或其生物活性片段)的外源性核酸的组合物和方法的材料。本文档还涉及参与治疗患有肌萎缩性侧索硬化症(ALS)的哺乳动物的方法和材料。例如,本文档提供了用于向患有ALS的哺乳动物施用含有编码NeuroD1多肽(或其生物活性片段)的外源性核酸的组合物和方法的材料。举例来说,本文档提供了用于向患有ALS的哺乳动物单独施用含有编码NeuroD1多肽(或其生物活性片段)的外源性核酸的组合物或与编码Isl1多肽(或其生物活性片段)的外源性核酸的组合物和方法的材料。

背景技术

[0006] 脊髓损伤(SCI)是一种破坏性中枢神经系统(CNS)病症并且通常导致损伤位点以下的运动和感觉功能丧失,甚至瘫痪,这取决于损伤的严重性(Adams和Hicks,《脊髓(Spinal Cord)》,43:577-586(2005))。SCI之后的病理生理学过程是相当复杂的,从而导致轴突的神经元丧失、神经炎症、脱髓鞘和瓦勒氏变性(Wallerian degeneration)(Norenberg等人,《神经创伤杂志(J.Neurotrauma)》,21:429-440(2004))。反应性星形胶质细胞增生是CNS损伤所常见的,并且在SCI之后特别严重。驻留星形胶质细胞与损伤诱导的细胞因子反应并且显著上调许多蛋白质,如星形胶质细胞标志物GFAP和神经祖细胞标志物巢蛋白和波形蛋白的表达(Sofroniew,《神经科学趋势(Trends Neurosci.)》,32:638-647(2009))。这些反应性星形胶质细胞还在细胞形态上具有增殖性和肥大性。在SCI的急性期,反应性星形胶质细胞在修复血液-脊髓屏障和限制原发性损伤的大小中起重要作用(Herrmann等人,《神经科学杂志(J.Neurosci.)》,28:7231-7243(2008);以及Okada等人,《自然·医学(Nature Med.)》,12:829-834(2006))。然而,在亚急性期或慢性期中,反应性星形胶质细胞构成胶质瘢痕的主要组分,所述胶质瘢痕是抑制轴突再生的致密组织结构(Silver和Miller,《自然神经科学综述(Nat.Rev.Neurosci.)》,5:146-156(2004))。因此,数十年来,已经做出了大量努力来克服胶质瘢痕并促进切断的轴突通过损伤位点再生长(Filous和Schwab,《美国病理学杂志(Am.J.Pathol.)》,188(1):53-62(2017))。另一方面,在损伤期间和之后丧失的脊柱神经元需要被替换以便重建局部神经元回路。在这方面,据

报道干细胞移植已经实现一定的成功 (Lu 等人,《临床研究杂志 (J.Clin.Inv.)》,127:3287-3299 (2017); 以及Tuszynski 等人,《细胞 (Cell)》,156:388-389 (2014)), 然而, 移植细胞在损伤位点的长期存活一直是未解决的问题 (Goldman,《细胞干细胞 (Cell Stem Cell)》,18:174-188 (2016))。因此, 对于治疗脊髓损伤, 仍然存在实质性未满足的需要。

[0007] 肌萎缩性侧索硬化症 (ALS) 是一种影响运动神经元的晚发性致命神经退行性疾病, 其中发病率为约1/100,000。大多数ALS病例是散发性的, 但是5-10%的病例是家族性ALS。散发性和家族性ALS (FALS) 两者均与皮质和脊髓运动神经元的变性相关。ALS的病因学仍然未知。然而, 已知超氧化物歧化酶1 (SOD1) 的突变是FALS的最常见原因。尽管集中精力研究引起疾病病理学的基本机制, 但是对于治疗ALS仍然存在实质性未满足的需要。

发明内容

[0008] 本文档提供了参与治疗患有脊髓损伤 (SCI) 的哺乳动物的方法和材料。例如, 本文档提供了用于向患有SCI的哺乳动物单独施用含有编码NeuroD1多肽 (或其生物活性片段) 的外源性核酸的组合物或与编码Dlx2多肽 (或其生物活性片段) 的外源性核酸的组合作用的方法和材料。本文档还涉及参与治疗患有肌萎缩性侧索硬化症 (ALS) 的哺乳动物的方法和材料。例如, 本文档提供了用于向患有ALS的哺乳动物施用含有编码NeuroD1多肽 (或其生物活性片段) 的外源性核酸的组合作用的方法和材料。本文档还提供了用于向患有ALS的哺乳动物单独施用含有编码NeuroD1多肽 (或其生物活性片段) 的外源性核酸的组合物或与编码Isl1多肽 (或其生物活性片段) 的外源性核酸的组合作用的方法和材料。

[0009] 通常,本文档的一个方面的特征在于用于治疗患有脊髓损伤(SCI)的哺乳动物的方法。所述方法包括(或基本上由以下组成或由以下组成)向所述哺乳动物施用包括(或基本上由以下组成或由以下组成)编码神经元分化1(NeuroD1)多肽或其生物活性片段的外源性核酸的组合物。所述哺乳动物可以是人。所述脊髓损伤可能是由于选自由以下组成的组的病状引起的:缺血性中风;出血性中风;身体损伤;脑震荡;挫伤;爆发;渗透;肿瘤;炎症;感染;创伤性脊柱损伤;缺血性或出血性脊髓病(脊髓梗塞);由心脏骤停或严重低血压(休克)引起的全局缺血;由缺氧、低血糖或贫血引起的缺氧-缺血性脑病;由感染性心内膜炎或心房粘液瘤引起的CNS栓塞;纤维软骨栓塞性脊髓病;由儿科白血病引起的CNS血栓形成;如由肾病综合征(肾脏疾病)、慢性炎性疾病、妊娠、使用基于雌激素的避孕药、脑膜炎、脱水引起的脑静脉窦血栓形成;或其任何两个或更多的组合。所述施用步骤可以包括向脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。所述施用步骤可以包括向脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。所述施用步骤可以包括向脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。所述腺相关病毒可以是AAV.PHP.eB。所述施用步骤可以包括施用包括编码NeuroD1多肽的核酸序列的重组表达载体,其中所述编码NeuroD1多肽的核酸序列包括选自由以下组成的组的核酸序列:编码SEQ ID NO:2或其功能片段的核酸序列;编码SEQ ID NO:4或其功能片段的核酸序列;SEQ ID NO:1或其功能片段;SEQ ID NO:3或其功能片段;以及编码与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4或其功能片段具有70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的蛋白质的核酸序列。所述施

用步骤可以包括对脊髓的立体定向注射。所述施用步骤可以包括静脉内注射或静脉内输注。

[0010] 另一方面,本文档的特征在于治疗患有脊髓损伤的哺乳动物的方法。所述方法包括(或基本上由以下组成或由以下组成)向所述哺乳动物的脊髓施用包括(或基本上由以下组成或由以下组成)含有腺相关病毒颗粒的药学上可接受的载体的药物组合物,所述腺相关病毒颗粒包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸。所述药物组合物可以包括约1 μ L到约500 μ L的药学上可接受的载体,所述药学上可接受的载体含有浓度为 10^{10} - 10^{14} 个腺相关病毒颗粒/毫升的包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的载体的腺相关病毒。可以将所述药物组合物以约0.1微升/分钟到约5微升/分钟的受控流速注射到所述哺乳动物的脊髓中。

[0011] 另一方面,本文档的特征在于用于治疗患有脊髓损伤的哺乳动物的方法。所述方法包括(或基本上由以下组成或由以下组成)向所述哺乳动物的脊髓施用包括以下(或基本上由以下组成或由以下组成)的组合物:编码mir124的外源性核酸、编码ISL LIM同源盒1(Isl1)多肽或其生物活性片段的外源性核酸以及编码LIM同源盒3(Lhx3)多肽或其生物活性片段的外源性核酸。所述哺乳动物可以是人。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的脊髓递送(i)包括编码mir124的核酸的表达载体;(ii)包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体以及(iii)包括编码多肽或其生物活性片段Lhx3的核酸的表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的脊髓递送(i)包括编码mir124的核酸的重组病毒表达载体;(ii)包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体以及(iii)包括编码Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的脊髓递送(i)包括编码mir124的核酸的重组腺相关病毒表达载体;(ii)包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体以及(iii)包括编码Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的脊髓递送包括编码mir124、Isl1多肽或其生物活性片段以及Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的脊髓递送包括编码mir124、Isl1多肽或其生物活性片段以及Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的脊髓递送包括编码mir124、Isl1多肽或其生物活性片段以及Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。所述施用步骤可以进一步包括向所述哺乳动物的脊髓施用治疗有效剂量的编码神经元素2(Ngn2)多肽或其生物活性片段、mir218的外源性核酸以及编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸与mir124、Isl1多肽或其生物活性片段、或Lhx3多肽或其生物活性片段的任何组合的组合中的一种或多种。所述腺相关病毒可以是AAV.PHP.eB。

[0012] 另一方面,本文档的特征在于用于治疗患有肌萎缩性侧索硬化症(ALS)的哺乳动物的方法。所述方法包括(或基本上由以下组成或由以下组成)向所述哺乳动物的中枢神经系统施用包括(或基本上由以下组成或由以下组成)编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸的组合物。所述哺乳动物可以是人。所述施用步骤可以包括向脑递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。所述施用步骤可以包括向脑递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。所述施用步骤可以包括向脑递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。所

述腺相关病毒可以是AAV.PHP.eB。所述施用步骤可以包括施用包括编码NeuroD1蛋白的核酸序列的重组表达载体,其中所述编码NeuroD1蛋白的核酸序列包括选自以下组成的组的核酸序列:编码SEQ ID NO:2或其功能片段的核酸序列;编码SEQ ID NO:4或其功能片段的核酸序列;SEQ ID NO:1或其功能片段;SEQ ID NO:3或其功能片段;以及编码与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4或其功能片段具有70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的蛋白质的核酸序列。所述施用步骤可以包括立体定向颅内注射。所述施用步骤可以包括两次或更多次立体定向颅内注射。所述施用步骤可以包括眶后注射。

[0013] 另一方面,本文档的特征在于治疗患有ALS的哺乳动物的方法。所述方法包括(或基本上由以下组成或由以下组成)向所述哺乳动物的中枢神经系统施用包括(或基本上由以下组成或由以下组成)含有腺相关病毒颗粒的药理学上可接受的载体的药物组合物,所述腺相关病毒颗粒包括编码NeuroD1的核酸。所述药物组合物可以包括约1 μ L到约500 μ L的药理学上可接受的载体,所述药理学上可接受的载体含有浓度为 10^{10} - 10^{14} 个腺相关病毒颗粒/毫升的包括编码NeuroD1多肽的核酸的载体的腺相关病毒。可以将所述药物组合物以约0.1微升/分钟到约5微升/分钟的受控流速注射到所述哺乳动物的中枢神经系统中。

[0014] 另一方面,本文档的特征在于用于治疗患有肌萎缩性侧索硬化症(ALS)的哺乳动物的方法。所述方法包括(或基本上由以下组成或由以下组成)向所述哺乳动物的中枢神经系统施用包括以下(或基本上由以下组成或由以下组成)的组合物:编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸、编码Isl1多肽或其生物活性片段的外源性核酸以及编码Lhx3多肽或其生物活性片段的外源性核酸。所述哺乳动物可以是人。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的中枢神经系统递送(i)包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体;(ii)包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体以及(iii)包括编码Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的中枢神经系统递送(i)包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体;(ii)包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体以及(iii)包括编码Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的中枢神经系统递送(i)包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体;(ii)包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体以及(iii)包括编码Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的中枢神经系统递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段、Isl1多肽或其生物活性片段以及Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的中枢神经系统递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段、Isl1多肽或其生物活性片段以及Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。所述施用步骤可以进一步包括向所述哺乳动物的中枢神经系统施用治疗有效剂量的编码Ngn2、mir218和mir124的外源性核酸与NeuroD1多肽或其生物活性片段、Isl1多肽或其生物活性片段以及Lhx3多肽或其生物活

性片段的任何组合的组合中的一种或多种。所述腺相关病毒可以是AAV.PHP.eB。

[0015] 另一方面,本文档的特征在于用于在患有SCI并且需要(1)再生脊髓背侧神经元;(2)产生新的谷氨酸能神经元;或(3)增加在脊髓中的循环的哺乳动物体内进行所述(1)、(2)或(3)的方法。所述方法包括(或基本上由以下组成或由以下组成)向所述哺乳动物施用包括(或基本上由以下组成或由以下组成)编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸的组合物,其中(a)脊髓神经元得以再生;(b)新的谷氨酸能神经元得以产生;或(c)脊髓循环得以增加。所述哺乳动物可以是人。所述施用步骤可以包括向脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。所述施用步骤可以包括向脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。所述施用步骤可以包括向脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。所述腺相关病毒可以是AAV.PHP.eB。所述施用步骤可以包括施用包括编码NeuroD1多肽的核酸序列的重组表达载体,其中所述编码NeuroD1多肽的核酸序列包括选自以下组成的组的核酸序列:编码SEQ ID NO:2或其功能片段的核酸序列;编码SEQ ID NO:4或其功能片段的核酸序列;SEQ ID NO:1或其功能片段;SEQ ID NO:3或其功能片段;以及编码与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4或其功能片段具有70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的蛋白质的核酸序列。所述施用步骤可以包括对脊髓的立体定向注射。所述施用步骤可以包括静脉内注射或静脉内输注。

[0016] 另一方面,本文档的特征在于用于在患有ALS疾病并且需要(1)产生运动神经元;(2)减少小胶质细胞的数量;或(3)减少反应性星形胶质细胞的数量哺乳动物体内进行所述(1)、(2)或(3)的方法。所述方法包括(或基本上由以下组成或由以下组成)向所述哺乳动物施用包括(或基本上由以下组成或由以下组成)编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸的组合物,其中(a)所述运动神经元得以产生;(b)小胶质细胞的数量得以减少;或(c)反应性星形胶质细胞的数量得以减少。所述哺乳动物可以是人。所述施用步骤可以包括向脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。所述施用步骤可以包括向脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。所述施用步骤可以包括向脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。所述腺相关病毒可以是AAV.PHP.eB。所述施用步骤可以包括施用包括编码NeuroD1多肽的核酸序列的重组表达载体,其中所述编码NeuroD1多肽的核酸序列包括选自以下组成的组的核酸序列:编码SEQ ID NO:2或其功能片段的核酸序列;编码SEQ ID NO:4或其功能片段的核酸序列;SEQ ID NO:1或其功能片段;SEQ ID NO:3或其功能片段;以及编码与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4或其功能片段具有70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的蛋白质的核酸序列。所述施用步骤可以包括对脊髓的立体定向注射。所述施用步骤可以包括静脉内注射或静脉内输注。

[0017] 另一方面,本文档的特征在于用于在患有SCI并且需要(1)再生脊髓背侧神经元;(2)产生新的谷氨酸能神经元;或(3)增加在脊髓中的循环的哺乳动物体内进行所述(1)、(2)或(3)的方法。所述方法包括(或基本上由以下组成或由以下组成)向所述哺乳动物施用

包括以下(或基本上由以下组成或由以下组成)的组合物:编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸、编码Isl1多肽或其生物活性片段的外源性核酸以及编码Lhx3多肽或其生物活性片段的外源性核酸,其中(a)脊髓神经元得以再生;(b)新的谷氨酸能神经元得以产生;或(c)脊髓循环得以增加。所述哺乳动物可以是人。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的中枢神经系统递送(i)包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体;(ii)包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体或(iii)包括编码Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的中枢神经系统递送(i)包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体;(ii)包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体或(iii)包括编码Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的中枢神经系统递送(i)包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体;(ii)包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体或(iii)包括编码Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。所述腺相关病毒可以是AAV.PHP.eB。所述施用步骤可以包括对脊髓的立体定向注射。所述施用步骤可以包括静脉内注射或静脉内输注。

[0018] 另一方面,本文档的特征在于用于治疗患有脊髓损伤的哺乳动物的方法。所述方法包括(或基本上由以下组成或由以下组成)向所述哺乳动物的脊髓施用包括以下(或基本上由以下组成或由以下组成)的组合物:(a)编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸以及(b)编码远端缺失同源盒2(Dlx2)多肽或其生物活性片段的外源性核酸。所述哺乳动物可以是人。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的脊髓递送(i)包括编码NeuroD1多肽的表达载体以及(ii)包括编码Dlx2多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的脊髓递送(i)包括编码NeuroD1多肽的核酸的重组病毒表达载体以及(ii)包括编码Dlx2多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的脊髓递送(i)包括编码NeuroD1多肽的核酸的重组腺相关病毒表达载体以及(ii)包括编码Dlx2多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段以及Dlx2多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段以及Dlx2多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段以及Dlx2多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。所述腺相关病毒可以是AAV.PHP.eB。所述施用步骤可以包括施用包括编码NeuroD1多肽的核酸序列的重组表达载体,其中所述编码NeuroD1多肽的核酸序列包括选自由以下组成的组的核酸序列:编码SEQ ID NO:2或其功能片段的核酸序列;编码SEQ ID NO:4或其功能片段的核酸序列;SEQ ID NO:1或其功能片段;SEQ ID NO:3或其功能片段;以及编码与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4或其功能片段具有70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的蛋白质的核酸序列。所述施用步骤可以包括施用包括编码Dlx2多肽的核酸序列的重组表达载体,其中所述编码Dlx2多肽的核酸序列包括选自由以下组成的组的核酸序列:编码SEQ ID NO:11或其功

能片段的核酸序列;编码SEQ ID NO:13或其功能片段的核酸序列;SEQ ID NO:10或其功能片段;SEQ ID NO:12或其功能片段;以及编码与SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13或其功能片段具有70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的蛋白质的核酸序列。所述施用步骤可以包括对脊髓的立体定向注射。所述施用步骤可以包括静脉内注射或静脉内输注。所述腺相关病毒可以是AAV血清型5。

[0019] 另一方面,本文档的特征在于用于在患有SCI并且需要(1)再生脊髓背侧神经元;(2)产生新神经元;或(3)增加在脊髓中的循环的哺乳动物体内进行所述(1)、(2)或(3)的方法。所述方法包括(或基本上由以下组成或由以下组成)施用包括以下(或基本上由以下组成或由以下组成)的组合物:(i)编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸以及(ii)编码Dlx2多肽或其生物活性片段的外源性核酸,其中(a)脊髓神经元得以再生;(b)新神经元得以产生;或(c)脊髓循环得以增加。所述哺乳动物可以是人。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的中枢神经系统递送(i)包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体以及(ii)包括编码Dlx2多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的中枢神经系统递送(i)包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体以及(ii)包括编码Dlx2多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的中枢神经系统递送(i)包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体以及(ii)包括编码Dlx2多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段以及Dlx2多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段以及Dlx2多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段以及Dlx2多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。所述腺相关病毒可以是AAV.PHP.eB。所述施用步骤可以包括对脊髓的立体定向注射。所述施用步骤可以包括静脉内注射或静脉内输注。新神经元可以选自由谷氨酸能神经元和GABA能神经元组成的组。新神经元可以是谷氨酸能神经元。新神经元可以是GABA能神经元。所述腺相关病毒可以是AAV血清型5。

[0020] 另一方面,本文档的特征在于用于治疗患有ALS的哺乳动物的方法。所述方法包括(或基本上由以下组成或由以下组成)向所述哺乳动物施用包括以下的组合物:(a)编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸以及(b)编码Isl1多肽或其生物活性片段的外源性核酸。所述哺乳动物可以是人。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物递送(i)包括核酸NeuroD1多肽的表达载体以及(ii)包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物递送(i)包括编码NeuroD1多肽的核酸的重组病毒表达载体以及(ii)包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的脊髓递送(i)包括编码NeuroD1多肽的核酸的重组腺相关病毒表达载体以及(ii)包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段以及Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。所述施用步骤可以包括

向所述哺乳动物递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段以及Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段以及Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。所述腺相关病毒可以是AAV.PHP.eB。所述施用步骤可以包括施用包括编码NeuroD1多肽的核酸序列的重组表达载体,其中所述编码NeuroD1多肽的核酸序列包括选自由以下组成的组的核酸序列:编码SEQ ID NO:2或其功能片段的核酸序列;编码SEQ ID NO:4或其功能片段的核酸序列;SEQ ID NO:1或其功能片段;SEQ ID NO:3或其功能片段;以及编码与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4或其功能片段具有70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的蛋白质的核酸序列。所述施用步骤可以包括施用包括编码Isl1多肽的核酸序列的重组表达载体,其中所述编码Isl1多肽的核酸序列包括选自由以下组成的组的核酸序列:编码SEQ ID NO:15或其功能片段的核酸序列;编码SEQ ID NO:17或其功能片段的核酸序列;SEQ ID NO:14或其功能片段;SEQ ID NO:16或其功能片段;以及编码与SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:17或其功能片段具有70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的蛋白质的核酸序列。

[0021] 另一方面,本文档的特征在于用于治疗患有脊髓损伤的哺乳动物的方法。所述方法包括(或基本上由以下组成或由以下组成)向所述哺乳动物的脊髓施用包括以下的组合物:(a) 编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸以及(b) 编码Isl1多肽或其生物活性片段的外源性核酸。所述哺乳动物可以是人。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的脊髓递送(i) 包括核酸NeuroD1多肽的表达载体以及(ii) 包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的脊髓递送(i) 包括编码NeuroD1多肽的核酸的重组病毒表达载体以及(ii) 包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的脊髓递送(i) 包括编码NeuroD1多肽的核酸的重组腺相关病毒表达载体以及(ii) 包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段以及Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段以及Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。所述施用步骤可以包括向所述哺乳动物的脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段以及Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。所述腺相关病毒可以是AAV.PHP.eB。所述施用步骤可以包括施用包括编码NeuroD1多肽的核酸序列的重组表达载体,其中所述编码NeuroD1多肽的核酸序列包括选自由以下组成的组的核酸序列:编码SEQ ID NO:2或其功能片段的核酸序列;编码SEQ ID NO:4或其功能片段的核酸序列;SEQ ID NO:1或其功能片段;SEQ ID NO:3或其功能片段;以及编码与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4或其功能片段具有70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的蛋白质的核酸序列。所述施用步骤可以包括施用包括编码Isl1

多肽的核酸序列的重组表达载体,其中所述编码Is11多肽的核酸序列包括选自以下组成的组的核酸序列:编码SEQ ID NO:15或其功能片段的核酸序列;编码SEQ ID NO:17或其功能片段的核酸序列;SEQ ID NO:14或其功能片段;SEQ ID NO:16或其功能片段;以及编码与SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:17或其功能片段具有70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的蛋白质的核酸序列。

[0022] 除非另外定义,否则本文中使用的所有技术术语和科学术语的含义与本发明涉及的领域的普通技术人员通常理解的含义相同。尽管类似或等效于本文所述的方法和材料的方法和材料可以用于实践或测试本发明,但下文描述了合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献均通过引用整体并入本文。在冲突的情况下,将以本说明书(包含定义)为准。另外,所述材料、方法和实例仅是说明性的并且不旨在进行限制。

[0023] 本发明的其它特征和优点将根据以下具体实施方式以及权利要求书而变得显而易见。

附图说明

[0024] 图1A-1F:在脊髓背角穿刺损伤之后使用表达NeuroD1的逆转录病毒进行神经元转化。(图1A)实验范例。(图1B)背角损伤和注射的示意图。坐标是中心动脉侧向0.4mm和组织表面下方0.4mm。用32-规格的针进行穿刺损伤,随后在损伤位点处进行立体定向注射。比例尺500 μ m。(图1C)在注射Retro GFP之后,在病毒注射后1周(wpi)的三种主要类型的增殖细胞:星形胶质细胞、OPC和小胶质细胞。GFAP、Olig2和Iba1染色示出了这些细胞类型的标志物。箭头示出了每一个的实例。比例尺50 μ m。(图1D)基于Retro GFP,1wpi样品的染色的定量。条形示出了三次重复的平均值和标准偏差。(图1E)在Retro ND1-GFP注射之后,在背角1wpi、3wpi和6wpi中转化细胞。成熟细胞逐渐上调NeuN,适应神经元形态,并且重组。箭头示出了示例NeuN+细胞。比例尺500 μ m。(图1F)基于Retro ND1-GFP,1W样品的染色的定量。条形示出了三次重复的平均值和标准偏差。

[0025] 图2A-2F:在脊髓背角穿刺损伤(例如,脊髓的部分损伤)之后使用表达NeuroD1的AAV9进行神经元转化。(图2A)实验范例。(图2B) AAV9 FLEX-NeuroD1-mCherry/AAV9 GFAP::Cre系统(在别处缩写为AAV9 ND1-mCh)。GFAP启动子将受感染细胞限制于星形胶质细胞。对照病毒用另外的mCh替换ND1转基因。(图2C)在AAV9 mCh注射之后,背角4wpi中的受感染星形胶质细胞。箭头和插图(2 $\times$ 放大率)示出了示例GFAP+单元。比例尺50 μ m。(图2D)在AAV9-ND1-mChy注射之后,背角4wpi中的经转化神经元。箭头和插图(2 $\times$ 放大率)示出了示例NeuN+细胞。比例尺50 μ m。(图2E)在AAV9-ND1-mChy注射之后,转化背角2wpi中的细胞。箭头和插图(4 $\times$ 放大率)示出了示例NeuN+/GFAP+细胞。比例尺50 μ m。(图2F)基于AAV9 ND1-mCh,2wpi和4wpi以及AAV9 ND1-GFP或AAV9 GFP(对照),8wpi样品的染色的定量。条形示出了三次重复的平均值和标准偏差。2wpi的受感染细胞大部分是过渡性的,对于NeuN和GFAP是染色阳性的,并且4wpi的受感染细胞大部分是转化的,仅对于NeuN是染色阳性的。

[0026] 图3A-3D:脊髓背角中的经NeuroD1转化的神经元的亚型。(图3A)在AAV9 ND1-GFP注射之后,背角8wpi中的经转化神经元的Tlx3(谷氨酸能)和Pax2(GABA能)亚型染色。Z-投

影靶向示例Tlx3+神经元。比例尺50 μ m。(图3B)在Retro ND1-GFP注射之后,背角6wpi中的经转化神经元的Tlx3和Pax2亚型染色。Z-投影靶向示例Pax2+神经元。比例尺50 μ m。(图3C) 24基于AAV9 ND1-GFP,8wpi和Retro ND1-GFP,6wpi样品的亚型染色的定量。对照数据是基于未损伤的、未经处理的组织中的NeuN+细胞。条形示出了三次重复的平均值和标准偏差。(图3D)在4wpi下AAV9 ND1-mCy和CaMK2-GFP共注射与经转化的Tlx3+细胞的CaMK2的强(89.5 $\pm$ 5.2%)共标记。Z-投影靶向示例Tlx3+、CaMK2+神经元。比例尺50 μ m。

[0027] 图4A-4D:脑对脊髓中的经NeuroD1转化的神经元的区域特异性亚型。(图4A)在AAV9 ND1-mCh注射之后,皮质4wpi中的经转化神经元的亚型染色。箭头示出了对于每个亚型呈阳性的细胞的实例。比例尺50 μ m。(图4B) 25基于皮质中的AAV9 ND1-mCh,4wpi样品的亚型染色的定量。条形示出了三次重复的平均值和标准偏差。(图4C)在AAV9 ND1-mChy注射之后,脊髓背角4wpi中的经转化神经元的亚型染色。箭头示出了对于每个亚型呈阳性的细胞的实例。比例尺50 μ m。(图4D)基于脊髓中的AAV9 ND1-mCh,4wpi样品的亚型染色的定量。条形示出了三次重复的平均值和标准偏差。

[0028] 图5A-5I:脊髓背角中的经NeuroD1转化的神经元的成熟和功能性。(图5A)膜片钳的经转化神经元的荧光/透射光图像。(图5B)对经转化神经元的动作电位进行采样。(图5C)对经转化神经元的Na⁺和K⁺电流进行采样。(图5D)对转化神经元的EPSC进行采样。(图5E)经转化神经元和天然神经元的Na⁺电流振幅。(图5F)经转化神经元和天然神经元的EPSC振幅和频率。(图5G)在AAV9 ND1-GFP注射之后,背角8wpi中的经转化神经元的突触SV2和VGluT1点。箭头和插图(4 $\times$ 放大率)示出了具有在其体细胞上可见的点的示例细胞和过程。比例尺50 μ m。(图5H)在AAV9 ND1-GFP注射之后,背角8wpi中的经转化神经元的突触SV2和VGluT2点。箭头和插图(4 $\times$ 放大率)示出了具有在其体细胞上可见的点的示例细胞和过程。比例尺50 μ m。(图5I)在AAV9 ND1-GFP注射之后,将经转化神经元整合到背角8wpi中的局部网络中。由cFos染色指示的激活神经元是所有神经元的子集。

[0029] 图6A-6F:NeuroD1在挫伤性SCI之后短暂延迟病毒注射的情况下将反应性星形胶质细胞转化成损伤核心周围的神经元。(图6A)在挫伤性SCI(30Kdyn力)后10天,注射仅表达GFP报告基因或NeuroD1-GFP的AAV9 FLEX连同AAV9 GFAP::Cre以靶向反应性星形胶质细胞。在6wpi下分析脊髓。(图6B) 28实验范例。(图6C)许多受感染细胞在损伤核心周围存活(由*指示)并且在两组之间显示出不同的细胞形态。神经元标志物GFAP和NeuN的免疫染色表明通过ND1-GFP从反应性星形胶质细胞成功进行神经元转化。比例尺在低放大率下为50 μ m,在高放大率下为20 μ m。(图6D)每次感染的经转化神经元的估计数量(从一个背部、一个中部和一个腹部切片计算的每个水平切片的NeuN+受感染细胞的平均数乘以每个样品的水平切片的总数(对于每个组n=3;*,p<0.01))。(图6E)在6wpi下的NeuN采集(对于每个组n=3;*,p<0.01)。(图6F)在6wpi下的GFAP丧失(对于每个组n=3;*,p<0.01)。

[0030] 图7A-7I:在挫伤性SCI之后长延迟病毒注射的情况下的NeuroD1介导的神经元转化。(图7A)在挫伤性SCI(30Kdyn力)后16周,注射仅表达GFP报告基因或NeuroD1-GFP的AAV9 FLEX连同AAV9 GFAP::Cre以靶向反应性星形胶质细胞。在10wpi下分析脊髓。(图7B)受感染细胞在损伤核心周围存活(由*指示)并且在30两组之间显示出不同的细胞形态。(图7C)星形胶质细胞标志物S100b在对照GFP+细胞中的共表达。比例尺50 μ m。(图7D)神经元标志物NeuN的免疫染色表明通过ND1-GFP以高效率从反应性星形胶质细胞成功进行神经元转化。

比例尺50 μ m。(图7E)在10wpi下的NeuN采集(对于每个组n=4;***,p<0.005)。(图7F)ND1蛋白在ND1-GFP+细胞中与典型的神经元形态共表达。比例尺20 μ m。(图7G)成熟神经元标志物SV2在ND1-GFP+细胞中的共表达。(图7H)神经元活性标志物cFos在ND1-GFP+细胞中的共表达。比例尺20 μ m。(图7I)谷氨酸能亚型标志物Tlx3在脊髓背角的ND1-GFP+神经元中的共表达。箭头示出了示例Tlx3+细胞。比例尺20 μ m。

[0031] 图8A-8B:通过AAV9-ND1-mChy感染的细胞在损伤的脊髓中过表达ND1蛋白。(图8A)免疫染色分析证实,通过AAV9 ND1-mCh感染的细胞表达神经元标志物NeuN,这表明在4wpi下损伤的脊髓的背角中的神经元转化。比例尺200 μ m。(图8B)受感染细胞在4wpi下过表达ND1蛋白。比例尺50 μ m。

[0032] 图9:NeuroD1介导的神经元转化不涉及细胞凋亡。进行TUNEL测定,以在损伤的脊髓中通过AAV9 ND1-mCh在神经元转化的不同阶段检测凋亡细胞。箭头示出了是NeuN+但TUNEL-的受感染细胞。

[0033] 图10A-10B:CaMK2-GFP病毒和GAD-GFP小鼠可以用于证实神经元亚型。(图10A)CaMK2-GFP(来自共注射的AAV9病毒)与Tlx3共染色,而(图10B)GAD-GFP(来自GAD-GFP转基因小鼠)与Pax2共染色,这表明这些标志物可以用于证实背角中的谷氨酸能和GABA能亚型。比例尺200 μ m。以下是4 $\times$ 放大率虚线框。

[0034] 图11A-11D:(图11A)穿刺损伤和病毒感染位点的示意图。(图11B)感染中的构建体的示意图。(图11C)感染后的染色示出了RFP、NeuN和GFAP的共染色。(图11D)在不同感染组合后的标志物组。

[0035] 图12A-12E:(图12A)在感染后1周(wpi)和感染后3周(wpi)用对照(mCherry)或MIL(mir124、Isl1和Lhx3)感染后的标志物组。(图12B)在1wpi下,对于mCherry和MIL,NeuN⁺RFP⁺/RFP⁺的直方图。(图12C)在3wpi下,对于mCherry和MIL,NeuN⁺RFP⁺/RFP⁺的直方图。(图12D)在1wpi下,对于mCherry和MIL,GFAP⁺RFP⁺/RFP⁺的直方图。(图12E)在3wpi下,对于mCherry和MIL,GFAP⁺RFP⁺/RFP⁺的直方图。

[0036] 图13A-13G:对于mir124、Isl1和Lhx3的NeuN免疫染色。Isl1和Lhx3两者都可以有效地将星形胶质细胞转化成神经元。*表示p<0.05。

[0037] 图14A-14C:用运动神经元标志物ChAT进行免疫染色发现Isl1可以将星形胶质细胞转化成运动神经元。

[0038] 图15A-15C:ChAT染色还表明Lhx3可以将星形胶质细胞转化成运动神经元。*P<0.01。

[0039] 图16:这些结果证实星形胶质细胞而不是经转化神经元中的Cre的GFAP::Cre表达。

[0040] 图17A-17D:这些结果表明,在GFAP::Cre转基因小鼠中,NeuroD1还可以将星形胶质细胞转化成神经元。

[0041] 图18A-18C:ND1表达在猫步测定(catwalk assay)中在20周时增加SOD1-G93A小鼠的爪印迹面积。未经处理的,n=5;EF1a-GFP,n=7;并且EF1a-ND1-GFP,n=8。*表示p<0.05。

[0042] 图19:通过猫步测定在20周时进行SOD1-G93A小鼠步态分析。未经处理的,n=5;EF1a-GFP,n=7;并且EF1a-ND1-GFP,n=8。

[0043] 图20:如通过猫步测定所评估的,ND1表达在20周时增加SOD1-G93A小鼠的爪摆动

速度。***表示 $p < 0.001$ 。

[0044] 图21:如通过猫步测定所评估的,ND1表达在20周时缩短SOD1-G93A小鼠的步进循环爪摆动速度。EF1a-GFP, $n=8$; EF1a-ND1-GFP, $n=9$ 。**表示 $p < 0.01$ 。

[0045] 图22:ND1表达在24周时增加SOD1-G93A小鼠的移动性和腿移动。EF1a-GFP, $n=4$; EF1a-ND1-GFP, $n=7$.*表示 $p < 0.05$ 。

[0046] 图23A-23C:对于感染指定病毒的小鼠,GFP、NeuroD1和SOD1在脊髓(图23A)、背角(图23B)或腹角(图23C)中的表达。

[0047] 图24A-24F:对于感染指定病毒的小鼠,GFP、CHAT(运动神经元标志物)、Iba1、iNOS和/或GFAP在脊髓(图24A-图24C)、腹角(图24D-图24E)或大脑、小脑以及腹角(图24F)中的表达。

[0048] 图25A-25L:通过眶后注射,注射有表达ND1/Is11/Lhx的病毒(DIL组)或对照病毒(Con组)的SOD1小鼠的表达分析。DIL组接受以下病毒:AAV.PHP.eB-GFAP-Cre (1.6×10^{10} 个基因组拷贝)加上AAV.PHP.eB-Flex-ND1-GFP (1.9×10^{10} 个基因组拷贝)加上AAV.PHP.eB-Flex-Is11-mCherry (1.3×10^{10} 个基因组拷贝)加上AAV.PHP.eB-Flex-Lhx31-mCherry (1.5×10^{10} 个基因组拷贝)。Con组接受以下病毒:AAV.PHP.eB-GFAP-Cre (1.8×10^{10} 个基因组拷贝)加上AAV.PHP.eB-Flex-GFP (0.8×10^{10} 个基因组拷贝)加上AAV.PHP.eB-Flex-mCherry (3.4×10^{10} 个基因组拷贝)。在9.4周龄进行病毒注射,并且在22.1周时处死小鼠。雄性=对于Con组,1只小鼠并且对于DIL组,2只小鼠;雌性=对于Con组,1只小鼠并且对于DIL组,2只小鼠。来自DIL组和对照组的小鼠的皮质、脑干和丘脑中的GFP(左图)和RFP(右图)的表达。对照和DIL组两者均显示出广泛的感染(图25A)。对照组在皮质和脑干中表现出约30-40%的渗漏,并且在丘脑中表现出大于90%的渗漏。mCherry表现出比GFP稍多的渗漏。DIL组证明所有神经元表达GFP和RFP信号。受感染细胞更加位于脊髓的腹角中(图25B)。Cre信号位于星形胶质细胞中,其中Con组表现出更多的Cre信号(图25C)。在DIL组中,GFP⁺细胞表达ND1信号,并且RFP⁺细胞表达Is11信号(图25D)。Is11表达的强度在脑的不同区域中有所不同(图25E)。Tbr1信号的分布在对照(CON)与DIL组之间表现出很小的差异(图25F)。Iba1信号在脑(图25G)和脊髓(图25H)中在对照(CON)组中具有更高的密度和亮度。在DIL组中在颈脊髓、腹角中存在更多的运动神经元(图25I)。在CON和DIL组两者中,腰部的运动柱中的神经元丧失都很严重(图25J)。在腰部脊髓中难以检测到运动神经元,并且在末期(22.1周)的腰部脊髓中神经变性太严重。血管在高放大率图像中没有显示出巨大差异(图25K)。在DIL组中,血管具有更高的密度和厚度(图25L)。

[0049] 图26A-26D:(图A)用AAV5-ND1-mCherry(AAV5-ND1-mCh)和AAV5-Dlx2-mCherry(AAV5-Dlx2-mCh)感染后,在4wpi下对NeuroD1(ND1)和Dlx2进行染色。(图B)在用AAV5-ND1-mCh和AAV5-Dlx2-mCh共感染后,4wpi下的标志物组(Tlx3和Pax2)。(图C)4wpi下的仅AAV5-ND1和AAV5-ND1-mCh+AAV5-Dlx2-mCh的Tlx3⁺细胞和Pax2⁺细胞的直方图。(图D)用AAV5-ND1-mCh+AAV5-Dlx2-mCh在4wpi下在GAD-GFP小鼠中感染后对Pax2进行染色。

[0050] 图27A-27B:ALS小鼠中的NeuroD1介导的星形胶质细胞到神经元转化。(图27A)将表达mCherry的对照AAV(RFP染色)注射到脊髓中揭示了在ALS小鼠的腹角中GFAP阳性反应性星形胶质细胞的感染。(图27B)AAV NeuroD1-mCherry感染的细胞对于NeuroD1(ND1)、NeuN(神经元标志物)和ChAT(运动神经元标志物)是免疫阳性的。一些经NeuroD1转化的神

经元是脊髓腹角中的ChAT阳性运动神经元。比例尺为50 μ m。

[0051] 图28A-28B:被设计成表达ND1+Isl1的病毒和被设计成表达ND1+Lhx3的病毒的鞘内注射使星形胶质细胞转化成ALS小鼠的腹角中的神经元。(图28A)鞘内注射后,AAV PHP.eB-GFAP::Cre加上AAV PHP.eB-Flex-GFP特异性靶向腹角中的星形胶质细胞,如左列GFP对照组所示。然而,在ND1-GFP+Isl1-mCherry(中间列)和ND1-GFP+Lhx3-mCherry(右列)组两者中,将GFP阳性细胞转化成ALS小鼠的腹角中的神经元。在ND1+Isl1组中存在更多的经转化神经元。比例尺:200 μ m。对9周龄ALS小鼠进行病毒注射,并且对21周龄小鼠进行免疫染色。(图28B)NeuroD1+Isl1组中的NeuN、ND1、Isl1、GFP和RFP的免疫染色。比例尺:40 μ m。

[0052] 图29A-29B:在ALS小鼠的脊髓的不同区段中进行基因疗法治疗之后的运动神经元的定量。(图29A)用运动神经元特异性标志物ChAT的免疫染色揭示了野生型(WT)小鼠和来自ND1+Isl1、ND1+Lhx3和GFP对照组的小鼠中的运动神经元数量。在GFP对照组中观察到运动神经元显著减少。比例尺:100 μ m。(图29B)WT、ND1+Isl1、ND1+Lhx3和GFP对照组的脊髓的不同区段中的运动神经元的定量分析。

[0053] 图30A-30B:NeuroD1+Isl1的病毒递送减少了ALS小鼠的小胶质细胞介导的炎症。(图30A)GFAP免疫染色揭示,被设计成表达ND1+Isl1的病毒处理的颈髓中的抑制的星形胶质细胞激活。比例尺:40 μ m。(图30B)通过在ALS小鼠的ND1+Isl1组中降低的Iba1和CD11b免疫染色观察到小胶质细胞激活的抑制。比例尺:100 μ m。

[0054] 图31A-31G:在递送被设计成表达NeuroD1+Isl1的病毒之后体重和移动性的部分拯救。(图31A)ND1+Isl1处理部分拯救ALS小鼠的体重。(图31B)在鞘内AAV注射之后,经ND1+Lhx3处理的ALS小鼠表现出更高的死亡率,但是运动神经元数量增加。(图31C)第22周的腿部伸展测量结果。(图31D-31F)腿部伸展实验的定量结果:腿部伸展的平均距离(图31D)、腿部伸展的次数(图31E)以及总移动时间(图31F)。用被设计成表达ND1+Isl1的病毒处理的ALS小鼠表现出较好的运动功能。(图31G)用被设计成表达ND1+Isl1的病毒处理的ALS小鼠在悬线测试中表现出更长的持续时间。

[0055] 图32A-32C:示出了基因疗法治疗后的中度改善的旷场测试。(A-B)在旷场测试中,与未经处理的ALS小鼠和用被设计成表达ND1+Lhx3的病毒处理的ALS小鼠相比,用被设计成表达ND1+Isl1的病毒处理的ALS小鼠表现出在旷场盒中行进的距离增加(图32A)和移动时间增加(图32B)。(图32C)在旷场盒中小鼠移动的典型轨迹。

[0056] 图33A-C:猫步步态分析显示,用被设计成表达ND1+Isl1的病毒处理的ALS小鼠的运动功能得到改善。(图33A)在不同组之间的ALS小鼠的猫步脚印的图示。(图33B-33C)示出了在对侧(图33B)或同侧(图33C)的比较中,用被设计成表达ND1+Isl1的病毒处理的ALS小鼠显示出增加的爪印迹面积的定量数据。

具体实施方式

[0057] 本文档提供了用于治疗患有SCI的哺乳动物的方法和材料。例如,本文档提供了用于向患有SCI的哺乳动物施用含有编码NeuroD1多肽的外源性核酸的组合物的方法和材料。在另一实例中,本文档提供了用于向患有SCI的哺乳动物施用含有编码NeuroD1多肽和Dlx2多肽的外源性核酸的组合物的方法和材料。在另一实例中,本文档提供了用于向患有SCI的哺乳动物施用含有以下的组合物的方法和材料:编码mir124微RNA的外源性核酸、编码Isl1

多肽的外源性核酸和/或编码Lhx3多肽的外源性核酸。在另一实例中,本文档提供了用于向患有SCI的哺乳动物施用含有以下的组合物的方法和材料:编码NeuroD1的外源性核酸、编码mir124微RNA的外源性核酸、编码Isl1多肽的外源性核酸和/或编码Lhx3多肽的外源性核酸。

[0058] 本文档还提供了参与治疗患有ALS的哺乳动物的方法和材料。例如,本文档提供了用于向患有ALS的哺乳动物施用含有编码NeuroD1多肽的外源性核酸的组合物的方法和材料。在另一实例中,本文档提供了用于向患有ALS的哺乳动物施用含有以下的组合物的方法和材料:编码NeuroD1多肽的外源性核酸、编码Isl1多肽的外源性核酸以及编码Lhx3多肽的外源性核酸。在另一实例中,本文档提供了用于向患有ALS的哺乳动物施用含有以下的组合物的方法和材料:编码NeuroD1多肽的外源性核酸和编码Isl1多肽的外源性核酸。

[0059] 任何适合的哺乳动物可以被鉴定为患有脑和/或中枢神经系统神经病症(例如,ALS)。例如,人和如猴等其它灵长类动物可以被鉴定为患有ALS。因此,可以如本文所述治疗患有脑和/或中枢神经系统神经病症(例如,ALS)的人、非人灵长类动物、猫、狗、绵羊、山羊、马、牛、猪以及啮齿动物(例如,小鼠和大鼠)。任何适合的哺乳动物可以被鉴定为患有脊髓损伤。例如,人和如猴等其它灵长类动物可以被鉴定为患有脊髓损伤。因此,可以如本文所述治疗患有脊髓损伤的人、非人灵长类动物、猫、狗、绵羊、山羊、马、牛、猪以及啮齿动物(例如,小鼠和大鼠)。

[0060] 在一些情况下,向受脑神经病症(例如,ALS)影响的受试者施用治疗有效量的(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3和Ngn2)的外源性核酸以及(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸介导:通过将反应性星形胶质细胞转化为谷氨酸能神经元来产生新的谷氨酸能神经元;反应性星形胶质细胞的数量减少;包含GABA能神经元和谷氨酸能神经元在内的受损神经元的存活率;新的非反应性星形胶质细胞的产生;未转化的反应性星形胶质细胞的反应性的降低;将血管再整合到受损区域中;运动神经元的产生、小胶质细胞数量的减少以及反应性星形胶质细胞数量的减少。

[0061] 在一些情况下,向受脊髓损伤影响的受试者施用治疗有效量的(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸介导:通过将反应性星形胶质细胞转化为谷氨酸能神经元来产生新的谷氨酸能神经元;反应性星形胶质细胞的数量减少;包含GABA能神经元和谷氨酸能神经元在内的受损神经元的存活率;新的非反应性星形胶质细胞的产生;未转化的反应性星形胶质细胞的反应性的降低;将血管再整合到受损区域中以及再生脊髓背侧神经元。

[0062] 在一些情况下,在施用本文所提供的组合物之后,本文所提供的方法或组合物再生脊髓背侧神经元,脊髓背侧神经元的数量相对于基线水平增加约1%与100%之间。在一些情况下,本文所提供的方法或组合物产生再生脊髓背侧神经元,脊髓背侧神经元的数量相对于基线水平增加约1%与约10%之间、1%与约20%之间、1%与约30%之间、10%与约20%之间、10%与约30%之间、约10%与约40%之间、约20%与约30%之间、约20%与约40%之间、约20%与约50%之间、约30%与约40%之间、约30%与约50%之间、约30%与约60%之间、约40%与约50%之间、约40%与约60%之间、约40%与约70%之间、约50%与约60%之间、约50%与约70%之间、约50%与约80%之间、约60%与约70%之间、约60%与约

80%之间、约60%与约90%之间、约70%与约80%之间、约70%与约90%之间、约70%与约100%之间、约80%与约90%之间、约80%与约100%之间或约90%与约100%之间。

[0063] 在一些情况下,在施用本文所提供的组合物之后,本文所提供的方法或组合物产生新的谷氨酸能神经元,谷氨酸能神经元的数量相对于基线水平增加约1%与500%之间。在一些情况下,在施用本文所提供的组合物之后,本文所提供的方法或组合物产生新的谷氨酸能神经元,谷氨酸能神经元的数量相对于基线水平增加约1%与50%之间、约1%与100%之间、约1%与150%之间、约50%与100%之间、约50%与150%之间、约50%与200%之间、约100%与150%之间、约100%与200%之间、100%与250%之间、约150%与200%之间、约150%与250%之间、约150%与300%之间、200%与250%之间、200%与300%之间、200%与350%之间、250%与300%之间、250%与350%之间、约250%与400%之间、约300%与350%之间、约300%与400%之间、约300%与450%之间、约350%与400%之间、约350%与450%之间、约350%与500%之间、约400%与450%之间、约400%与500%之间或约450%与500%之间。

[0064] 在一些情况下,在施用本文所提供的组合物之后,本文所提供的方法或组合物使脊髓中的循环增加约1%与100%之间。在一些情况下,在施用本文所提供的组合物之后,本文所提供的方法或组合物使脊髓中的循环增加约1%与约10%之间、1%与约20%之间、1%与约30%之间、10%与约20%之间、10%与约30%之间、约10%与约40%之间、约20%与约30%之间、约20%与约40%之间、约20%与约50%之间、约30%与约40%之间、约30%与约50%之间、约30%与约60%之间、约40%与约50%之间、约40%与约60%之间、约40%与约70%之间、约50%与约60%之间、约50%与约70%之间、约50%与约80%之间、约60%与约70%之间、约60%与约80%之间、约60%与约90%之间、约70%与约80%之间、约70%与约90%之间、约70%与约100%之间、约80%与约90%之间、约80%与约100%之间或约90%与约100%之间。

[0065] 在一些情况下,在施用本文所提供的组合物之后,本文所提供的方法或组合物产生运动神经元,运动神经元的数量相对于基线水平增加约1%与500%之间。在一些情况下,在施用本文所提供的组合物之后,本文所提供的方法或组合物产生运动神经元,运动神经元的数量相对于基线水平增加约1%与50%之间、约1%与100%之间、约1%与150%之间、约50%与100%之间、约50%与150%之间、约50%与200%之间、约100%与150%之间、约100%与200%之间、100%与250%之间、约150%与200%之间、约150%与250%之间、约150%与300%之间、200%与250%之间、200%与300%之间、200%与350%之间、250%与300%之间、250%与350%之间、约250%与400%之间、约300%与350%之间、约300%与400%之间、约300%与450%之间、约350%与400%之间、约350%与450%之间、约350%与500%之间、约400%与450%之间、约400%与500%之间或约450%与500%之间。

[0066] 在一些情况下,在施用本文所提供的组合物之后,本文所提供的方法或组合物减少了小胶质细胞,小胶质细胞的数量相对于基线水平减少约1%与100%之间。在一些情况下,在施用本文所提供的组合物之后,本文所提供的方法或组合物减少了小胶质细胞,小胶质细胞的数量相对于基线水平减少约1%与约10%之间、1%与约20%之间、1%与约30%之间、10%与约20%之间、10%与约30%之间、约10%与约40%之间、约20%与约30%之间、约20%与约40%之间、约20%与约50%之间、约30%与约40%之间、约30%与约50%之间、约

30%与约60%之间、约40%与约50%之间、约40%与约60%之间、约40%与约70%之间、约50%与约60%之间、约50%与约70%之间、约50%与约80%之间、约60%与约70%之间、约60%与约80%之间、约60%与约90%之间、约70%与约80%之间、约70%与约90%之间、约70%与约100%之间、约80%与约90%之间、约80%与约100%之间或约90%与约100%之间。

[0067] 在一些情况下,在施用本文所提供的组合物之后,本文所提供的方法或组合物使反应性星形胶质细胞的数量减少约1%与100%之间。在一些情况下,在施用本文所提供的组合物之后,本文所提供的方法或组合物使反应性星形胶质细胞的数量减少约1%与约10%之间、1%与约20%之间、1%与约30%之间、10%与约20%之间、10%与约30%之间、约10%与约40%之间、约20%与约30%之间、约20%与约40%之间、约20%与约50%之间、约30%与约40%之间、约30%与约50%之间、约30%与约60%之间、约40%与约50%之间、约40%与约60%之间、约40%与约70%之间、约50%与约60%之间、约50%与约70%之间、约50%与约80%之间、约60%与约70%之间、约60%与约80%之间、约60%与约90%之间、约70%与约80%之间、约70%与约90%之间、约70%与约100%之间、约80%与约90%之间、约80%与约100%之间或约90%与约100%之间。

[0068] 在一些情况下,向受脑神经病症(例如,ALS)影响或患有脊髓损伤的受试者施用治疗有效量的(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸介导:减少损伤位点处的炎症;降低损伤位点处的神经抑制;重建损伤位点处的正常小神经胶质形态;重建损伤位点处的神经回路、增加损伤位点处的血管;重建损伤位点处的血脑屏障;重建损伤位点处的正常组织结构;以及改善由于正常血流的中断而引起的运动缺陷。

[0069] 在一些情况下,在施用于反应性星形胶质细胞时,施用治疗有效量的(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218或其任何组合的外源性核酸以改善有需要的个体受试者的脑神经病症(例如,ALS)的效果比施用于静态星形胶质细胞时具有更大的有益效果。在一些情况下,在施用于反应性星形胶质细胞时,施用治疗有效量的(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸以改善有需要的个体受试者的脊髓损伤的效果比施用于静态星形胶质细胞时具有更大的有益效果。

[0070] 在一些情况下,用于治疗患有脊髓损伤的哺乳动物的方法可以包含施用治疗有效量的组合物、表达载体或腺相关表达载体,所述组合物、表达载体或腺相关表达载体包含编码NeuroD1多肽(或其生物活性片段)的核酸序列和编码Dlx2多肽(或其生物活性片段)的核酸序列。在一些情况下,将编码NeuroD1多肽(或其生物活性片段)的核酸序列和编码Dlx2多肽(或其生物活性片段)的核酸序列亚克隆到一个表达载体中。在一些情况下,将编码NeuroD1多肽(或其生物活性片段)的核酸序列和编码Dlx2多肽(或其生物活性片段)的核酸序列亚克隆到单独的表达载体中。

[0071] 在一些情况下,用于在患有SCI并且需要(1)再生脊髓背侧神经元;(2)产生新神经元;和/或(3)增加在脊髓中的循环的哺乳动物体内进行所述(1)、(2)和/或(3)的方法可以包含在以下条件下施用包含编码NeuroD1多肽(或其生物活性片段)的外源性核酸和编码

Dlx2多肽(或其生物活性片段)的外源性核酸的组合物:其中(a)脊髓神经元得以再生;(b)新神经元得以产生;和/或(c)脊髓循环得以增加。在一些情况下,新神经元选自由谷氨酸能神经元和GABA能神经元组成的组。在一些情况下,新神经元是谷氨酸能神经元。在一些情况下,新神经元是GABA能神经元。

[0072] 在一些情况下,用于治疗患有脊髓损伤的哺乳动物的方法可以包含施用治疗有效量的组合物、表达载体或腺相关表达载体,所述组合物、表达载体或腺相关表达载体包含编码NeuroD1多肽(或其生物活性片段)的核酸序列和编码Isl1多肽(或其生物活性片段)的核酸序列。在一些情况下,将编码NeuroD1多肽(或其生物活性片段)的核酸序列和编码Isl1多肽(或其生物活性片段)的核酸序列亚克隆到一个表达载体中。在一些情况下,将编码NeuroD1多肽(或其生物活性片段)的核酸序列和编码Isl1多肽(或其生物活性片段)的核酸序列亚克隆到单独的表达载体中。

[0073] 在一些情况下,脊髓损伤可能是由于选自由以下组成的组的病状引起的:缺血性中风、出血性中风、身体损伤、脑震荡、挫伤、爆发、渗透、肿瘤、炎症、感染、创伤性脊髓损伤、缺血性或出血性脊髓病(脊髓梗塞)、全局缺血、缺氧-缺血性脑病、如由纤维软骨栓塞性脊髓病引起的CNS栓塞、CNS血栓形成以及脑静脉窦血栓形成。

[0074] 在一些情况下,全局缺血是由心脏骤停或严重低血压(休克)引起的。在一些情况下,缺氧-缺血性脑病是由缺氧、低血糖或贫血引起的。在一些情况下,CNS栓塞是由感染性心内膜炎或心房粘液瘤引起的。在一些情况下,CNS血栓形成是由儿科白血病引起的。在一些情况下,脑静脉窦血栓形成是由肾病综合征(肾脏疾病)、慢性炎症性疾病、妊娠、使用基于雌激素的避孕药、脑膜炎或脱水引起的。

[0075] 在一些情况下,脊髓损伤是由于缺血性中风引起的。在一些情况下,脊髓损伤是由于出血性中风引起的。在一些情况下,脊髓损伤是由于身体损伤引起的。在一些情况下,脊髓损伤是由于脑震荡引起的。在一些情况下,脊髓损伤是由于挫伤引起的。在一些情况下,脊髓损伤是由于爆发引起的。在一些情况下,脊髓损伤是由于渗透引起的。在一些情况下,脊髓损伤是由于肿瘤引起的。在一些情况下,脊髓损伤是由于炎症引起的。在一些情况下,脊髓损伤是由于感染引起的。在一些情况下,脊髓损伤是由于创伤性脊髓损伤引起的。在一些情况下,脊髓损伤是由于缺血性或出血性脊髓病(脊髓感染)引起的。在一些情况下,脊髓损伤是由于全局缺血引起的。在一些情况下,脊髓损伤是由于缺氧-缺血性脑病引起的。在一些情况下,脊髓损伤是由于CNS栓塞引起的。在一些情况下,脊髓损伤是由于纤维软骨栓塞性脊髓病引起的。在一些情况下,脊髓损伤是由于CNS血栓形成引起的。在一些情况下,脊髓损伤是由于脑静脉窦引起的。在一些情况下,脊髓损伤是由于血栓形成引起的。

[0076] 在一些情况下,用于治疗患有ALS的哺乳动物的方法可以包含施用治疗有效量的组合物、表达载体或腺相关表达载体,所述组合物、表达载体或腺相关表达载体包含编码NeuroD1多肽(或其生物活性片段)的核酸序列和编码Isl1多肽(或其生物活性片段)的核酸序列。在一些情况下,将编码NeuroD1多肽(或其生物活性片段)的核酸序列和编码Isl1多肽(或其生物活性片段)的核酸序列亚克隆到一个表达载体中。在一些情况下,将编码NeuroD1多肽(或其生物活性片段)的核酸序列和编码Isl1多肽(或其生物活性片段)的核酸序列亚克隆到单独的表达载体中。

[0077] 用(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、

Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸进行的治疗可以施用于如通过磁共振成像(MRI)诊断的损伤区域。电生理学可以评估由神经细胞死亡或损伤引起的神经放电的功能变化。用于测定神经损伤的非侵入性方法包含EEG。至损伤点的血流的中断可以通过近红外光谱和功能磁共振(fMRI)进行非侵入性地测定。区域内的血流量可以增加(如在动脉瘤中所见)或减少(如在缺血中所见)。由血流的中断引起的对CNS的损伤另外引起了可以用于诊断损伤点的组织结构的短期和长期变化。从短期来看,损伤将引起局部肿胀。从长期来看,细胞死亡将引起组织点丧失。用于测定由组织死亡引起的结构变化的非侵入性方法包含MRI、正电子发射断层扫描(PET)、计算机轴向断层扫描(CAT)或超声。这些方法可以单独地使用或以任何组合使用,以精准确定损伤的焦点。

[0078] 如上所述,用于测定由组织死亡引起的结构变化的非侵入性方法包含MRI、CAT扫描或超声。功能测定可以包含EEG记录。

[0079] 在用于治疗如本文所述的神经病症的方法的一些实施例中,(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸作为表达载体施用,所述表达载体含有编码本文所述的任何多肽或mir218和/或mir214的核酸序列。

[0080] 在用于治疗如本文所述的神经病症的方法的一些实施例中,包含以下的病毒载体(例如,AAV)通过如立体定向颅内注射或眶后注射等注射递送到受试者的脑中:(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和/或mir218的外源性核酸。在一些情况下,在脑中的同一位置处使用两次或更多次颅内注射将含有包含以下的腺相关病毒的组合物施用于脑:(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和/或mir218的外源性核酸。在一些情况下,在脑中的两个或更多个不同位置处使用两次或更多次颅内注射将含有包含以下的腺相关病毒的组合物施用于脑:(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和/或mir218的外源性核酸。

[0081] 在用于治疗如本文所述的脊髓损伤的方法的一些实施例中,病毒载体(例如,AAV)(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和/或mir218的外源性核酸通过如立体定向注射或通过静脉内输注或静脉内注射等注射递送到受试者的脊髓中。

[0082] 在一些实施例中,所述基因递送载体可以是AAV载体。例如,AAV载体可以选自以下的组:AAV2载体、AAV5载体和AAV8载体、AAV1载体、AAV7载体、AAV9载体、AAV3载体、AAV6载体、AAV10载体和AAV11载体。

[0083] 术语“表达载体”是指用于将(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸在体外或体内引入到宿主细胞中的重组媒介,其中所述核酸在所述宿主细胞中表达以产生如本文所述的多肽。

[0084] 在特定实施例中,包含SEQ ID NO:1或3或基本上相同的核酸序列的表达载体被表达以在含有表达载体的细胞中产生NeuroD1。在特定实施例中,包含SEQ ID NO:10或12或基本上相同的核酸序列的表达载体被表达以在含有表达载体的细胞中产生Dlx2。术语“重组”

用于指示两个或更多个核酸连接并且在自然界中未发现连接的核酸构建体。表达载体包含但不限于质粒、病毒、BAC和YAC。特定的病毒表达载体说明性地包含源自腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒和慢病毒的病毒表达载体。

[0085] 本文档描述了根据所描述的方法用于治疗有需要的受试者的神经病症(例如, ALS)或脊髓损伤的材料和方法,所述方法包含:提供包含以下的病毒载体:(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸;以及将病毒载体递送到受试者的脑或脊髓中,由此病毒载体分别感染中枢神经系统的胶质细胞,从而产生受感染的胶质细胞,并且由此(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸在受感染的胶质细胞中以治疗有效水平表达,其中与患有同一神经病状的未经治疗的受试者相比,多肽或miRNA、或多肽与miRNA的组合在受感染细胞中的表达在受试者中产生更多数量的神经元,由此治疗神经病症或脊髓损伤。除了产生新神经元之外,反应性胶质细胞的数量也将减少,从而导致所释放的神经抑制因子更少、神经炎症更少、还均匀分布的血管更多,由此使局部环境更允许神经元生长或轴突渗透,因此减轻神经病状。

[0086] 在一些情况下,腺相关载体可以用于本文所述的方法中,并且将在注射位点处感染分裂细胞和非分裂细胞两者。腺相关病毒(AAV)是细小病毒科家族的ssDNA动物病毒的普遍存在的、非细胞病变的、无复制能力的成员。在一些情况下,可以如本文所述使用如血清型1-11等各种重组腺相关病毒中的任何重组腺相关病毒。在一些情况下,AAV-PHP.eb用于施用外源性NeuroD1。在一些情况下,AAV-PHP.eb用于施用外源性Dlx2。在一些情况下,AAV-PHP.eb用于施用外源性Isl1。在一些情况下,AAV血清型5用于施用外源性NeuroD1。在一些情况下,AAV血清型5用于施用外源性Dlx2。在一些情况下,AAV血清型5用于施用外源性Isl1。

[0087] 根据本文所述的一些方面,“FLEX”转换方法用于在受感染细胞中表达例如NeuroD1。术语“FLEX”和“翻转切除(flip-excision)”可互换使用,以表示将两对异型的反平行loxP型重组位点安置在反向NeuroD1编码序列的任一侧的方法,所述反向NeuroD1编码序列首先经历编码序列的反向,随后切除两个位点,从而导致每个正交重组位点之一相反地定向并且不能进一步重组,从而实现稳定的反向,参见例如Schnutgen等人,《自然·生物技术(Nature Biotechnology)》,21:562-565(2003);以及Atasoy等人,《神经科学杂志》,28:7025-7030(2008)。由于在胶质细胞特异性启动子控制下的位点特异性重组酶将在包含反应性星形胶质细胞在内的胶质细胞中强烈表达,因此NeuroD1也将包含反应性星形胶质细胞在内的胶质细胞中表达。然后,当从重组中去除NeuroD1前面的终止密码子时,组成型或神经元特异性启动子将驱动NeuroD1的高表达,从而使反应性星形胶质细胞转化成功能神经元。

[0088] 根据具体方面,(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸通过施用以下而施用于有需要的受试者:1)腺相关病毒表达载体,所述腺相关病毒表达载体包含在如GFAP或S100b或Aldh1L1等星形胶质细胞特异性启动子的转录控制下编码位点特异性重组酶的DNA序列;以及2)腺相关病毒表达载体,所述腺相关病毒表达载体包含(i)编码

本文所述的任何多肽或多肽的任何组合 (例如, NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2 和 Ngn2) 的外源性核酸和/或 (ii) 在普遍存在的 (组成型) 启动子或神经元特异性启动子的转录控制下编码 mir124 和 mir218 的外源性核酸, 其中编码外源性核酸序列的核酸序列被反向并且以错误的定向进行多肽和 miRNA 的表达, 直到位点特异性重组酶使编码多肽和/或 miRNA 的反向核酸序列反向, 由此允许多肽和/或 miRNA 的表达。

[0089] 位点特异性重组酶及其识别位点包含例如 Cre 重组酶连同识别位点 loxP 和 lox2272 位点或 FLP-FRT 重组或其组合。

[0090] 包含以下的组合物可以被调配成用于施用于哺乳动物的药物组合物: (i) 编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合 (例如, NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2 和 Ngn2) 的外源性核酸和/或 (ii) 编码 mir124 和 mir218 的外源性核酸 (例如, 包含以下的 AAV: (i) 编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合 (例如, NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2 和 Ngn2) 的外源性核酸和/或 (ii) 编码 mir124 和 mir218 的外源核酸。例如, 治疗有效量的包含编码 NeuroD1 多肽的外源性核酸 (例如, 编码 NeuroD1 多肽的 AAV) 的组合物可以与一种或多种药学上可接受的载体 (添加剂) 和/或稀释剂一起调配。在一些情况下, 治疗有效量的包含编码 Dlx2 多肽的外源性核酸 (例如, 编码 Dlx2 多肽的 AAV) 的组合物可以与一种或多种药学上可接受的载体 (添加剂) 和/或稀释剂一起调配。包含编码 NeuroD1 多肽的外源性核酸 (例如, 编码 NeuroD1 多肽的 AAV) 的药物组合物可以被调配成用于各种施用途径, 例如, 作为胶囊、液体等口服施用。在一些情况下, 包含编码 Dlx2 多肽的外源性核酸 (例如, 编码 Dlx2 多肽的 AAV) 的药物组合物可以被调配成用于各种施用途径, 例如, 作为胶囊、液体等口服施用。在一些情况下, 包含编码 Isl1 多肽的外源性核酸 (例如, 编码 Isl1 多肽的 AAV) 的药物组合物可以被调配成用于各种施用途径, 例如, 作为胶囊、液体等口服施用。在一些情况下, 肠胃外施用, 优选地通过静脉内注射或静脉内输注施用包含以下的病毒载体 (例如, AAV): (i) 编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合 (例如, NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2 和 Ngn2) 的外源性核酸和/或 (ii) 编码 mir124 和 mir218 的外源性核酸。施用可以是例如通过静脉内输注进行, 例如持续 60 分钟、30 分钟或 15 分钟。在一些情况下, 施用可以介于 1 分钟与 60 分钟之间。在一些情况下, 施用可以介于 1 分钟与 5 分钟之间、介于 1 分钟与 10 分钟之间、介于 1 分钟与 15 分钟之间、介于 5 分钟与 10 分钟之间、介于 5 分钟与 15 分钟之间、介于 5 分钟与 20 分钟之间、介于 10 分钟与 15 分钟之间、介于 10 分钟与 20 分钟之间、介于 10 分钟与 25 分钟之间、介于 15 分钟与 20 分钟之间、介于 15 分钟与 25 分钟之间、介于 15 分钟与 30 分钟之间、介于 20 分钟与 25 分钟之间、介于 20 分钟与 30 分钟之间、介于 20 分钟与 35 分钟之间、介于 25 分钟与 30 分钟之间、介于 25 分钟与 35 分钟之间、介于 25 分钟与 40 分钟之间、介于 30 分钟与 35 分钟之间、介于 30 分钟与 40 分钟之间、介于 30 分钟与 45 分钟之间、介于 35 分钟与 40 分钟之间、介于 35 分钟与 45 分钟之间、介于 35 分钟与 50 分钟之间、介于 40 分钟与 45 分钟之间、介于 40 分钟与 50 分钟之间、介于 40 分钟与 55 分钟之间、介于 45 分钟与 50 分钟之间、介于 45 分钟与 55 分钟之间、介于 45 分钟与 60 分钟之间、介于 50 分钟与 55 分钟之间、介于 50 分钟与 60 分钟或介于 55 分钟与 60 分钟之间。在一些情况下, 病毒载体 {例如, 包含以下的 AAV: (i) 编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合 (例如, NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2 和 Ngn2) 的外源性核酸和/或 (ii) 编码 mir124 和 mir218 的外源性核酸} 在外科手术期间通过注射局部地施用于脑。适于通过注射和/或输注施用的组合物包含溶液和分散体以及可以由其制备对应溶液和分散体的粉末。此类组合物将包括病毒载体

和至少一种合适的药学上可接受的载体。用于静脉内施用的合适的药学上可接受的载体包含但不限于抑菌水、林格氏溶液 (Ringer's solution)、生理盐水、磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 和 Cremophor ELTM。用于注射和/或输注的无菌组合物可以通过将病毒载体 {例如, 包含以下的 AAV: (i) 编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合 (例如, NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2 和 Ngn2) 的外源性核酸和/或 (ii) 编码 mir124 和 mir218 的外源性核酸} 以所需的量引入到适当的载体中, 并且然后通过过滤灭菌来制备。用于通过注射或输注施用的组合物在其制备后在储存条件下应当在延长的时间段内保持稳定。出于此目的, 组合物可以含有防腐剂。合适的防腐剂包含但不限于氯丁醇、苯酚、抗坏血酸和硫柳汞。

[0091] 药物组合物可以被调配成用于以固体或液体形式施用, 所述固体或液体形式包含但不限于无菌溶液、悬浮液、缓释调配物、片剂、胶囊、丸剂、粉末和颗粒。所述调配物可以存在于单位剂量或多剂量容器中, 例如密封的安瓿瓶和小瓶, 并且可以储存在仅需要紧接着在使用之前添加无菌液体载体 (例如, 注射用水) 的冷冻干燥 (冻干) 条件下。可以由无菌粉末、微粒和片剂制备临时注射溶液和悬浮液。

[0092] 可以用于本文所述的药物组合物中的另外的药学上可接受的载体、填充剂或媒剂包含但不限于离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、如人血清白蛋白等血清蛋白、如磷酸盐等缓冲物质、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐等电解质、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、基于纤维素的物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙二醇-聚氧丙烯-嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。

[0093] 如本文所使用的, 术语“腺相关病毒颗粒”是指将其核酸基因组传递到细胞的 AAV 病毒的包装衣壳形式。

[0094] 含有 (i) 编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合 (例如, NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2 和 Ngn2) 的外源性核酸和/或 (ii) 编码 mir124 和 mir218 的外源性核酸的组合物有效量可以是改善哺乳动物 (例如, 人) 体内的神经病症的症状而不对哺乳动物产生严重毒性的任何量。例如, 编码 NeuroD1 多肽的腺相关病毒的有效量可以是约 10^{10} 到 10^{14} 个腺相关病毒颗粒/毫升的浓度。在一些情况下, 编码 NeuroD1 多肽的腺相关病毒的有效量可以介于 10^{10} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{11} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间、介于 10^{10} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{12} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间、介于 10^{10} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{13} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间、介于 10^{11} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{12} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间、介于 10^{11} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{13} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间、介于 10^{11} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{14} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间、介于 10^{12} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{13} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间、介于 10^{12} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{14} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间或介于 10^{13} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{14} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间。在一些情况下, 编码 Dlx2 多肽的腺相关病毒的有效量可以是约 10^{10} 到 10^{14} 个腺相关病毒颗粒/毫升的浓度。在一些情况下, 编码 Dlx2 多肽的腺相关病毒的有效量可以介于 10^{10} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{11} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间、介于 10^{10} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{12} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间、介于 10^{10} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{13} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间、介于 10^{11} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{12} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间、介于 10^{11} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{13} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间、介于 10^{11} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{14} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间。

毫升与 10^{14} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间、介于 10^{12} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{13} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间、介于 10^{12} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{14} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间或介于 10^{13} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{14} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间。在一些情况下,编码Isl1多肽的腺相关病毒的有效量可以是约 10^{10} 到 10^{14} 个腺相关病毒颗粒/毫升的浓度。在一些情况下,编码Isl1多肽的腺相关病毒的有效量可以介于 10^{10} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{11} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间、介于 10^{10} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{12} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间、介于 10^{10} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{13} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间、介于 10^{11} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{12} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间、介于 10^{11} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{14} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间、介于 10^{12} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{13} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间、介于 10^{12} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{14} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间或介于 10^{13} 个腺相关病毒颗粒/毫升与 10^{14} 个腺相关病毒颗粒/毫升之间。如果特定哺乳动物对特定量没有反应,则可以增加编码NeuroD1多肽的AAV的量。在一些情况下,如果特定哺乳动物对特定量没有反应,则可以增加编码多肽的AAV的量。与待施用的病毒载体(例如,编码对NeuroD1多肽进行编码的外源性核酸的AAV)的量相关的因素是例如病毒载体的施用途径、疾病的性质和严重性、所治疗的患者的疾病史以及待治疗的患者的年龄、体重、身高和健康状况。在一些情况下,实现治疗效果所需的如本文所述的多肽或miRNA的表达水平、患者的免疫应答以及基因产物的稳定性与待施用的量相关。在一些情况下,病毒载体(例如,编码NeuroD1多肽的AAV)的施用导致脑或脊髓的功能障碍或疾病的完全或基本上完全愈合的量发生。

[0095] 在一些情况下,有效量的含有(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸的组合物可以以约0.1微升/分钟到约5微升/分钟的受控流速进行任何施用。

[0096] 在一些情况下,受控流速介于0.1微升/分钟与0.2微升/分钟之间、介于0.1微升/分钟与0.3微升/分钟之间、介于0.1微升/分钟与0.4微升/分钟之间、介于0.2微升/分钟与0.3微升/分钟之间、介于0.2微升/分钟与0.4微升/分钟之间、介于0.2微升/分钟与0.5微升/分钟之间、介于0.3微升/分钟与0.4微升/分钟之间、介于0.3微升/分钟与0.5微升/分钟之间、介于0.3微升/分钟与0.6微升/分钟之间、介于0.4微升/分钟与0.5微升/分钟之间、介于0.4微升/分钟与0.6微升/分钟之间、介于0.4微升/分钟与0.7微升/分钟之间、介于0.5微升/分钟与0.6微升/分钟之间、介于0.5微升/分钟与0.7微升/分钟之间、介于0.5微升/分钟与0.8微升/分钟之间、介于0.6微升/分钟与0.7微升/分钟之间、介于0.6微升/分钟与0.8微升/分钟之间、介于0.6微升/分钟与0.9微升/分钟之间、介于0.7微升/分钟与0.8微升/分钟之间、介于0.7微升/分钟与0.9微升/分钟之间、介于0.7微升/分钟与1.0微升/分钟之间、介于0.8微升/分钟与0.9微升/分钟之间、介于0.8微升/分钟与1.0微升/分钟之间、介于0.8微升/分钟与1.1微升/分钟之间、介于0.9微升/分钟与1.0微升/分钟之间、介于0.9微升/分钟与1.1微升/分钟之间、介于0.9微升/分钟与1.2微升/分钟之间、介于1.0微升/分钟与1.1微升/分钟之间、介于1.0微升/分钟与1.2微升/分钟之间、介于1.0微升/分钟与1.3微升/分钟之间、介于1.1微升/分钟与1.2微升/分钟之间、介于1.1微升/分钟与1.3微升/分钟之间、介于1.1微升/分钟与1.4微升/分钟之间、介于1.2微升/分钟与1.3微升/分钟之间、介于1.2微升/分钟与1.4微升/分钟之间、介于1.2微升/分钟与1.5微升/分钟之间、介于1.3微升/分钟

[illegible]

升/分钟与4.4微升/分钟之间、介于4.2微升/分钟与4.3微升/分钟之间、介于4.2微升/分钟与4.4微升/分钟之间、介于4.2微升/分钟与4.5微升/分钟之间、介于4.3微升/分钟与4.4微升/分钟之间、介于4.3微升/分钟与4.5微升/分钟之间、介于4.3微升/分钟与4.6微升/分钟之间、介于4.4微升/分钟与4.5微升/分钟之间、介于4.4微升/分钟与4.6微升/分钟之间、介于4.4微升/分钟与4.7微升/分钟之间、介于4.5微升/分钟与4.6微升/分钟之间、介于4.5微升/分钟与4.7微升/分钟之间、介于4.5微升/分钟与4.8微升/分钟之间、介于4.6微升/分钟与4.7微升/分钟之间、介于4.6微升/分钟与4.8微升/分钟之间、介于4.6微升/分钟与4.9微升/分钟之间、介于4.7微升/分钟与4.8微升/分钟之间、介于4.7微升/分钟与4.9微升/分钟之间、介于4.7微升/分钟与5.0微升/分钟、4.8微升/分钟和4.9微升/分钟、介于4.8微升/分钟与5.0微升/分钟之间或介于4.9微升/分钟与5.0微升/分钟之间。

[0097] 病毒载体 {例如,包含以下的AAV: (i) 编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合 (例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2) 的外源性核酸和/或 (ii) 编码mir124和mir218的外源性核酸} 可以以对应于在约 1.0×10^{10} vg/kg到约 1.0×10^{14} vg/kg (病毒基因组/kg体重) 的范围内的病毒剂量的量施用。在一些情况下,病毒载体 (例如,包含以下的AAV: (i) 编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合 (例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2) 的外源性核酸和/或 (ii) 编码mir124和mir218的外源性核酸} 可以以对应于在约 1.0×10^{11} 到约 1.0×10^{12} vg/kg的范围内、约 5.0×10^{11} 到约 5.0×10^{12} vg/kg的范围内、或约 1.0×10^{12} 到约 5.0×10^{11} 的范围内的病毒剂量仍然是更优选的量施用。在一些情况下,病毒载体以对应于约 2.5×10^{12} vg/kg的剂量的量施用。在一些情况下,病毒载体 {例如,包含以下的AAV: (i) 编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合 (例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2) 的外源性核酸和/或 (ii) 编码mir124和mir218的外源性核酸} 的有效量可以是约1 μ L到约500 μ L的体积,对应于本文所述的vg/kg (病毒基因组每kg体重) 剂量的体积。在一些情况下,待施用的病毒载体 {例如,包含以下的AAV: (i) 编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合 (例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2) 的外源性核酸和/或 (ii) 编码mir124和mir218的外源性核酸} 的量是根据一个或多个转基因 (例如,NeuroD1) 的表达的强度来调整的。

[0098] 在一些情况下,病毒载体的所施用的有效体积介于1 μ L与25 μ L之间、介于1 μ L与50 μ L之间、介于1 μ L与75 μ L之间、介于25 μ L与50 μ L之间、介于25 μ L与75 μ L之间、介于25 μ L与100 μ L之间、介于50 μ L与75 μ L之间、介于50 μ L与100 μ L之间、介于50 μ L与125 μ L之间、介于75 μ L与100 μ L之间、介于75 μ L与125 μ L之间、介于75 μ L与150 μ L之间、介于100 μ L与125 μ L之间、介于100 μ L与150 μ L之间、介于100 μ L与175 μ L之间、介于125 μ L与150 μ L之间、介于125 μ L与175 μ L之间、介于125 μ L与200 μ L之间、介于150 μ L与175 μ L之间、介于150 μ L与200 μ L之间、介于150 μ L与225 μ L之间、介于175 μ L与200 μ L之间、介于175 μ L与225 μ L之间、介于175 μ L与250 μ L之间、介于200 μ L与225 μ L之间、介于200 μ L与250 μ L之间、介于200 μ L与275 μ L之间、介于225 μ L与250 μ L之间、介于225 μ L与275 μ L之间、介于225 μ L与300 μ L之间、介于250 μ L与275 μ L之间、介于250 μ L与300 μ L之间、介于250 μ L与325 μ L之间、介于275 μ L与300 μ L之间、介于275 μ L与325 μ L之间、介于275 μ L与350 μ L之间、介于300 μ L与325 μ L之间、介于300 μ L与350 μ L之间、介于300 μ L与375 μ L之间、介于325 μ L与350 μ L之间、介于325 μ L与375 μ L之间、介于325 μ L与400 μ L之间、介于350 μ L与375 μ L之间、介于350 μ L与400 μ L之间、介于350 μ L与425 μ L之间、介于375 μ L与400 μ L之间、介于375 μ L与425 μ L之间、介于375 μ L与450 μ L之间、介于400 μ L与425 μ L之间、介于400 μ L与450 μ L之间、介

于400μL与475μL之间、介于425μL与450μL之间、介于425μL与475μL之间、介于425μL与500μL之间、介于450μL与475μL之间、介于450μL与500μL之间或介于475μL与500μL之间。

[0099] 在一些情况下,包含(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合{例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)在普遍存在的(组成型)启动子或神经元特异性启动子的转录控制下编码mir124和mir218的外源性核酸的腺相关病毒载体连同编码位点特异性重组酶的腺相关病毒通过立体定向注射递送到受试者的脑中或通过局部递送到受试者的脊髓损伤,其中编码多肽和miRNA(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2、mir124、Ngn2和mir218)的核酸序列被反向并且以错误的定向进行转基因的表达,并且进一步包含位点特异性重组酶的重组酶活性的位点,直到位点特异性重组酶使编码转基因的反向核酸序列反向,由此允许转基因的表达。

[0100] 在一些情况下,包含(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)在普遍存在的(组成型)启动子或神经元特异性启动子的转录控制下编码mir124和mir218的外源性核酸的腺相关病毒载体连同编码位点特异性重组酶的腺相关病毒根据本文所述的方法通过立体定向注射递送到受试者的脑中或通过局部递送到受试者的脊髓,其中编码转基因的核酸序列被反向并且以错误的定向进行转基因的表达,并且进一步包含位点特异性重组酶的重组酶活性的位点,直到位点特异性重组酶使编码转基因的反向核酸序列反向,由此允许转基因的表达。

[0101] 在一些情况下,位点特异性重组酶是Cre重组酶,并且重组酶活性的位点是识别位点loxP和lox2272位点。

[0102] 在一些情况下,在治疗期间或之后监测用(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸对受试者进行治疗,以监测治疗的进展和/或最终结果。通过恢复或接近恢复正常的电生理学、血流、组织结构和功能来诊断用于成功的神经元细胞整合和组织微环境的恢复的治疗后测定。测定神经功能的非侵入性方法包含EEG。血流可以通过近红外光谱和fMRI进行非侵入性地测定。用于测定组织结构的非侵入性方法包含MRI、CAT扫描、PET扫描或超声。行为测定可以用于非侵入性测定脑功能的恢复。行为测定应当与由原始脑损伤引起的功能丧失相匹配。例如,如果损伤引起瘫痪,则应测试患者的移动性和肢体灵活性。如果损伤引起语音的丧失或减慢,则应测定患者通过口头语言进行交流的能力。单独或与Dlx2组合的NeuroD1治疗后正常行为的恢复表明有效神经元回路的成功产生和整合。这些方法可以单独地使用或以任何组合使用,以测定神经功能和组织健康。用于评估治疗的测定可以在单独或与Dlx2组合的NeuroD1治疗后的任何时间点进行,例如1天、2天、3天、一周、2周、3周、一个月、两个月、三个月、六个月、一年或更晚。此类测定可以在单独或与Dlx2组合的NeuroD1治疗之前进行,以便在需要时建立基线比较。

[0103] 本文所使用的科学和技术术语旨在具有本领域的普通技术人员通常理解的含义。发现在各种标准参考文献的上下文中定义并使用此类术语,这些参考文献说明性地包含以下:J.Sambrook和D.W.Russell,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)》,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press);第3版,2001;F.M.Asubel编辑,《精编分子生物学实验指南(Short Protocols in Molecular Biology)》,《实验室指南(Current Protocols)》;第5版,2002;B.Alberts等人,

《细胞分子生物学 (Molecular Biology of the Cell)》,第4版,加兰科学出版社 (Garland),2002;D.L.Nelson和M.M.Cox,《生物化学原理 (Lehninger Principles of Biochemistry)》,第4版,W.H.弗里曼公司 (W.H.Freeman&Company),2004;Engelke,D.R.,《RNA干扰 (RNAi):RNAi技术的具体细节 (RNA Interference (RNAi):Nuts and Bolts of RNAi Technology)》,宾夕法尼亚州伊格尔维尔的DNA出版社有限责任公司 (DNA Press LLC,Eagleville,PA),2003;Herdewijn,p.(编辑),《寡核苷酸合成:方法与应用 (Oligonucleotide Synthesis:Methods and Applications)》,《分子生物学方法 (Methods in Molecular Biology)》,胡马纳出版社 (Humana Press),2004;A.Nagy、M.Gertsenstein、K.Vintersten、R.Behringer,《操纵小鼠胚胎:实验室手册 (Manipulating the Mouse Embryo:A Laboratory Manual)》,冷泉港实验室出版社,第3版;2002年12月15日,ISBN-10:0879695919;Kursad Turksen(编辑),《胚胎干细胞:分子生物学方法中的方法和方案 (Embryonic Stem Cells:Methods and Protocols in Methods in Molecular Biology)》2002;185,胡马纳出版社:《干细胞生物学实验指南 (Current Protocols in Stem Cell Biology)》,ISBN:9780470151808。

[0104] 如本文所使用的,单数术语“一个(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”不旨在是限制性的,并且包含复数指示物,除非另外明确地陈述或上下文另外清楚地指示。

[0105] 如本文所使用的,术语“NeuroD1蛋白”是指参与胚胎脑发育和成人神经发生的bHLH促神经原转录因子,参见Cho等人,《分子神经生物学 (Mol.Neurobiol.)》,30:35-47 (2004);Kuwabara等人,《自然神经科学 (Nature Neurosci.)》,12:1097-1105 (2009);以及Gao等人,《自然神经科学》,12:1090-1092 (2009)。NeuroD1在发育后期表达,主要在神经系统中表达,并且参与神经元分化、成熟和存活。

[0106] 本文所使用的,术语“D1x2蛋白”是指在前脑和颅面发育中发挥作用的远端缺失同源盒2转录因子。人D1x2多肽的实例包含但不限于NCBI参考序列:NP_004396.1或其生物活性片段。

[0107] 在一些实施例中,与野生型D1x2多肽(例如,NCBI参考序列:NP_004396.1)相比,D1x2多肽包含导致突变的D1x2活性增加的氨基酸取代、插入或缺失。

[0108] 本文所使用的,术语“Is11”是指参与调节胰岛素基因表达并且运动神经元产生所需的ISL LIM同源盒1转录因子。人Is11多肽的实例包含但不限于NCBI参考序列:NP_002193.2或其生物活性片段。在一些实施例中,与野生型Is11多肽(例如,NCBI参考序列:NP_002193.2)相比,Is11多肽包含导致突变的Is11活性增加的氨基酸取代、插入或缺失。

[0109] 术语“NeuroD1蛋白”或“外源性NeuroD1”涵盖人NeuroD1蛋白,此处被鉴定为SEQ ID NO:2以及小鼠NeuroD1蛋白,此处被鉴定为SEQ ID NO:4。除了SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4的NeuroD1蛋白之外,术语“NeuroD1蛋白”涵盖NeuroD1蛋白的变体,如SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4的变体,所述变体可以包含在本文所述的方法中。

[0110] 术语“D1x2蛋白”或“外源性D1x2”涵盖人D1x2蛋白,此处被鉴定为SEQ ID NO:11以及小鼠D1x2蛋白,此处被鉴定为SEQ ID NO:13。除了SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:13的D1x2蛋白之外,术语“D1x2蛋白”涵盖D1x2蛋白的变体,如SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:13的变体,所述变体可以包含在本文所述的方法中。

[0111] 术语“Is11蛋白”或“外源性Is11”涵盖人Is11蛋白,此处被鉴定为SEQ ID NO:15以

及小鼠Is11蛋白,此处被鉴定为SEQ ID NO:17。除了SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:17的Is11蛋白之外,术语“Is11蛋白”涵盖Is11蛋白的变体,如SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:17的变体,所述变体可以包含在本文所述的方法中。在一些情况下,Is11蛋白可以包含GenBank登录号:EAW54861、NP_002193.2或AAH31213.1中所示的序列。

[0112] 如本文所使用的,术语“变体”是指天然存在的遗传变异和重组制备的变异,与参考NeuroD1蛋白(如SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4)相比,所述变异中的每一种在其氨基酸序列中含有一个或多个变化。在一些情况下,术语“变体”是指天然存在的遗传变异和重组制备的变异,与参考D1x2蛋白(如SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13)相比,所述变异中的每一种在其氨基酸序列中含有一个或多个变化。在一些情况下,术语“变体”是指天然存在的遗传变异和重组制备的变异,与参考Is11蛋白(如SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:17)相比,所述变异中的每一种在其氨基酸序列中含有一个或多个变化。此类变化包含一个或多个氨基酸残基已经通过氨基酸取代、添加或缺失进行修饰的变化。术语“变体”涵盖人NeuroD1,包含例如哺乳类动物和鸟NeuroD1的直向同源物,如但不限于来自非人灵长类动物、猫、狗、绵羊、山羊、马、牛、猪、鸟、家禽动物和啮齿动物(如但不限于小鼠和大鼠)的NeuroD1直向同源物。在非限制性实例中,在本文中例示为氨基酸序列SEQ ID NO:4的小鼠NeuroD1是人NeuroD1的直向同源物。在一些情况下,优选的变体与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。

[0113] 在一些情况下,术语“变体”涵盖人D1x2,包含例如哺乳类动物和鸟D1x2的直向同源物,如但不限于来自非人灵长类动物、猫、狗、绵羊、山羊、马、牛、猪、鸟、家禽动物和啮齿动物(如但不限于小鼠和大鼠)的D1x2直向同源物。在非限制性实例中,在本文中例示为氨基酸序列SEQ ID NO:13的小鼠D1x2是人D1x2的直向同源物。在一些情况下,优选的变体与SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。

[0114] 可以使用如定点诱变和PCR介导的诱变等标准分子生物学技术引入突变。本领域的技术人员将认识到,可以在不改变NeuroD1蛋白、D1x2蛋白或Is11蛋白的功能性质的情况下引入一个或多个氨基酸突变。例如,可以在不改变SEQ ID NO:2或4的NeuroD1蛋白的功能性质的情况下进行一个或多个氨基酸取代、添加或缺失。在一些情况下,可以在不改变SEQ ID NO:11或13的D1x2蛋白的功能性质的情况下进行一个或多个氨基酸取代、添加或缺失。在一些情况下,可以在不改变SEQ ID NO:15或17的Is11蛋白的功能性质的情况下进行一个或多个氨基酸取代、添加或缺失。

[0115] 可以在NeuroD1蛋白中进行保守氨基酸取代以产生NeuroD1蛋白变体。在一些情况下,可以在D1x2蛋白中进行保守氨基酸取代以产生D1x2蛋白变体。在一些情况下,可以在Is11蛋白中进行保守氨基酸取代以产生Is11蛋白变体。保守氨基酸取代是本领域公认的一个氨基酸对具有类似特性的另一个氨基酸的取代。例如,每个氨基酸可以被描述为具有以下特性中的一个或多个:正电性、负电性、脂肪族、芳香族、极性、疏水性和亲水性。保守取代是具有指定结构或功能特性的一个氨基酸对具有同一特性的另一个氨基酸的取代。酸性氨基酸包含天冬氨酸、谷氨酸;碱性氨基酸包含组氨酸、赖氨酸、精氨酸;脂肪族氨基酸包含异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸;芳香族氨基酸包含苯丙氨酸、甘氨酸、酪氨酸和色氨酸;极性氨基酸包含天冬氨酸、谷氨酸、组氨酸、赖氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸和

酪氨酸;并且疏水性氨基酸包含丙氨酸、半胱氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、缬氨酸和色氨酸;并且保守取代包含每组内的氨基酸之间的取代。氨基酸还可以根据相对大小来描述:丙氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、甘氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、苏氨酸、丝氨酸、缬氨酸,所有这些通常被认为是小的。

[0116] NeuroD1变体可以包含合成氨基酸类似物、氨基酸衍生物和/或非标准氨基酸,说明性地包含但不限于 α -氨基丁酸、瓜氨酸、刀豆氨酸、氰基丙氨酸、二氨基丁酸、二氨基庚二酸、二羟基-苯丙氨酸、黎豆氨酸、高精氨酸、羟脯氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、3-磷酸丝氨酸、高丝氨酸、5-羟色氨酸、1-甲基组氨酸、3-甲基组氨酸和鸟氨酸。在一些情况下,D1x2变体可以包含合成氨基酸类似物、氨基酸衍生物和/或非标准氨基酸,说明性地包含但不限于 α -氨基丁酸、瓜氨酸、刀豆氨酸、氰基丙氨酸、二氨基丁酸、二氨基庚二酸、二羟基-苯丙氨酸、黎豆氨酸、高精氨酸、羟脯氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、3-磷酸丝氨酸、高丝氨酸、5-羟色氨酸、1-甲基组氨酸、3-甲基组氨酸和鸟氨酸。在一些情况下,Is11变体可以包含合成氨基酸类似物、氨基酸衍生物和/或非标准氨基酸,说明性地包含但不限于 α -氨基丁酸、瓜氨酸、刀豆氨酸、氰基丙氨酸、二氨基丁酸、二氨基庚二酸、二羟基-苯丙氨酸、黎豆氨酸、高精氨酸、羟脯氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、3-磷酸丝氨酸、高丝氨酸、5-羟色氨酸、1-甲基组氨酸、3-甲基组氨酸和鸟氨酸。

[0117] 为了确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的百分比同一性,出于最佳比较目的对序列进行比对(例如,可以在第一氨基酸或核酸序列的序列中引入空位,以与第二氨基酸或核酸序列进行最佳比对)。然后将对应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸进行比较。当第一序列中的位置被与在第二序列中的对应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,则这些分子在所述位置处是相同的。两个序列之间的同一性百分比是序列共有的相同位置的数量的函数(即,同一性% = 相同重叠位置的数量/位置总数 $\times$ 100%)。在一个实施例中,两个序列的长度相同。

[0118] 两个序列之间的同一性百分比的确定也可以使用数学算法来完成。用于比较两个序列的数学算法的优选的非限制性实例是Karlin和Altschul的算法,《美国国家科学院院刊(PNAS)》,87:2264-2268(1990),所述文献被修改为Karlin和Altschul,《美国国家科学院院刊》,90:5873-5877(1993)。将这种算法并入到Altschul等人,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》,215:403(1990)的NBLAST和XBLAST程序中。用NBLAST核苷酸程序参数集(例如,分数=100,字长=12)执行BLAST核苷酸搜索,以获得与本文所述的核酸分子同源的核苷酸序列。

[0119] 用XBLAST程序参数集(例如,分数50,字长=3)执行BLAST蛋白搜索,以获得与本发明的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的有空位的比对,利用如在Altschul等人(《核酸研究(Nucleic Acids Res)》,25:3389-3402(1997))中所描述的有空位的BLAST。可替代地,PSI BLAST用于执行检测分子之间的距离关系的迭代搜索。当利用BLAST、有空位的BLAST和PSI Blast程序时,使用相应程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数(参见,例如,NCBI网站)。

[0120] 用于序列比较的数学算法的另一个优选的非限制性实例是Myers和Miller的算法(CABIOS,4:11-17(1988))。将这种算法并入到ALIGN程序(第2.0版)中,所述程序是GCG序列比对软件包的一部分。当利用ALIGN程序比较氨基酸序列时,使用PAM120权重残基表、空位

长度罚分12以及空位罚分4。

[0121] 在容许或不容许空位的情况下,使用类似于以上所述的那些技术的技术,确定两个序列之间的同一性百分比。在计算同一性百分比时,通常仅对确切的匹配进行计数。

[0122] 术语“NeuroD1蛋白”涵盖在本文所述的方法或组合物中可操作的NeuroD1蛋白的片段,如SEQ ID NO:2和4的片段及其变体。

[0123] 术语“Dlx2蛋白”涵盖在本文所述的方法或组合物中可操作的Dlx2蛋白的片段,如SEQ ID NO:11和13的片段及其变体。

[0124] 术语“Isl1蛋白”涵盖在本文所述的方法或组合物中可操作的Isl1蛋白的片段,如SEQ ID NO:15和17的片段及其变体。

[0125] NeuroD1蛋白和核酸可以从天然来源分离,如生物体的脑或表达NeuroD1的细胞系的细胞。可替代地,可以重组地产生NeuroD1蛋白或核酸,如通过使用表达构建体在体外或体内进行表达。NeuroD1蛋白和核酸也可以通过熟知的方法来合成。在一些情况下,Dlx2蛋白和核酸可以从天然来源分离,如生物体的脑或表达Dlx2的细胞系的细胞。可替代地,可以重组地产生Dlx2蛋白或核酸,如通过使用表达构建体在体外或体内进行表达。Dlx2蛋白和核酸也可以通过熟知的方法来合成。在一些情况下,Isl1蛋白和核酸可以从天然来源分离,如生物体的脑或表达Isl1的细胞系的细胞。可替代地,可以重组地产生Isl1蛋白或核酸,如通过使用表达构建体在体外或体内进行表达。Isl1蛋白和核酸也可以通过熟知的方法来合成。

[0126] 包含在本文所述的方法或组合物中的NeuroD1可以使用重组核酸技术来产生。重组NeuroD1生产包含将涵盖编码NeuroD1的DNA序列的重组表达载体引入到宿主细胞中。在一些情况下,包含在本文所述的方法或组合物中的Dlx2可以使用重组核酸技术来产生。重组Dlx2生产包含将涵盖编码Dlx2的DNA序列的重组表达载体引入到宿主细胞中。在一些情况下,包含在本文所述的方法或组合物中的Isl1可以使用重组核酸技术来产生。重组Isl1生产包含将涵盖编码Isl1的DNA序列的重组表达载体引入到宿主细胞中。

[0127] 在一些情况下,编码NeuroD1的引入到宿主细胞中以产生NeuroD1的核酸序列可以编码SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或其变体。

[0128] 在一些情况下,编码Dlx2的引入到宿主细胞中以产生Dlx2的核酸序列可以编码SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13或其变体。

[0129] 在一些情况下,编码Isl1的引入到宿主细胞中以产生Isl1的核酸序列可以编码SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17或其变体。

[0130] 在一些情况下,在本文中被鉴定为SEQ ID NO:1的核酸序列编码SEQ ID NO:2并且被包含在表达载体中并被表达以产生NeuroD1。在一些情况下,在本文中被鉴定为SEQ ID NO:10的核酸序列编码SEQ ID NO:11并且被包含在表达载体中并被表达以产生Dlx2。在一些情况下,在本文中被鉴定为SEQ ID NO:14的核酸序列编码SEQ ID NO:15并且被包含在表达载体中并被表达以产生Isl1。在一些情况下,在本文中被鉴定为SEQ ID NO:3的核酸序列编码SEQ ID NO:4并且被包含在表达载体中并被表达以产生NeuroD1。在一些情况下,在本文中被鉴定为SEQ ID NO:12的核酸序列编码SEQ ID NO:13并且被包含在表达载体中并被表达以产生Dlx2。在一些情况下,在本文中被鉴定为SEQ ID NO:16的核酸序列编码SEQ ID NO:17并且被包含在表达载体中并被表达以产生Isl1。

[0131] 应当理解,由于遗传密码的简并性质,与SEQ ID NO.1和3基本上相同的核酸序列编码NeuroD1和NeuroD1的变体,并且这些替代性核酸可以包含在表达载体中并且被表达以产生NeuroD1和NeuroD1的变体。在一些情况下,与SEQ ID NO:10和12基本上相同的核酸序列编码Dlx2和Dlx2的变体,并且这些替代性核酸可以包含在表达载体中并且被表达以产生Dlx2和Dlx2的变体。在一些情况下,与SEQ ID NO:14和16基本上相同的核酸序列编码Isl1和Isl1的变体,并且这些替代性核酸可以包含在表达载体中并且被表达以产生Isl1和Isl1的变体。本领域的技术人员将理解,编码NeuroD1蛋白的核酸的片段可以用于产生NeuroD1蛋白的片段。在一些情况下,本领域的技术人员将理解,编码Dlx2蛋白的核酸的片段可以用于产生Dlx2蛋白的片段。在一些情况下,本领域的技术人员将理解,编码Isl1蛋白的核酸的片段可以用于产生Isl1蛋白的片段。

[0132] 如本文所使用的,术语“Lhx3”是指参与垂体发育和运动神经元规格的LIM同源盒3转录因子。人Lhx3多肽的实例包含但不限于NCBI参考序列:NP_001350675.1或其生物活性片段。在一些实施例中,与野生型Lhx3多肽(例如,NCBI参考序列:NP_001350675.1)相比,Lhx3多肽包含导致突变的Lhx3活性增加的氨基酸取代、插入或缺失。

[0133] 如本文所使用的,术语“mir124”是指微RNA 124。微RNA(miRNA)是短的(20-24nt)非编码RNA,其通过影响mRNA的稳定性和翻译两者而参与多细胞生物体中基因表达的转录后调节。

[0134] 如本文所使用的,术语“mir218”是指微RNA 218。微RNA(miRNA)是短的(20-24nt)非编码RNA,其通过影响mRNA的稳定性和翻译两者而参与多细胞生物体中基因表达的转录后调节。

[0135] 如本文所使用的,术语“Ngn2”是指可以指定外胚层细胞上的神经元命运的神经特异性碱性螺旋-环-螺旋(bHLH)转录因子,并且在发育中的中枢神经系统和外周神经系统内的神经祖细胞中表达。人Ngn2多肽的实例包含但不限于NCBI参考序列:NP_076924.1或其生物活性片段。在一些实施例中,与野生型Ngn2多肽(例如,NCBI参考序列:NP_076924.1)相比,Ngn2多肽包含导致突变的Ngn2活性增加的氨基酸取代、插入或缺失。

[0136] 表达载体含有核酸,所述核酸包含编码所关注多肽的区段,所述所关注多肽与提供编码所关注多肽的区段的转录的一个或多个调控元件可操作地连接。如本文所使用的术语“可操作地连接”是指与第二核酸有功能关系的核酸。术语“可操作地连接”涵盖两个或更多个核酸分子(如待转录的核酸和调控元件)的功能连接。如本文所使用的术语“调控元件”是指控制可操作地连接的核酸的表达的一些方面的核苷酸序列。示例性调控元件包含增强子,如但不限于:土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE);内部核糖体进入位点(IRES)或2A结构域;内含子;复制起点;聚腺苷酸化信号(pA);启动子;转录终止序列;以及上游调控结构域,其有助于可操作地连接的核酸序列的复制、转录、转录后加工。本领域的普通技术人员能够在不超过常规实验的情况下选择和使用表达载体中的这些和其它调控元件。

[0137] 如本文所使用的术语“启动子”是指与如编码NeuroD1的核酸序列等待转录的核酸序列可操作地连接的DNA序列。启动子通常定位在待转录的核酸序列的上游,并且并且提供用于通过RNA聚合酶和其它转录因子特异性结合的位点。在具体实施例中,启动子通常定位在被转录以产生期望分子的核酸序列的上游,并且提供由RNA聚合酶和其它转录因子特异性结合的位点。

[0138] 如本领域的技术人员将认识到的,基因的5'非编码区可以被分离并且以其整体用于驱动可操作地连接的核酸的表达的启动子。可替代地,5'非编码区的一部分可以被分离并且用于驱动可操作地连接的核酸的表达。通常,基因的5'非编码区的约500-6000bp用于驱动可操作地连接的核酸的表达。任选地,使用基因的5'非编码区的含有驱动可操作地连接的核酸的表达所需的最小量的5'非编码区的部分。用于确定基因的5'非编码区的指定部分驱动可操作连接的核酸表达的能力的测定是本领域熟知的。

[0139] 根据本文所述的方法,用于驱动表达(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸的特定启动子是“普遍存在的”或“组成型”启动子,其驱动表达载体所转入的生物体的许多、大多数或所有细胞类型中的表达。可以用于(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸的表达的普遍存在的启动子的非限制性实例是巨细胞病毒启动子;猿猴病毒40(SV40)早期启动子;劳斯氏肉瘤病毒启动子(rous sarcoma virus promoter);腺病毒主要晚期启动子; β 肌动蛋白启动子;甘油醛3-磷酸脱氢酶;葡萄糖调控蛋白78启动子;葡萄糖调控蛋白94启动子;热休克蛋白70启动子;B驱动蛋白启动子;ROSA启动子;泛素B启动子;真核起始因子4A1启动子和延长因子I启动子;所有这些启动子在本领域中都是熟知的并且可以使用常规方法从主要来源分离或从商业来源获得。启动子可以完全源自单个基因或者可以是嵌合的,具有源自多于一个基因的部分。

[0140] 调控序列的组合可以包含在表达载体中并且用于驱动NeuroD1的表达。包含在表达载体中以驱动NeuroD1的表达的非限制性实例是CAG启动子,所述启动子组合了巨细胞病毒CMV早期增强子元件和鸡 β -肌动蛋白启动子。

[0141] 根据本文所述的方法,用于驱动NeuroD1(或任何其它(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码本文所述的mir124和mir218的外源性核酸)的表达的特定启动子是驱动优选在胶质细胞,特别是星形胶质细胞和/或NG2细胞中表达的启动子。这种启动子被称为“星形胶质细胞特异性”和/或“NG2细胞特异性”启动子。

[0142] 星形胶质细胞特异性启动子的非限制性实例是胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)启动子和醛脱氢酶1家族成员L1(Aldh1L1)启动子。人GFAP启动子在本文中被示出为SEQ ID NO:6。小鼠Aldh1L1启动子在本文中被示出为SEQ ID NO:7。

[0143] NG2细胞特异性启动子的非限制性实例是硫酸软骨素蛋白聚糖4基因的启动子,也称为神经元-胶质抗原2(NG2)。人NG2启动子在本文中被示出为SEQ ID NO:8。

[0144] 根据本文所述的方法,用于驱动NeuroD1的表达的特定启动子是优先驱动反应性胶质细胞,特别是反应性星形胶质细胞和/或反应性NG2细胞中的表达的启动子。这种启动子被称为“反应性星形胶质细胞特异性”和/或“反应性NG2细胞特异性”启动子。

[0145] 根据本文所述的方法,用于驱动Dlx2的表达的特定启动子是优先驱动反应性胶质细胞,特别是反应性星形胶质细胞和/或反应性NG2细胞中的表达的启动子。这种启动子被称为“反应性星形胶质细胞特异性”和/或“反应性NG2细胞特异性”启动子。

[0146] “反应性星形胶质细胞特异性”启动子的非限制性实例是脂质运载蛋白2(lcn2)基因的启动子。小鼠lcn2启动子在本文中被示出为SEQ ID NO:5。

[0147] 普遍存在的启动子和细胞类型特异性启动子的同源物和变体可以用于表达NeuroD1。

[0148] 在一些情况下,启动子同源物和启动子变体可以包含在用于表达NeuroD1的表达载体中。在一些情况下,启动子同源物和启动子变体可以包含在用于表达Dlx2的表达载体中。在一些情况下,启动子同源物和启动子变体可以包含在用于表达Isl1的表达载体中。术语“启动子同源物”和“启动子变体”是指与本文公开的那些启动子相比,具有基本上类似的功能性质以在编码NeuroD1的可操作地连接的核酸上赋予期望的表达类型,如NeuroD1的细胞类型特异性表达或NeuroD1的普遍存在表达的启动子。例如,与GFAP、S100b、Aldh1L1、NG2、lcn2和CAG启动子相比,启动子同源物或变体具有基本上类似的功能性质以在编码NeuroD1的可操作地连接的核酸上赋予细胞类型特异性表达。

[0149] 本领域的技术人员将认识到,可以在不改变给定启动子的功能性质的情况下引入一个或多个核酸突变。可以使用如定点诱变和PCR介导的诱变等标准分子生物学技术引入突变,以产生启动子变体。如本文所使用的,术语“启动子变体”是指参考启动子,如但不限于GFAP、S100b、Aldh1L1、NG2、lcn2和pCAG启动子的分离的天然存在的或重组制备的变体。

[0150] 本领域已知来自其它物种的启动子是具有功能的,例如小鼠Aldh1L1启动子在人类细胞中是具有功能的。可以使用本领域已知的生物信息学工具鉴定来自其它物种的同源物和同源启动子,参见例如,Xuan等人,《基因组生物学(Genome Biol)》,6:R72(2005);Zhao等人,《核酸研究》,33:D103-107(2005);以及Halees等人,《核酸研究》,31:3554-3559(2003)。

[0151] 在结构上,NeuroD1的细胞类型特异性启动子和/或普遍存在的启动子的同源物和变体与参考发育调节的和/或普遍存在的启动子具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的核酸序列同一性,并且包含用于结合RNA聚合酶的位点以及任选地用于转录因子的一个或多个结合位点。

[0152] 与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3基本上相同的核酸序列的特征在于具有能够在高严格性杂交条件下与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3杂交的互补核酸序列。

[0153] 除了编码NeuroD1的一个或多个核酸之外,编码另外的蛋白质的一个或多个核酸序列可以包含在表达载体中。例如,此类另外的蛋白质包含非NeuroD1蛋白,如包含但不限于β-半乳糖苷酶、绿色荧光蛋白的报告基因以及抗生素抗性报告基因。

[0154] 在特定实施例中,重组表达载体编码至少SEQ ID NO:2的NeuroD1、与SEQ ID NO:2具有至少95%同一性的蛋白质或由与SEQ ID NO:1基本上相同的核酸序列编码的蛋白质。

[0155] 在特定实施例中,重组表达载体编码至少SEQ ID NO:4的NeuroD1、与SEQ ID NO:4具有至少95%同一性的蛋白质或由与SEQ ID NO:2基本上相同的核酸序列编码的蛋白质。

[0156] SEQ ID NO:9是包含与编码NeuroD1的核酸可操作地连接的CAG启动子并且进一步包含编码EGFP和增强子WPRE的核酸序列的核酸的实例。IRES将编码NeuroD1的核酸与编码EGFP的核酸分离。将SEQ ID NO:9插入到表达载体中,以便表达NeuroD1和报告基因EGFP。任选地,去除IRES以及编码EGFP的核酸,并且将剩余CAG启动子以及编码NeuroD1的可操作地连接的核酸插入到表达载体中,以便表达NeuroD1。可以任选地包含WPRE或另一种增强子。

[0157] 任选地,报告基因包含在编码NeuroD1的重组表达载体中。可以包含报告基因以产生肽或蛋白质,所述肽或蛋白质用作从重组表达载体表达NeuroD1的替代标志物。在一些情

况下,报告基因包含在编码Dlx2的重组表达载体中。在一些情况下,报告基因包含在编码Isl1的重组表达载体中。可以包含报告基因以产生肽或蛋白质,所述肽或蛋白质用作从重组表达载体表达Dlx2的替代标志物。如本文所使用的术语“报告基因”是指当通过例如化学发光、荧光、比色反应、抗体结合、诱导型标志物和/或配体结合测定表达时易于检测的基因。示例性报告基因包含但不限于绿色荧光蛋白(GFP)、增强型绿色荧光蛋白(eGFP)、黄色荧光蛋白(YFP)、增强型黄色荧光蛋白(eYFP)、青色荧光蛋白(CFP)、增强型青色荧光蛋白(eCFP)、蓝色荧光蛋白(BFP)、增强型蓝色荧光蛋白(eBFP)、MmGFP(Zernicka-Goetz等人,《发育(Development)》,124:1133-1137(1997))、dsRed、荧光素酶和 β -半乳糖苷酶(lacZ)。

[0158] 将遗传物质引入到接受者宿主细胞中的过程,如用于在宿主细胞中瞬时或稳定表达由遗传物质编码的期望蛋白质的过程被称为“转染”。转染技术是本领域熟知的并且包含但不限于电穿孔、颗粒加速转化(也称为“基因枪”技术)、脂质体介导的转染、磷酸钙或氯化钙共沉淀介导的转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、显微注射、聚乙二醇介导的转染、热休克介导的转染和病毒介导的转染。如本文所述,病毒介导的转染可以使用病毒载体,如源自腺病毒、腺相关病毒和慢病毒的病毒载体来完成。

[0159] 任选地,将宿主细胞离体转染并且然后重新引入到宿主生物体中。例如,可以从受试者体内去除细胞或组织,用编码NeuroD1的表达载体转染,并且然后返回到受试者。在一些情况下,可以从受试者体内去除细胞或组织,用编码NeuroD1和Dlx2的表达载体转染,并且然后返回到受试者。在一些情况下,可以从受试者体内去除细胞或组织,用编码NeuroD1的表达载体和编码Dlx2的表达载体转染,并且然后返回到受试者。在一些情况下,可以从受试者体内去除细胞或组织,用编码NeuroD1和Isl1的表达载体转染,并且然后返回到受试者。在一些情况下,可以从受试者体内去除细胞或组织,用编码NeuroD1的表达载体和编码Isl1的表达载体转染,并且然后返回到受试者。

[0160] 将包含编码NeuroD1或其功能片段的核酸的重组表达载体在体外或体内引入到宿主胶质细胞中,以便在宿主胶质细胞中表达外源性NeuroD1,从而将胶质细胞转化成神经元是通过各种转染方法中的任何一种来实现的。在一些情况下,将包含编码Dlx2或其功能片段的核酸的重组表达载体在体外或体内引入到宿主胶质细胞中,以便在宿主胶质细胞中表达外源性Dlx2,从而将胶质细胞转化成神经元是通过各种转染方法中的任何一种来实现的。在一些情况下,将包含编码Isl1或其功能片段的核酸的重组表达载体在体外或体内引入到宿主胶质细胞中,以便在宿主胶质细胞中表达外源性Isl1,从而将胶质细胞转化成神经元是通过各种转染方法中的任何一种来实现的。

[0161] (i) 编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii) 编码mir124和mir218的外源性核酸在宿主胶质细胞中将胶质细胞转化成神经元的表达任选地通过将编码NeuroD1(或本文所述的任何其它多肽)的mRNA或其功能片段在体外或体内引入到宿主胶质细胞中来实现。

[0162] (i) 编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii) 编码mir124和mir218的外源性核酸在宿主胶质细胞中将胶质细胞转化成神经元的表达任选地通过将多肽引入到宿主胶质细胞中来实现。这些和其它技术的细节是本领域已知的,例如,如以下文献中所描述的:J.Sambrook和D.W.Russell,《分子克隆:实验室手册》,冷泉港实验室出版社;第3版,2001;F.M.Ausubel编辑,《精编分子

生物学实验指南》,《实验室指南》;第5版,2002;以及Engelke,D.R.,《RNA干扰(RNAi):RNAi技术的具体细节》,宾夕法尼亚州伊格尔维尔的DNA出版社有限责任公司,2003。

[0163] 包含(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218或其功能片段的外源性核酸、编码多肽或其功能片段的mRNA、全长或其功能片段的表达载体任选地与用于在体外或体内引入到宿主细胞中的载体缔合。

[0164] 在特定方面,载体是颗粒载体,如脂质颗粒,包含脂质体、胶束、单层或多层囊泡;聚合物颗粒,如水凝胶颗粒、聚乙醇酸颗粒或聚乳酸颗粒;无机颗粒,如磷酸钙颗粒,如例如美国专利第5,648,097号中所描述的;以及无机/有机颗粒载体,如例如美国专利第6,630,486号中所描述的。

[0165] 颗粒载体可以选自脂质颗粒;聚合物颗粒;无机颗粒;和无机/有机颗粒。颗粒类型的混合物也可以作为颗粒药学上可接受的载体被包含在内。

[0166] 颗粒载体通常被调配成使得颗粒的平均粒度在约1nm-10微米的范围内。在特定方面,颗粒载体被调配成使得颗粒的平均粒度在约1nm-100nm的范围内。

[0167] 对脂质体和与其制备和用途相关的方法的进一步描述可见于《脂质体:实用方法(Liposomes:A Practical Approach)》(实用方法系列,264),V.P.Torchilin和V.Weissig(编辑),牛津大学出版社(Oxford University Press);第2版,2003。在S.M.Moghimi等人,《美国实验生物学学会联合会杂(FASEB J.)》2005,19,311-30中描述了纳米颗粒的另外的方面。

[0168] 使用重组表达载体表达(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸是通过将表达载体引入到真核或原核宿主细胞表达系统,如昆虫细胞、哺乳动物细胞、酵母细胞、细菌细胞或本领域公认的任何其它单细胞或多细胞生物中来完成的。宿主细胞任选地是原代细胞或永生化源性细胞。永生化细胞是可以在体外维持至少5次复制传代的细胞。

[0169] 在产生NeuroD1的条件下维持含有重组表达载体的宿主细胞。在一些情况下,在产生Dlx2的条件下维持含有重组表达载体的宿主细胞。可以使用已知的细胞培养技术培养和维持宿主细胞,所述细胞培养技术如Celis,Julio编辑,1994,《细胞生物学实验室手册(Cell Biology Laboratory Handbook)》,纽约的学术出版社(Academic Press,N.Y.)中所述。本领域的技术人员可以选择和优化这些细胞的各种培养条件,包含关于特定营养物、氧气、张力、二氧化碳和降低的血清水平的培养基调配物。

[0170] 在一些情况下,将包含以下的重组表达载体引入到受试者的胶质细胞中:(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸。(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸在胶质细胞中的表达使胶质细胞“转化”成神经元。

[0171] 在一些情况下,将包含以下的重组表达载体引入到受试者的星形胶质细胞中:(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸。(i)编码本文所述的任何多肽或多

肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸在胶质细胞中的表达使星形胶质细胞“转化”成神经元。

[0172] 在一些情况下,将重组表达载体(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸引入到受试者的反应性星形胶质细胞中。(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸在反应性星形胶质细胞中的表达使反应性星形胶质细胞“转化”成神经元。

[0173] 在一些情况下,将包含以下的重组表达载体引入到受试者的NG2细胞中:(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸。外源性(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸在NG2细胞中的表达使NG2细胞“转化”成神经元。

[0174] 在引入重组表达载体后检测(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸的表达是使用各种标准方法中的任一种来实现的,所述重组表达载体包含对(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码mir124和mir218的外源性核酸进行编码的核酸,所述标准方法包含但不限于免疫测定、核酸检测测定和与外源性核酸共表达的报告基因的检测。

[0175] 术语“转化(converts)”和“转化的(converted)”在本文中用于描述单独的或与Dlx2或其功能片段组合的NeuroD1或其功能片段的表达导致胶质细胞、星形胶质细胞或反应性星形胶质细胞表型改变为神经元表型的作用。类似地,短语“经NeuroD1转化的神经元”、“经NeuroD1和Dlx2转化的神经元”和“经转化神经元”在本文中用于指包含单独的外源性NeuroD1蛋白或其功能片段或者与具有随之发生的神经元表型的外源性Dlx2蛋白或其功能片段组合的细胞。

[0176] 术语“表型”是指本文所提及的细胞的熟知的可检测特性。神经元表型可以是但不限于以下的一种或多种:神经元形态、一种或多种神经元标志物的表达、神经元的电生理学特性、突触形成和神经递质的释放。例如,神经元表型涵盖但不限于:神经元的特征性形态方面,如树突、轴突和树突脊的存在;特征性神经元蛋白表达和分布,如在突触点中存在突触蛋白、在树突中存在MAP2;以及特征性电生理体征,如自发和诱发突触事件。

[0177] 在另外的实例中,如星形胶质细胞表型和反应性星形胶质细胞表型等胶质表型涵盖但不限于:星形胶质细胞和反应性星形胶质细胞的特征性形态方面,如通常“星形”形态;以及特征性星形胶质细胞和反应性星形胶质细胞蛋白表达,如胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)的存在。

[0178] 术语“核酸”是指具有多于一个核苷酸的任何形式的RNA或DNA分子包含单链、双链、寡核苷酸或多核苷酸。术语“核苷酸序列”是指单链形式的核酸中的寡核苷酸或多核苷酸中的核苷酸的排序。

[0179] 术语“NeuroD1核酸”是指分离的NeuroD1核酸分子,并且涵盖具有与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3中所示的DNA序列或其互补体或其片段具有至少70%、75%、80%、85%、

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的分离的NeuroD1核酸,或具有在高严格性杂交条件下与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3中所示的核酸、其互补体或其片段杂交的序列的分离的DNA分子。

[0180] SEQ ID NO:3的核酸是具有在高严格性杂交条件下与SEQ ID NO:1中所示的核酸杂交的序列的分离的DNA分子的实例。NeuroD1核酸的片段是在本文所述的一方面中可操作的NeuroD1核酸的任何片段,包含NeuroD1核酸。

[0181] 能够与靶NeuroD1 mRNA或cDNA杂交的核酸探针或引物可以用于检测和/或定量编码NeuroD1蛋白的mRNA或cDNA。核酸探针可以是长度为至少10、15、30、50或100个核苷酸的寡核苷酸,并且足以在严格条件下与NeuroD1 mRNA或cDNA或其互补序列特异性杂交。核酸引物可以是长度为至少10、15或20个核苷酸的寡核苷酸,并且足以在严格条件下与mRNA或cDNA或其互补序列特异性杂交。

[0182] 术语“互补体”和“互补”是指核苷酸之间的沃森-克里克碱基配对(Watson-Crick base pairing)并且具体地是指彼此氢键键合的核苷酸,其中胸腺嘧啶或尿嘧啶残基通过两个氢键与腺嘌呤残基连接并且胞嘧啶和鸟嘌呤残基通过三个氢键连接。通常,核酸包含描述为与指定的第二核苷酸序列具有“百分比互补性”的核苷酸序列。例如,核苷酸序列可以与指定的第二核苷酸序列具有80%、90%或100%互补性,这表明序列的10个核苷酸中的8个、10个核苷酸中的9个或10个核苷酸中的10个与指定的第二核苷酸序列互补。例如,核苷酸序列3'-TCGA-5'与核苷酸序列5'-AGCT-3'是100%互补的。另外,核苷酸序列3'-TCGA-与核苷酸序列5'-TTAGCTGG-3'的区域100%互补。

[0183] 术语“杂交”和“杂交”是指互补核酸的配对和结合。杂交在两个核酸之间以不同程度发生,这取决于如核酸的互补程度、核酸的解链温度 T_m 以及杂交条件的严格性等因素,如本领域中熟知的。术语“杂交条件的严格性”是指杂交介质相对于如甲酰胺和登哈特氏溶液(Denhardt's solution)等特定常见添加剂的温度、离子强度和组成的条件。

[0184] 与特定核酸相关的特定杂交条件的确定是常规的并且是本领域熟知的,例如,如在以下文献中所描述的:J.Sambrook和D.W.Russell,《分子克隆:实验室手册》,冷泉港实验室出版社;第3版,2001;以及F.M.Ausubel编辑,《精编分子生物学实验指南》,《实验室指南》;第5版,2002。高严格性杂交条件是仅允许基本上互补的核酸杂交的那些条件。通常,具有约85-100%互补性的核酸被认为是高度互补的并且在高严格性条件下杂交。中间严格性条件被例示为具有中间互补性、约50-84%互补性的核酸以及具有高互补性程度的核酸杂交的条件。相反,低严格性杂交条件是具有低互补性程度的核酸杂交的条件。

[0185] 术语“特异性杂交(specific hybridization)”和“特异性杂交(specifically hybridizes)”是指特定核酸与靶核酸的杂交而不与样品中除了靶核酸之外的核酸发生实质性杂交。

[0186] 杂交和洗涤条件的严格性取决于若干因素,包含探针和靶标的 T_m 以及杂交和洗涤条件的离子强度,如本领域技术人员熟知的。例如在以下文献中描述了杂交和用于实现期望的杂交严格性的条件:Sambrook等人,《分子克隆:实验室手册》,冷泉港实验室出版社,2001;以及Ausubel,F.等人(编辑),《精编分子生物学实验指南》,威利出版公司(Wiley),2002。

[0187] 高严格性杂交条件的实例是长度超过约100个核苷酸的核酸在含有6X SSC、5X登

哈特氏溶液、30%甲酰胺和100微克/毫升变性鲑鱼精子的溶液在37℃下杂交过夜,随后在0.1X SSC和0.1%SDS的溶液在60℃下洗涤15分钟。SSC是0.15M NaCl/0.015M柠檬酸钠。登哈特氏溶液是0.02%牛血清白蛋白/0.02%FICOLL/0.02%聚乙烯吡咯烷酮。在高严格条件下,SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3将与基本上相同靶标的互补体杂交,而不与不相关序列杂交。

[0188] 根据本公开的各个方面提供治疗有需要的受试者的神经病状的方法,所述方法包含递送治疗有效的(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码针对受试者的中枢神经系统或外周神经系统的胶质细胞的mir124和mir218的外源性核酸,治疗有效量的(i)编码本文所述的任何多肽或多肽的任何组合(例如,NeuroD1、Isl1、Lhx3、Dlx2和Ngn2)的外源性核酸和/或(ii)编码胶质细胞中的mir124和mir218的外源性核酸导致受试者的神经元数量比具有同一神经病状的未经治疗的受试者更多,由此神经病状得到治疗。

[0189] 反应性胶质细胞向神经元的转化还减少了与反应性胶质细胞相关的神经炎症和神经抑制因子,由此使胶质瘢痕组织更允许神经元生长,使得神经病状得以减轻。

[0190] 如本文所使用的术语“神经病状”或“神经病症”是指受试者的中枢神经系统的通过另外的神经元得以减轻、改善或预防的任何病状。导致神经元丧失或抑制和/或神经元功能丧失或抑制的损伤或疾病是通过本文所述的方法进行治疗的神经病状。

[0191] 导致谷氨酸能神经元丧失或抑制和/或谷氨酰胺能神经元功能丧失或抑制的损伤或疾病是可以如本文所述进行治疗的神经病状。其它类型的神经元的丧失或抑制,如GABA能、胆碱能、多巴胺能、去甲肾上腺素能或血清素神经元可以用类似的方法进行治疗。

[0192] 如本文所使用的术语“治疗有效量”旨在意指有效减轻、改善或预防待治疗的神经病状的症状或体征的本发明的组合物的量。在特定实施例中,治疗有效量是对具有神经病状的体征和/或症状的受试者具有有益效果的量。

[0193] 如本文所使用的术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”、“NeuroD1治疗”以及“NeuroD1和Dlx2治疗”或语法等效物是指减轻、抑制或改善神经病状、神经病状的症状或体征以及预防神经病状的症状或体征,并且包含但不限于治疗性和/或预防性治疗。

[0194] 神经病状的体征和症状连同检测和评估此类体征和症状的方法是本领域熟知的。

[0195] 在一些情况下,可以施用针对受试者的神经病状的疗法的组合。

[0196] 根据特定方面,施用于受试者以治疗有需要的个体受试者的CNS中正常血流的中断作用的另外的药剂或治疗性治疗包含治疗,如但不限于去除血凝块、促进血流、施用一种或多种抗炎剂、施用一种或多种抗氧化剂以及施用有效降低兴奋性中毒的一种或多种药剂。

[0197] 术语“受试者”是指人并且还是指非人哺乳动物,如但不限于非人灵长类动物、猫、狗、绵羊、山羊、马、牛、猪和啮齿动物,如但不限于小鼠和大鼠;以及非哺乳动物,如但不限于鸟类、家禽、爬行动物、两栖动物。

[0198] 以下实例说明了本发明组合物和方法的实施例。这些实例出于说明性目的提供,并且不认为是对本发明组合物和方法的范围的限制。

[0199] 实例

[0200] 材料和方法

[0201] 动物使用

[0202] GAD-GFP小鼠 (Tg[Gad1-EGFP]94Agmo/J) 和野生型C57BL/6小鼠购自杰克逊实验室 (Jackson Laboratory) 并且在室内繁殖。使用2-4月龄的小鼠 (雄性和雌性)。将小鼠关在12小时光/暗循环中, 并且供应充足的食物和水。所有动物使用和研究均得到宾夕法尼亚州立大学 (the Pennsylvania State University) 的动物护理和使用委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) 批准。根据国家卫生研究院 (NIH) 批准的方案和指南进行所有程序。

[0203] 逆转录病毒和AAV产生

[0204] 先前描述了在CAG启动子 (pCAG) 下表达GFP和NeuroD1-GFP的逆转录病毒载体 (Guo等人,《细胞干细胞》,14:188-202 (2014))。如先前所述进行逆转录病毒包装、纯化和滴定 (Guo等人,《细胞干细胞》,14:188-202 (2014))。对于AAV介导的基因表达, 使用人GFAP (hGFAP) 启动子, 应用Cre-Flex系统以将转基因表达特异性靶向反应性星形胶质细胞。为了产生pAAV-hGFAP::Cre载体, 首先将hGFAP启动子通过PCR从pDRIVE-hGFAP质粒 (InvivoGen公司 (InvivoGen)) 扩增并且插入到MluI与SacII位点之间的pAAV-MCS (细胞生物学实验室 (Cell Biolab)) 中, 以替换CMV启动子。然后类似地从phGFAP-Cre (Addgene质粒#40591) 亚克隆Cre基因编码片段并且将其插入到EcoRI与SalI位点之间的pAAV MCS中。为了构建表达转基因的pAAV-FLEX载体, 通过PCR从对应的逆转录病毒构建体扩增NeuroD1、mCherry或GFP的编码序列。将NeuroD1片段与P2A-mCherry或P2A-GFP融合, 并且亚克隆到KpnI与XhoI位点之间的pAAV-FLEX-GFP载体 (Addgene质粒#28304) 中。通过测序确认所有质粒构建体。AAV-CamKII-GFP质粒购自Addgene (#64545)。对于AAV产生, 将HEK 293T细胞用pAAV表达载体、pAAV9-RC载体 (细胞生物学实验室) 和pHelper载体 (细胞生物学实验室) 进行转染, 以产生携带转基因的AAV颗粒。转染三天后, 将细胞在细胞培养基中刮除并离心。然后弃去上清液, 并且将细胞沉淀冷冻和解冻四次, 重悬于不连续的碘克沙醇梯度中, 并且以54,000rpm离心两小时。最后, 提取含有病毒的层, 并且使用Millipore Amicon超离心过滤器浓缩病毒。使用QuickTiter™ AAV定量试剂盒 (细胞生物实验室) 确定病毒滴度, 并且然后稀释到 1×10^{10} 基因组拷贝 (GC) /mL的最终浓度用于注射。

[0205] 椎板切除术、损伤和立体定向病毒注射

[0206] 通过腹膜内注射氯胺酮/甲苯噻嗪 (80-120mg/kg氯胺酮; 10-16mg/kg甲苯噻嗪) 麻醉小鼠。然后, 在T11-T12椎骨处进行椎板切除术以暴露脊髓的背侧面, 并且进行穿刺或挫伤。穿刺损伤是用31号针在暴露表面的中心 (在中心动脉的侧面0.4mm, 深度为0.4mm) 进行的, 而挫伤损伤是用45kdyn的力在无限地平线撞击器 (IH-0400, 精密系统和仪器 (Precision Systems and Instrumentation)) 上直接在暴露表面的中心产生的。在损伤后立即或在指定的延迟时间下, 使用具有34号注射针的50μL Hamilton注射器, 以0.05微升/分钟的速率, 在用于穿刺损伤的相同坐标处或在用于挫伤损伤的1mm远处, 注射1.0μL的浓缩病毒。然后, 在注射后将针保持在适当位置三分钟以防止在取出期间抽出病毒。然后用抗生素软膏处理外科手术区域, 并且将皮肤剪掉一周以允许皮肤再缝合。将小鼠保持在加热垫上, 并且在外科手术当天通过皮下注射 (5mg/kg) 以及在外科手术后三天通过饮用水 (10mg/kg) 用卡洛芬治疗以便实现疼痛缓解, 并且密切监测一周以确保完全恢复健康。

[0207] 电生理学

[0208] 在限定的时间点通过用2.5%阿佛丁麻醉并断头处死小鼠。然后将脊髓区段从脊柱中移入到在冰上冷却的切割溶液(125mM NaCl、2.5mM KCl、1.3mM MgSO₄、26mM NaHCO₃、1.25mM NaH₂PO₄、2.0mM CaCl₂以及10mM葡萄糖,调节到pH 7.4和295mOsm/L,并且用95%O₂/5%CO₂鼓泡一小时)中,其中所述切割溶液包裹在琼脂糖基质(西格玛公司(Sigma))中并且使用VT3000振动切片机(莱卡公司(Leica))切割成300μm厚度的切片。然后,在标准ACSF(125mM NaCl、2.5mM KCl、1.25mM NaH₂PO₄、26mM NaHCO₃、1.3mM MgSO₄、2.5mM CaCl₂以及10mM葡萄糖,调节到pH 7.4和295mOsm/L,并且用95%O₂/5%CO₂鼓泡一小时)中进行膜片钳记录之前,将切片在保持溶液(92mM NaCl、2.5mM KCl、1.25mM NaH₂PO₄、30mM NaHCO₃、20mM HEPES、15mM葡萄糖、12mM N-乙酰基-L-半胱氨酸、5mM抗坏血酸钠、2mM硫脲、3mM丙酮酸钠、2mM MgSO₄和2mM CaCl₂,调节到pH 7.4和295mOsm/L,并且用95%O₂/5%CO₂连续鼓泡)中在室温下温育一小时。使用标准内溶液(135mM K-葡萄糖酸盐、10mM KCl、5mM磷酸肌酸钠(Naphosphocreatine)、10mM HEPES、2mM EGTA、4mM MgATP以及0.5mM Na₂GTP,调节到pH 7.4和295mOsm/L)通过全细胞记录来记录天然细胞和经转化细胞两者,其中膜电位保持在-70mV。移液管和总串联电阻的典型值分别为2-10MΩ和20-60MΩ。使用pClamp 9软件(美谷分子仪器有限公司(Molecular Devices))通过在10kHz下采样并且在1kHz下过滤来收集数据。然后用Clampfit 9.0软件(美谷分子仪器有限公司)分析数据并且作图。

[0209] 免疫组织化学、免疫细胞化学和显微术

[0210] 在灌注之后,手术解剖脊髓的靶区域(长度约0.5cm),在含4%多聚甲醛(PFA)的PBS中固定一天,在30%蔗糖溶液中脱水一天,并且使用莱卡CM1950低温恒温器切成30μm冠状或水平切片。将切片连续收集在24孔板中,以便稍后可以确定距损伤位点的距离。然后将样品在4℃下储存在含0.02%叠氮化钠(NaN₃)的PBS中以防止细菌降解。通过在荧光显微镜下检查储存溶液中的报告蛋白(mCherry或GFP),基于背角的感染,选择脊髓切片用于免疫组织化学。对于穿刺损伤实验,小心选择距损伤位点至少100μm的冠状切片以确保组织完整性。在染色的第一天,将样品在PBS中洗涤三次,每次洗涤五分钟,用含2%Triton X-100的PBS渗透20分钟,并且使用含5%正常驴血清(NDS)和0.1%Triton-X的PBS封闭两小时,以减少抗体的非特异性结合。然后将样品与在相同的封闭缓冲液中稀释的一级抗体在4℃下温育两夜,以允许抗体彻底渗透。在第三天,将样品回收到室温,在PBS中洗涤三次,每次洗涤五分钟,并且与在封闭缓冲液中稀释的二级抗体温育一小时。最后,将样品在PBS中再洗涤三次,每次洗涤十分钟,并且使用抗褪色封固溶液(英杰公司(Invitrogen))用盖玻片封固在载玻片上。使用Olympus FV1200和Zeiss LSM 800激光共聚焦显微镜对经免疫染色的样品进行检查和成像。收集样品的整个厚度的体内图像的Z-堆叠,并且将最大强度和z-堆叠投影用于图像制备和分析。

[0211] 定量和数据分析

[0212] 作为上述仔细选择的注射坐标的结果,受感染细胞主要发现于脊髓的背角,Rexed薄层1-6(Rexed,《比较神经学杂志(J.Comp.Neurol.)》,100:297-379(1954))。对于包含细胞转化和NeuN采集的大多数定量,如果细胞出现在此区域的任何部分,则对细胞进行计数。对于基于细胞亚型的定量(图3和4),仅当细胞出现在Rexed薄层1-3中时才对细胞进行计数,所述薄层的中心在胶状质周围,所述胶状质是由小的兴奋性中间神经元支配并且由于

其高细胞密度而容易区分的区域(Santos等人,《生理学杂志(J.Physiol.)》,581:241-254(2007))。选择此区域是因为这个区域易于划界,并且使得可以预期样品与样品之间一致的神经元亚型局部群体。使用z堆叠图像作为向导和分层堆叠对所收集图像进行定量以检查垂直尺寸。计算每个通道的阳性信号的严格背景截止值,作为相关组织和抗体的平均背景强度的三倍。使用病毒荧光团(mCherry或GFP)来鉴定受感染细胞并且使用DAPI来确认进行计数的每种细胞,通过所讨论的每种标志物的存在(即,高于背景截止值)或不存在(即,低于背景截止值)将细胞分箱。为了估计用于挫伤实验的每次感染的经转化神经元的总数,将每水平切片的NeuN+受感染细胞的平均数(从一个背部、一个中部和一个腹部切片计算的)乘以每个样品的水平切片的总数。所有定量均在每个数据点的三个生物重复上进行并且报告为三个重复的平均值和标准偏差。

[0213] 实例1-NeuroD1将反应性星形胶质细胞重新编程为受损脊髓中的神经元

[0214] 数十年来,一直对SCI进行研究,但是迄今为止,用于治疗SCI患者的疗法仍然有限。除了轴突变性之外,SCI后的神经元丧失是功能恢复的主要障碍。先前证明,在脑损伤之后在反应性星形胶质细胞中表达NeuroD1可以直接将星形胶质细胞转化成神经元(Guo等人,《细胞干细胞》,14:188-202(2014))。在本研究中,调查了这种体内直接转化技术是否可以用于再生受损脊髓中的功能性新神经元。为了在损伤之后靶向分裂反应性星形胶质细胞,采用主要在分裂细胞中表达异位基因但不能在无法分裂的神经元中表达异位基因的逆转录病毒。当已经检测到许多分裂反应性星形胶质细胞时,在穿刺损伤后4天(dpi)注射表达NeuroD1的逆转录病毒(Chen等人,《神经科学杂志》,28:10983-10989(2008);以及Hong等人,《胶质细胞(Glia)》,62:2044-2060(2014)),并且在注射后1、3和6周(wpi)分析样品(图1A)。在本研究中,选择脊髓背角作为主要的所关注区域,因为所述脊髓背角由兴奋性和抑制性神经元两者构成并且对于传入感觉信息处理至关重要(图1B)。分别研究脊髓腹角中的运动神经元再生。首先探索被对照CAG::GFP逆转录病毒感染的细胞类型。在1wpi下,发现对照GFP逆转录病毒感染胶质细胞类型的混合物,所述胶质细胞类型包含反应性星形胶质细胞(GFAP+和一些GFAP+/Olig2+)、少突胶质细胞祖细胞(OPC)(Olig2+)和小胶质细胞(Iba1+) (图1C和1D),但不感染NeuN+神经元(图1D)。相比之下,被CAG::NeuroD1-GFP逆转录病毒感染的细胞示出随着时间具有神经元形态的NeuN+细胞的数量增加(图1E),并且在6wpi下定量地达到93.5%,这是高效率的(图1F),这表明在受损脊髓中成功的胶质到神经元转化。

[0215] 虽然逆转录病毒可以靶向反应性胶质细胞,但是在病毒感染时分裂胶质细胞的数量可能是有限的。采用了AAV基因递送系统,其中转基因表达受星形胶质细胞特异性GFAP启动子控制(图2A)。具体地,使用了Cre-Flex基因表达系统,其含有两个AAV载体,其中一个载体编码GFAP-Cre并且另一个载体编码侧接双LoxP位点的反向形式的转基因(FLEX载体)(Atasoy等人,《神经科学杂志》,28:7025-7030(2008);Chen等人,《生物预印本期刊(BioRxiv)》,2018年4月4日;doi:http://dx.doi.org/10.1101/294967);以及Liu等人,《神经科学杂志》,35:9336-9355(2015))。因此,当将两个AAV共注射到脊髓中时,Cre重组酶将在受感染的反应性星形胶质细胞中表达,并且通过将转基因序列翻转成正确形式而开启FLEX载体中的转基因表达以进行转录(图2B)。首先通过将AAV GFAP::Cre和AAV FLEXCAG::mCherry(或::GFP)共注射到穿刺受损背角中来确认Cre-Flex AAV系统在脊髓中的特异性。对照病毒感染的细胞大部分是4wpi的GFAP+、NeuN-星形胶质细胞(图2C)。接下来,将AAV

GFAP::Cre与AAV FLEX-CAG::NeuroD1-P2A-mCherry共注射到穿刺受损背角中。与对照AAV相反,NeuroD1-mCherry感染的细胞大部分是在4wpi下具有清楚的神经元形态的NeuN+/GFAP-神经元(图2D)。通过免疫染色确认了受感染细胞中的NeuroD1过表达(图8)。有趣的是,除了经NeuN+/GFAP转化的神经元之外,还观察到2wpi的许多NeuroD1-AAV感染的细胞连同GFAP+和NeuN+两者的共免疫染色(图2E),这表明在星形胶质细胞-神经元转化期间的潜在中间阶段。将在星形胶质细胞中由NeuroD1表达诱导的这些GFAP+/NeuN+细胞称为“AtN移行细胞”。在损伤后,在对照mCherry感染的脊髓中没有观察到任何此类移行细胞,这表明AtN转化未在神经损伤后发生,但可以通过如NeuroD1等转录因子的异位表达来诱导。定量分析揭示,对照AAV感染的细胞在8wpi时大部分是GFAP+星形胶质细胞(图2F,左侧条形),而NeuroD1 AAV感染的细胞显示神经元百分比从2到8wpi逐渐增加(NeuN+/GFAP-,图2F中的右侧条形),在8wpi下达到约95%(图2F,最右侧条形)。注意在2wpi下,超过60%的NeuroD1感染的细胞是GFAP+/NeuN+移行细胞(图2F中的中间条形),其在4wpi和8wpi下逐渐减少,同时NeuroD1感染的细胞群中GFAP+星形胶质细胞(图2F中的左侧条形)减少。进一步分析显示,移行细胞和经转化神经元均未表现出显著的细胞死亡,这表明细胞凋亡在NeuroD1介导的细胞转化期间并没有发挥显著作用(图9)。与Ngn2介导的或Ascl1介导的AtN转化(Gascon等人,《细胞干细胞》,18:396-409(2016))相比,在NeuroD1介导的转化过程期间检测到更少的细胞凋亡,这可以表明不同的转录因子通过不同的信号传导和代谢途径起作用以进行细胞转化。

[0216] 实例2-NeuroD1使背侧脊髓星形胶质细胞转化为Tlx3+谷氨酸能神经元

[0217] 在证明脊髓中的星形胶质细胞到神经元转化之后,接下来研究了通过NeuroD1介导的转化产生哪些神经元亚型。脊髓的背角含有两个主要的神经元亚型:谷氨酸能神经元和GABA能神经元(Abraira和Ginty,《神经元(Neuron)》,79:618-639(2013))。在脊髓发育期间,两种转录因子Tlx3和Pax2似乎在确定背角的细胞命运特化中发挥作用(Cheng等人,《自然神经科学(Nature Neurosci.)》,8:1510-1515(2005);以及Huang等人,《发育生物学(Dev.Biol.)》,322:394-405(2008))。有趣的是,通过在8wpi下检查背角中的AAV NeuroD1-GFP感染的细胞,发现大部分经NeuroD1转化的神经元是Tlx3+($62.6 \pm 3.3\%$),这表明大部分谷氨酸能神经元亚型(图3A)。相比之下,在背角中仅有小百分比的经NeuroD1转化的神经元是Pax2+($8.8 \pm 1.3\%$),这表明少数GABA能神经元亚型(图3A)。因为AAV可能感染小比例的神经元(图2F,对照),所以进一步在6wpi下检查了背角中的逆转录病毒NeuroD1-GFP感染的细胞,并且发现,类似于AAV实验,逆转录病毒NeuroD1转化的神经元主要是Tlx3+(图3B)。作为对照,定量了未损伤的和未经处理的小鼠的脊髓背角中Tlx3+和Pax2+神经元的比例,并且发现Tlx3+和Pax2+细胞的天然比例分别为 $62.0 \pm 6.4\%$ 和 $14.2 \pm 2.0\%$ (图3C,左侧两个条形)。相比之下,经AAV NeuroD1转化的神经元中Tlx3+和Pax2+神经元的比例分别为 $62.6 \pm 3.3\%$ 和 $8.8 \pm 1.3\%$ (图3C,中间两个条形);并且在逆转录病毒中,经NeuroD1转化的神经元为 $50.3 \pm 17.0\%$ 的Tlx3+和 $16.4 \pm 4.3\%$ 的Pax2+(图3C,右侧两个条形)。这些结果表明,在脊髓的背角中的大部分经NeuroD1转换的神经元是Tlx3+神经元,其中小比例是Pax2+神经元。

[0218] 在使用AAV CaMKII-GFP来鉴定谷氨酸能神经元并且使用GAD-GFP转基因小鼠来鉴定GABA能神经元的NeuroD1转化之后进一步确认了神经元亚型。当将AAV GFAP::Cre和

Flex-NeuroD1-mCherry与AAV CaMKII::GFP (Dittgen等人,《美国国家科学院院刊》,101:18206-18211 (2004))一起共注射时,观察到 $89.5 \pm 5.2\%$ ($n=3$)的GFP+细胞共表达Tlx3+,从而证实这些Tlx3+神经元确实是谷氨酸能的(图3D)。许多NeuroD1-mCherry转化的神经元也与CaMKII-GFP共定位(图3D),这表明其是谷氨酸能神经元。当将AAV GFAP::Cre和Flex-NeuroD1-mCherry注射到GAD-GFP小鼠($n=3$)中时(其中GABA能神经元是用GFP遗传标记的),如所预期的,没有观察到与Tlx3+的GAD-GFP共表达。实际上,CaMKII和GAD标志物也与内源性Tlx3+和Pax2+神经元一致地共染色,这是在未损伤的、未经处理的小鼠的脊髓背角中观察到的(图10)。因此,脊髓背角中的大部分经NeuroD1转化的神经元是谷氨酸能神经元,这与在小鼠皮质中的发现一致(Chen等人,《生物预印本期刊》,2018年4月4日;doi:<http://dx.doi.org/10.1101/294967>)。

[0219] 实例3-经NeuroD1转化的神经元表达区域特异性神经元亚型标志物

[0220] 虽然经NeuroD1转化的神经元似乎主要是小鼠皮质和脊髓两者中的谷氨酸能神经元,但是进一步研究了所述神经元是否是同一类型的谷氨酸能神经元。出于此目的,将相同的AAV GFAP::Cre和AAV FLEX-NeuroD1-mCherry注射到小鼠M1运动皮质和脊髓中,并且然后使用皮质神经元标志物(FoxG1和Tbr1)和脊髓神经元标志物(Tlx3和Pax2)两者在4wpi下进行连续免疫染色(图4)。大部分经NeuroD1感染的细胞在4wpi下被转化为脑和脊髓两者中的神经元(图4A和4C)。引人注目地,当对由脑中的NeuroD1介导的转化与并排的脊髓转化产生的神经元亚型进行比较时,出现了不同的模式:小鼠皮质中的经转化神经元获得皮质神经元标志物,如FoxG1($66.1 \pm 14.3\%$)和Tbr1($17.1 \pm 1.9\%$),但未获得脊髓神经元标志物,如Tlx3(0%)或Pax2(0%) (图4A和4B)。相比之下,脊髓中的经转化神经元获得脊髓神经元标志物Tlx3($46.4 \pm 2.2\%$)和Pax2($4.2 \pm 0.3\%$),但未获得皮质神经元标志物FoxG1(0%)或Tbr1($0.6 \pm 0.5\%$) (图4C和4D)。在形态学上,脑中的经转化神经元类似于具有较大细胞体的皮质锥体神经元(图4A),而脊髓中的经转化神经元类似于具有较小细胞体的背角中间神经元(图4C)。皮质中经转化神经元中Tbr1+细胞的相对较低百分比表明,新转化的神经元在4wpi下可能不够成熟,并且可能花费更长的时间来完全获得其神经元身份。在脑对脊髓中通过同一转录因子转化后神经元身份的这些明显差异表明,胶质细胞谱系(此处是皮质谱系对脊髓谱系)以及局部环境可能对所得的经转化神经元亚型产生重要影响。

[0221] 实例4-经NeuroD1转化的神经元是生理学功能的

[0222] 为了测试经NeuroD1转化的神经元的功能和电路整合,在来自在8-10wpi下处死的小鼠的脊髓切片上进行了天然和经转化神经元的膜片钳电生理学记录(图5A)。经转化神经元可以产生重复性动作电位(图5B)并且显示出大的Na⁺和K⁺电流(图5C)。此外,从经NeuroD1转化的神经元中检测到强健的自发EPSC(图5D)。定量地,发现经NeuroD1转化的神经元显示出与其相邻的天然神经元类似水平的Na⁺电流(图5E)和自发EPSC(图5F)。用包含SV2和VGlu1/VGlu2的一系列突触标志物进行的免疫染色进一步证实,经NeuroD1转化的神经元被许多突触点包围,其中许多突触点直接支配神经元体细胞和树突(图5G和5H,青色和黄色点)。最后,在一些经NeuroD1转化的神经元中清晰地检测到cFos(一种通常在功能任务期间由神经元活性激活的立即早期基因),这表明所述神经元在局部脊髓回路中具有功能活性(图5I)。这些结果证明,NeuroD1可以将反应性星形胶质细胞重新编程为受损脊髓背角中的功能神经元。

[0223] 实例5-挫伤性SCI模型中的NeuroD1介导的细胞转化

[0224] 为了更接近临床情况,评估了挫伤性SCI模型中的NeuroD1介导的神经元转化。与穿刺损伤相比,挫伤性损伤(例如,使用活塞驱动的金属棒击打区域而产生的挫伤性损伤)会产生更严重的损伤环境,这可能影响神经元转化的效率和经转化神经元的存活。因此,在挫伤性SCI之后进行两个实验以测试AAV GFAP::Cre和Flex-NeuroD1-GFP系统:一个短延迟注射以测试治疗作为对急性损伤的应答(图6),并且一个长延迟注射以测试治疗作为对慢性损伤的应答(图7)。短延迟实验的优点是通过利用反应性星形胶质细胞的损伤后增殖使感染率最大化,而长延迟实验的优点是通过允许损伤诱导的神经炎症逐渐减少并使挫伤损伤的继发效应最小化而使转化后的神经元存活最大化。在短延迟实验中,在挫伤性损伤后10天进行病毒注射,并且在病毒感染后6周收集组织(图6A)。在离挫伤位点1mm处进行病毒注射,以避免损伤核心(图6B)。损伤核心在挫伤后是明显的,并且特征在于NeuN+神经元细胞体的丧失(图6C,标记为*)。挫伤后10天的病毒注射在对照GFP和NeuroD1-GFP组两者中均导致损伤核心周围有许多GFP+细胞(图6C),这表明挫伤性SCI模型中的AAV感染的细胞的感染率和存活良好。另一方面,AAV NeuroD1-GFP感染的细胞显示出与对照GFP组的显著的形态学差异(图6C)。如图6C的放大图像所示,对照组中的GFP感染的细胞显示出典型的星形胶质细胞形态和与GFAP信号的共定位(染色为品红色),但很少显示出与神经元标志物NeuN的任何共定位(染色为红色)。相比之下,NeuroD1-GFP感染的细胞通常与NeuN共定位,但很少与GFAP共定位(图6C),这表明成功的神经元转化。定量地,将经转化神经元的总数计数为围绕病变核心区域的约2,600个细胞(图6D)。如通过NeuN免疫反应性所测量的,在短延迟实验中,NeuroD1介导的神经元转化的效率为约55%(图6E),而其余细胞大部分是GFAP+(图6F)。相比之下,GFP感染的细胞大部分是GFAP+星形胶质细胞并且很少是NeuN+神经元(在GFP组中只有3.9%NeuN+) (图6E和6F)。

[0225] 在长延迟实验中,在挫伤性损伤后4个月进行病毒注射,此时在挫伤后胶质瘢痕已经很好地形成,并且在病毒感染后10周收集组织(图7A)。图7B展示了用GFP、NeuN和GFAP进行免疫染色的脊髓的总体形态。如在短延迟实验中,病变核心(标记为*)也缺乏NeuN+神经元。在单独的对照AAV GFP组中,病毒感染的细胞主要是S100b+星形胶质细胞(图7C),但很少显示任何NeuN+信号(图7D,顶行)。相比之下,大部分NeuroD1-GFP感染的细胞被转化为NeuN+神经元(图7D,底行;在图7E中定量)。NeuroD1介导的转化效率达到>95%,这是非常高的效率(图7E)。免疫染色证实了NeuroD1-GFP感染的细胞中的NeuroD1过表达(图7F)。此外,10wpi下的经NeuroD1转化的神经元被许多突触点(SV2)包围,其中所述突触点中的一些突触点直接支配体细胞和树突(图7G,黄色点)。还鉴定了经NeuroD1转化的神经元中的c-Fos+细胞(图7H),这表明其能够整合到局部脊髓功能电路系统中。最后,在10wpi下挫伤性SCI模型中的一些经NeuroD1转化的神经元通过在背角中表达Tlx3显示谷氨酸能亚型(图7I),这与穿刺损伤模型一致。总之,这些结果表明,NeuroD1过表达可以在急性和慢性治疗条件下在挫伤性SCI之后将反应性星形胶质细胞重新编程为功能神经元,在胶质瘢痕形成之后实现更高的转化效率。这种临床相关模型可以用于未来研究中,以使用体内细胞转化技术在SCI之后进一步测试功能改善。

[0226] 实例6-星形胶质细胞到神经元转化

[0227] 将驱动Mir124、NeuroD1、Isl1、Lhx3、Ngn2或其组合的表达的核酸引入到小鼠腹角

中并且发现将星形胶质细胞转化成神经元,其中一些经转化神经元通过对ChAT(一种典型的运动神经元标志物)呈阳性的免疫染色而显示运动神经元性质(图11-16)。

[0228] 实例7-NeuroD1和Dlx2介导的细胞转化

[0229] 进行以下研究是否通过将NeuroD1与其它转录因子组合而增加GABA能神经元的比例。将1:1比率的AAV5 FLEX-NeuroD1-mCherry和AAV5 FLEX-Dlx2-mCherry与AAV5-GFAP-Cre组合(图26;n=3)用于注射。首先,在病毒感染之后,用免疫染色确认NeuroD1和Dlx2的共表达(图26A)。免疫染色实验证明,许多NeuroD1+Dlx2转化的神经元是Tlx3⁺或Pax2⁺神经元(图26B)。定量分析揭示,32.5±2.1%的NeuroD1+Dlx2转化的神经元是Pax2⁺神经元(图26C),与单独的NeuroD1产生的神经元相比增加了5倍(6.3%;p=0.05,Kruskal-Wallis H测试)。由NeuroD1+Dlx2产生的Tlx3⁺神经元的百分比为56.2±3.4%(图26C)。在GAD-GFP小鼠中进一步证实NeuroD1+Dlx2转化的神经元的GABA能身份,其中NeuroD1+Dlx2转化的神经元对于Pax2和GAD-GFP两者都是阳性的(图26D;n=3;4wpi)。这些结果表明,可以通过NeuroD1和Dlx2转录因子的组合来确定脊髓背角中的新转化的Tlx3⁺对Pax2⁺神经元的比率。

[0230] 实例8-治疗ALS

[0231] ALS的小鼠模型(SOD1*G93A)用于使用体内星形胶质细胞到神经元转化技术研究基因疗法治疗,以再生脊髓中的运动神经元并恢复ALS小鼠的运动功能。

[0232] 将AAV9-GFAP-Cre+AAV9-Flex-mCherry用于感染星形胶质细胞作为对照实验。采用AAV9-GFAP-Cre+AAV9-Flex-NeuroD1-mCherry或AAV9-GFAP-Cre+AAV9-Flex-NeuroD1-GFP+AAV9-Flex-Isl1-mCherry或AAV9-GFAP-Cre+AAV9-Flex-NeuroD1-GFP+AAV9-Flex-Lhx3-mCherry通过脊髓内注射或鞘内注射将星形胶质细胞转化为脊髓中的神经元。

[0233] 将表达NeuroD1或NeuroD1+Isl1或NeuroD1+Lhx3的AAV9注射到脊髓腹角中,在ALS小鼠中全部产生ChAT+运动神经元,但仅对照mCherry AAV感染的细胞仍然是星形胶质细胞(图27-29)。

[0234] 用表达NeuroD1+Isl1的AAV9进行的治疗也减少了神经炎症,显示为Iba1和CD11b信号减少(图30)。

[0235] 此外,用表达NeuroD1+Isl1的AAV9进行的治疗也部分地挽救了ALS小鼠的体重、腿部伸展能力、悬线持续时间以及旷场移动性。猫步测试进一步发现,用表达NeuroD1+Isl1的AAV9进行的治疗增加了ALS小鼠的后腿的爪印迹区域(图31-33)。还参见图17-25。这些结果证明,在颈脊髓中出现更多的运动神经元。在对照组和NeuroD1-Isl1-Lhx3(DIL)组两者中,腰部脊髓中的运动神经元发生严重退化。Iba1信号揭示对照组中有更多的小胶质细胞,并且CD31和Ly6C染色揭示血管中没有巨大差异。巨噬细胞标志物CD11b还用包含NeuroD1+Isl1和NeuroD1+Lhx3的因子的组合进行检查。在这些组合中,与NeuroD1+Lhx3组或GFP对照组相比,NeuroD1+Isl1导致CD11b信号减少更多。

[0236] 总之,这些结果证实,基因疗法治疗可以显著地将星形胶质细胞转化为神经元,并且再生的运动神经元可以改善ALS小鼠的运动功能。还参见图17-25。

[0237] 动物使用

[0238] 在此实例中,将B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)d11Gur/J小鼠(杰克逊实验室)与C57BL/6J雌性(杰克逊实验室)交配以获得纯背景上的小鼠。断奶后通过针对人SOD1的PCR对小鼠进行基因分型(P21-27),并且将无突变的同窝仔用作正常小鼠。将小鼠关在12小时光/暗循环

中,并且供应充足的食物和水。

[0239] 椎板切除术、损伤和立体定向病毒注射

[0240] 通过腹膜内注射氯胺酮/甲苯噻嗪 (80-120mg/kg氯胺酮;10-16mg/kg甲苯噻嗪)麻醉SOD1G93A小鼠,随后在背部上进行毛皮修剪,并且放置到立体定向设置中。出于保护目的,施涂人工眼软膏以覆盖眼睛。然后在T11-L1椎骨处进行椎板切除术以暴露脊髓。将1.0μL的AAV9-GFAP-Cre+AAV9-Flex-NeuroD1-mCherry或AAV9-GFAP-Cre+AAV9-Flex-mCherry通过具有34号注射针的50μL Hamilton注射器以0.05微升/分钟的速率注射到脊髓的腹角中(在中心动脉的侧面0.45mm,深度为0.9mm)。注射后,将针保持在适当位置三分钟以防止抽出病毒并且然后缓慢取出。然后用抗生素软膏处理外科手术区域。将小鼠保持在加热垫上,并且在外科手术当天通过皮下注射 (5mg/kg) 以及在外科手术后三天通过饮用水 (10mg/kg) 用卡洛芬治疗以便实现疼痛缓解,并且密切监测一周以确保完全恢复健康。

[0241] 鞘内注射

[0242] 对于鞘内注射,使用异氟烷麻醉9周龄小鼠。使用具有31号注射针的25μL Hamilton注射器将十微升的AAV-PHP.eB-GFAP-Cre+AAV-PHP.eB-Flex-TFs-GFP/mCherry或+AAV-PHP.eB-Flex-GFP/mCherry注射到小鼠腰部蛛网膜下隙中。简而言之,用3%异氟烷麻醉小鼠,并且在动物后端靠近尾部刮削2*2cm²的毛皮,以在针插入期间促进面糊可视化。在俯卧位的手术期间,将小鼠放置在鼻锥中进行连续的异氟烷施用,并且将异氟烷减少到1.5%。出于保护目的,施涂人工眼软膏以覆盖眼睛。将针小心地插入在L5与L6椎骨的凹槽之间,并且观察小鼠甩尾作为成功进入腰池的迹象。一旦观察到甩尾,注射器稳定并且注射缓慢进行。这种注射每24小时重复两次,以达到病毒的最佳量(每只小鼠总共2×10¹⁰个基因组拷贝病毒)。所有注射均是用定时器完成的,以达到恒定的注射速度,在2分钟内注射10mL。在1分钟后去除注射器以使CSF和载体泄漏最小化。将小鼠维持在同一位置,持续另外5分钟。手术后,动物被关在笼子里,可自由获取食物和水,直到终点。

[0243] 体重

[0244] 从第70天到第126天,每8天记录每只小鼠的体重,持续8周。

[0245] 动物行为

[0246] 旷场测试

[0247] 在明亮照亮的房间中,在不透明的、开放的丙烯酸盒(40×40×40cm)中进行旷场测试。在测试之前,在测试室中使小鼠习惯于测试环境1小时。将每只个体小鼠随机放置在具有红光的暗室中的盒的一个角处。摄像机记录了小鼠的水平移动,持续10分钟。通过Noldus EthoVision XT软件测量行进的总距离和移动的持续时间。在每个试验之间,用70%乙醇清洁旷场设备。

[0248] 猫步测试

[0249] 在测试之前,使小鼠在测试室习惯化1小时。猫步是在Noldus CatWalk XT系统中进行的。将每只个体小鼠放置在走道的入口处,用直线来引导移动。小鼠在走道上自由地行进。以恒定速度行进的小鼠作为成功的踪迹。用照明足迹技术记录三个踪迹。通过猫步XT软件测量爪印迹面积、摆动速度和步进循环。在每个踪迹之间,用70%乙醇清洁猫步设备。

[0250] 线悬挂测试

[0251] 为了测试肌肉强度,进行线悬挂测试。将每只个体小鼠放置在有线网格上。直到小

鼠停止移动,网格才被轻轻地翻转。测量小鼠落在软表面上的时间。

[0252] 腿部拉伸测试

[0253] 在终点(22周),通过尾部将每只小鼠从杠杆上悬挂约30秒。摄像机记录了腿部的移动。测量腿部伸展频率、移动的距离和持续时间。

[0254] 实例9-另外的实施例

[0255] 实施例1.一种用于治疗患有脊髓损伤(SCI)的哺乳动物的方法,其中所述方法包括向所述哺乳动物施用包括编码神经元分化1(NeuroD1)多肽或其生物活性片段的外源性核酸的组合物。

[0256] 实施例2.根据实施例1所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

[0257] 实施例3.根据实施例1所述的方法,其中所述脊髓损伤是由于选自以下组成的组的病状引起的:缺血性中风;出血性中风;身体损伤;脑震荡;挫伤;爆发;渗透;肿瘤;炎症;感染;创伤性脊柱损伤;缺血性或出血性脊髓病(脊髓梗塞);由心脏骤停或严重低血压(休克)引起的全局缺血;由缺氧、低血糖或贫血引起的缺氧-缺血性脑病;由感染性心内膜炎或心房粘液瘤引起的CNS栓塞;纤维软骨栓塞性脊髓病;由儿科白血病引起的CNS血栓形成;如由肾病综合征(肾脏疾病)、慢性炎症性疾病、妊娠、使用基于雌激素的避孕药、脑膜炎、脱水引起的脑静脉窦血栓形成;或其任何两个或更多个的组合。

[0258] 实施例4.根据实施例1所述的方法,其中所述施用步骤包括向脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。

[0259] 实施例5.根据实施例1所述的方法,其中所述施用步骤包括向脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。

[0260] 实施例6.根据实施例1所述的方法,其中所述施用步骤包括向脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。

[0261] 实施例7.根据实施例6所述的方法,其中所述腺相关病毒是AAV.PHP.eB。

[0262] 实施例8.根据实施例1到7中任一项所述的方法,其中所述施用步骤包括施用包括编码NeuroD1多肽的核酸序列的重组表达载体,其中所述编码NeuroD1多肽的核酸序列包括选自以下组成的组的核酸序列:编码SEQ ID NO:2或其功能片段的核酸序列;编码SEQ ID NO:4或其功能片段的核酸序列;SEQ ID NO:1或其功能片段;SEQ ID NO:3或其功能片段;以及编码与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4或其功能片段具有70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的蛋白质的核酸序列。

[0263] 实施例9.根据实施例1到8中任一项所述的方法,其中所述施用步骤包括向脊髓立体定向注射。

[0264] 实施例10.根据实施例1到8中任一项所述的方法,其中所述施用步骤包括静脉内注射或静脉内输注。

[0265] 实施例11.一种治疗患有脊髓损伤的哺乳动物的方法,其中所述方法包括向所述哺乳动物的脊髓施用包括含有腺相关病毒颗粒的药理学上可接受的载体的药物组合物,所述腺相关病毒颗粒包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸。

[0266] 实施例12.根据实施例11所述的方法,其中所述药物组合物包括约1 μ L到约500 μ L的药理学上可接受的载体,所述药理学上可接受的载体含有浓度为 10^{10} - 10^{14} 个腺相关病毒颗

粒/毫升的包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的载体的腺相关病毒。

[0267] 实施例13.根据实施例11或12所述的方法,其中将所述药物组合物以约0.1微升/分钟到约5微升/分钟的受控流速注射到所述哺乳动物的脊髓中。

[0268] 实施例14.一种用于治疗患有脊髓损伤的哺乳动物的方法,其中所述方法包括向所述哺乳动物的脊髓施用包括以下的组合物:编码mir124的外源性核酸、编码ISL LIM同源盒1 (Isl1) 多肽或其生物活性片段的外源性核酸以及编码LIM同源盒3 (Lhx3) 多肽或其生物活性片段的外源性核酸。

[0269] 实施例15.根据实施例14所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

[0270] 实施例16.根据实施例14所述的方法,其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的脊髓递送(i) 包括编码mir124的核酸的表达载体;(ii) 包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体以及(iii) 包括编码多肽或其生物活性片段Lhx3的核酸的表达载体。

[0271] 实施例17.根据实施例14所述的方法,其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的脊髓递送(i) 包括编码mir124的核酸的重组病毒表达载体;(ii) 包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体以及(iii) 包括编码Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。

[0272] 实施例18.根据实施例14所述的方法,其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的脊髓递送(i) 包括编码mir124的核酸的重组腺相关病毒表达载体;(ii) 包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体以及(iii) 包括编码Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。

[0273] 实施例19.根据实施例14所述的方法,其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的脊髓递送包括编码mir124、Isl1多肽或其生物活性片段以及Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。

[0274] 实施例20.根据实施例14所述的方法,其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的脊髓递送包括编码mir124、Isl1多肽或其生物活性片段以及Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。

[0275] 实施例21.根据实施例14所述的方法,其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的脊髓递送包括编码mir124、Isl1多肽或其生物活性片段以及Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。

[0276] 实施例22.根据实施例14所述的方法,其中所述施用步骤进一步包括向所述哺乳动物的脊髓施用治疗有效剂量的编码神经元素2 (Ngn2) 多肽或其生物活性片段、mir218的外源性核酸以及编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸与mir124、Isl1多肽或其生物活性片段、或Lhx3多肽或其生物活性片段的任何组合的组合中的一种或多种。

[0277] 实施例23.根据实施例18或21所述的方法,其中所述腺相关病毒是AAV.PHP.eB。

[0278] 实施例24.一种用于治疗患有肌萎缩性侧索硬化症(ALS)的哺乳动物的方法,其中所述方法包括向所述哺乳动物的中枢神经系统施用包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸的组合物。

[0279] 实施例25.根据实施例24所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

[0280] 实施例26.根据实施例24所述的方法,其中所述施用步骤包括向脑递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。

[0281] 实施例27.根据实施例24所述的方法,其中所述施用步骤包括向脑递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。

[0282] 实施例28.根据实施例24所述的方法,其中所述施用步骤包括向脑递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。

[0283] 实施例29.根据实施例28所述的方法,其中所述腺相关病毒是AAV.PHP.eB。

[0284] 实施例30.根据实施例24到29中任一项所述的方法,其中所述施用步骤包括施用包括编码NeuroD1蛋白的核酸序列的重组表达载体,其中所述编码NeuroD1蛋白的核酸序列包括选自由以下组成的组的核酸序列:编码SEQ ID NO:2或其功能片段的核酸序列;编码SEQ ID NO:4或其功能片段的核酸序列;SEQ ID NO:1或其功能片段;SEQ ID NO:3或其功能片段;以及编码与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4或其功能片段具有70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的蛋白质的核酸序列。

[0285] 实施例31.根据实施例24到30中任一项所述的方法,其中所述施用步骤包括立体定向颅内注射。

[0286] 实施例32.根据实施例31所述的方法,其中所述施用步骤包括两次或更多次立体定向颅内注射。

[0287] 实施例33.根据实施例24到30中任一项所述的方法,其中所述施用步骤包括眶后注射。

[0288] 实施例34.一种治疗患有ALS的哺乳动物的方法,其中所述方法包括向所述哺乳动物的中枢神经系统施用包括含有腺相关病毒颗粒的药理学上可接受的载体的药物组合物,所述腺相关病毒颗粒包括编码NeuroD1的核酸。

[0289] 实施例35.根据实施例34所述的方法,其中所述药物组合物包括约1 μ L到约500 μ L的药理学上可接受的载体,所述药理学上可接受的载体含有浓度为 10^{10} - 10^{14} 个腺相关病毒颗粒/毫升的包括编码NeuroD1多肽的核酸的载体的腺相关病毒。

[0290] 实施例36.根据实施例34或35所述的方法,其中将所述药物组合物以约0.1微升/分钟到约5微升/分钟的受控流速注射到所述哺乳动物的中枢神经系统中。

[0291] 实施例37.一种用于治疗患有肌萎缩性侧索硬化症(ALS)的哺乳动物的方法,其中所述方法包括向所述哺乳动物的中枢神经系统施用包括以下的组合物:编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸、编码Isl1多肽或其生物活性片段的外源性核酸以及编码Lhx3多肽或其生物活性片段的外源性核酸。

[0292] 实施例38.根据实施例37所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

[0293] 实施例39.根据实施例37所述的方法,其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的中枢神经系统递送(i)包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体;(ii)包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体以及(iii)包括编码Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。

[0294] 实施例40.根据实施例37所述的方法,其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的中枢神经系统递送(i)包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体;(ii)包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体以及(iii)包括

编码Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。

[0295] 实施例41. 根据实施例37所述的方法, 其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的中枢神经系统递送 (i) 包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体; (ii) 包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体以及 (iii) 包括编码Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。

[0296] 实施例42. 根据实施例37所述的方法, 其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的中枢神经系统递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段、Isl1多肽或其生物活性片段以及Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。

[0297] 实施例43. 根据实施例37所述的方法, 其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的中枢神经系统递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段、Isl1多肽或其生物活性片段以及Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。

[0298] 实施例44. 根据实施例37所述的方法, 其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的中枢神经系统递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段、Isl1多肽或其生物活性片段以及Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。

[0299] 实施例45. 根据实施例37所述的方法, 其中所述施用步骤进一步包括向所述哺乳动物的中枢神经系统施用治疗有效剂量的编码Ngn2、mir218和mir124的外源性核酸与NeuroD1多肽或其生物活性片段、Isl1多肽或其生物活性片段以及Lhx3多肽或其生物活性片段的任何组合的组合中的一种或多种。

[0300] 实施例46. 根据实施例41或实施例44所述的方法, 其中所述腺相关病毒是AAV.PHP.eB。

[0301] 实施例47. 一种用于在患有SCI并且需要 (1) 再生脊髓背侧神经元; (2) 产生新的谷氨酸能神经元; 或 (3) 增加在脊髓中的循环的哺乳动物体内进行所述 (1)、(2) 或 (3) 的方法, 其中所述方法包括向所述哺乳动物施用包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸的组合物, 其中 (a) 所述脊髓神经元得以再生; (b) 新的谷氨酸能神经元得以产生; 或 (c) 脊髓循环得以增加。

[0302] 实施例48. 根据实施例47所述的方法, 其中所述哺乳动物是人。

[0303] 实施例49. 根据实施例47所述的方法, 其中所述施用步骤包括向脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。

[0304] 实施例50. 根据实施例47所述的方法, 其中所述施用步骤包括向脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。

[0305] 实施例51. 根据实施例47所述的方法, 其中所述施用步骤包括向脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。

[0306] 实施例52. 根据实施例51所述的方法, 其中所述腺相关病毒是AAV.PHP.eB。

[0307] 实施例53. 根据实施例47到52中任一项所述的方法, 其中所述施用步骤包括施用包括编码NeuroD1多肽的核酸序列的重组表达载体, 其中所述编码NeuroD1多肽的核酸序列包括选自由以下组成的组的核酸序列: 编码SEQ ID NO:2或其功能片段的核酸序列; 编码SEQ ID NO:4或其功能片段的核酸序列; SEQ ID NO:1或其功能片段; SEQ ID NO:3或其功能片段; 以及编码与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4或其功能片段具有70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的蛋白质的核酸序列。

[0308] 实施例54.根据实施例47到53中任一项所述的方法,其中所述施用步骤包括向脊髓立体定向注射。

[0309] 实施例55.根据实施例47到54中任一项所述的方法,其中所述施用步骤包括静脉内注射或静脉内输注。

[0310] 实施例56.一种用于在患有ALS疾病并且需要(1)产生运动神经元;(2)减少小胶质细胞的数量;或(3)减少反应性星形胶质细胞的数量数的哺乳动物体内进行所述(1)、(2)或(3)的方法,其中所述方法包括向所述哺乳动物施用包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸的组合物,其中(a)所述运动神经元得以产生;(b)小胶质细胞的数量得以减少;或(c)反应性星形胶质细胞的数量得以减少。

[0311] 实施例57.根据实施例56所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

[0312] 实施例58.根据实施例56所述的方法,其中所述施用步骤包括向脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。

[0313] 实施例59.根据实施例56所述的方法,其中所述施用步骤包括向脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。

[0314] 实施例60.根据实施例56所述的方法,其中所述施用步骤包括向脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。

[0315] 实施例61.根据实施例60所述的方法,其中所述腺相关病毒是AAV.PHP.eB。

[0316] 实施例62.根据实施例56到61中任一项所述的方法,其中所述施用步骤包括施用包括编码NeuroD1多肽的核酸序列的重组表达载体,其中所述编码NeuroD1多肽的核酸序列包括选自由以下组成的组的核酸序列:编码SEQ ID NO:2或其功能片段的核酸序列;编码SEQ ID NO:4或其功能片段的核酸序列;SEQ ID NO:1或其功能片段;SEQ ID NO:3或其功能片段;以及编码与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4或其功能片段具有70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的蛋白质的核酸序列。

[0317] 实施例63.根据实施例56到62中任一项所述的方法,其中所述施用步骤包括向脊髓立体定向注射。

[0318] 实施例64.根据实施例56到63中任一项所述的方法,其中所述施用步骤包括静脉内注射或静脉内输注。

[0319] 实施例65.一种用于在患有SCI并且需要(1)再生脊髓背侧神经元;(2)产生新的谷氨酸能神经元;或(3)增加在脊髓中的循环的哺乳动物体内进行所述(1)、(2)或(3)的方法,其中所述方法包括向所述哺乳动物施用包括以下的组合物:编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸、编码Isl1多肽或其生物活性片段的外源性核酸或编码Lhx3多肽或其生物活性片段的外源性核酸,其中(a)所述脊髓神经元得以再生;(b)新的谷氨酸能神经元得以产生;或(c)脊髓循环得以增加。

[0320] 实施例66.根据实施例65所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

[0321] 实施例67.根据实施例66所述的方法,其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的

中枢神经系统递送 (i) 包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体; (ii) 包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体或 (iii) 包括编码Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。

[0322] 实施例68. 根据实施例66所述的方法, 其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的中枢神经系统递送 (i) 包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体; (ii) 包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体或 (iii) 包括编码Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。

[0323] 实施例69. 根据实施例66所述的方法, 其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的中枢神经系统递送 (i) 包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体; (ii) 包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体或 (iii) 包括编码Lhx3多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。

[0324] 实施例70. 根据实施例69所述的方法, 其中所述腺相关病毒是AAV.PHP.eB。

[0325] 实施例71. 根据实施例65到70中任一项所述的方法, 其中所述施用步骤包括向脊髓立体定向注射。

[0326] 实施例72. 根据实施例65到71中任一项所述的方法, 其中所述施用步骤包括静脉内注射或静脉内输注。

[0327] 实施例73. 一种用于治疗患有脊髓损伤的哺乳动物的方法, 其中所述方法包括向所述哺乳动物的脊髓施用包括以下的组合物: (a) 编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸以及 (b) 编码远端缺失同源盒2 (Dlx2) 多肽或其生物活性片段的外源性核酸。

[0328] 实施例74. 根据实施例73所述的方法, 其中所述哺乳动物是人。

[0329] 实施例75. 根据实施例73所述的方法, 其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的脊髓递送 (i) 包括核酸NeuroD1多肽的表达载体以及 (ii) 包括编码Dlx2多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。

[0330] 实施例76. 根据实施例73所述的方法, 其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的脊髓递送 (i) 包括编码NeuroD1多肽的核酸的重组病毒表达载体以及 (ii) 包括编码Dlx2多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。

[0331] 实施例77. 根据实施例73所述的方法, 其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的脊髓递送 (i) 包括编码NeuroD1多肽的核酸的重组腺相关病毒表达载体以及 (ii) 包括编码Dlx2多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。

[0332] 实施例78. 根据实施例73所述的方法, 其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段以及Dlx2多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。

[0333] 实施例79. 根据实施例73所述的方法, 其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段以及Dlx2多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。

[0334] 实施例80. 根据实施例73所述的方法, 其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段以及Dlx2多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。

[0335] 实施例81. 根据实施例77或80所述的方法, 其中所述腺相关病毒是AAV.PHP.eB。

[0336] 实施例82. 根据实施例73到81中任一项所述的方法, 其中所述施用步骤包括施用包括编码NeuroD1多肽的核酸序列的重组表达载体, 其中所述编码NeuroD1多肽的核酸序列包括选自由以下组成的组的核酸序列: 编码SEQ ID NO:2或其功能片段的核酸序列; 编码SEQ ID NO:4或其功能片段的核酸序列; SEQ ID NO:1或其功能片段; SEQ ID NO:3或其功能片段; 以及编码与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4或其功能片段具有70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的蛋白质的核酸序列。

[0337] 实施例83. 根据实施例73到82中任一项所述的方法, 其中所述施用步骤包括施用包括编码D1x2多肽的核酸序列的重组表达载体, 其中所述编码D1x2多肽的核酸序列包括选自由以下组成的组的核酸序列: 编码SEQ ID NO:11或其功能片段的核酸序列; 编码SEQ ID NO:13或其功能片段的核酸序列; SEQ ID NO:10或其功能片段; SEQ ID NO:12或其功能片段; 以及编码与SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:13或其功能片段具有70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的蛋白质的核酸序列。

[0338] 实施例84. 一种用于在患有SCI并且需要(1)再生脊髓背侧神经元; (2)产生新神经元; 或(3)增加在脊髓中的循环的哺乳动物体内进行所述(1)、(2)或(3)的方法, 其中所述方法包括施用包括以下的组合物: (i) 编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸; 以及(ii) 编码D1x2多肽或其生物活性片段的外源性核酸, 其中(a)所述脊髓神经元得以再生; (b)新神经元得以产生; 或(c)脊髓循环得以增加。

[0339] 实施例85. 根据实施例84所述的方法, 其中所述哺乳动物是人。

[0340] 实施例86. 根据实施例84所述的方法, 其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的中枢神经系统递送(i)包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体以及(ii)包括编码D1x2多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。

[0341] 实施例87. 根据实施例84所述的方法, 其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的中枢神经系统递送(i)包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体以及(ii)包括编码D1x2多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。

[0342] 实施例88. 根据实施例84所述的方法, 其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的中枢神经系统递送(i)包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体以及(ii)包括编码D1x2多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。

[0343] 实施例89. 根据实施例84所述的方法, 其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段以及D1x2多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。

[0344] 实施例90. 根据实施例84所述的方法, 其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段以及D1x2多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。

[0345] 实施例91. 根据实施例84所述的方法, 其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的

脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段以及Dlx2多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。

[0346] 实施例92.根据实施例88或91所述的方法,其中所述腺相关病毒是AAV.PHP.eB。

[0347] 实施例93.根据实施例73到92中任一项所述的方法,其中所述施用步骤包括向脊髓立体定向注射。

[0348] 实施例94.根据实施例73到93中任一项所述的方法,其中所述施用步骤包括静脉内注射或静脉内输注。

[0349] 实施例95.根据实施例84所述的方法,其中所述新神经元选自由谷氨酸能神经元和GABA能神经元组成的组。

[0350] 实施例96.根据实施例95所述的方法,其中所述新神经元是谷氨酸能神经元。

[0351] 实施例97.根据实施例95所述的方法,其中所述新神经元是GABA能神经元。

[0352] 实施例98.根据实施例77或80所述的方法,其中所述腺相关病毒是AAV血清型5。

[0353] 实施例99.根据实施例88或91所述的方法,其中所述腺相关病毒是AAV血清型5。

[0354] 实施例100.一种用于治疗患有ALS的哺乳动物的方法,其中所述方法包括向所述哺乳动物施用包括以下的组合物:(a) 编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸以及(b) 编码Isl1多肽或其生物活性片段的外源性核酸。

[0355] 实施例101.根据实施例100所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

[0356] 实施例102.根据实施例100所述的方法,其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物递送(i) 包括核酸NeuroD1多肽的表达载体以及(ii) 包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。

[0357] 实施例103.根据实施例100所述的方法,其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物递送(i) 包括编码NeuroD1多肽的核酸的重组病毒表达载体以及(ii) 包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。

[0358] 实施例104.根据实施例100所述的方法,其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的脊髓递送(i) 包括编码NeuroD1多肽的核酸的重组腺相关病毒表达载体以及(ii) 包括编码Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。

[0359] 实施例105.根据实施例100所述的方法,其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段以及Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。

[0360] 实施例106.根据实施例100所述的方法,其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段以及Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。

[0361] 实施例107.根据实施例100所述的方法,其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段以及Isl1多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。

[0362] 实施例108.根据实施例104或107所述的方法,其中所述腺相关病毒是AAV.PHP.eB。

[0363] 实施例109.根据实施例100到108中任一项所述的方法,其中所述施用步骤包括施用包括编码NeuroD1多肽的核酸序列的重组表达载体,其中所述编码NeuroD1多肽的核酸序

列包括选自由以下组成的组的核酸序列:编码SEQ ID NO:2或其功能片段的核酸序列;编码SEQ ID NO:4或其功能片段的核酸序列;SEQ ID NO:1或其功能片段;SEQ ID NO:3或其功能片段;以及编码与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4或其功能片段具有70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的蛋白质的核酸序列。

[0364] 实施例110.根据实施例100到109中任一项所述的方法,其中所述施用步骤包括施用包括编码Is11多肽的核酸序列的重组表达载体,其中所述编码Is11多肽的核酸序列包括选自由以下组成的组的核酸序列:编码SEQ ID NO:15或其功能片段的核酸序列;编码SEQ ID NO:17或其功能片段的核酸序列;SEQ ID NO:14或其功能片段;SEQ ID NO:16或其功能片段;以及编码与SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:17或其功能片段具有70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的蛋白质的核酸序列。

[0365] 实施例111.一种用于治疗患有脊髓损伤的哺乳动物的方法,其中所述方法包括向所述哺乳动物的脊髓施用包括以下的组合物:(a) 编码NeuroD1多肽或其生物活性片段的外源性核酸以及(b) 编码Is11多肽或其生物活性片段的外源性核酸。

[0366] 实施例112.根据实施例111所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

[0367] 实施例113.根据实施例111所述的方法,其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的脊髓递送(i) 包括核酸NeuroD1多肽的表达载体以及(ii) 包括编码Is11多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。

[0368] 实施例114.根据实施例111所述的方法,其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的脊髓递送(i) 包括编码NeuroD1多肽的核酸的重组病毒表达载体以及(ii) 包括编码Is11多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。

[0369] 实施例115.根据实施例111所述的方法,其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的脊髓递送(i) 包括编码NeuroD1多肽的核酸的重组腺相关病毒表达载体以及(ii) 包括编码Is11多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。

[0370] 实施例116.根据实施例111所述的方法,其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段以及Is11多肽或其生物活性片段的核酸的表达载体。

[0371] 实施例117.根据实施例111所述的方法,其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段以及Is11多肽或其生物活性片段的核酸的重组病毒表达载体。

[0372] 实施例118.根据实施例111所述的方法,其中所述施用步骤包括向所述哺乳动物的脊髓递送包括编码NeuroD1多肽或其生物活性片段以及Is11多肽或其生物活性片段的核酸的重组腺相关病毒表达载体。

[0373] 实施例119.根据实施例115或118所述的方法,其中所述腺相关病毒是AAV.PHP.eB。

[0374] 实施例120.根据实施例111到119中任一项所述的方法,其中所述施用步骤包括施

用包括编码NeuroD1多肽的核酸序列的重组表达载体,其中所述编码NeuroD1多肽的核酸序列包括选自自由以下组成的组的核酸序列:编码SEQ ID NO:2或其功能片段的核酸序列;编码SEQ ID NO:4或其功能片段的核酸序列;SEQ ID NO:1或其功能片段;SEQ ID NO:3或其功能片段;以及编码与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4或其功能片段具有70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的蛋白质的核酸序列。

[0375] 实施例121.根据实施例111到120中任一项所述的方法,其中所述施用步骤包括施用包括编码Is11多肽的核酸序列的重组表达载体,其中所述编码Is11多肽的核酸序列包括选自自由以下组成的组的核酸序列:编码SEQ ID NO:15或其功能片段的核酸序列;编码SEQ ID NO:17或其功能片段的核酸序列;SEQ ID NO:14或其功能片段;SEQ ID NO:16或其功能片段;以及编码与SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:17或其功能片段具有70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的蛋白质的核酸序列。

[0376] 序列

[0377] SEQ ID NO:1-编码人NeuroD1蛋白的人NeuroD1核酸序列-1071个核苷酸,包含终止密码子

[0378] ATGACCAAATCGTACAGCGAGAGTGGGCTGATGGGCGAGCCTCAGCCCCAAGGTCTCCAAGCTGGACA
GACGAGTGTCTCAGTTCTCAGGACGAGGAGCACGAGGCAGACAAGAAGGAGGACGACCTCGAAGCCATGAACGCAGA
GGAGGACTCACTGAGGAACGGGGGAGAGGAGGAGGACGAAGATGAGGACCTGGAAGAGGAGGAAGAAGAGGAAGAGG
AGGATGACGATCAAAAGCCCAAGAGACGCGGCCCAAAAAGAAGAAGATGACTAAGGCTCGCCTGGAGCGTTTTAAA
TTGAGACGCATGAAGGCTAACGCCCCGGGAGCGGAACCGCATGCACGGACTGAACGCGGCGCTAGACAACCTGCGCAA
GGTGGTGCCTTGCTATTCTAAGACGCAGAAGCTGTCCAAAATCGAGACTCTGCGCTTGCCAAGAAGTACATCTGGG
CTCTGTGCGAGATCCTGCGCTCAGGCAAAAGCCAGACCTGGTCTCCTTCGTTTCAGACGCTTTGCAAGGGCTTATCC
CAACCCACCACCAACCTGGTTGCGGGCTGCCTGCAACTCAATCCTCGGACTTTTCTGCCTGAGCAGAACCAGGACAT
GCCCCCCCACCTGCCGACGCGCCAGCGCTTCCTTCCCTGTACACCCCTACTCCTACCAGTCGCCTGGGCTGCCAGTC
CGCCTTACGGTACCATGGACAGCTCCCATGTCTTCCACGTTAAGCCTCCGCCGCACGCCTACAGCGCAGCGCTGGAG
CCCTTCTTTGAAAGCCCTCTGACTGATTGCACCAGCCCTTCCTTTGATGGACCCCTCAGCCCGCCGCTCAGCATCAA
TGGCAACTTCTCTTTCAAACACGAACCGTCCGCCGAGTTTGAGAAAAATTATGCCTTTACCATGCACTATCCTGCAG
CGACACTGGCAGGGGGCCAAAGCCACGGATCAATCTTCTCAGGCACCGCTGCCCCTCGCTGCGAGATCCCCATAGAC
AATATTATGTCCTTCGATAGCCATTACATCATGAGCGAGTCATGAGTGCCCAGCTCAATGCCATATTTTCATGATTA
G

[0379] SEQ ID NO:2-由SEQ ID NO:1编码的人NeuroD1氨基酸序列-356个氨基酸

[0380] MTKSYSESLMGEPQPQGPPSWTDECLSSQDEEHEADKKEDDLEAMNAEEDSLRNGGEEDEDEDLEE
EEEEEEEDDDQKPKRRGPKKKKMTKARLERFKLRRMKANARERNMHGLNAALDNLRKVVPYCYSKTQKLSKIETLR
LAKNYIWALSEILRSGKSPDLVSFVQTLCKGLSQPTTNLVAGCLQLNPRTFLPEQNQDMPPHLPTASASFPVHPYS
YQSPGLSPPPYGTMDSSSHVFHVKPPPHAYSAALEPFESPLTDCTSPSFDGPLSPPLSINGNFSFKHEPSAEFEKN
YAFTMHYPAATLAGAQSHGSIFSGTAAPRCEIPIDNIMSFDSHSHHERVMSAQLNAIFHDSEQ ID NO:3-编码

小鼠NeuroD1蛋白的小鼠NeuroD1核酸序列-1074个核苷酸,包含终止密码子ATGACCAAATCA
TACAGCGAGAGCGGGCTGATGGGCGAGCCTCAGCCCCAAGTCCCCCAAGCTGGACAGATGAGTGTCTCAGTTCTCA
GGACGAGGAACACGAGGCAGACAAGAAAGAGGACGAGCTTGAAGCCATGAATGCAGAGGAGGACTCTCTGAGAAACG
GGGAGAGGAGGAGGAGGAAGATGAGGATCTAGAGGAAGAGGAGGAAGAAGAAGAGGAGGAGGAGGATCAAAAGCCC
AAGAGACGGGGTCCCCAAAAGAAAAAGATGACCAAGGCGCGCCTAGAACGTTTTAAATTAAGGCGCATGAAGGCCAA
CGCCCGCGAGCGGAACCGCATGCACGGGCTGAACGCGGCGCTGGACAACCTGCGCAAGGTGGTACCTTGCTACTCCA
AGACCCAGAAACTGTCTAAATAGAGACACTGCGCTTGGCCAAGAACTACATCTGGGCTCTGTCTCAGAGATCCTGCGC
TCAGGCAAAAGCCCTGATCTGGTCTCCTTCGTACAGACGCTCTGCAAAGGTTTGTCCCAGCCCACTACCAATTTGGT
CGCCGGCTGCCTGCAGCTCAACCCCTCGGACTTTCTTGCTGAGCAGAACCCGGACATGCCCCGCATCTGCCAACCG
CCAGCGCTTCCTTCCCGGTGCATCCCTACTCCTACCAGTCCCCTGGACTGCCCAGCCCGCCCTACGGCACCATTGGAC
AGCTCCACGTCTTCCACGTCAAGCCGCCGCCACACGCTACAGCGCAGCTCTGGAGCCCTTCTTTGAAAGCCCCCT
AACTGACTGCACCAGCCCTTCCTTTGACGGACCCCTCAGCCCGCGCTCAGCATCAATGGCAACTTCTCTTTCAAAC
ACGAACCATCCGCCGAGTTTGAAAAAATTATGCCTTTACCATGCACTACCCTGCAGCGACGCTGGCAGGGCCCCAA
AGCCACGGATCAATCTTCTCTTCCGGTGCCGCTGCCCCTCGCTGCGAGATCCCCATAGACAACATTATGTCTTTTGA
TAGCCATTGCGATCATGAGCGAGTCATGAGTGCCAGCTTAATGCCATCTTTCACGATTAG

[0381] SEQ ID NO:4-由SEQ ID NO:3编码的小鼠NeuroD1氨基酸序列-357个氨基酸

[0382] MTKSYSESLMGEPQPQGPSSWTDECLSSQDEEHEADKKEDELEAMNAEEDSLRNGEEEEDEDELEEE
EEEEEEEEEDQKPKRRGPKKKKMTKARLERFKLRMKANARERNMHGLNAALDNLRKVVPYCYSKTQKLSKIETLRLA
KNYIWALSEILRSKSPDLVSFVQTLCKGLSQPTTNLVAGCLQLNPRTFLPEQNPDMPPHLPASASFPVHPYSYQS
PGLPSPPYGTMDSSHVFHVKPPPHAYSAALEPFFESPLTDCTSPSFDGPLSPPLSINGNFSFKHEPSAEFEKNYAFT
MHYPAATLAGPQSHGSIFSSGAAAPRCEIPIDNIMSFDSHSHHERVMSAQLNAIFHD

[0383] 小鼠LCN2启动子-SEQ ID NO:5

[0384] GCAGTGTGGAGACACACCCACTTTCCCCAAGGGCTCCTGCTCCCCCAAGTGATCCCCTTATCCTCCGTG
CTAAGATGACACCGAGGTTGCAGTCCTTACCTTTGAAAGCAGCCACAAGGGCGTGGGGGTGCACACCTTTAATCCCA
GCACTCGGGAGGCAGAGGCAGGAGGATTTCTGAGTTTCGAGACCAGCCTGGTCTACAAAGTGAATTCCAGGACAGCCA
GGGCTATACAGAGAAACCTGTCTTGAAAAAAGAGAAAGAAAAAAGAAAAAATGAAAGCAGCCACATCT
AAGGACTACGTGGCACAGGAGAGGGTGAGTCCCTGAGAGTTCAGCTGCTGCCCTGTCTGTTTCTGTAAATGGCAGTG
GGGTGATGGGAAAGTGAAGGGGCTCAAGGTATTGGACACTTCCAGGATAATCTTTTGGACGCCTCACCTGTGCCAG
GACCAAGGCTGAGCTTGGCAGGCTCAGAACAGGGTGCTCTGTTCTTCCCTGTCTAAACATTCACTCTCAGCTTGCT
CACCTTCCCCAGACAAGGAAGCTGCACAGGGTCTGGTGTTTCAGATGGCTTTGGCTTACAGCAGGTGTGGGTGTGGG
GTAGGAGGCAGGGGTAGGGGTGGGGGAAGCCTGTACTATACTCACTATCCTGTTTCTGACCCTCTAGGACTCCTAC
AGGGTTATGGGAGTGGACAGGCAGTCCAGATCTGAGCTGCTGACCCACAAGCAGTGCCCTGTGCCTGCCAGAATCCA
AAGCCCTGGGAATGTCCCTCTGGTCCCCCTCTGTCCCCTGCAGCCCTTCTGTTGCTCAACCTTGCACAGTTCCGAC
CTGGGGGAGAGAGGGACAGAAATCTTGCCAAGTATTTCAACAGAATGTACTGGCAATTACTTCATGGCTTCTCTGGAC
TTGGTAAAGGATGGACTACCCCGCCCAACAGGGGGGCTGGCAGCCAGGTAGGCCCATAAAAAGCCCGCTGGGGAGTC
CTCCTCACTCTCTGCTCTTCTCCTCCAGCACACATCAGACCTAGTAGCTGTGGAACCA

[0385] 人GFAP启动子-SEQ ID NO:6

[0386] GTCTGCAAGCAGACCTGGCAGCATTGGGCTGGCCGCCCCCAGGGCCTCCTCTTCATGCCAGTGAATG
ACTCACCTTGGCACAGACACAATGTTTCGGGGTGGGCACAGTGCTGCTTCCCGCCGACCCCAGCCCCCTCAAATG

CCTTCCGAGAAGCCCATTGAGTAGGGGGCTTGCATTGCACCCCAGCCTGACAGCCTGGCATCTTGGGATAAAAGCAG
CACAGCCCCCTAGGGGCTGCCCTTGCTGTGTGGCGCCACCGGCGGTGGAGAACAAGGCTCTATTACGCCTGTGCCCA
GGAAAGGGGATCAGGGGATGCCAGGCATGGACAGTGGGTGGCAGGGGGGAGAGGAGGGCTGTCTGCTTCCCAGAA
GTCCAAGGACACAAATGGGTGAGGGGACTGGGCAGGGTTCTGACCCTGTGGGACCAGAGTGGAGGGCGTAGATGGAC
CTGAAGTCTCCAGGGACAACAGGGCCCAGGTCTCAGGCTCCTAGTTGGGCCAGTGGCTCCAGCGTTTCCAAACCCA
TCCATCCCCAGAGGTTCTTCCCATCTCTCCAGGCTGATGTGTGGGAACTCGAGGAAATAAATCTCCAGTGGGAGACG
GAGGGGTGGCCAGGGAAACGGGGCGCTGCAGGAATAAAGACGAGCCAGCACAGCCAGCTCATGCGTAACGGCTTTGT
GGAGCTGTCAAGGCCTGGTCTCTGGGAGAGAGGCACAGGGAGGCCAGACAAGGAAGGGGTGACCTGGAGGGACAGAT
CCAGGGGGCTAAAGTCTGATAAGGCAAGAGAGTGCCGGCCCCCTCTTGCCCTATCAGGACCTCCACTGCCACATAGA
GGCCATGATTGACCCTTAGACAAAGGGCTGGTGTCCAATCCCAGCCCCCAGCCCCAGAACTCCAGGGAATGAATGGG
CAGAGAGCAGGAATGTGGGACATCTGTGTTCAAGGGAAGGACTCCAGGAGTCTGCTGGGAATGAGGCCTAGTAGGAA
ATGAGGTGGCCCTTGAGGGTACAGAACAGGTTCAATTCTCGCCAAATTTCCAGCACCTTGCAGGCACTTACAGCTGA
GTGAGATAATGCCTGGGTTATGAAATCAAAAAGTTGGAAAGCAGGTCAGAGGTCATCTGGTACAGCCCTTCCCTTCCC
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGAGACAAGGTCTCTCTCTGTTGCCCAGGCTGGAGTGGCGCAAACACAGCTCACTGC
AGCCTCAACCTACTGGGCTCAAGCAATCCTCCAGCCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAAGCATGAGCCACCC
CACTCAGCCCTTTCCTTCCCTTTTAAATTGATGCATAATAATTGTAAGTATTCATCATGGTCCAACCAACCCTTCTT
GACCCACCTTCCCTAGAGAGAGGGTCTCTTGATTACAGCGGTCAGGGCCCCAGACCCATGGTCTGGCTCCAGGTACCA
CCTGCCTCATGCAGGAGTTGGCGTGCCAGGAAGCTCTGCCTCTGGGCACAGTGACCTCAGTGGGGTGAGGGGAGCT
CTCCCCATAGCTGGGCTGCGGCCCAACCCACCCCTCAGGCTATGCCAGGGGTGTTGCCAGGGGCACCCGGGCAT
CGCCAGTCTAGCCCACTCCTTCATAAAGCCCTCGCATCCCAGGAGCGAGCAGAGCCAGAGCAT

[0387] 小鼠A1dh1L1启动子-SEQ ID NO:7

[0388] AACTGAGAGTGGAGGGGCACAGAAGAGCCCAAGAGGCTCCTTAGGTTGTGTGGAGGGTACAATATGTTT
GGGCTGAGCAACCCAGAGCCAGACTTTGTCTGGCTGGTAAGAGACAGAGGTGCCTGCTATCACAATCCAAGGGTCTG
CTTGAGGCAGAGCCAGTGCAAAGGATGTGGTTAGAGCCAGCCTGGTGTACTGAAGAGGGGCGAAGAGCTTGAGTAAG
GAGTCTCAGCGGTGGTTTGAGAGGCAGGGTGGTTAATGGAGTAGCTGCAGGGGAGAATCCTTGGGAGGGAGCCTGCA
GGACAGAGCTTTGGTCAGGAAGTGATGGGCATGTCACTGGACCCTGTATTGTCTCTGACTTTTCTCAAGTAGGACAA
TGAAGAGGTGGGAAGGGGCTGTGACAAGGTGGAAGGGCCAGAGGAGAACTTCTGAGAAGAAAACCAGAGGCCG
TGAAGAGGTGGGAAGGGCATGGGATTGAGAACCTCAGGCCCCAGGACACAACCCAGGTCCACAGCAGATGGGTG
ACCTTGATGTCTCAGTCACCAGCATTGTGCTCCTTGCTTATCACGCTTGGGTGAAGGAAATGACCCAAATAGCATA
AAGCCTGAAGGCCGGGACTAGGCCAGCTAGGGCTTGCCCTTCCCTTCCCAGCTGCACCTTCCATAGGTCCACCTTC
AGCAGATTAGACCCGCTCCTGCTTCTGCTCCTTGCTCCTCACTCATGGGTCTATGCCACCTCCAGTCTCGGG
ACTGAGGCTCACTGAAGTCCCATCGAGGTCTGGTCTGGTGAATCAGCGGTGGCTCTGGGCCCTGGGCGACCAGTTA
GGTTCCGGGCATGCTAGGCAATGAACTCTACCCGGAATTGGGGGTGCGGGGAGGCGGGGAGGTCTCCAACCCAGCCT
TTTGAGGACGTGCTGTGCTGCACGGTGCTTTTATAGACGATGGTGGCCCATTTTGCAGAAGGGAAAGCCGGAGC
CCTCTGGGGAGCAAGGTCCCCGAAATGGACGGATGACCTGAGCTTGGTTCTGCCAGTCCACTTCCCAAATCCCTCA
CCCCATTCTAGGGACTAGGGAAAGATCTCCTGATTGGTCATATCTGGGGGCTGGCCGGAGGGCCTCCTATGATTGG
AGAGATCTAGGCTGGGCGGGCCCTAGAGCCCGCCTCTTCTCTGCCTGGAGGAGGAGCACTGACCCTAACCTCTCTG
CACAAGACCCGAGCTTGTGCGCCCTTCTGGGAGCTTGCTGCCCTGTGCTGACTGCTGACAGCTGACTGACGCTCGC
AGCTAGCAGGTACTTCTGGGTTGCTAGCCCAGAGCCCTGGGCCGGTGACCCTGTTTTCCCTACTTCCCGTCTTTGAC

CTTGGGTAAGTTTCTTTTCTTTTGTGAGAGAGGCACCCAGATCCTCTCCACTACAGGCAGCCGCTGAACCTT
GGATCCTCAGCTCCTGCCCTGGGAACTACAGTTCCCTGCCCTTTTTTCCCACCTTGAGGGAGGTTTTCCCTGAGTAG
CTTCGACTATCCTGGAACAAGCTTTGTAGACCAGCCTGGGTCTCCGGAGAGTTGGGATTAAAGGCGTGCACCACCAC
C

[0389] 人NG2启动子-SEQ ID NO:8

[0390] CTCTGGTTTCAAGACCAATACTCATAACCCCCACATGGACCAGGCACCATCACACCTGAGCACTGCACT
TAGGGTCAAAGACCTGGCCCCACATCTCAGCAGCTATGTAGACTAGCTCCAGTCCCTTAATCTCTCTCAGCCTCAGT
TTCTTCATCTGCAAAACAGGTCTCAGTTTCGTTGCAAAGTATGAAGTGCTGGGCTGTTACTGGTCAAAGGGAAGAGC
TGGAAGAGGGTGCAAGGTGGGGTGGGCTGGAGTGGGCTGGAGCAGATAGATGGAGGGACCTGAATGGAGGAAGT
AAACCAAGGCCCGGTAACATTGGGACTGGACAGAGAACACGCAGATCCTCTAGGCACCGGAAGCTAAGTAACATTGC
CCTTTCTCCTCCTGTTTGGGACTAGGCTGATGTTGCTGCCTGGAAGGGAGCCAGCAGAAGGGCCCCAGCCTGAAGCT
GTTAGGTAGAAGCCAAATCCAGGGCCAGATTTCCAGGAGGCAGCCTCGGAAGTTGAAACACCCGGATTACAGGGGTC
AGGAGGCCTGGGCTTCTGGCACCAACGGCCAGGGACCTACTTTCCACCTGGAGTCTTGTAAGAGCCACTTTTCAGCT
TGAGCTGCACTTTCGTCTCCTCATGAAATGGGGGAGGGGATGCTCCTCACCCACCTTGCAAGGTTATTTTGAGGCAAA
TGTCATGGCGGGACTGAGAATTCTTCTGCCCTGCGAGGAAAATCCAGACATCTCTCCCTTACAGACAGGGAGACTGAG
GTGAGGCCCTTCCAGGCAGAGAAGGTCACTGTTGCAGCCATGGGCAGTGCCCCACAGGACCTCGGGTGGTGCCTCTG
GAGTCTGGAGAAGTTCTAGGGGACCTCCGAGGCAAAGCAGCCCAAAAGCCGCCTGTGAGGGTGGCTGGTGTCTGTC
CTTCTCCTAAGGCTGGAGTGTGCCTGTGGAGGGGTCTCCTGAACTCCCGCAAAGGCAGAAAGGAGGGAAGTAGGGG
CTGGGACAGTTTCATGCCTCCTCCCTGAGGGGGTCTCCCGGGCTCGGCTCTTGGGGCCAGAGTTCAGGGTGTCTGGGC
CTCTCTATGACTTTGTTCTAAGTCTTTAGGGTGGGGCTGGGGTCTGGCCCAGCTGCAAGGGCCCCCTCACCCCTGCC
CCAGAGAGGAACAGCCCCGACGGGCCCTTTAAGAAGGTTGAGGGTGGGGGAGGTGGGGGAGTCCAAGCCTGAAAC
CCGAGCGGGCGCGGGGTCTGCGCCTGCCCCGCCCCCGGAGTTAAGTGCGCGACACCCGGAGCCGGCCCCGCGCCCA
GGAGCAGAGCCGCGCTCGCTCCACTCAGCTCCCAGCTCCCAGGACTCCGCTGGCTCCTCGCAAGTCCTGCCGCCAG
CCCCCGGG

[0391] CAG::NeuroD1-IRES-GFP-SEQ ID NO:9

[0392] GATCCGGCCATTAGCCATATTATTTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCA
TACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTAT
TGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTT
ACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGT
AACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAG
TGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATG
ACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCA
GTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCGAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTT
TGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGG
CATGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCAATAAAAAGAGCCACAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTCTCC
GATTGACTGAGTCGCCCCGGTACCCGATTCCCAATAAAAGCCTCTTGCTGTTTGCATCCGAATCGTGGTCTCGCTGT
TCCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCACGACGGGGTCTTTCATTTGGGGGCTCGTCCGGGATTTGG
AGACCCCTGCCAGGGACACCGACCCACCGGGAGGTAAGCTGGCCAGCAACTTATCTGTGTCTGTCCGATTGT
CTAGTGTCTATGTTTGATGTTATGCGCCTGCGTCTGTACTAGTTAGCTAACTAGCTCTGTATCTGGCGGACCCGTGG

TGGAAGTACGAGTTCTGAACACCCGGCCGCAACCCTGGGAGACGTCCCAGGGACTTTGGGGGCGGTTTTTGTGGCC
CGACCTGAGGAAGGGAGTCGATGTGGAATCCGACCCCGTCAGGATATGTGGTTCTGGTAGGAGACGAGAACCTAAAA
CAGTTCCCGCCTCCGTCTGAATTTTTGCTTTCGGTTTGGAAACCGAAGCCGCGCTTGTCTGCTGCAGCGCTGCAG
CATCGTTCTGTGTTGTCTCTGTCTGACTGTGTTTCTGTATTTGTCTGAAAATTAGGGCCAGACTGTTACCACTCCCT
TAAGTTTGACCTTAGGTCACTGGAAGATGTCGAGCGGATCGCTCACAACCAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGT
TGGGTTACCTTCTGCTCTGCAGAATGGCCAACCTTTAACGTCGGATGGCCGCGAGACGGCACCTTTAACCGAGACCT
CATCACCCAGGTAAAGATCAAGGTCTTTTACCTGGCCCGCATGGACACCCAGACCAGGTCCCTACATCGTGACCT
GGGAAGCCTTGGCTTTTGACCCCCCTCCCTGGGTCAAGCCCTTTGTACACCCTAAGCCTCCGCTCCTCTTCCTCCA
TCCGCCCCGTCTCTCCCCCTTGAACCTCCTCGTTTCGACCCCGCCTCGATCCTCCCTTTATCCAGCCCTCACTCCTTC
TCTAGGCGCCGGAATTCGATGTGCACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTC
ATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGC
CCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTA
TTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACG
GTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTA
GTCATCGCTATTACCATGGGTGCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCC
CAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCGAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCAGGCGG
GGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCGAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAA
AGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGAGTCGCTGCG
TTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCGGCTCTGACTGACCGGTTACTCCCACA
GGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTCGTTTCTTTCTGT
GGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTG
TGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGGGGGCTTG
TGCGCTCCGCGTGTGCGGAGGGGAGCGCGGCCGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAA
GGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGCTGTAACCCCCCTGC
ACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCTGGCGCGGGGCTCGCC
GTGCCGGGCGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCGGGGAGGGCTCGGGGA
GGGGCGCGGCGGCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTG
CGAGAGGGGCGAGGGACTTCTTTGTCCCAAATCTGGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGACCCCTCTAG
CGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCG
TCCCTTCTCCATCTCCAGCCTCGGGGCTGCCGAGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTT
CGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCTCC
TGGGCAACGTGCTGGTTGTTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTTCGTAGCGGATCCGGCCGCTCGGCCAC
CGGTGCCACCATCGCCACCATGACCAATCATACAGCGAGAGCGGGCTGATGGGCGAGCCTCAGCCCCAAGGTCCC
CCAAGCTGGACAGATGAGTGTCTCAGTTCTCAGGACGAGGAACACGAGGCAGACAAGAAAGAGGACGAGCTTGAAGC
CATGAATGCAGAGGAGGACTCTCTGAGAAACGGGGGAGAGGAGGAGGAGGAAGATGAGGATCTAGAGGAAGAGGAGG
AAGAAGAAGAGGAGGAGGAGGATCAAAAGCCCAAGAGACGGGGTCCCAAAAAGAAAAGATGACCAAGGCGCGCCTA
GAACGTTTTAAATTAAGGCGCATGAAGGCCAACGCCCGGAGCGGAACCGCATGCACGGGCTGAACGCGGCGCTGGA
CAACCTGCGCAAGGTGGTACCTTGCTACTCCAAGACCCAGAACTGTCTAAAATAGAGACACTGCGCTTGGCCAAGA
ACTACATCTGGGCTCTGTCAGAGATCCTGCGCTCAGGCAAAAGCCCTGATCTGGTCTCCTTCGTACAGACGCTCTGC

AAAGGTTTGTCCCAGCCCACTACCAATTTGGTCGCCGGCTGCCTGCAGCTCAACCCTCGGACTTTCTTGCCTGAGCA
GAACCCGGACATGCCCCGCATCTGCCAACCGCCAGCGCTTCCTTCCCGGTGCATCCCTACTCTACCAGTCCCCTG
GACTGCCCAGCCCCCCTACGGCACCATTGGACAGCTCCACAGTCTTCCACGTCAAGCCGCCGCCACAGCCTACAGC
GCAGCTCTGGAGCCCTTCTTTGAAAGCCCCCTAACTGACTGCACCAGCCCTTCCTTTGACGGACCCCTCAGCCCCGC
GCTCAGCATCAATGGCAACTTCTCTTTCAAACACGAACCATCCGCCGAGTTTGAAAAAAATTATGCCTTTACCATGC
ACTACCCTGCAGCGACGCTGGCAGGGCCCCAAAGCCACGGATCAATCTTCTTCCGGTGCCGCTGCCCTCGCTGC
GAGATCCCCATAGACAACATTATGTCTTTTCGATAGCCATTTCGCATCATGAGCGAGTCATGAGTGCCAGCTTAATGC
CATCTTTTACGATTAGGTTTAAACGCGGCCGCGCCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCT
TGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGG
AAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAA
TGTCGTGAAGGAAGCAGTTCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTCAGGCAGCGGA
ACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCC
CAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAA
GGATGCCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGA
GGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCAC
AACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACG
GCCACAAGTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACC
ACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCC
CGACCACATGAAGCAGCAGCAGCTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCA
AGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG
GGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCTATAT
CATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGC
TCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACC
CAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGAT
CACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGTCGACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTG
GTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCC
CGTATGGCTTTTCATTTTCTCCTCCTTGATAAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAG
GCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTGAGCTCC
TTTCCGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAATCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACA
GGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTGCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTG
TGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCC
GCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCC
GCCTCCCCGCTGGAATTCGAGCTCGAGCTTGTTAACATCGATAAAATAAAAGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAG
GGGGGAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATAC
ATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTG
TGGTAAGCAGTTCTTCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTG
GTAAGCAGTTCTTCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGA
GAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGGCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTTCG
CTTCTCGCTTCTGTTGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCACAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGT

[0394] ATGACTGGAGTCTTTGACAGTCTAGTGGCTGATATGCACTCGACCCAGATCGCCGCCTCCAGCACGTAC
CACCAGCACCAGCAGCCCCGAGCGGCGGCGGCGCCGGCCCCGGTGGCAACAGCAGCAGCAGCAGCAGCCTCCACAA
GCCCCAGGAGTCGCCCACCCCTTCCGGTGTCACCGCCACCGACAGCAGCTACTACACCAACCAGCAGCACCCGGCGG
GCGGCGGCGGCGGCGGGGCTCGCCCTACGCGCACATGGGTTCCCTACCAGTACCAAGCCAGCGGCCTCAACAACGTC
CCTTACTCCGCCAAGAGCAGCTATGACCTGGGCTACACCGCCGCCTACACCTCCTACGCTCCCTATGGAACCAGTTC
GTCCCCAGCCAACAACGAGCCTGAGAAGGAGGACCTTGAGCCTGAAATTCGGATAGTGAACGGGAAGCCAAAGAAAG
TCCGGAACCCCGACCATCTACTCCAGTTTCCAGCTGGCGGCTCTTCAGCGGCGTTTCCAAAAGACTCAATACTTG
GCCTTGCCGAGCGAGCCGAGCTGGCGGCCTCTCTGGGCCTACCCAGACTCAGGTCAAATCTGGTTCCAGAACCG
CCGGTCCAAGTTCAAGAAGATGTGAAAAAGTGGTGAGATCCCCCTCGGAGCAGCACCCCTGGGGCCAGCGCTTCTCCAC
CTTG TGCTTCGCCGCCAGTCTCAGCGCCGGCCTCCTGGGACTTTGGTG TGCCG CAGCGGATGGCGGGCGGCGGTGGT

CCGGGCAGTGGCGGCAGCGGCCCGGCAGCTCGGGCTCCAGCCCAGCAGCGCGCCTCGGCTTTTCTGGGCAACTA
CCCCTGGTACCACCAGACCTCGGGATCCGCTCACACCTGCAGGCCACGGCGCCGCTGCTGCACCCCACTCAGACCC
CGCAGCCGCATCACCACCACCACCATCACGGCGCGGGGGCGCCCCGGTGAGCGCGGGGACGATTTTCTAA

[0395] SEQ ID NO:11-由SEQ ID NO:10编码的人D1x2氨基酸序列

[0396] MTGVFDSLVDHSTQIAASSTYHQHQPPSGGGAGPGNSSSSSLHKPQESPTLPVSTATDSSYYTN
QQHPAGGGGGGSPYAHMGSYQYQASGLNNVPYSAKSSYDLGYTAAYTSYAPYGTSSSPANNEPEKEDLEPEIRIVN
GKPKKVRKPRTIYSSFQLAALQRRFQKTQYLALPERAELAASLGLTQTQVKIWFQNRRSKFKKMWKSGEIPSEQHPG
ASASPPCASPPVSAPASWDFGVPQRMAGGGGPGSGSGAGSSGSSPSSAASAFLGNYPWYHQTSGSASHLQATAPLL
HPTQTPQPHHHHHHHGGGGAPVSAGTIF

[0397] SEQ ID NO:12-编码小鼠D1x2蛋白的小鼠D1x2核酸序列ATGACTGGAGTCTTTGACAGT

CTGGTGGCTGATATGCACTCGACCCAGATCACGCCTCCAGCACGTACCACCAGCACCAGCAGCCCCGAGCGGTGC
GGGCGCCGGCCCTGGCGGCAACAGCAACAGCAGCAGCAGCAACAGCAGCCTGCACAAGCCCCAGGAGTCGCCAACCC
TCCCGGTGTCCACGGCTACGGACAGCAGCTACTACCAACCAGCAGCACC CGCGGGCGGGCGGGGGGGGCC
TCGCCCTACGCGCACATGGGCTCCTACCAGTACCACGCCAGCGGCCTCAACAATGTCTCCTACTCCGCCAAAAGCAG
CTACGACCTGGGCTACACCGCCGCTACACCTCCTACGCGCCCTACGGCACCAGTTCGTCTCCGGTCAACAACGAGC
CGGACAAGGAAGACCTTGAGCCTGAAATCCGAATAGTGAACGGGAAGCCAAAGAAAGTCCGGAACACGCACCATC
TACTCCAGTTTCCAGCTGGCGGCCCTTCAACGACGCTTCCAGAAGACCCAGTATCTGGCCCTGCCAGAGCGAGCCGA
GCTGGCGGCGTCCCTGGGCCTCACCCAAACTCAGGTCAAAATCTGGTTCCAGAACCGCCGATCCAAGTTCAAGAAGA
TGTGGAAGAGCGGCGAGATACCCACCGAGCAGCACCTGGAGCCAGCGCTTCTCCTCCTTGTGCCTCCCCGCCGGTC
TCGGCGCCAGCATCTGGGACTTCGGCGCGCCGAGCGGATGGCTGGCGGCGCCCGGGCAGCGGAGGCGGCGGTGC
GGGCGAGCTCTGGCTCCAGCCCAGCAGCGCCGCTCGGCCTTTCTGGGAAACTACCCGTGGTACCACCAGGCTTCGG
GCTCCGCTTCACACCTGCAGGCCACAGCGCCACTTCTGCATCCTTCGCAGACTCCGAGGCGCACCATCACCACCAT
CACCACCACACGCAGGCGGGGGCGCCCCGGTGAGCGCGGGGACGATTTTCTAA

[0398] SEQ ID NO:13-由SEQ ID NO:12编码的小鼠D1x2氨基酸序列

[0399] MTGVFDSLVDHSTQITASSTYHQHQPPSGAGAGPGNNSSSSSNSSLHKPQESPTLPVSTATDSS
YTNQQHPAGGGGGGASPYAHMGSYQYHASGLNNVSYSKSSYDLGYTAAYTSYAPYGTSSSPVNNPEPKEDLEPEIR
IVNGKPKKVRKPRTIYSSFQLAALQRRFQKTQYLALPERAELAASLGLTQTQVKIWFQNRRSKFKKMWKSGEIPTEQ
HPGASASPPCASPPVSAPASWDFGAPQRMAGGGGPGSGGGGAGSSGSSPSSAASAFLGNYPWYHQASGSASHLQATAP
LLHPSQTPQAHHHHHHHHHAGGGAPVSAGTIF

[0400] SEQ ID NO:14-编码人Is11蛋白的人Is11核酸序列

[0401] tgaaggaaga ggaagaggag gagagggagg ccagagccag aacagcccgg cagcccgggc
ttcggggggag aacggcctga gccccgagca agttgcctcg ggagccctaa tcctctcccg ctggctcgcc
gagcggctcag tggcgctcag cggcggcgag gctgaaatat gataatcaga acagctgcgc cgcgcgcct
gcagccaatg ggcgcggcgc tcgcctgacg tccccgcgcg ctgcgtcaga ccaatggcga tggagctgag
ttggagcaga gaagtttgag taagagataa ggaagagagg tgcccgagcc gcgccgagtc tgccgcgcgc
gcagcgcctc cgtccgcca actccgcgg cttaaattgg aatcctagat ccgcgagggc gcggcgcagc
cgagcagcgg ctctttcagc attggcaacc ccaggggcca atatttccca cttagccaca gctccagcat
cctctctgtg ggctgttcac cagctgtaca accaccattt cactgtggac attactcct cttacagata
tgggagacat gggagatcca ccaaaaaaaaa aacgtctgat ttccctatgt gttggttgcg gcaatcagat

tcacgatcag tatattctga gggtttctcc ggatttggaa tggcatgcgg catgtttgaa atgtgcggag
tgtaatcagt atttggacga gagctgtaca tgctttgtta gggatgggaa aacactactgt aaaagagatt
atatcagggt gtacgggatc aaatgcgcca agtgcagcat cggttcagc aagaacgact tcgtgatgcg
tgcccgcctcc aaggtgtatc acatcgagtg tttccgctgt gtggcctgca gccgccagct catccctggg
gacgaatttg cgcttcggga ggacggctctc ttctgccgag cagaccacga tgtggtggag agggccagtc
taggcgctgg cgacccgctc agtcccctgc atccagcgcg gccactgcaa atggcagcgg agcccatctc
cgccaggcag ccggccctgc ggccccacgt ccacaagcag ccggagaaga ccacccgcgt gcggactgtg
ctgaacgaga agcagctgca caccttgagg acctgctacg ccgcaaaccg cgggccagat gcgctcatga
aggagcaact ggtagagatg acgggcctca gtccccgtgt gatccgggtc tggtttcaaa acaagcgggtg
caaggacaag aagcgaagca tcatgatgaa gcaactccag cagcagcagc ccaatgacaa aactaatatc
caggggatga caggaactcc catggtggct gccagtccag agagacacga cggtggctta caggctaacc
cagtgggaagt acaaagttac cagccacctt ggaaagtact gagcgacttc gccttgca ga gtgacataga
tcagcctgct tttcagcaac tgggtcaattt ttcagaagga ggaccgggct ctaattccac tggcagtga
gtagcatcaa tgtcctctca acttccagat acacctaaac gcatggtagc cagtcctatt gaggcattgag
gaacattcat tctgtatttt ttttccctgt tggagaaagt gggaaattat aatgtcgaa tctgaaacaa
aagtatttaa cgaccagtc aatgaaaact gaatcaagaa atgaatgctc catgaaatgc acgaagtctg
ttttaatgac aaggtgatat ggtagcaaca ctgtgaagac aatcatggga ttttactaga attaaacaac
aaacaaaacg caaaaccag tatatgctat tcaatgatct tagaagtact gaaaaaaaa gacgttttta
aaacgtagag gatttatatt caaggatctc aaagaaagca ttttcatttc actgcacatc tagagaaaaa
caaaaataga aaattttcta gtccatccta atctgaatgg tgctgtttct atatttggtca ttgccttgcc
aaacaggagc tccagcaaaa gcgcaggaag agagactggc ctccttggtc gaaagagtcc tttcaggaag
gtggagctgc attggtttga tatgtttaaa gttgacttta acaaggggtt aattgaaatc ctgggtctct
tggcctgtcc ttagctggtt ttatttttta ctttgcccc tccccacttt tttgagatc catcctttat
caagaagtct gaagcgactt taaaggtttt tgaattcaga tttaaaaacc aacttataaa gcattgcaac
aaggttacct ctattttgcc acaagcgtct cgggattgtg tttgacttgt gtctgtccaa gaacttttcc
cccaaagatg tgtatagtta ttggttaaaa tgactgtttt ctctctctat ggaaataaaa aggaaaaaaa
aaaaaaa

[0402] SEQ ID NO:15-由SEQ ID NO:14编码的人Is11氨基酸序列

[0403] MGDMDPPKKKRLISLCVCGNQIHDQYILRVSPDLEWHAACKCAECNQYLDESCFVRDGTKYCKR
DYIRLYGIKCAKCSIGFSKNDFVMRARKVYHIECFRCVACSRQLIPGDEFALREDGLFCRADHDVVERASLGAGDP
LSPLHPARPLQMAAEPISARQPALRPHVHKQPEKTTRVRTVLNEKQLHLTLRTCYAANPRPDALMKEQLVEMTGLSPR
VIRVWFQNKRCDDKRSIMMKQLQQQPNDKTNIQGMTGTPMVAASPERHDGGLQANPVEVQSYQPPWKVLSDFALQ
SDIDQPAFQQLVNFSEGGPGSNSTGSEVASMSSQLPDTNPMVASPIEA

[0404] SEQ ID NO:16-编码小鼠Is11蛋白的小鼠Is11核酸序列

[0405] caactccgcc ggcttaaate ggactcccag atctgcgagg gcgcggcgca gccgggcagc
tgtttccccc agttttggca accccggggg ccactatttg ccacctagcc acagcaccag catcctctct
gtgggctatt caccaattgt ccaaccacca tttcactgtg gacgttactc cctcttacag atatgggaga
catgggcgat ccacaaaaa aaaaacgtct gatttccctg tgtgttggtt gcggcaatca aattcacgac
cagtatatte tgagggtttc tccggatttg gagtggcatg cagcatgttt gaaatgtgcg gagtgtaatc

agtattttgga cgaaagctgt acgtgctttg ttagggatgg gaaaacctac tgtaaaagag attatatcag
gttgtagcggg atcaaatgcg ccaagtgcag cataggcttc agcaagaacg acttcgtgat gcgcgcccgc
tctaaggtgt accacatcga gtgtttccgc tgtgtagcct gcagccgaca gctcatcccg ggagacgaat
tcgccctgcg ggaggatggg cttttctgcc gtgcagacca cgatgtggtg gagagagcca gcctgggagc
tggagaccct ctcagtccct tgcattccagc gcggcctctg caaatggcag ccgaacccat ctcggctagg
cagccagctc tgcggccgca cgtccacaag cagccggaga agaccacccg agtgcggact gtgctcaacg
agaagcagct gcacaccttg cggacctgct atgccgcca ccctcggcca gatgcgctca tgaaggagca
actagtggag atgacgggccc tcagtcccag agtcatccga gtgtggtttc aaaacaagcg gtgcaaggac
aagaaacgca gcatcatgat gaagcagctc cagcagcagc aaccaacga caaaactaat atccagggga
tgacaggaac tcccatggtg gctgctagtc cggagagaca tgatggtggt ttacaggcta acccagtaga
ggtgcaaagt taccagccgc cctggaaagt actgagtgc ttcgccttgc aaagcgacat agatcagcct
gcttttcagc aactggtcaa tttttcagaa ggaggaccag gctctaattc tactggcagt gaagtagcat
cgatgtcctc gcagctccca gatacacca acagcatggt agccagtcct attgaggcat gaggaacatt
cattcagatg ttttgttttg ttttgttttg tttttttccc ctgttggaga aagtggg

[0406] SEQ ID NO:17-由SEQ ID NO:16编码的小鼠Isl1氨基酸序列

[0407] MGDMDPPKKKRLISLCVGCNQIHDQYILRVSPDLEWHAACLKCAECNQYLDESCTCFVRDGKTYCKR
DYIRLYGIKCAKCSIGFSKND FVMRARSKVYHIECFRCVACSRQLIPGDEFALREDGLFCRADHDVVERASLGAGDP
LSPLHPARPLQMAAEPISARQPALRPHVHKQPEKTTRVRTVLNEKQLHLRLTCYAANPRPDALMKEQLVEMTGLSPR
VIRVWFQNKRCDDKRSIMMKQLQQQPNDKTNIQGMTGTPMVAASPERHDGGLQANPVEVQSYQPPWKVLSDFALQ
SDIDQPAFQQLVNFSEGGPGSNSTGSEVASMSSQLPDTPNMVASPIEA

[0408] 其它实施例

[0409] 应当理解,虽然已经结合本发明的具体描述对本发明进行了描述,但前面的描述旨在说明而非限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求书的范围限定。其它方面、优点以及修改都在以下权利要求书的范围内。

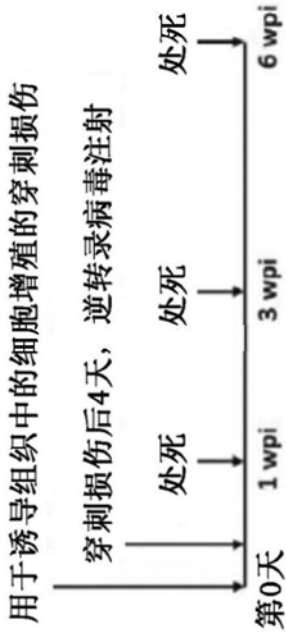


图1A

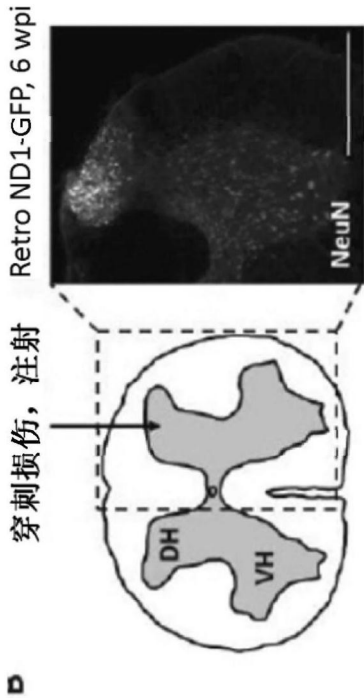


图1B

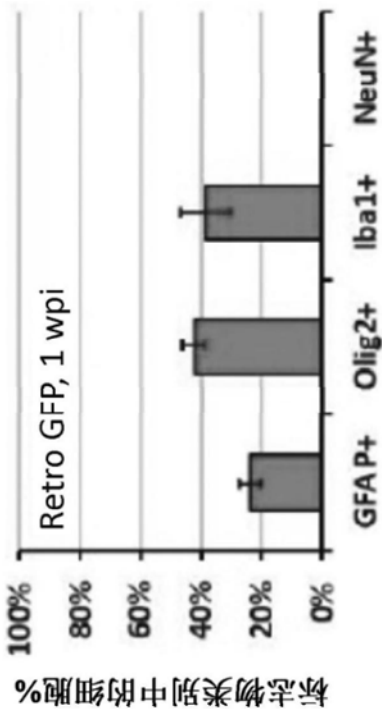


图1D

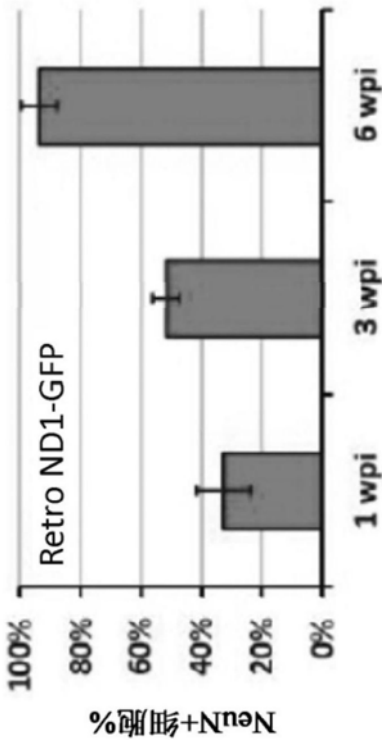


图1F

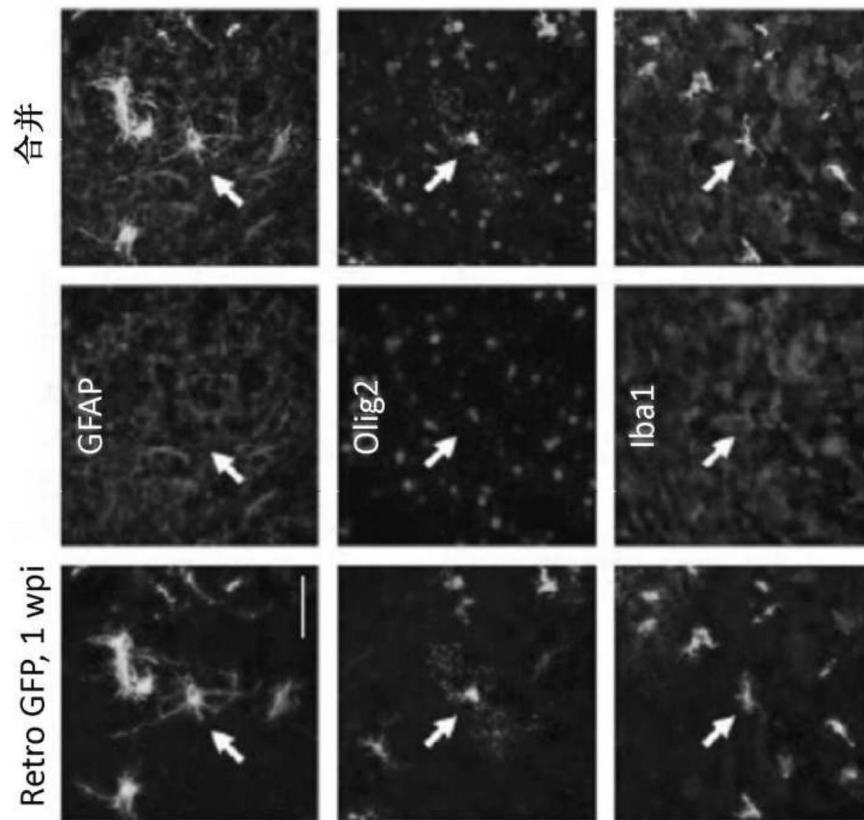


图1C

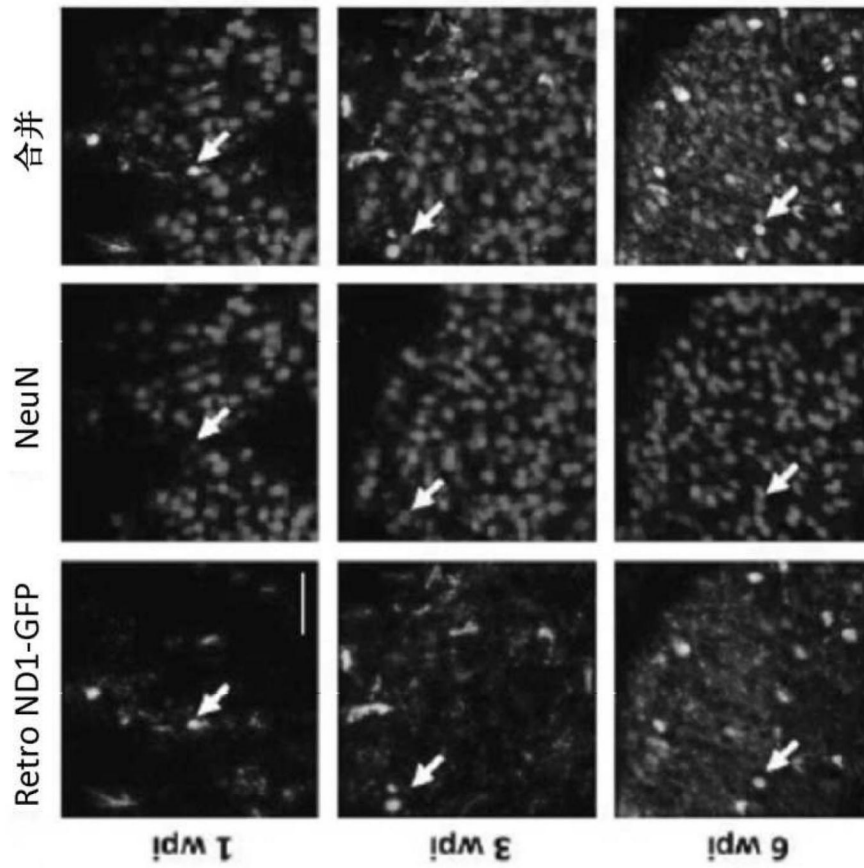


图1E

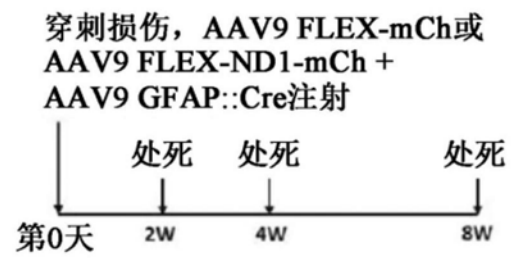


图2A



图2B

AAV9 mCh, 4 wpi

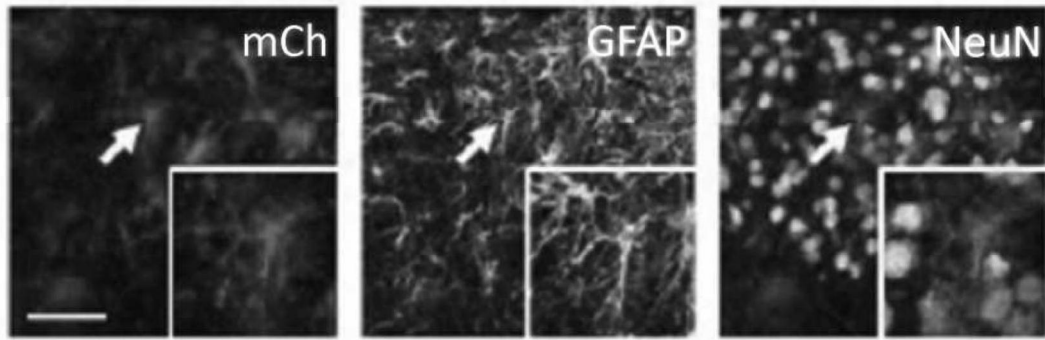


图2C

AAV9 ND1-mCh, 4 wpi

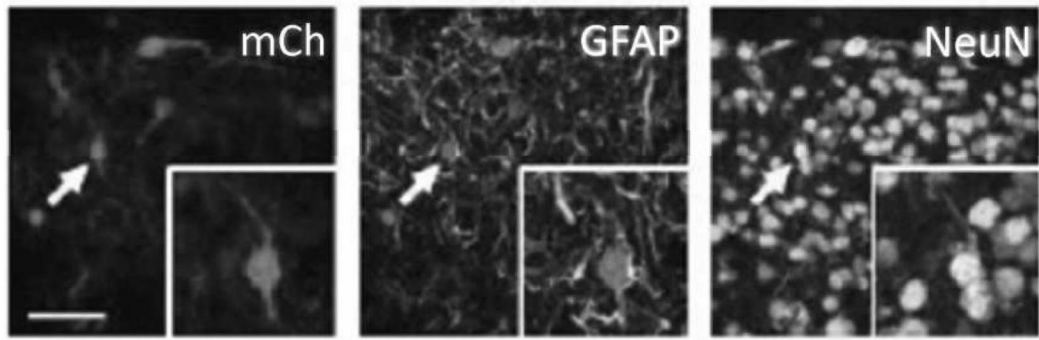


图2D

AAV9 ND1-mCh, 2 wpi

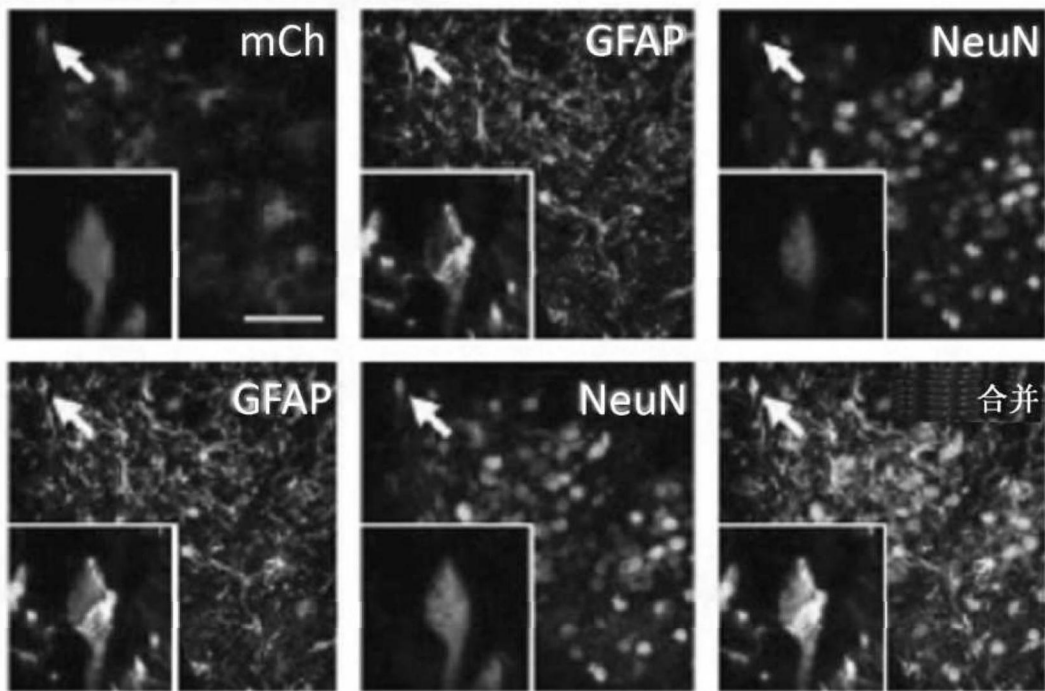


图2E

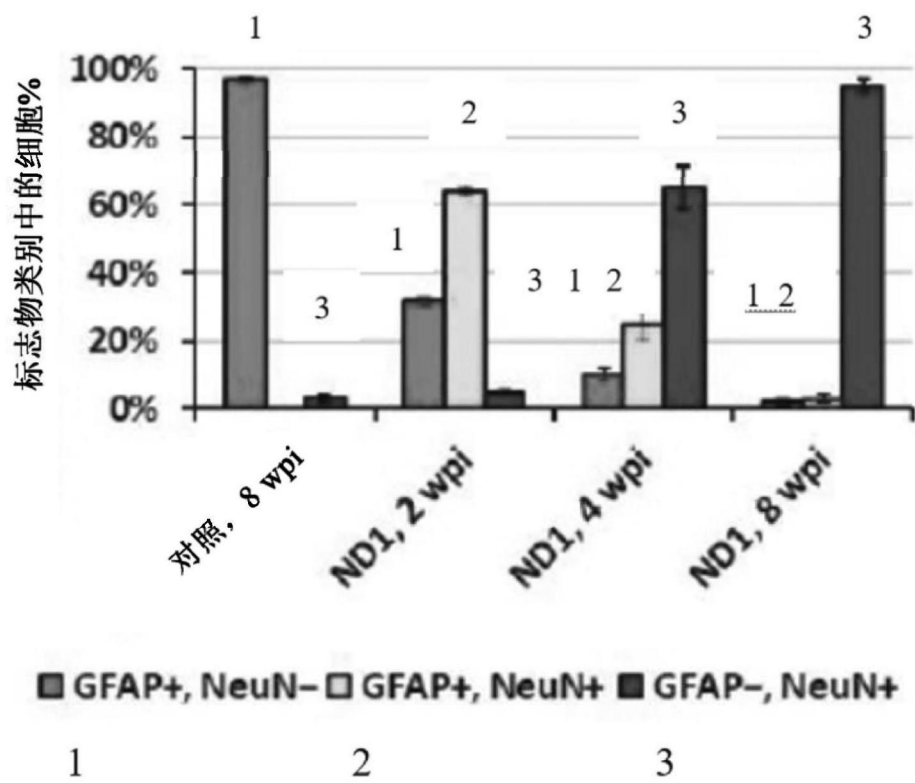


图2F

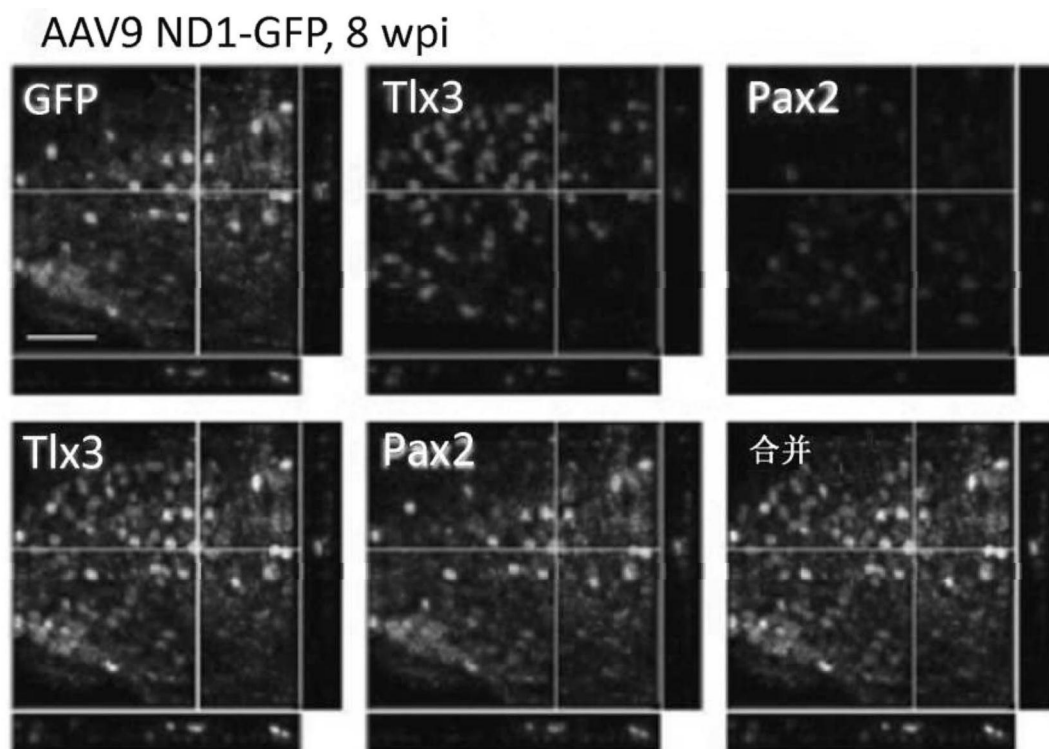


图3A

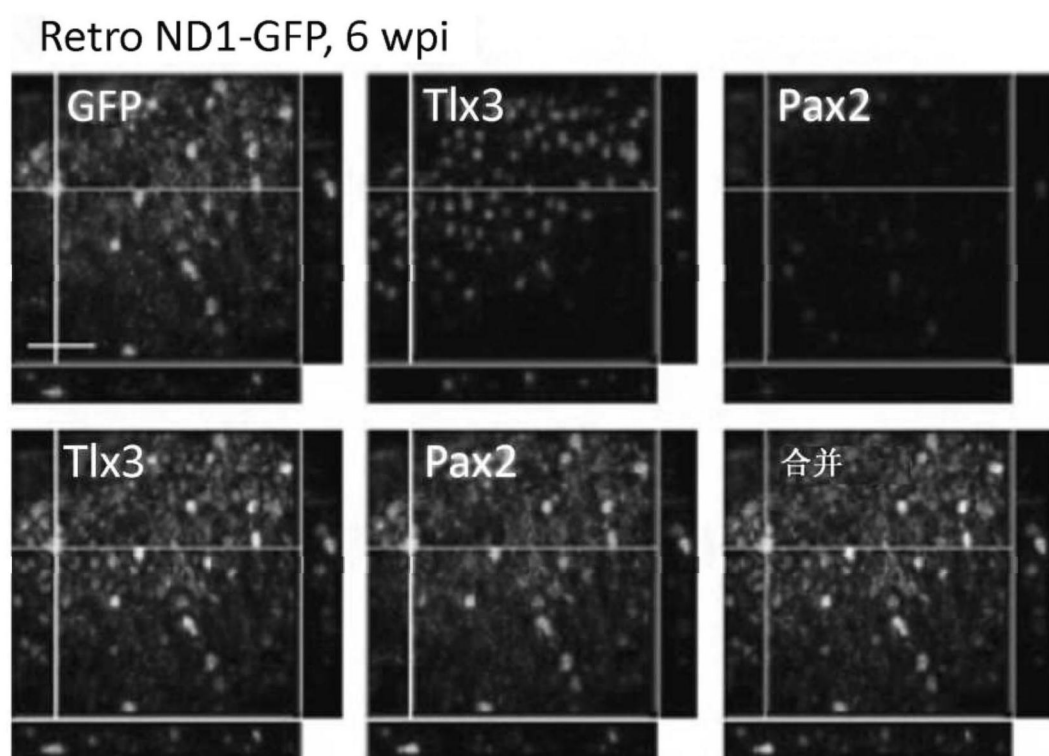


图3B

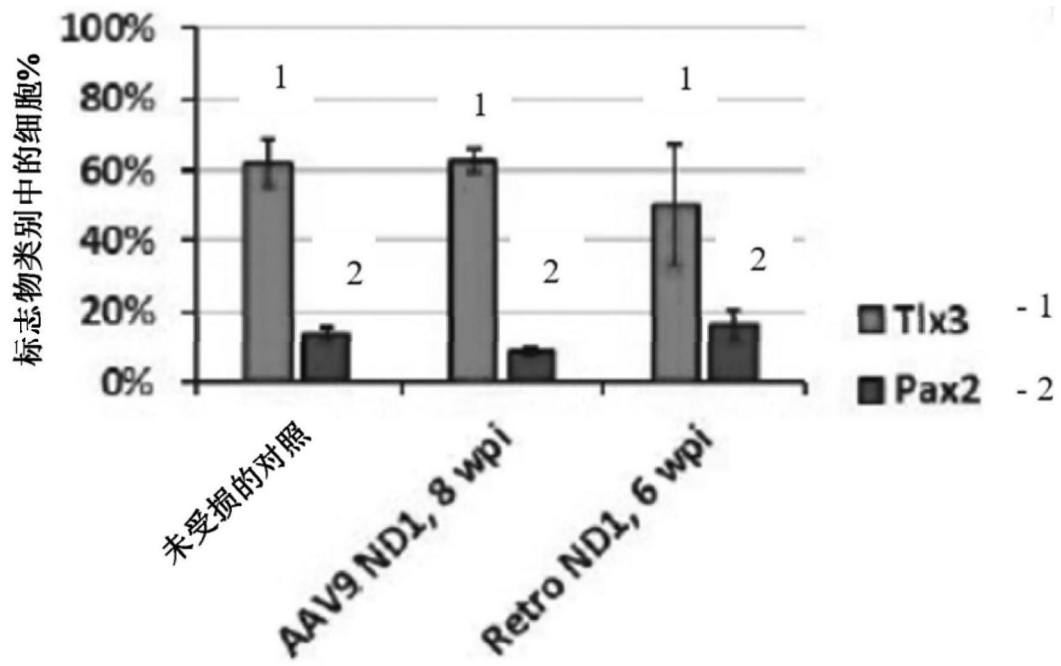


图3C

AAV9 ND1-mch, 4wpi

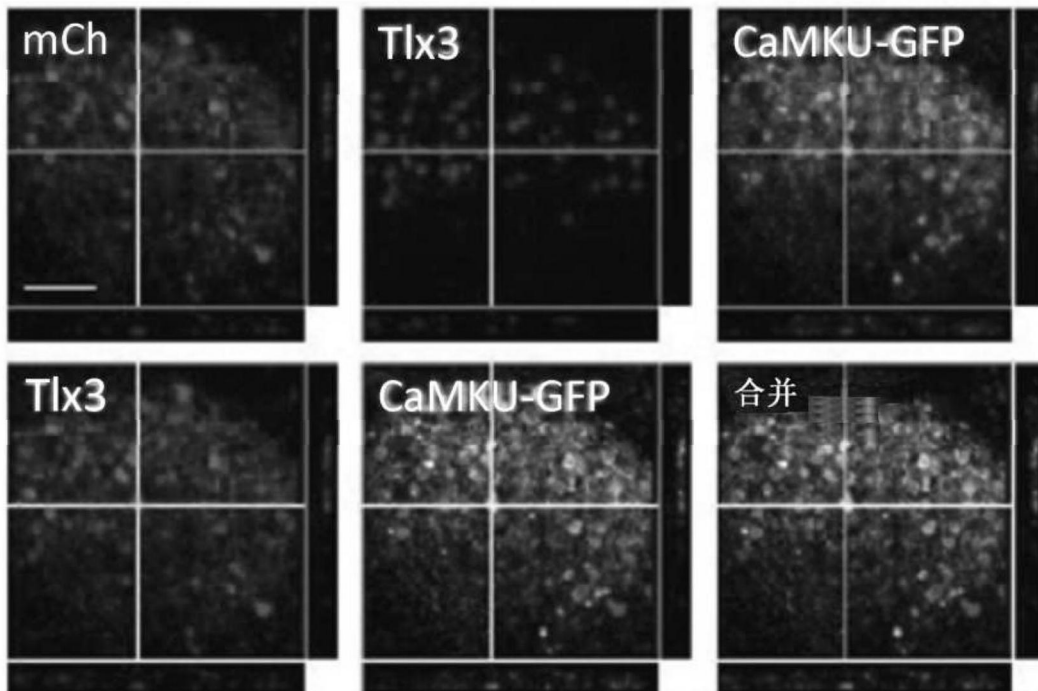


图3D

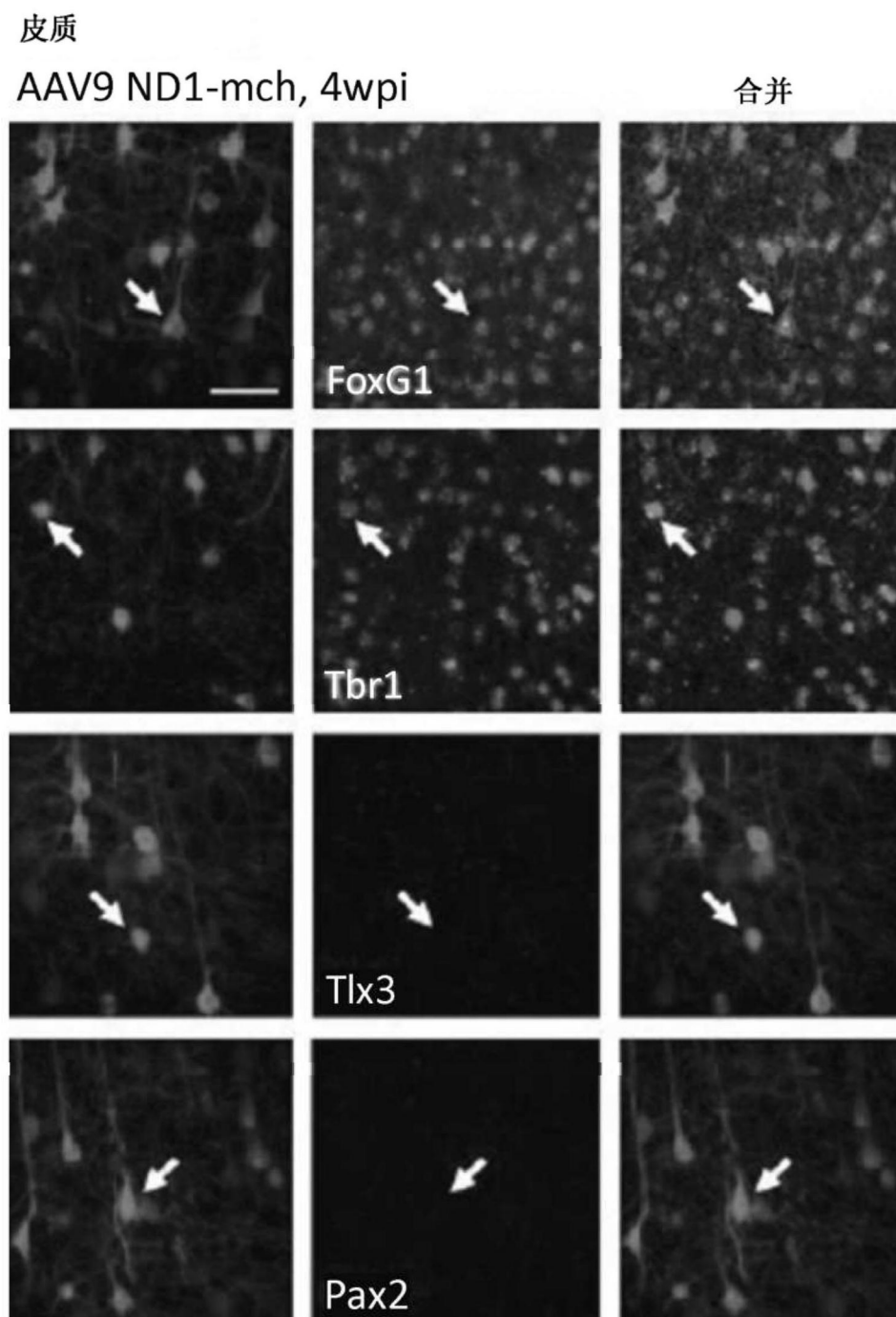


图4A

脊髓

AAV9 ND1-mch, 4wpi

合并

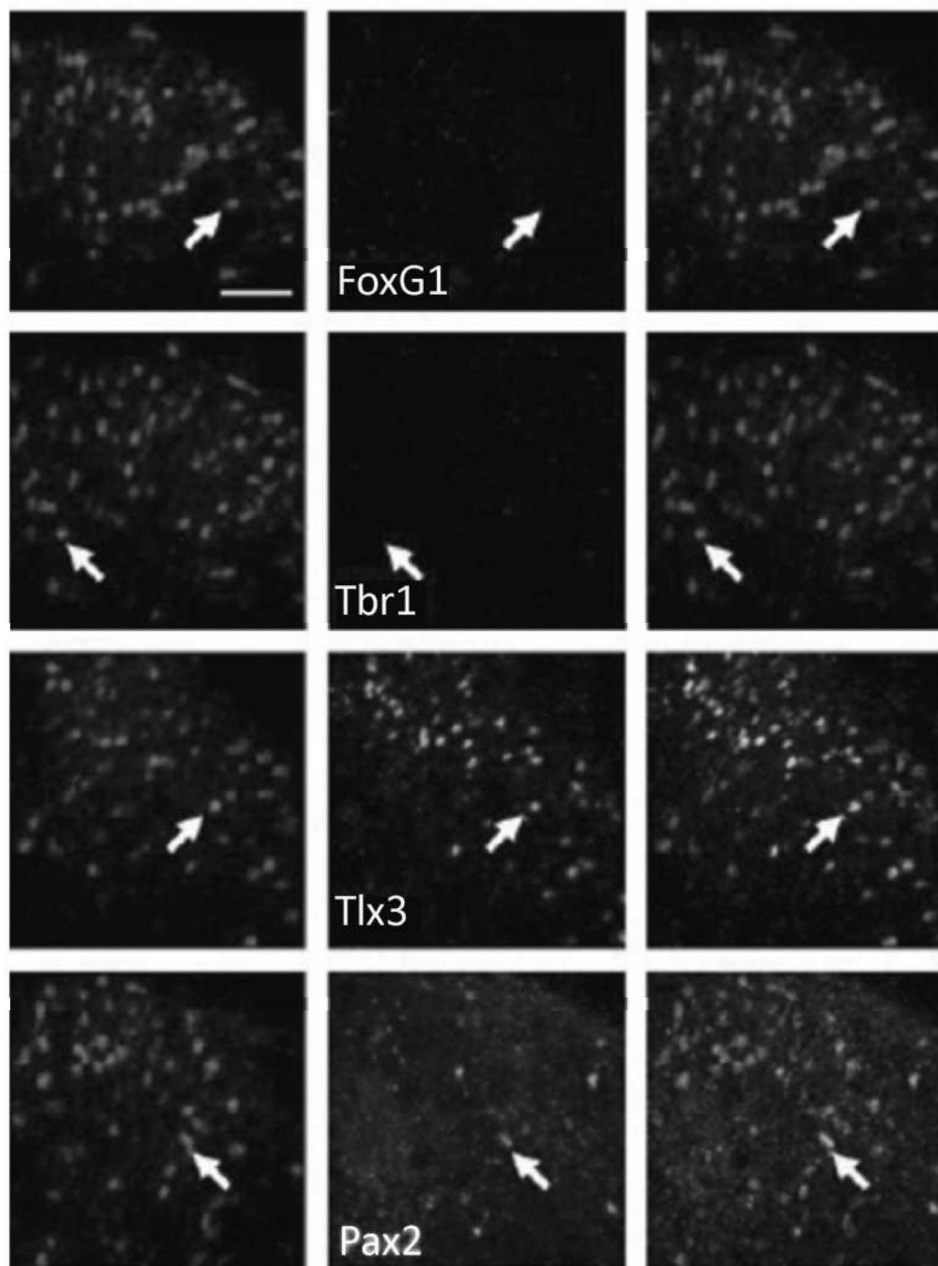


图4C

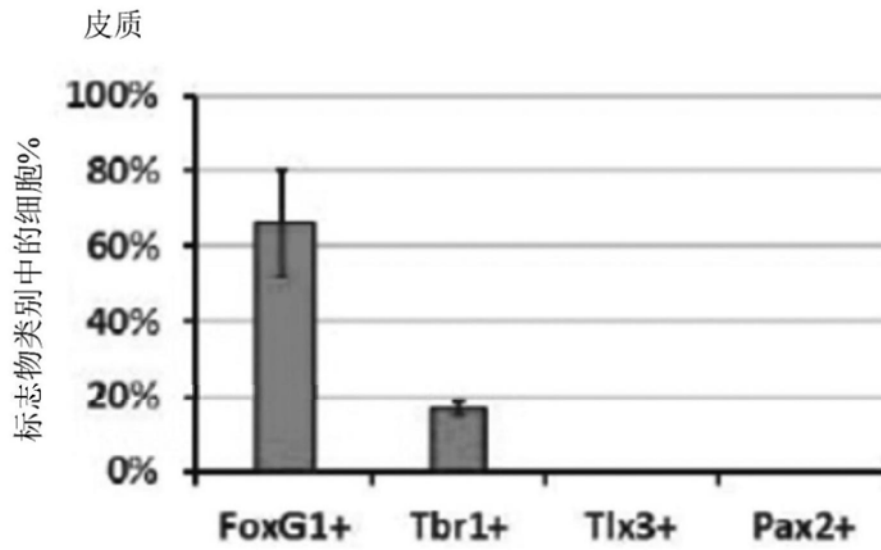


图4B

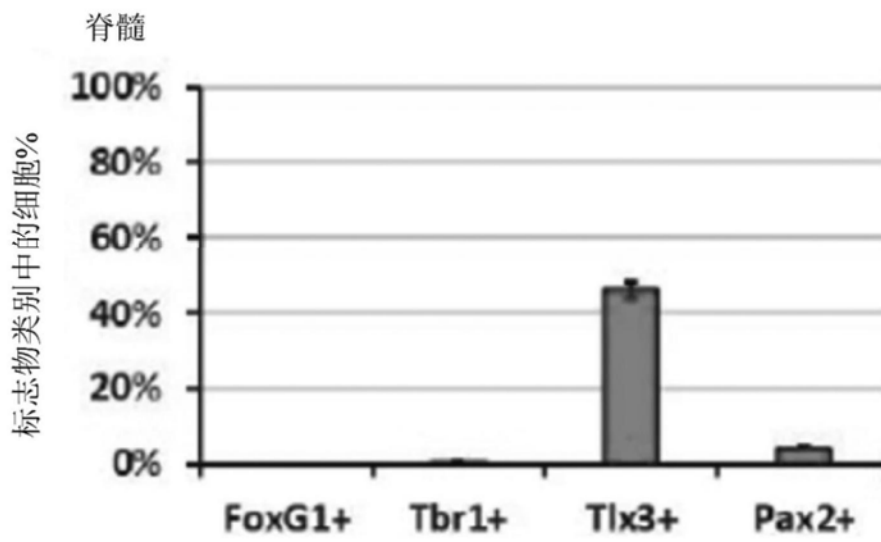


图4D



图5A

持续时间：2秒



图5B

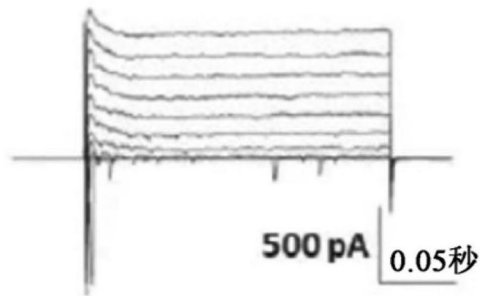


图5C

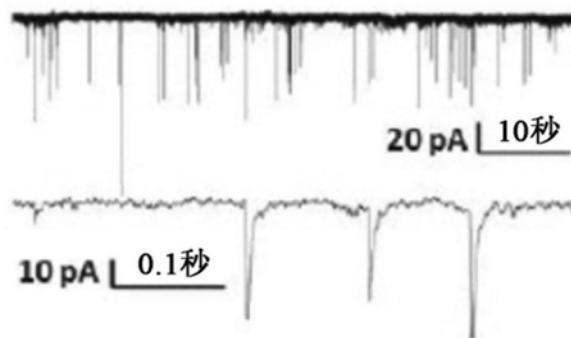


图5D

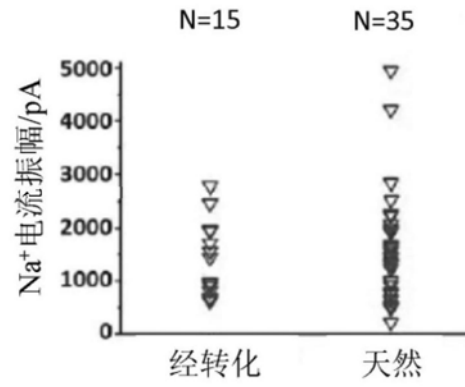


图5E

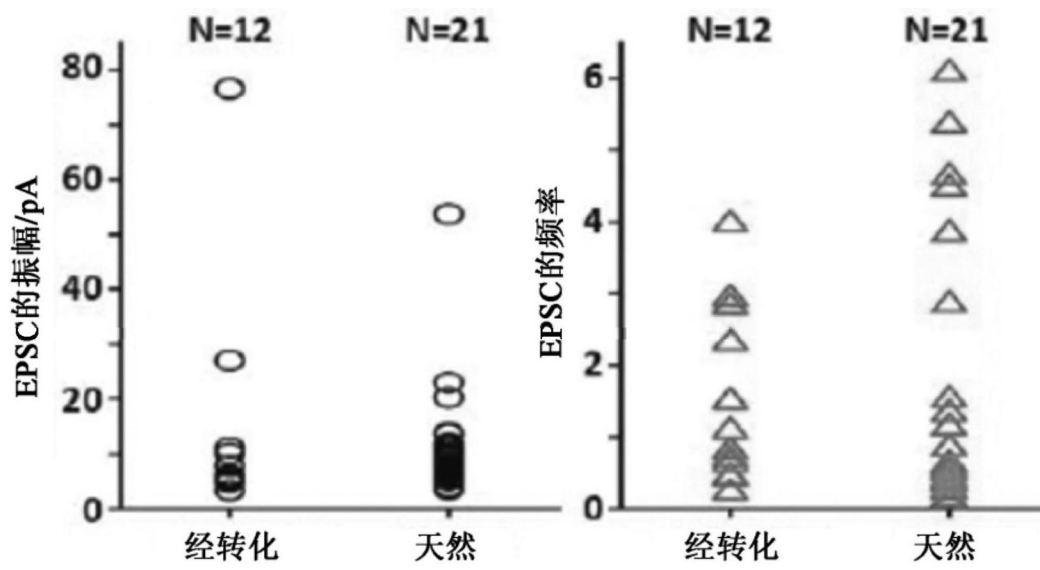


图5F

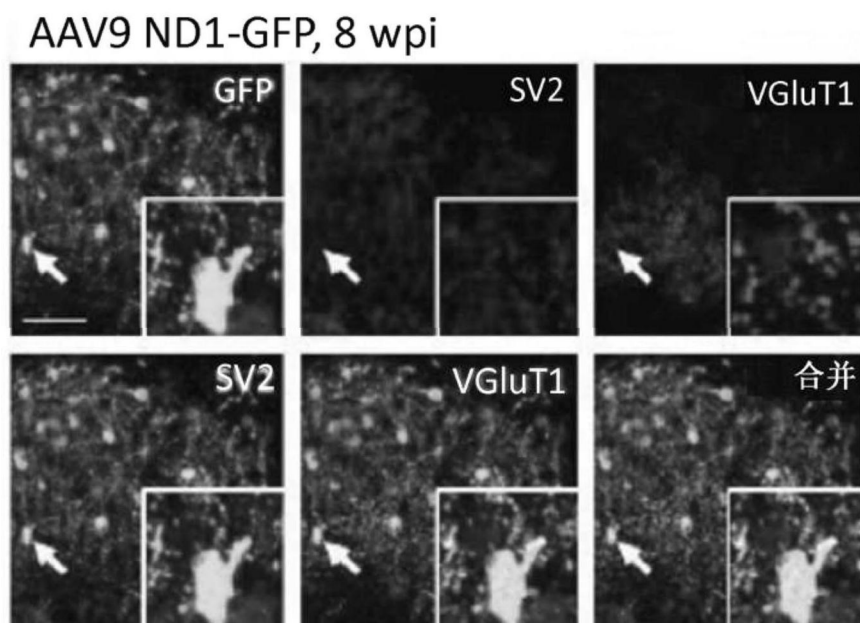


图5G

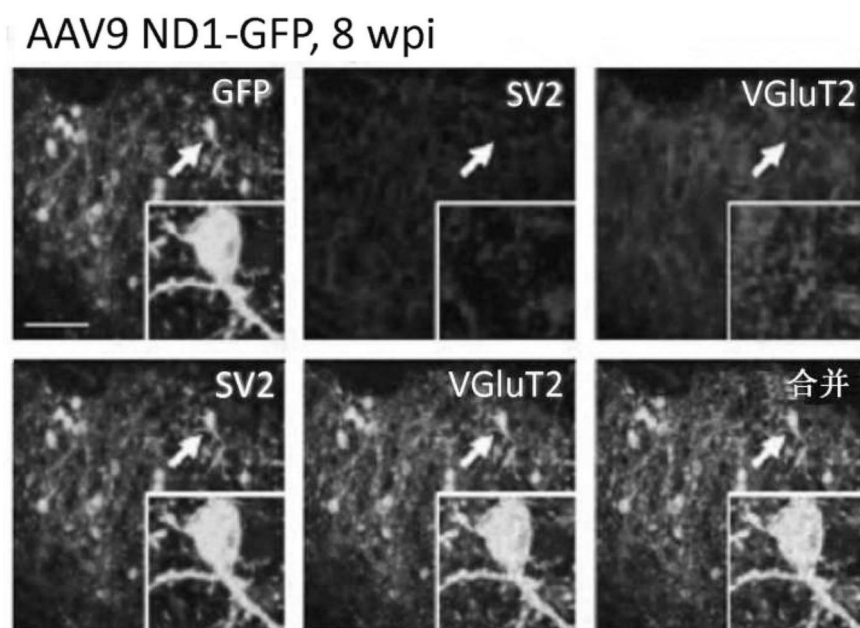


图5H

AAV9 ND1-GFP, 8 wpi

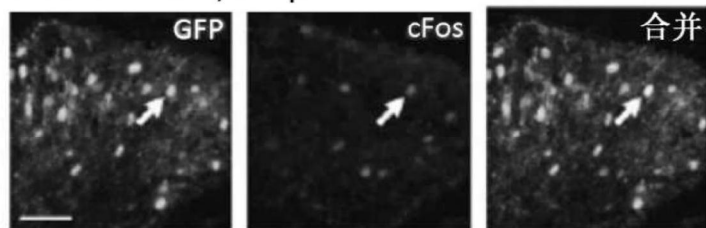


图5I



图6A

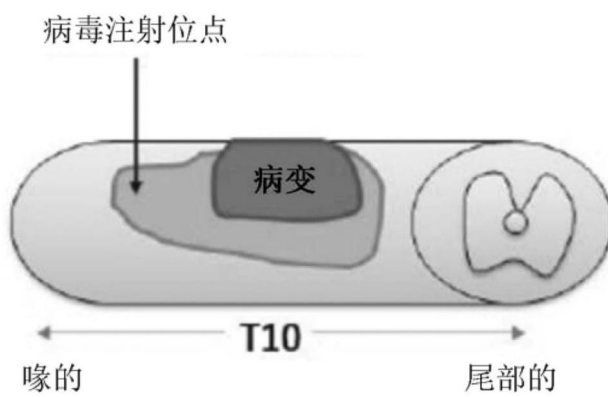


图6B

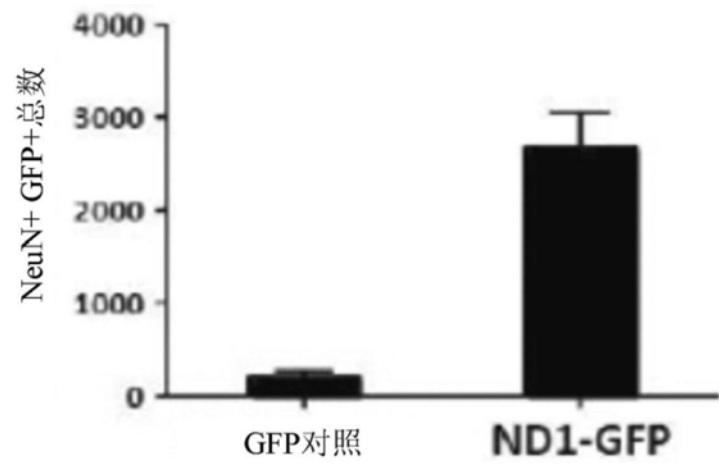


图6D

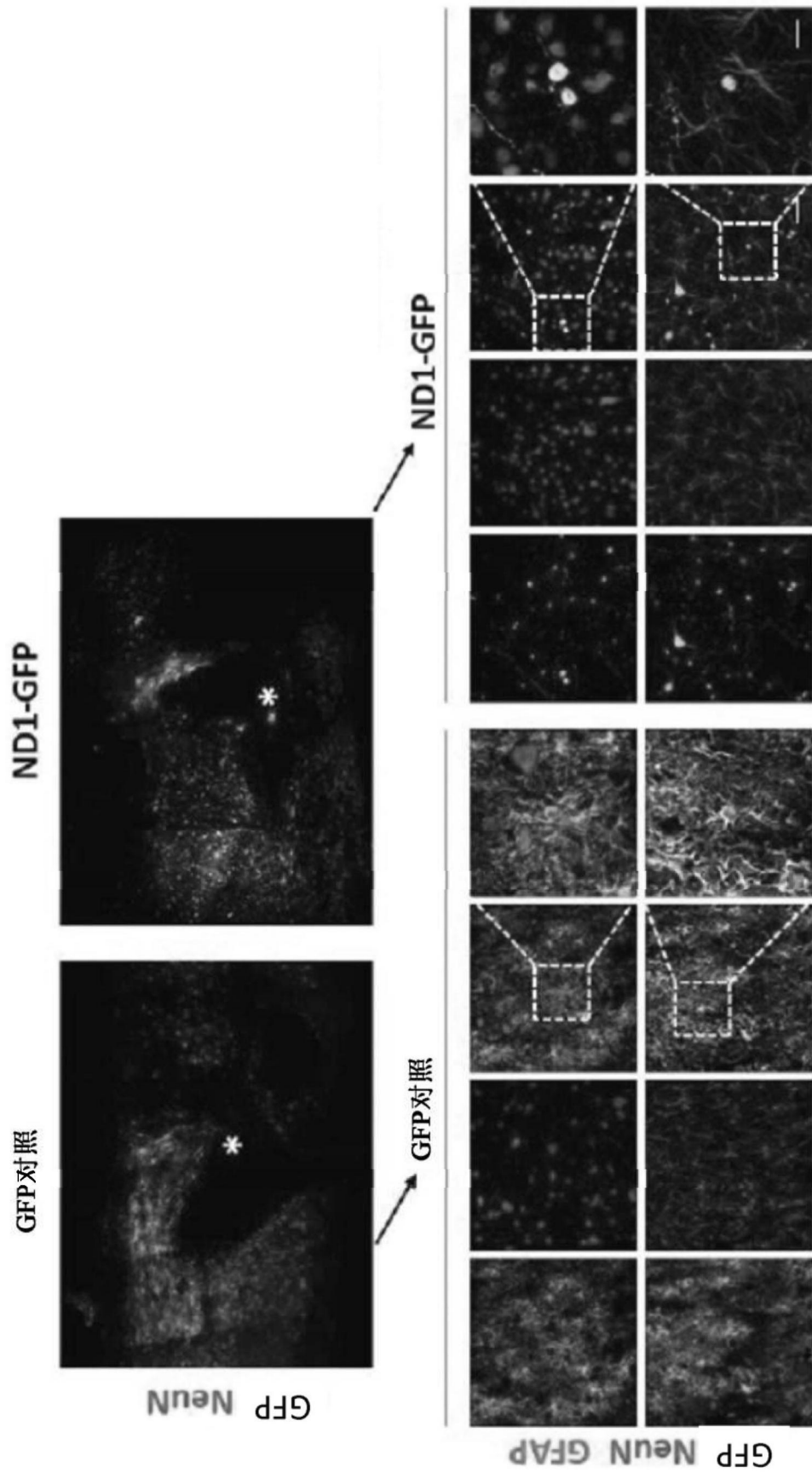


图6C

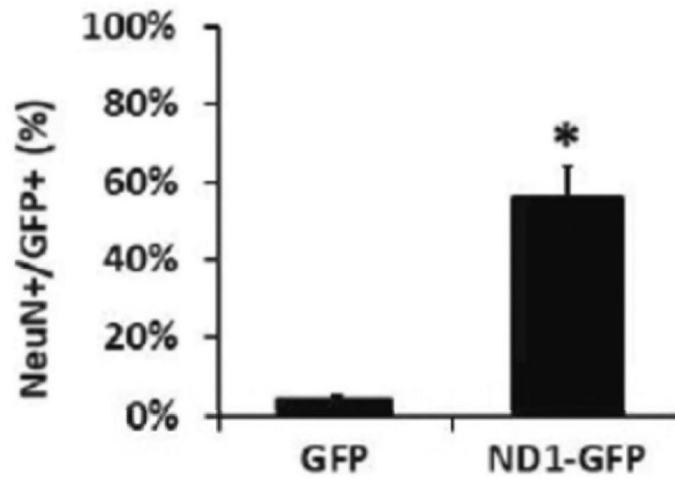


图6E

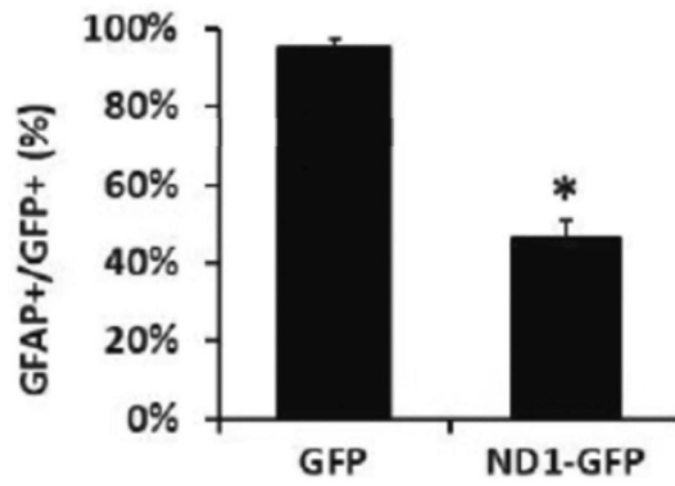


图6F

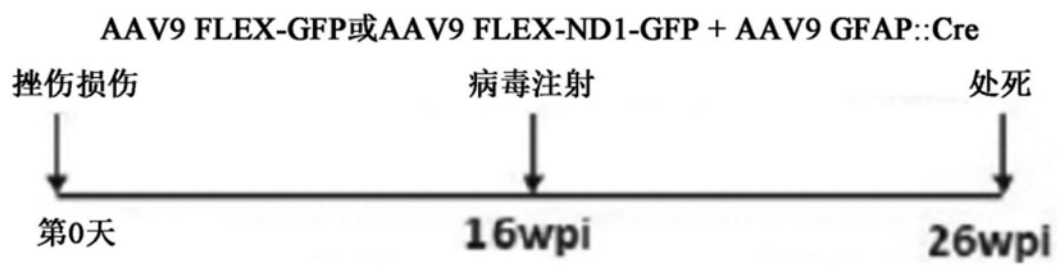


图7A

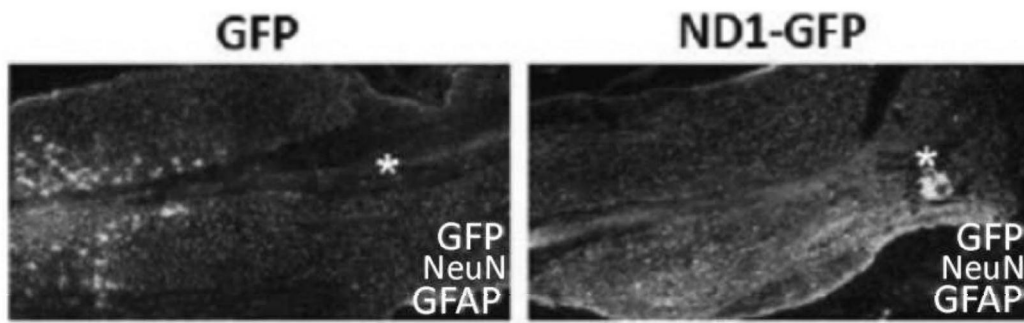


图7B

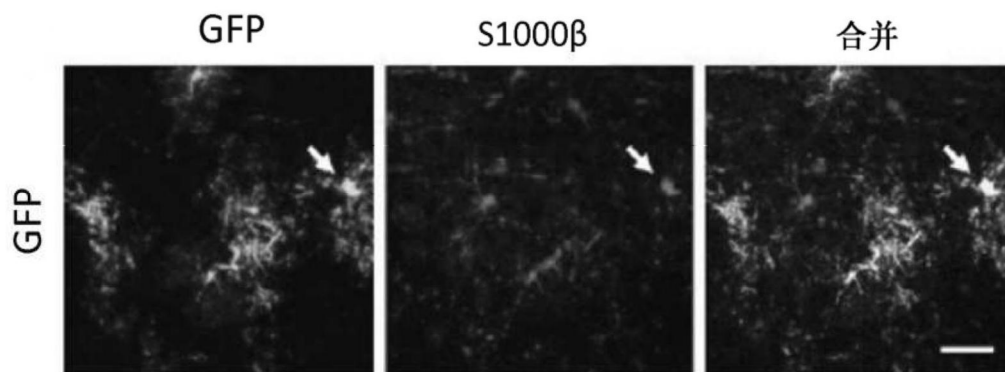


图7C

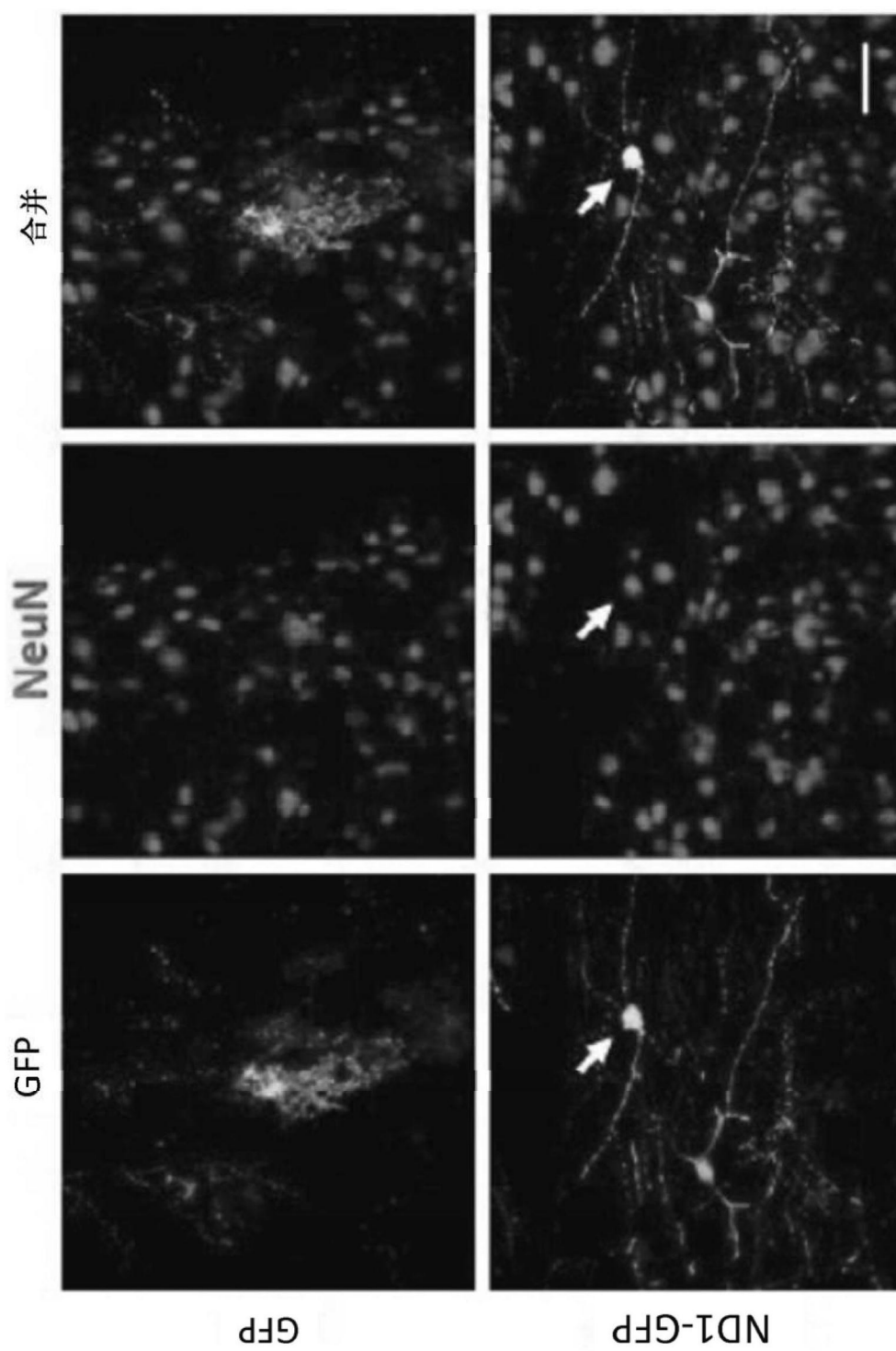


图7D

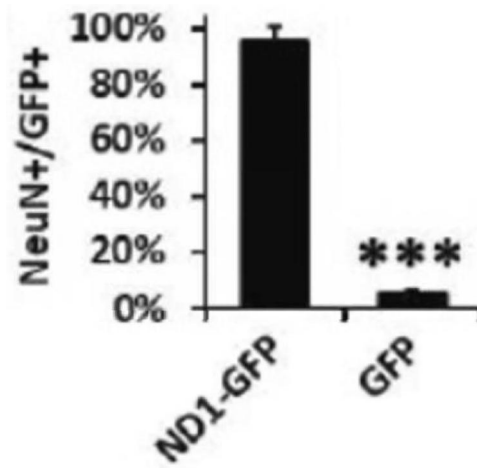


图7E

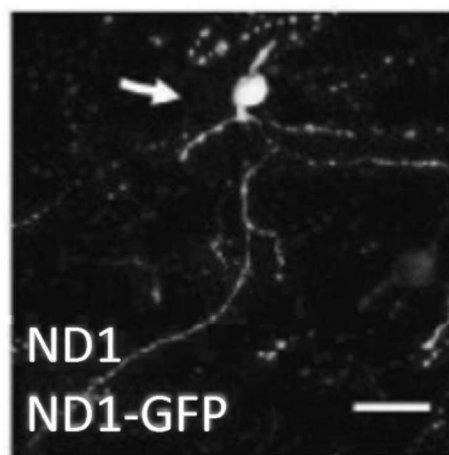


图7F

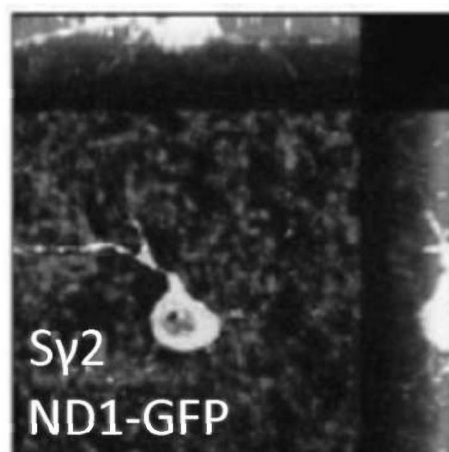


图7G

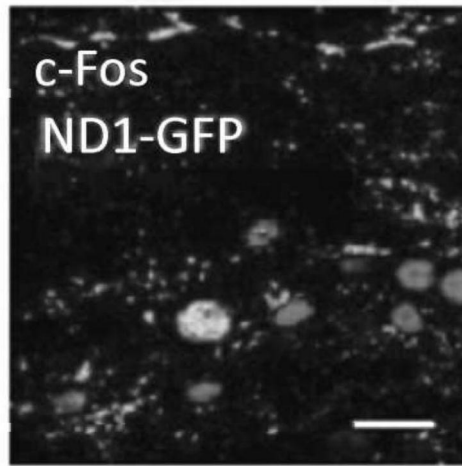


图7H

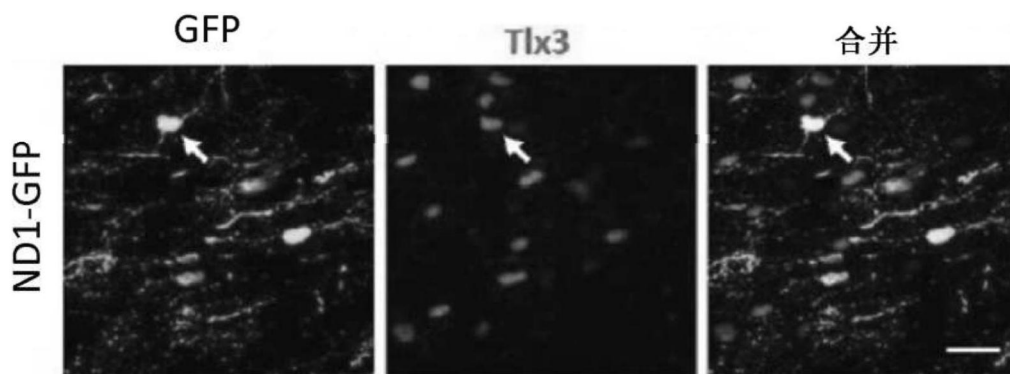


图7I

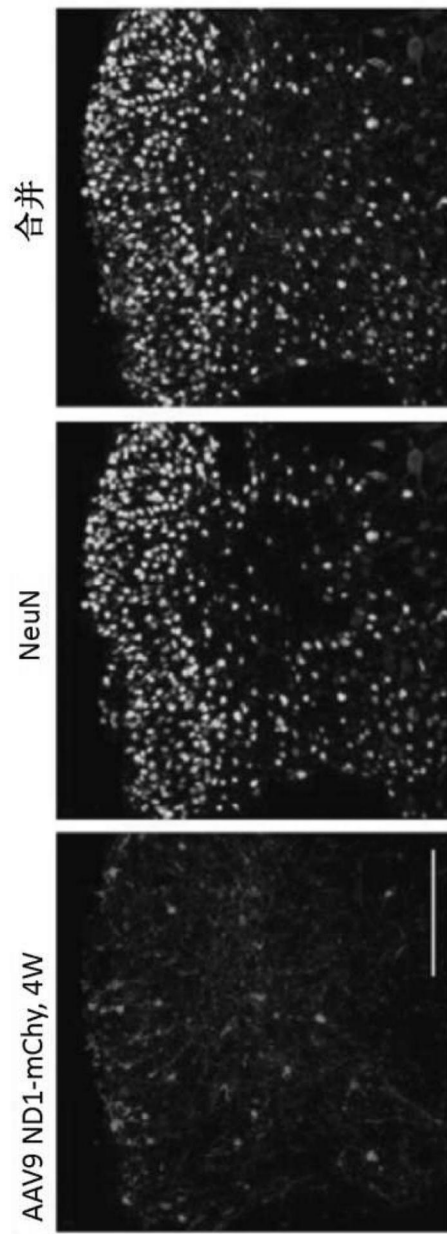


图8A

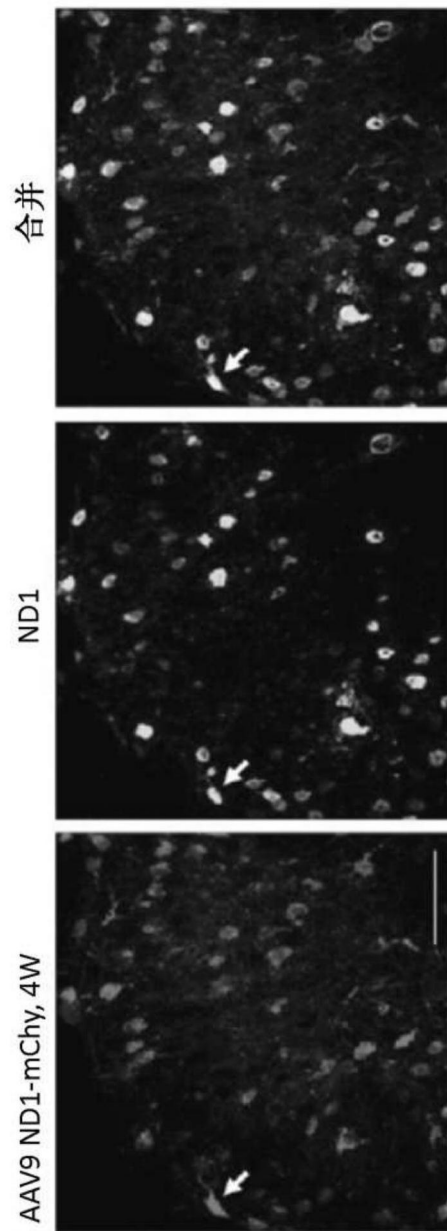


图8B

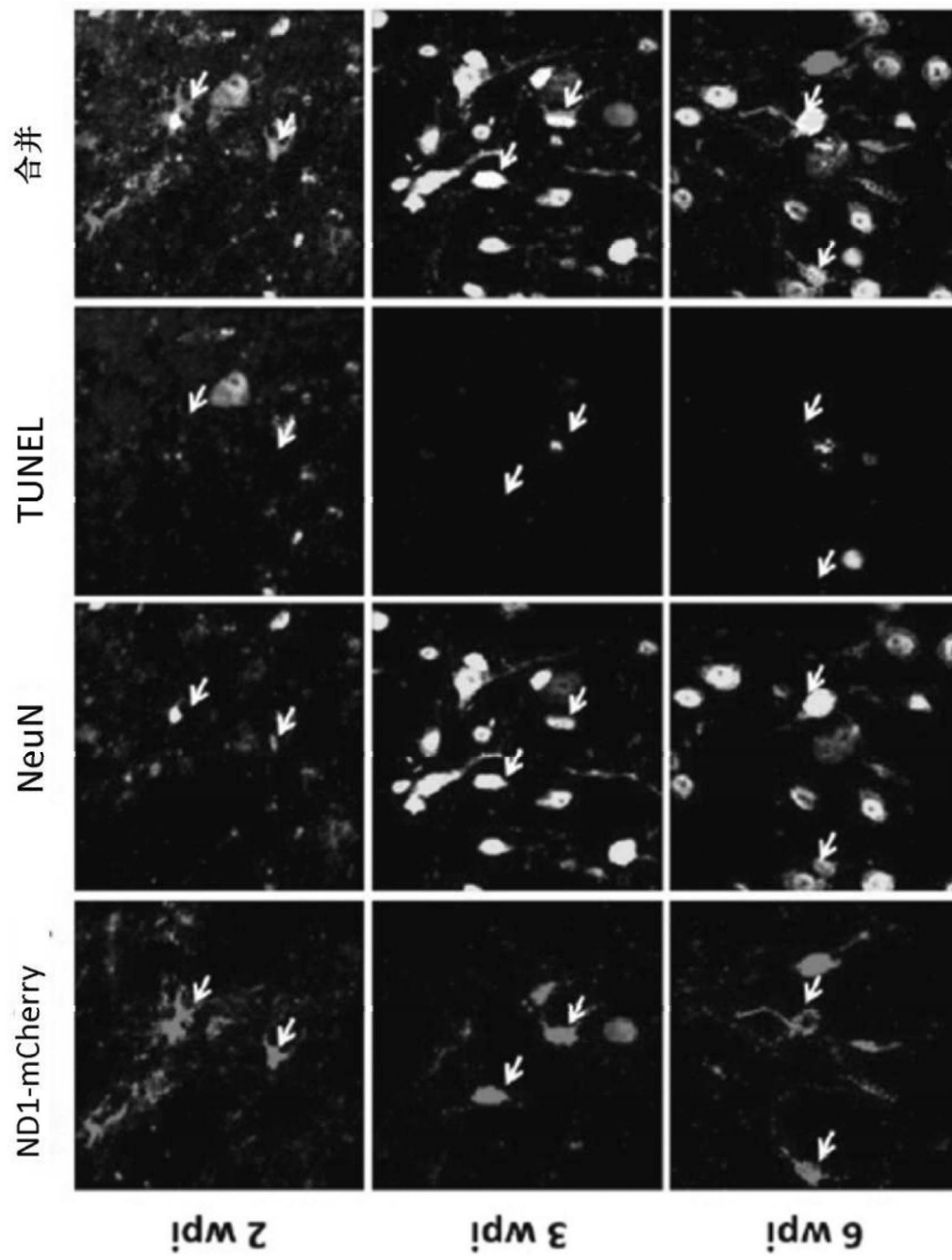


图9

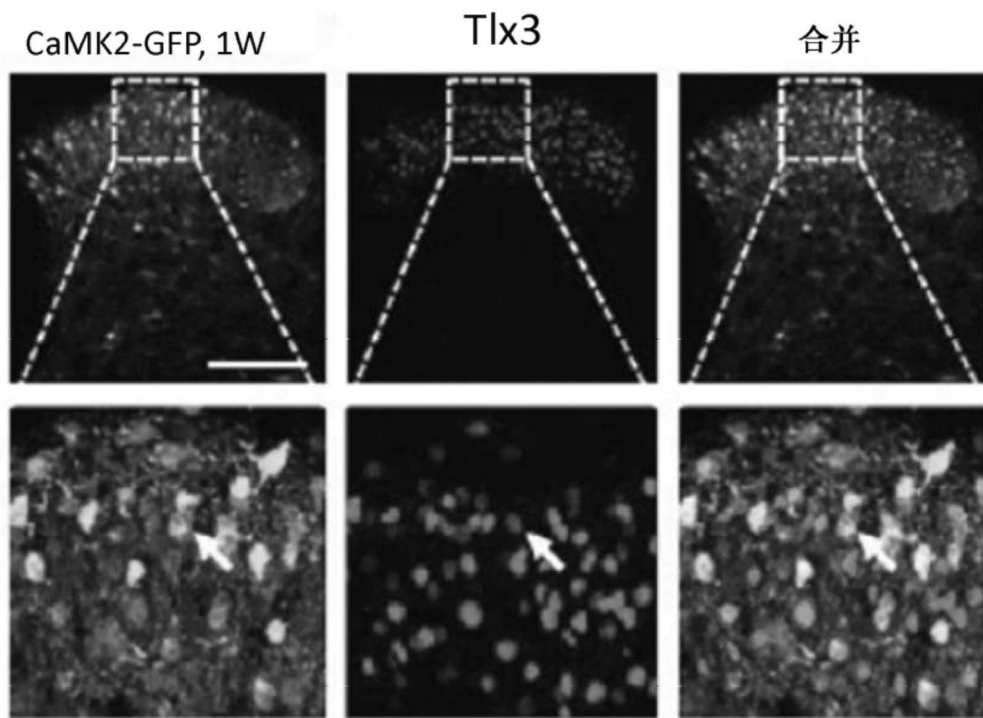


图10A

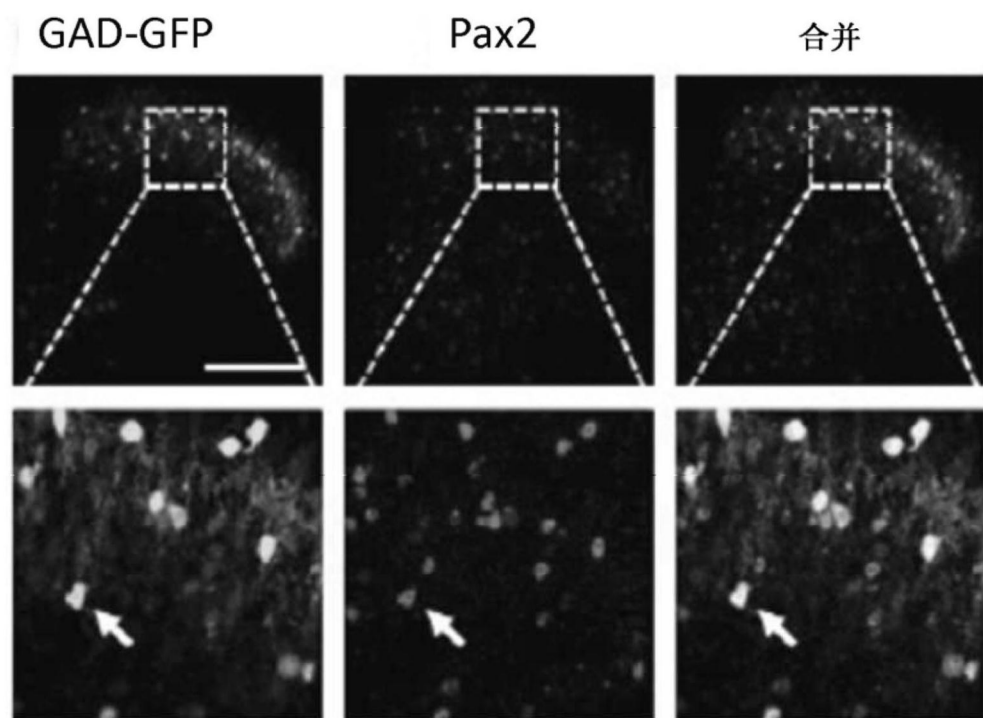


图10B

穿刺损伤和病毒注射

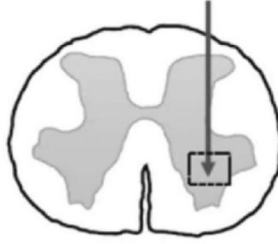


图11A

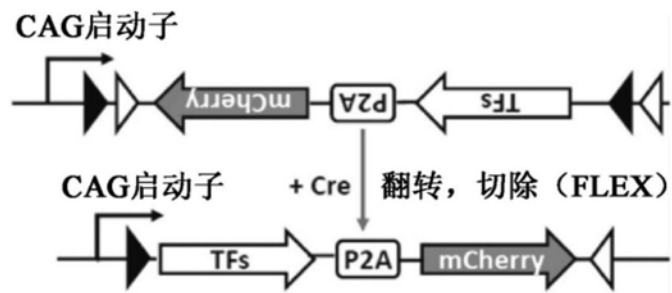


图11B

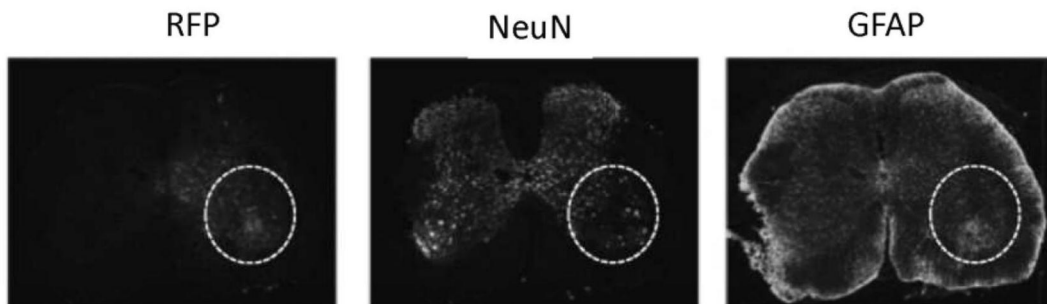


图11C

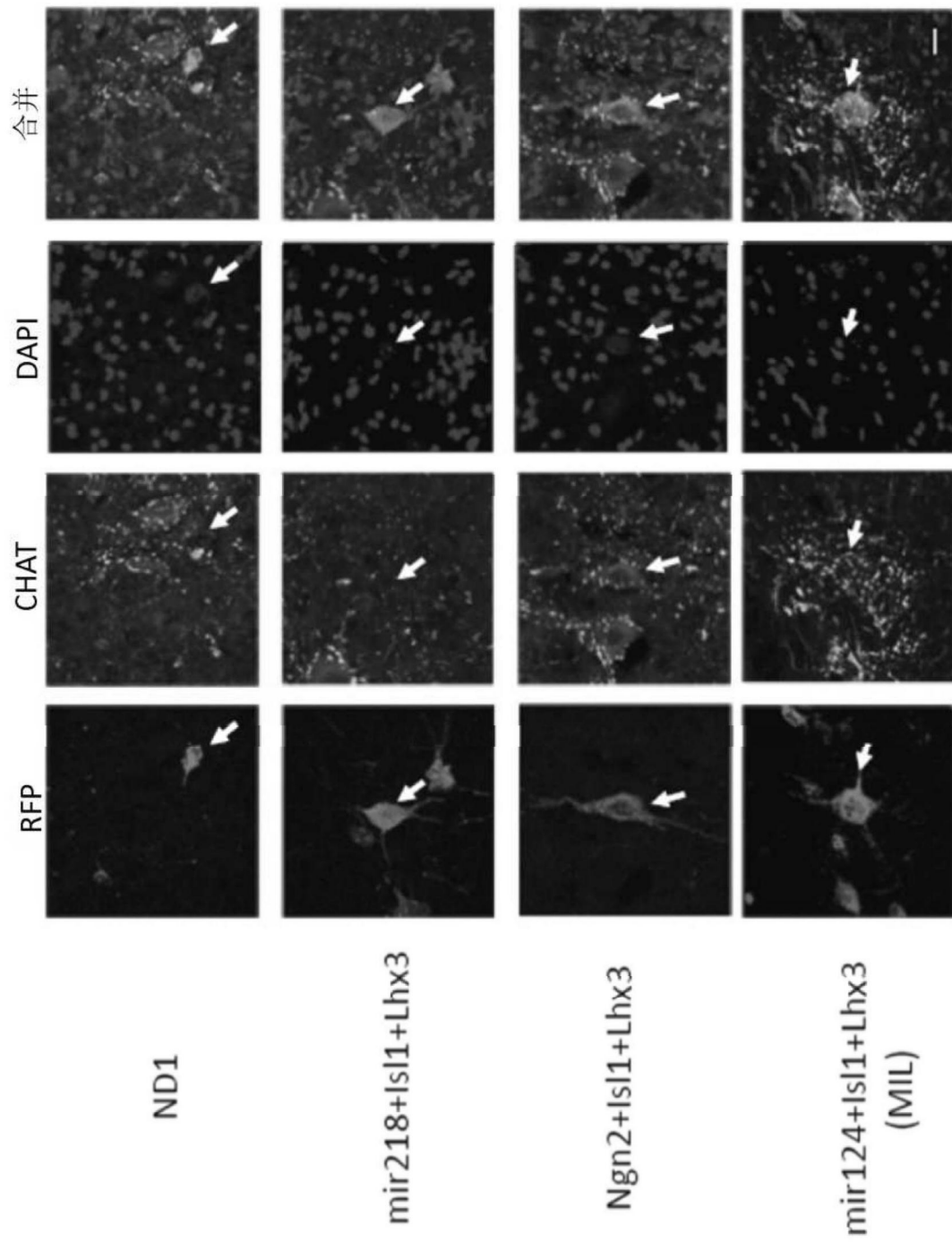


图11D

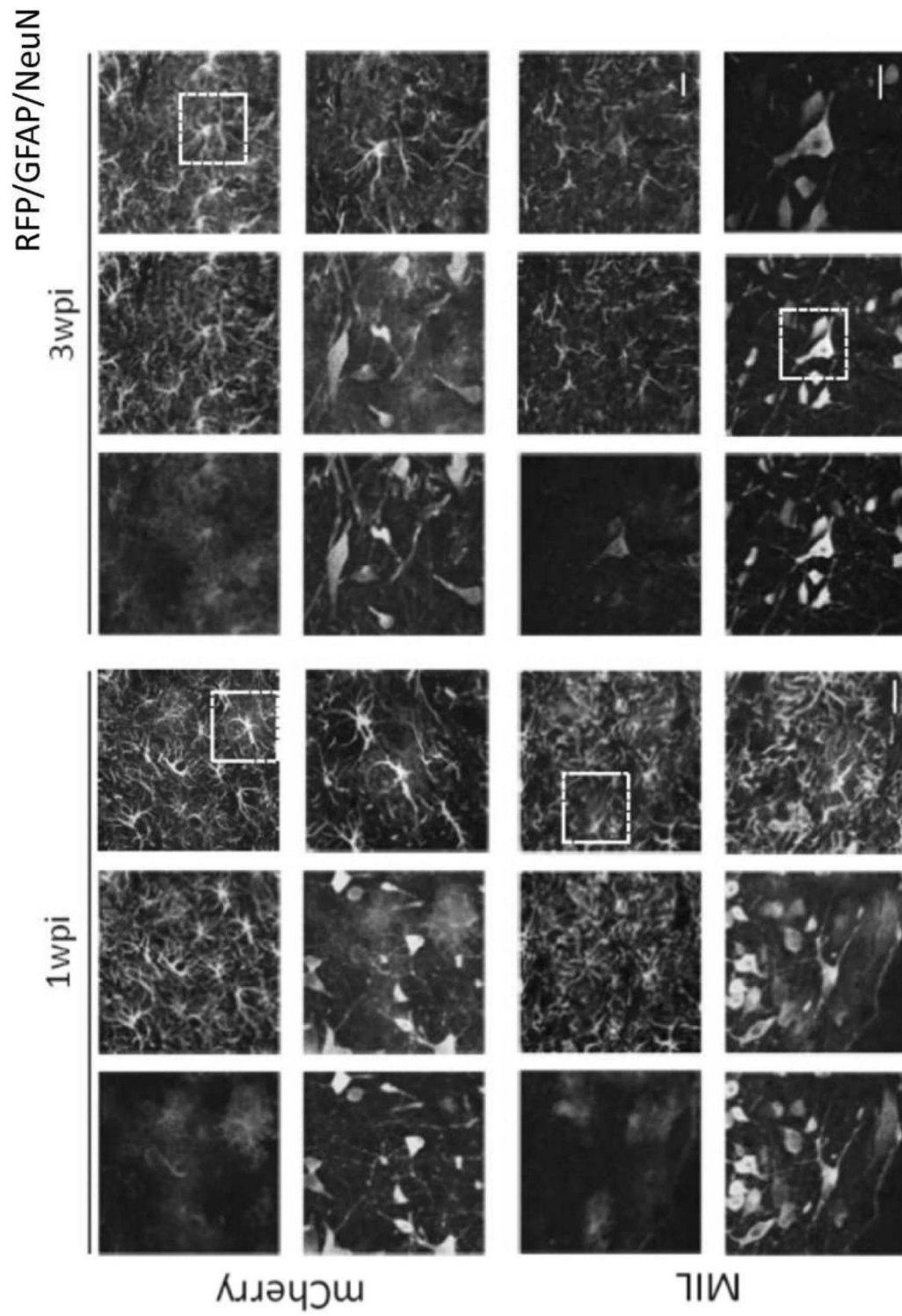


图12A

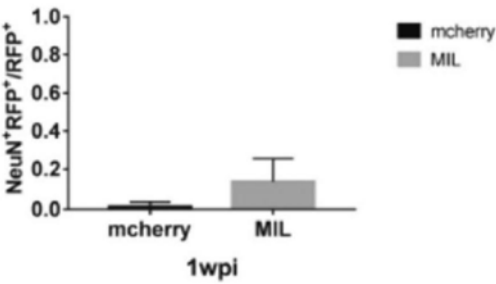


图12B

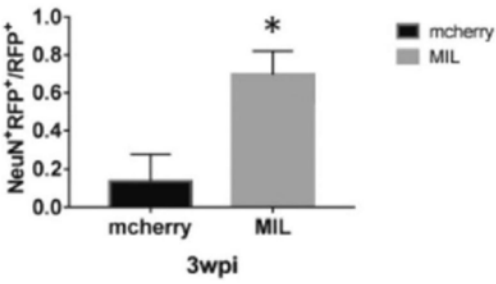


图12C

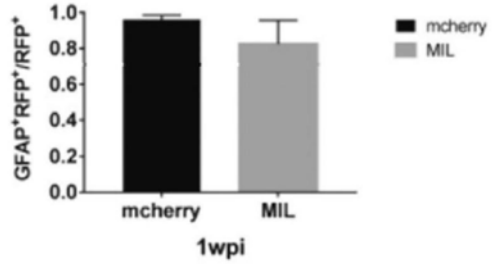


图12D

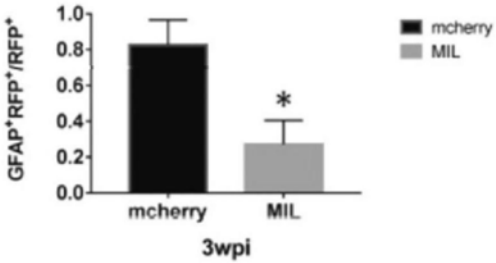
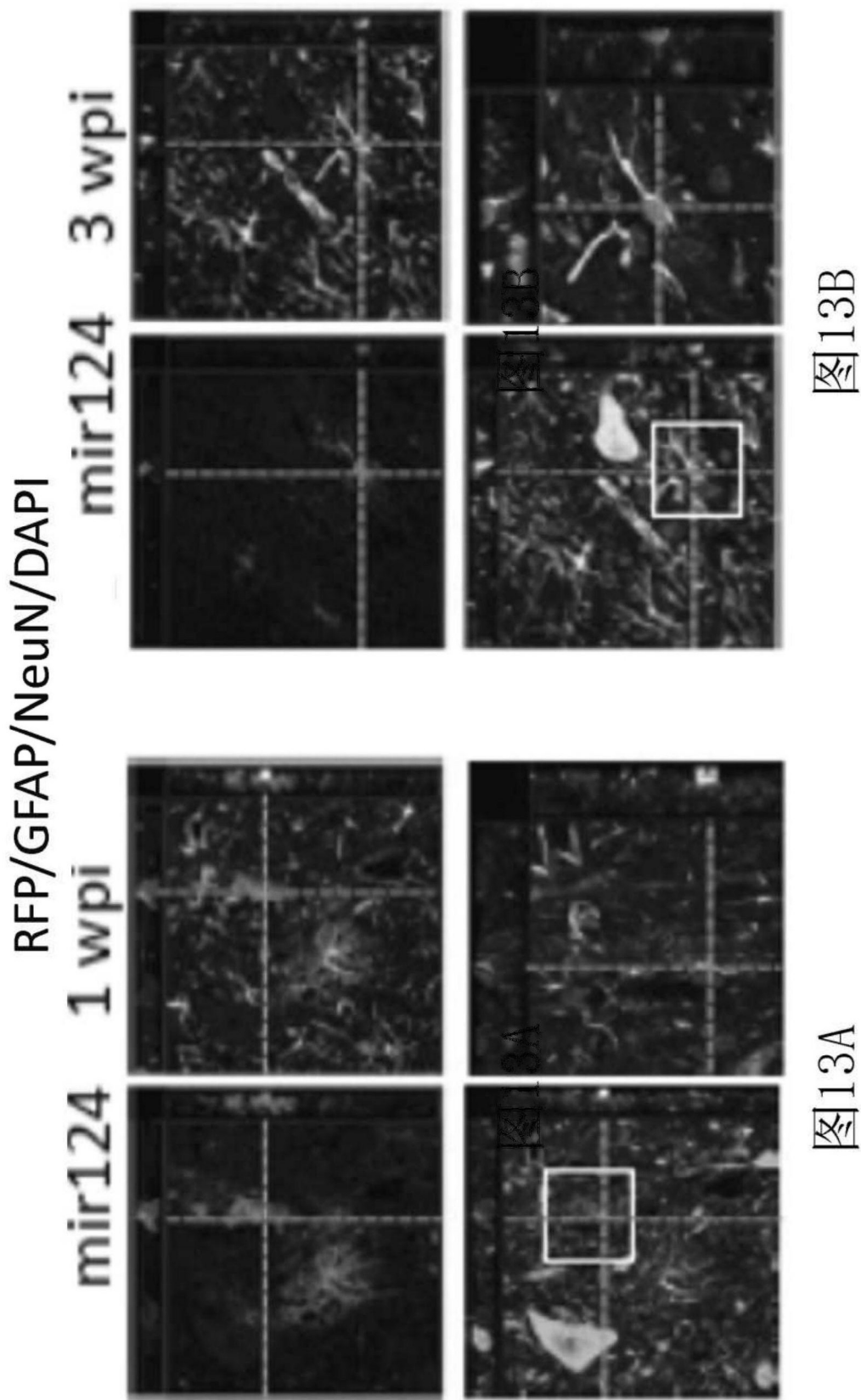
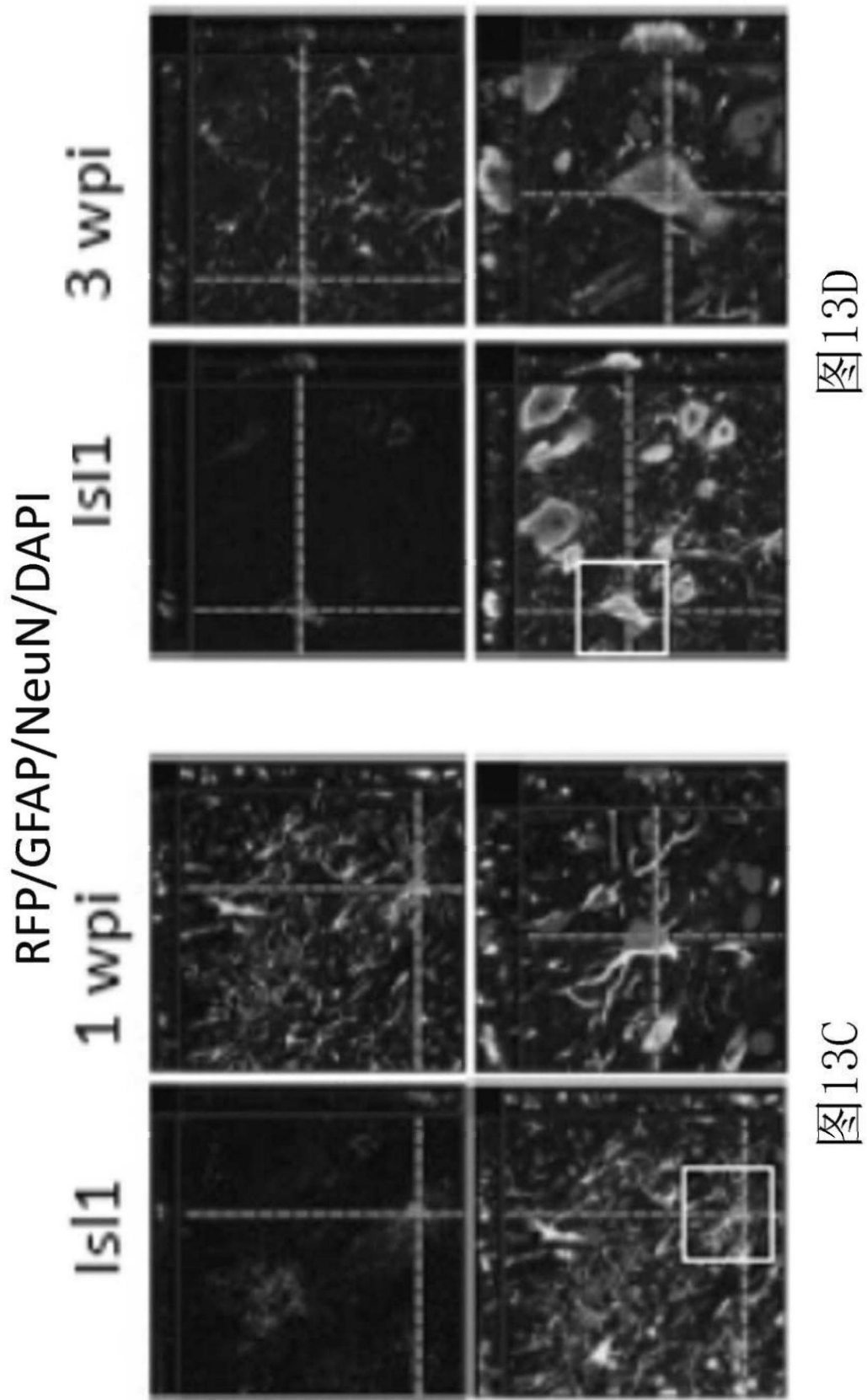


图12E





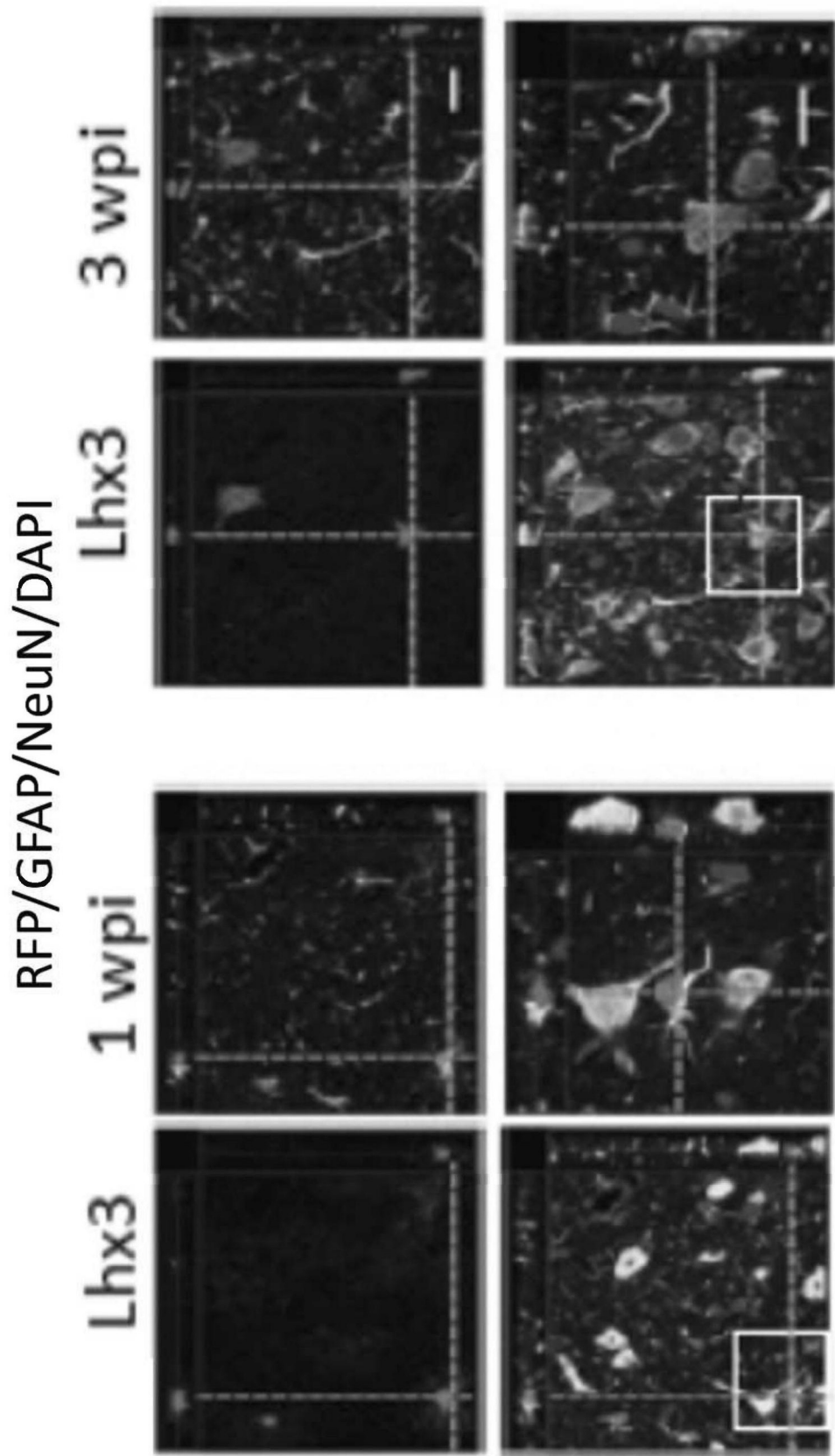


图13F

图13E

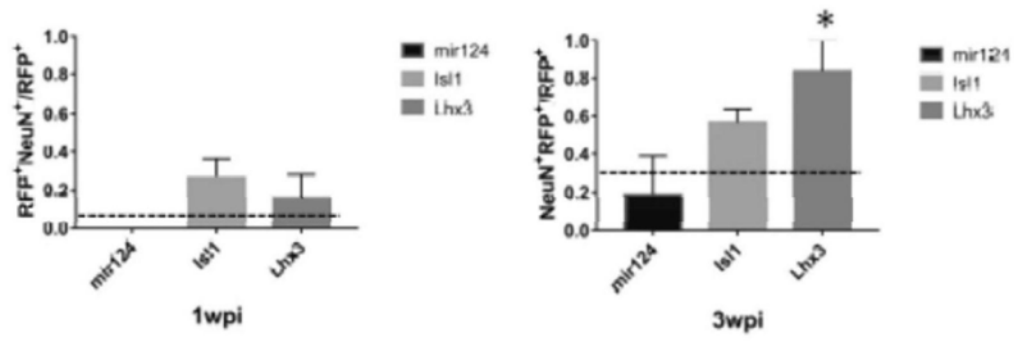


图13G

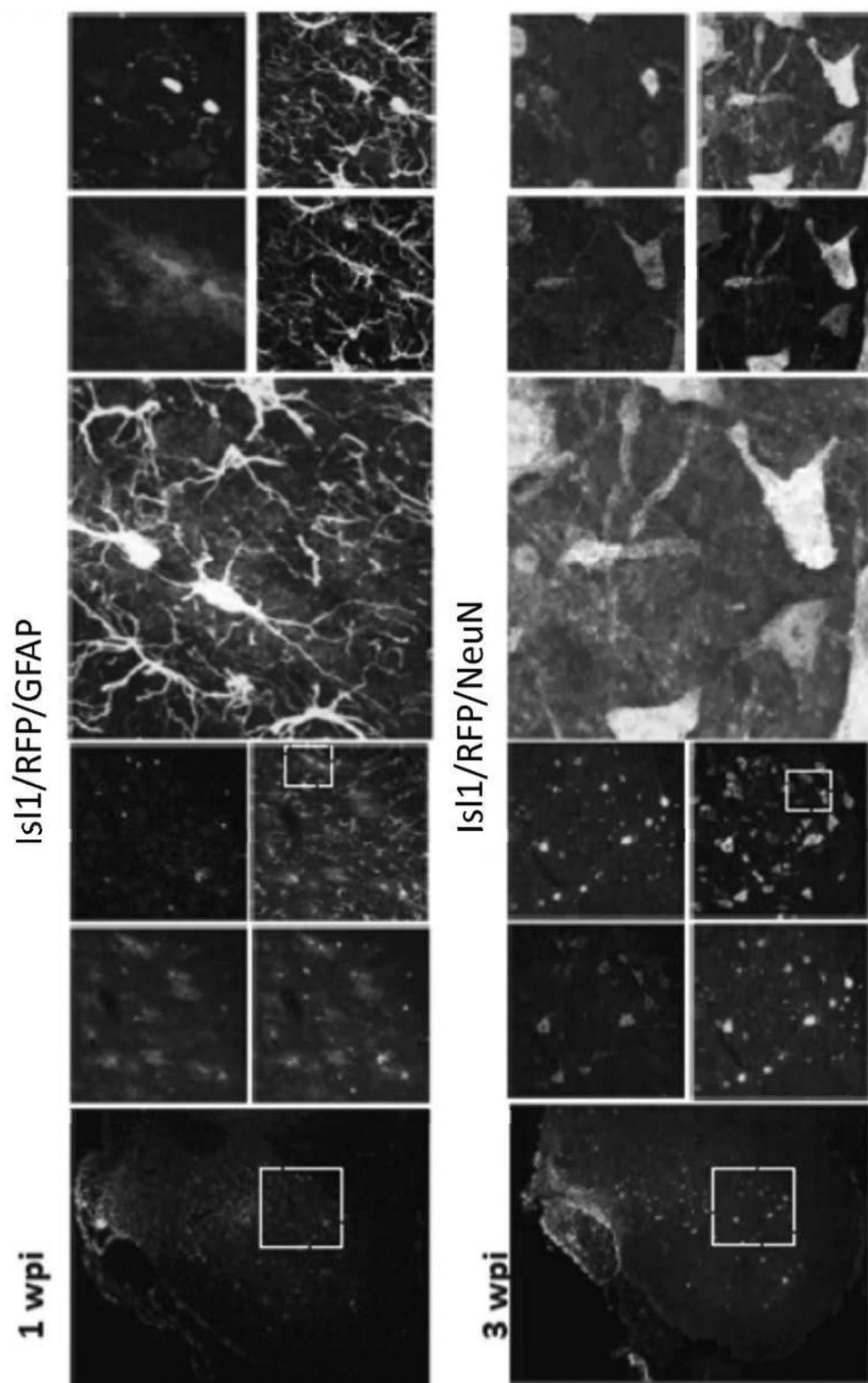


图14A

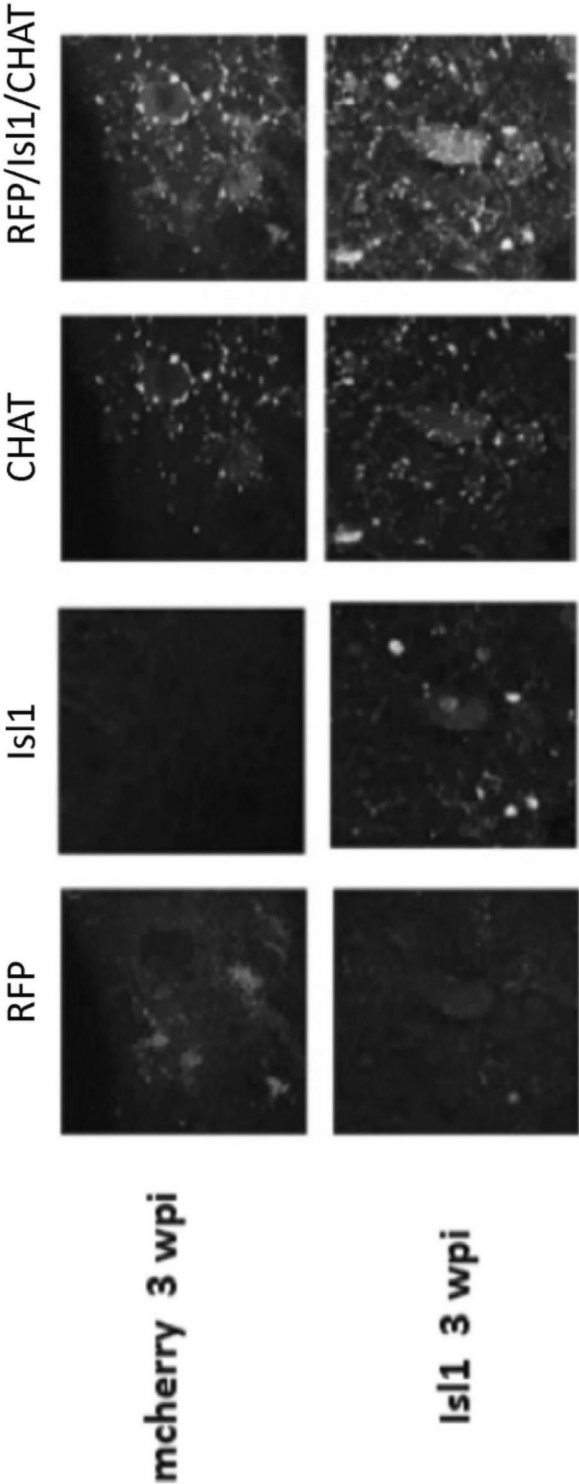


图14B

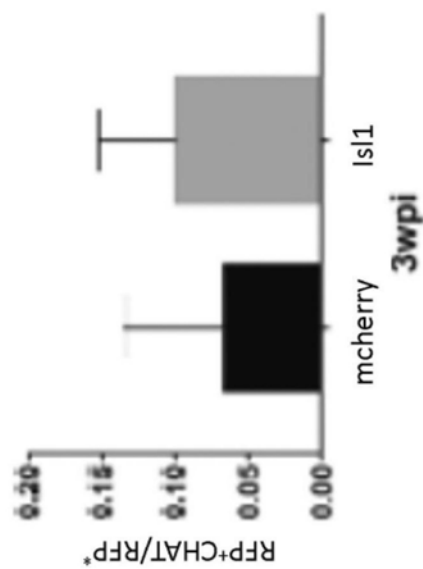


图14C

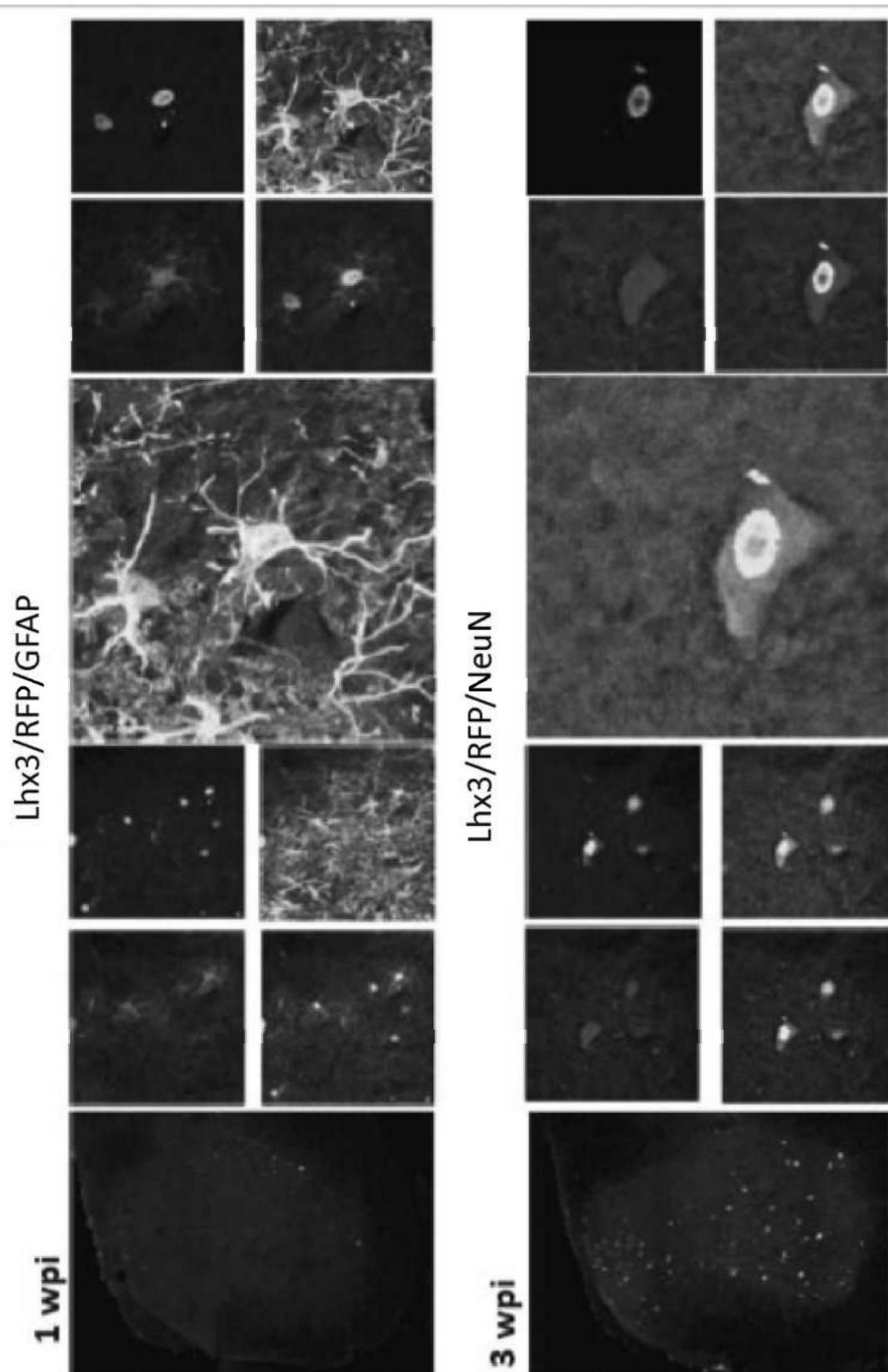


图15A

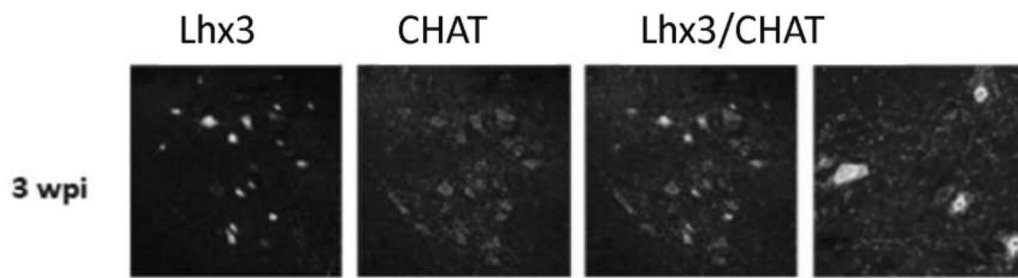


图15B

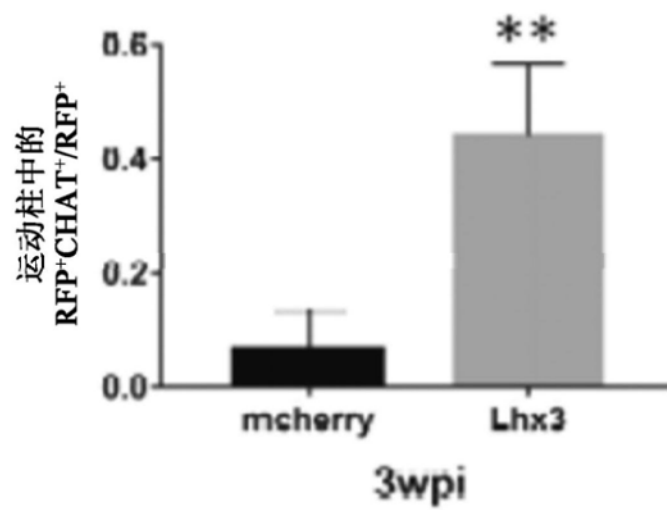


图15C

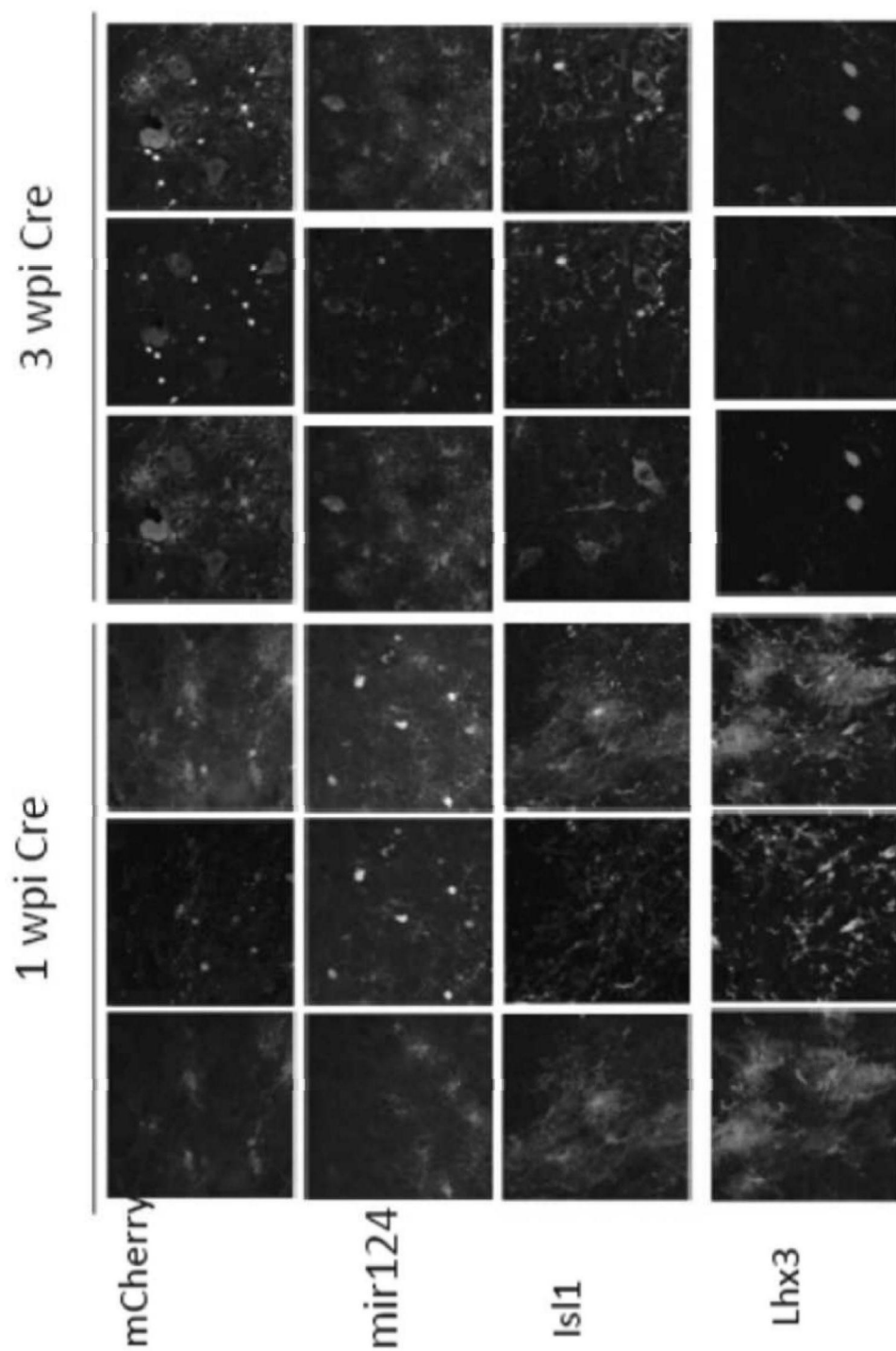


图16

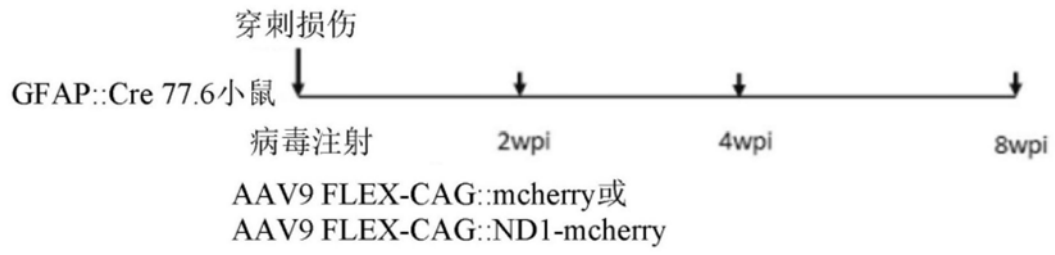


图17A

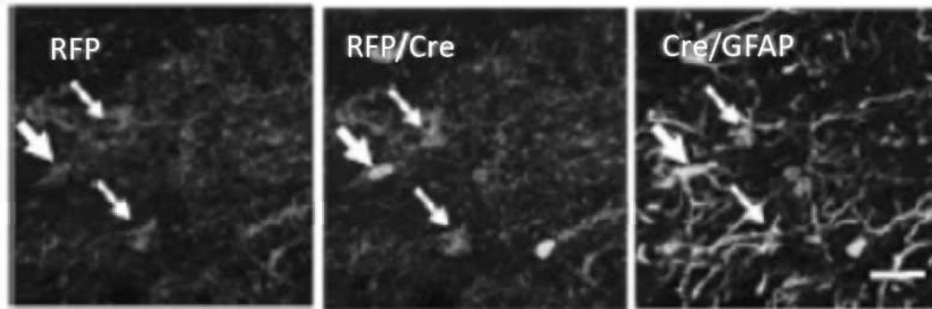


图17B

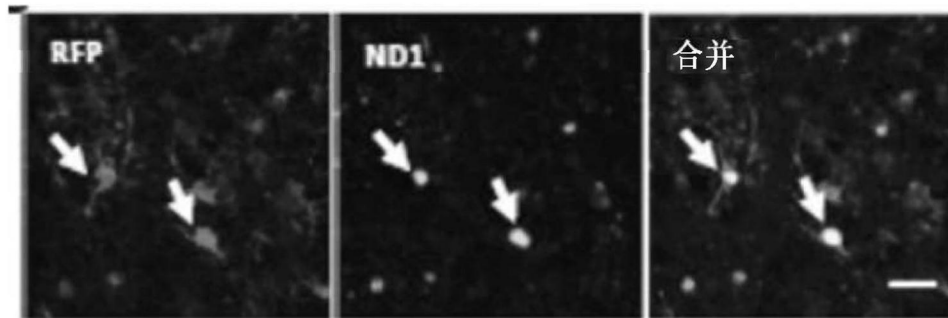


图17C

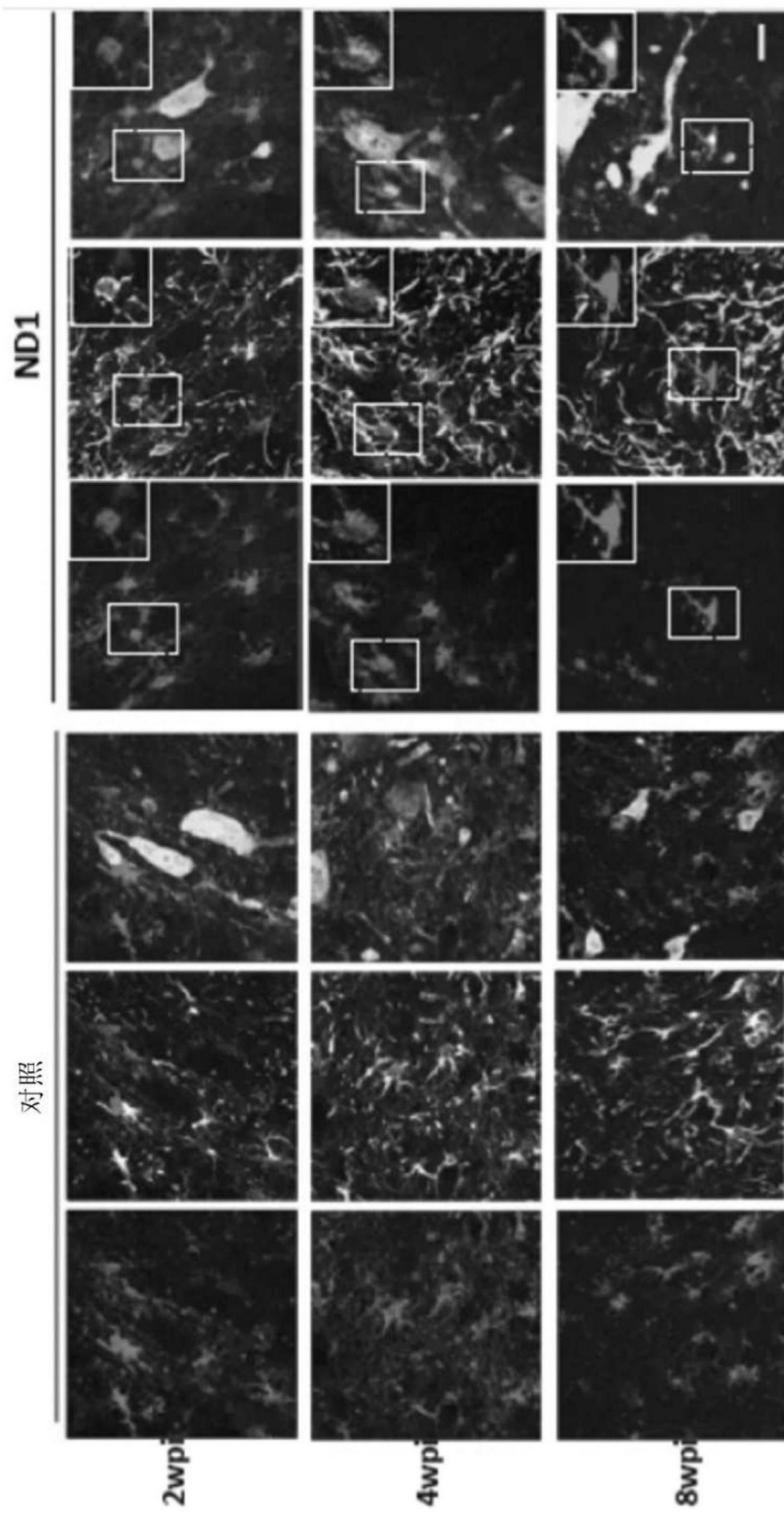


图17D

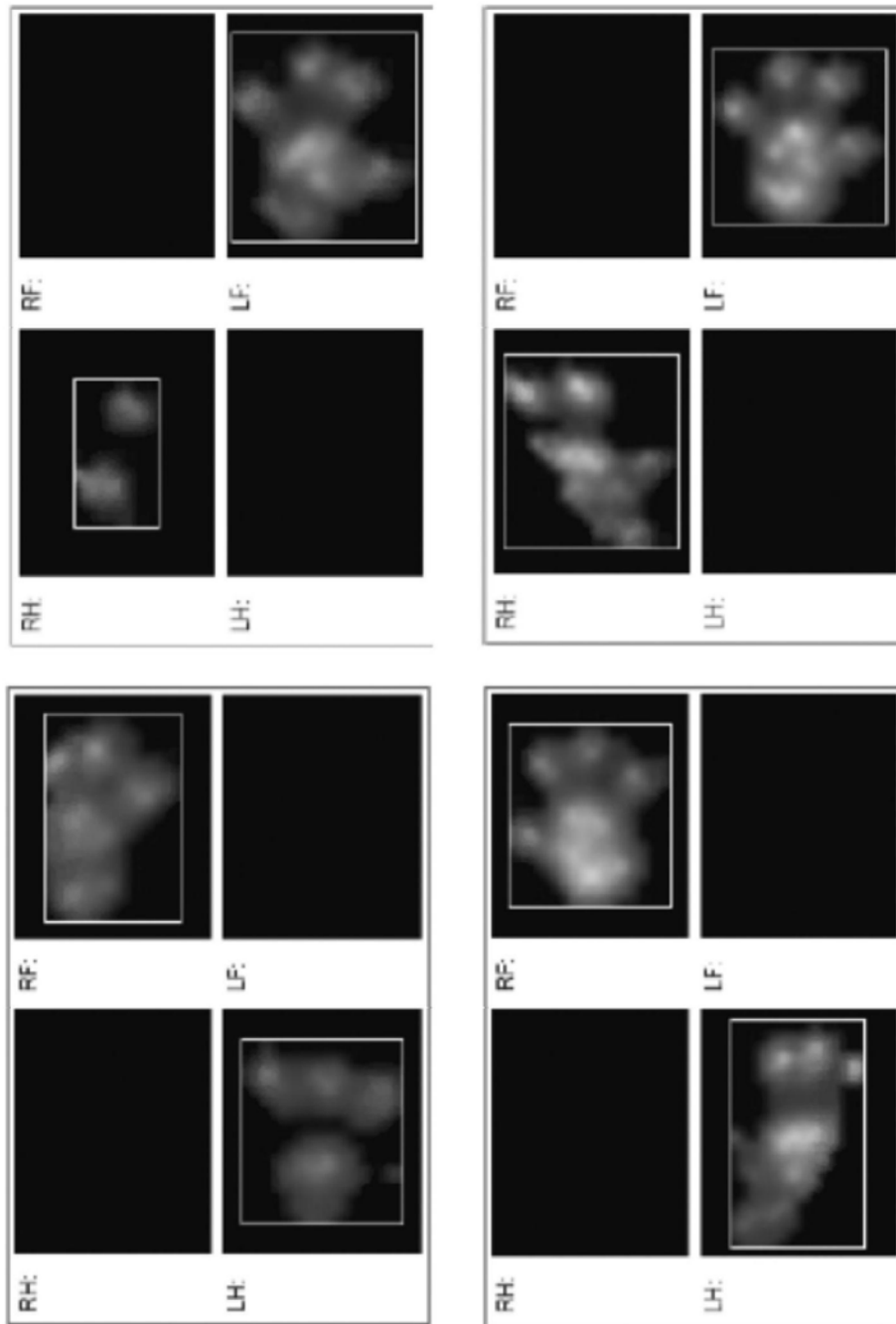


图18A

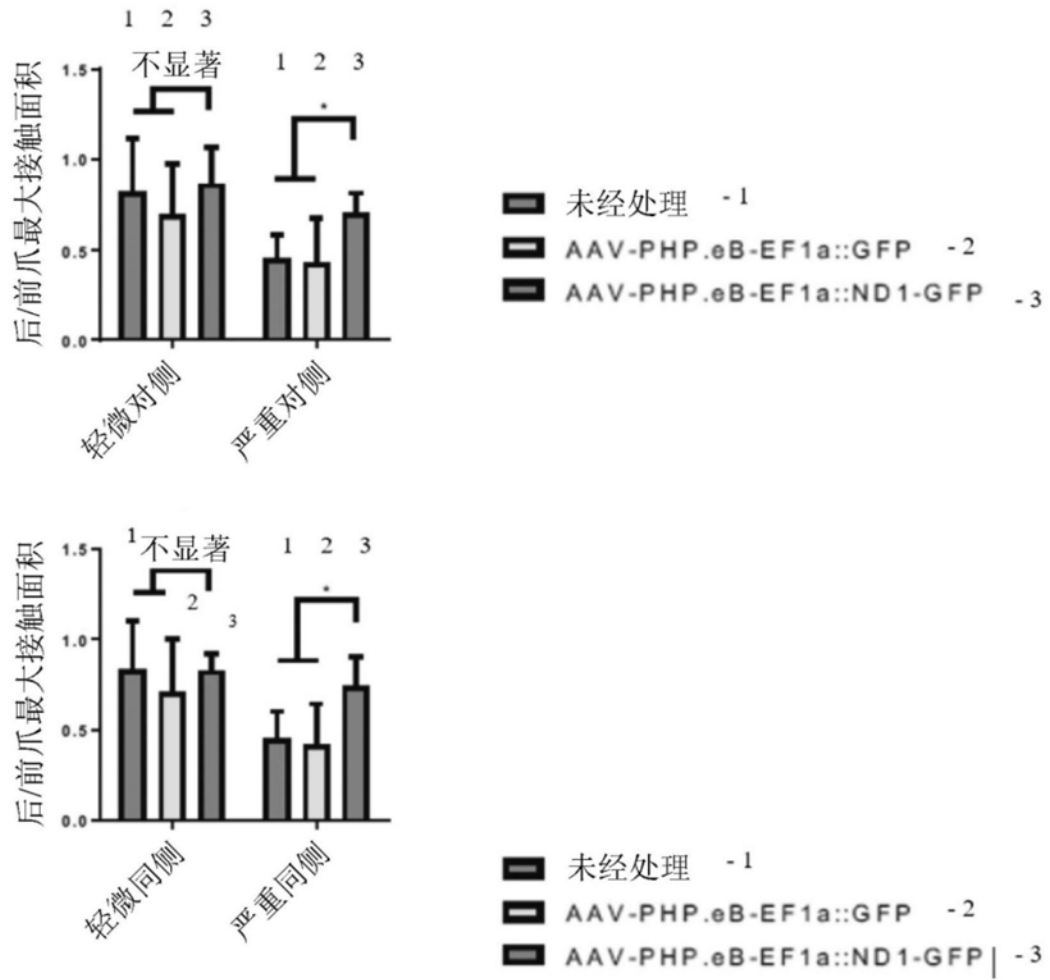


图18B

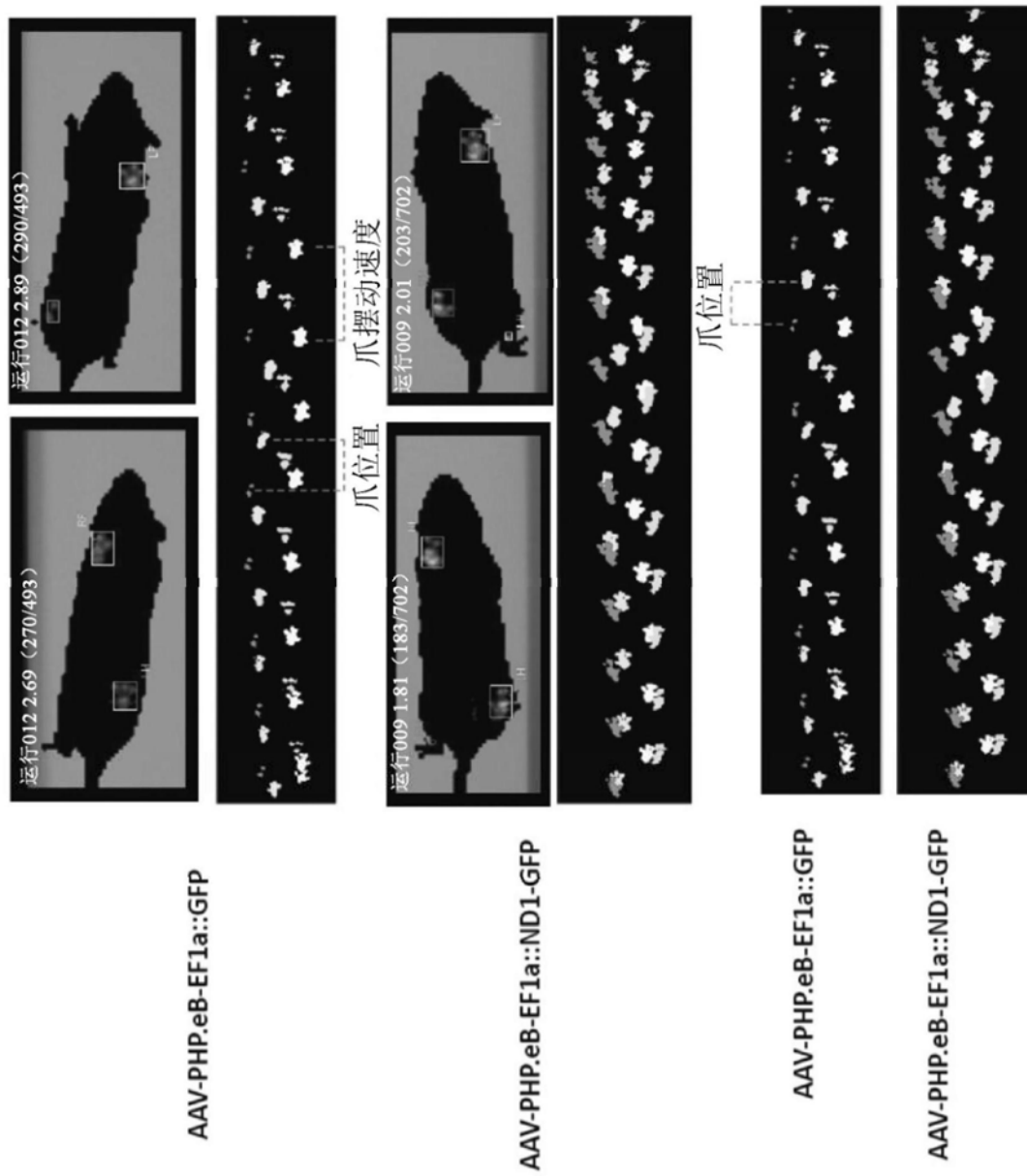


图19

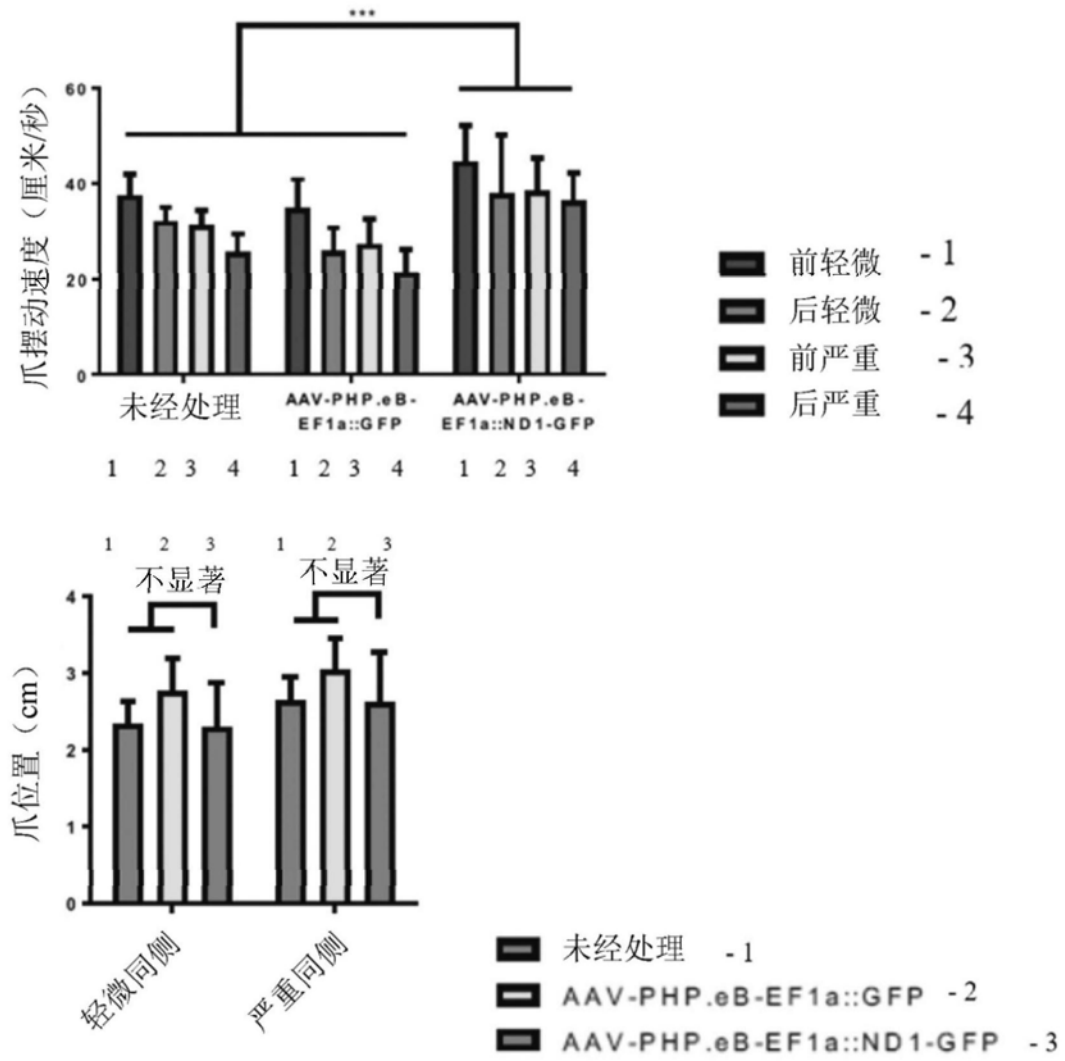


图20

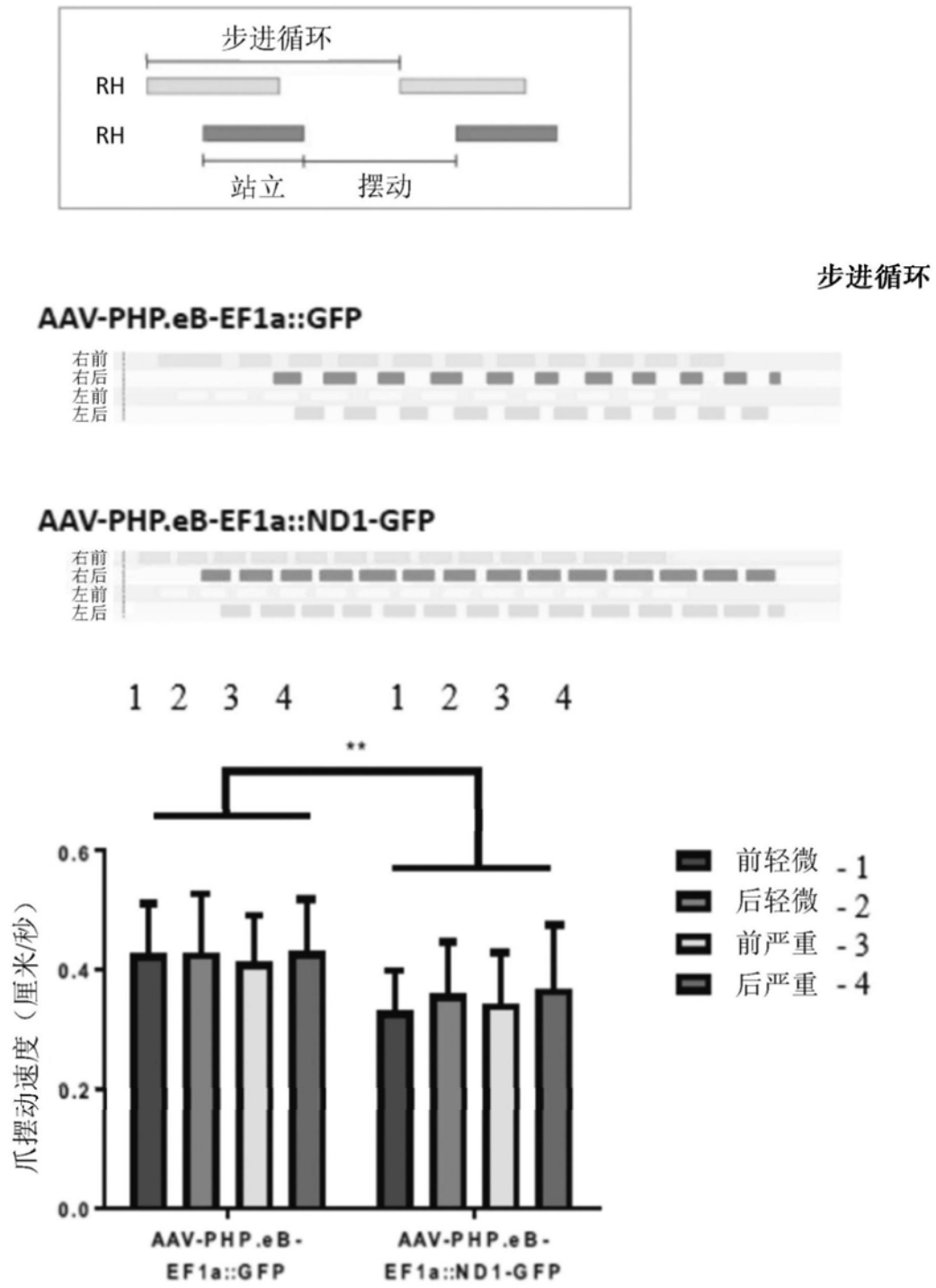


图21

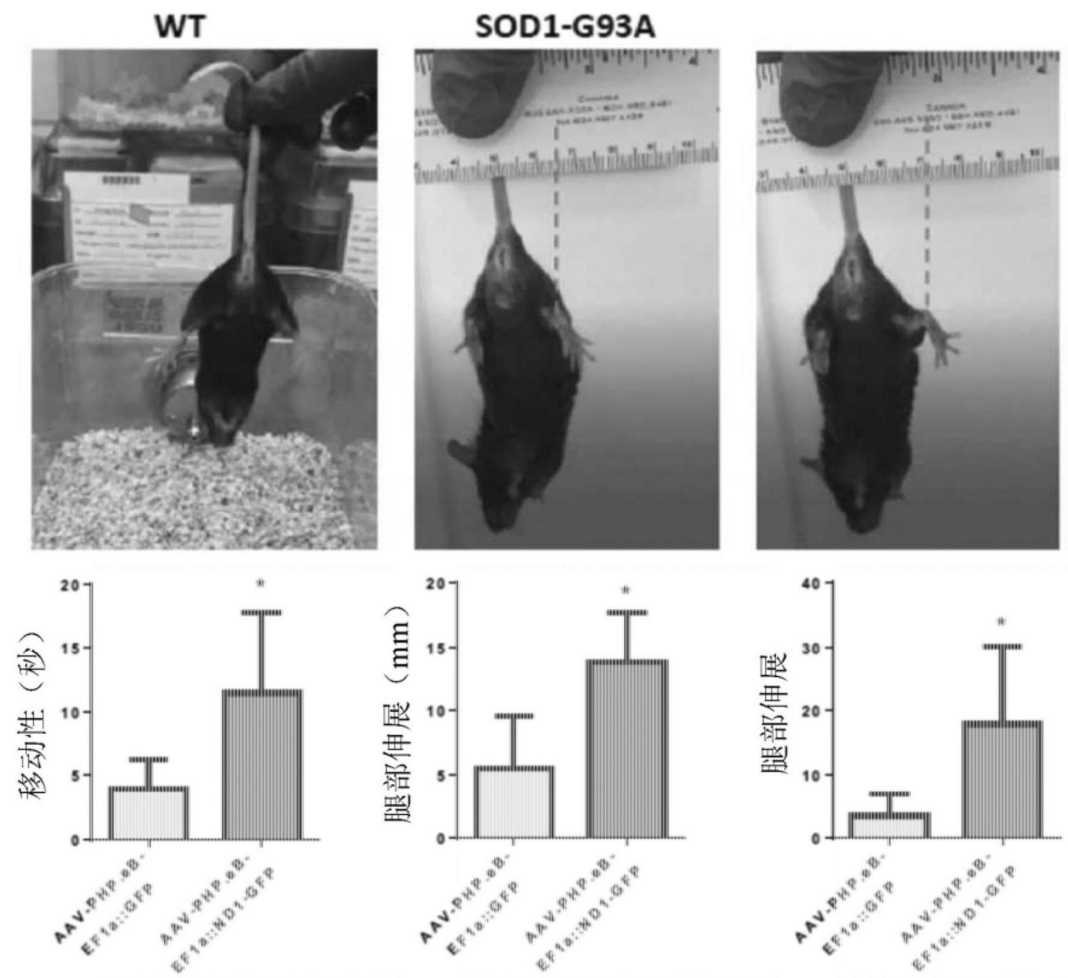


图22

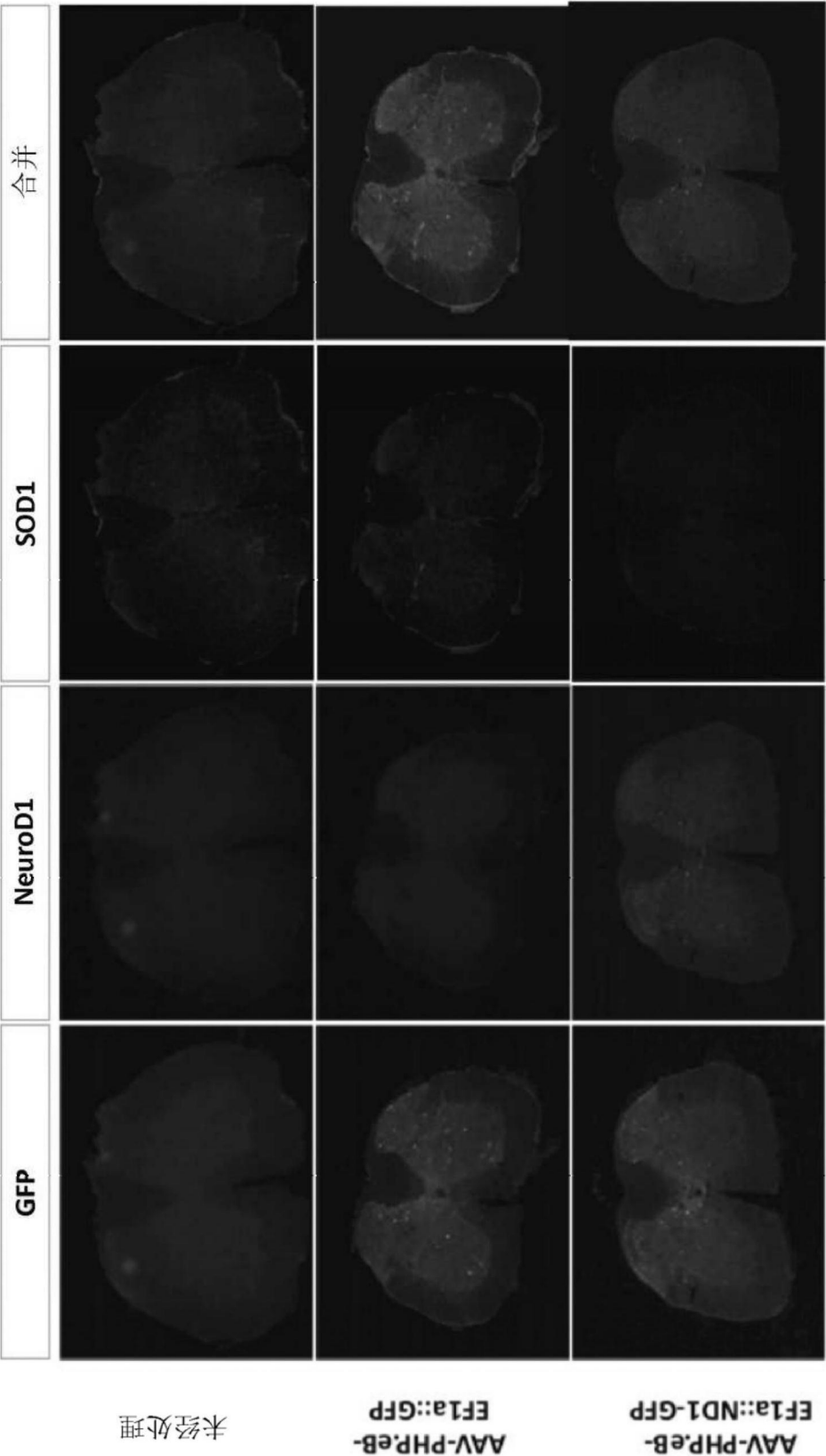


图23A

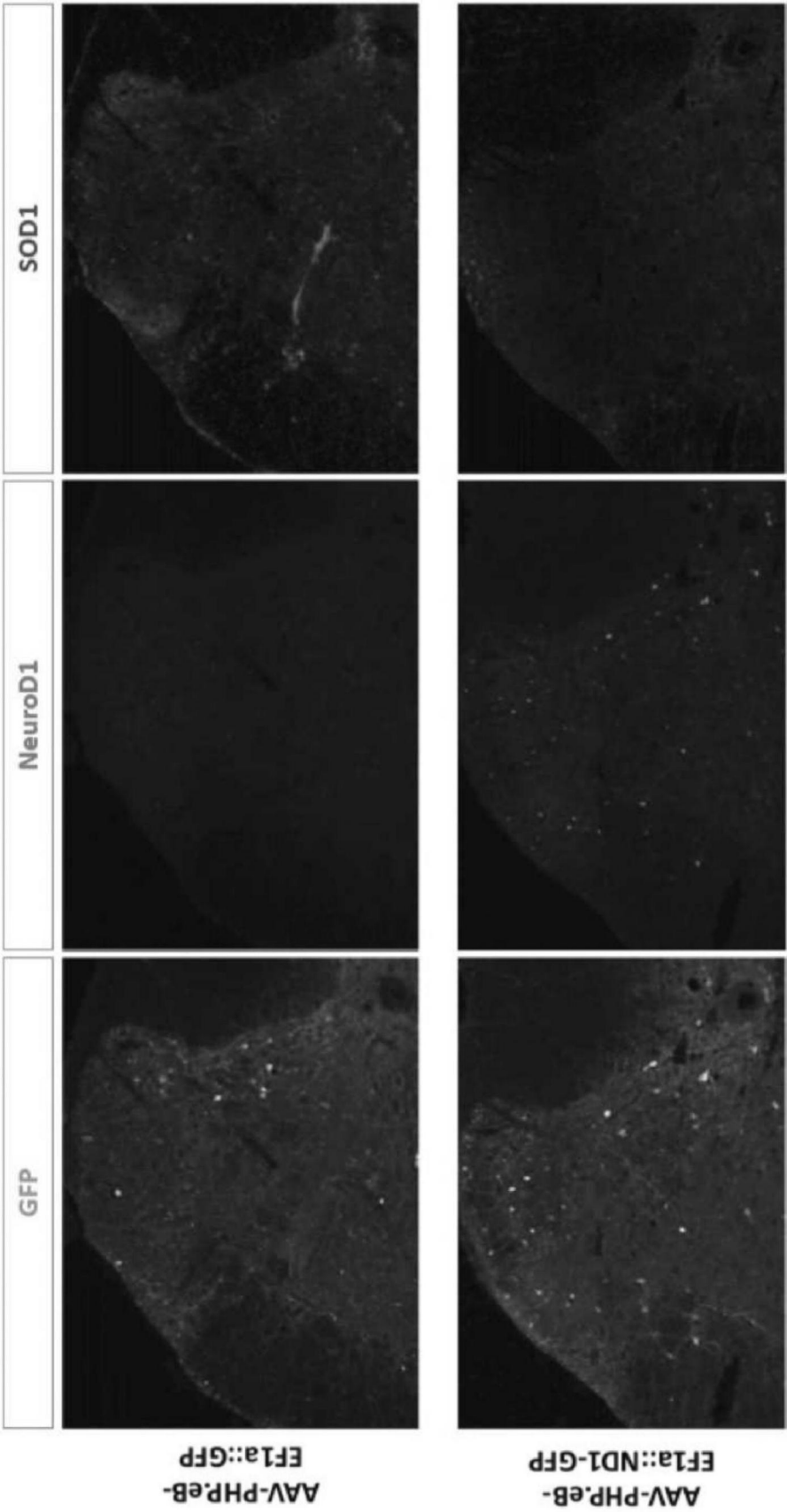


图23B

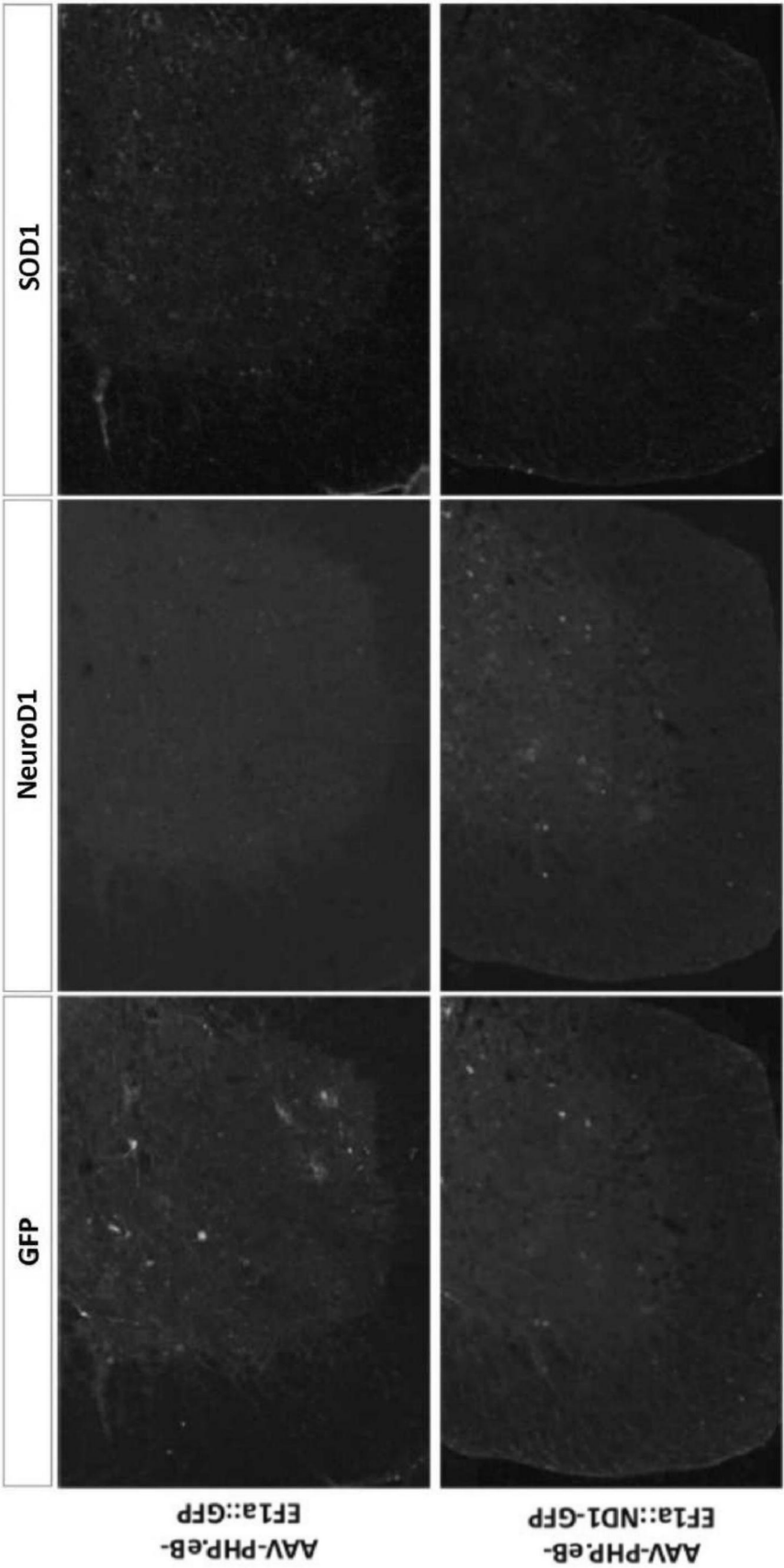


图23C

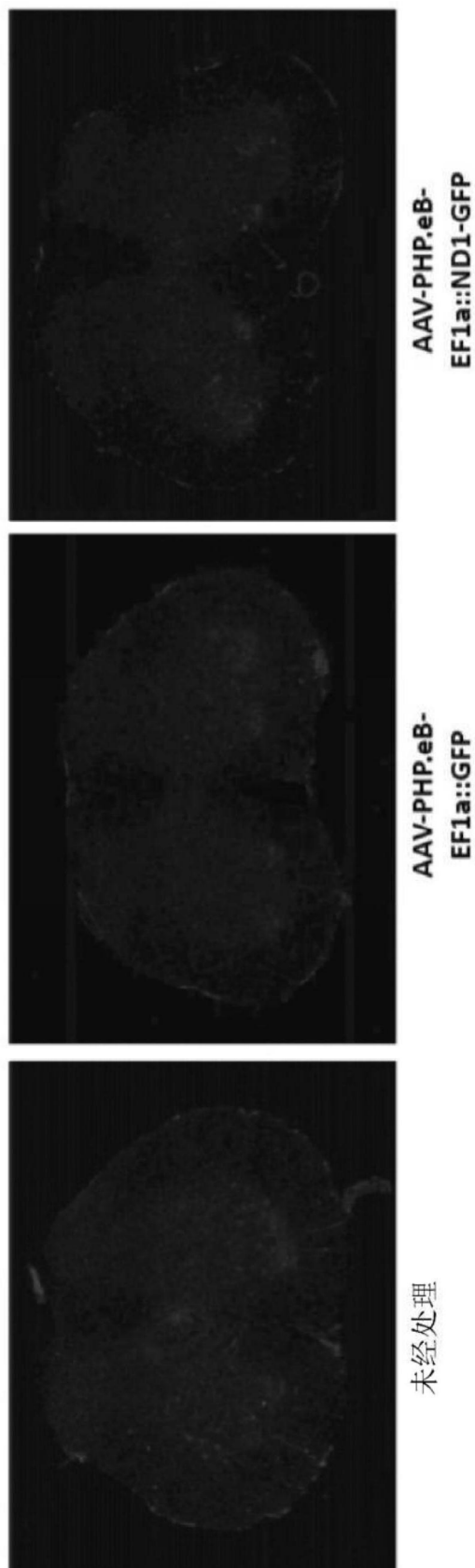


图24A

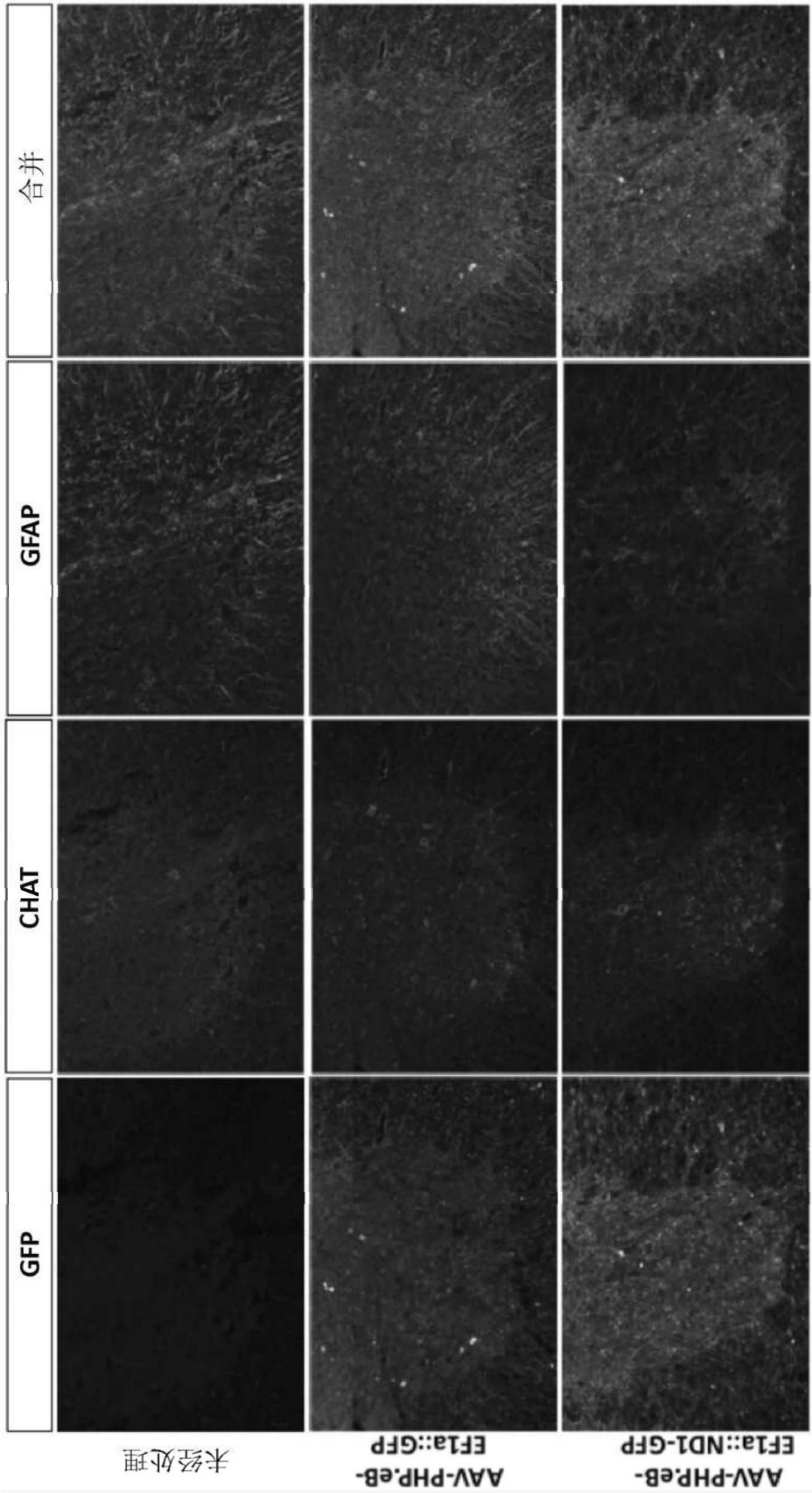


图24B

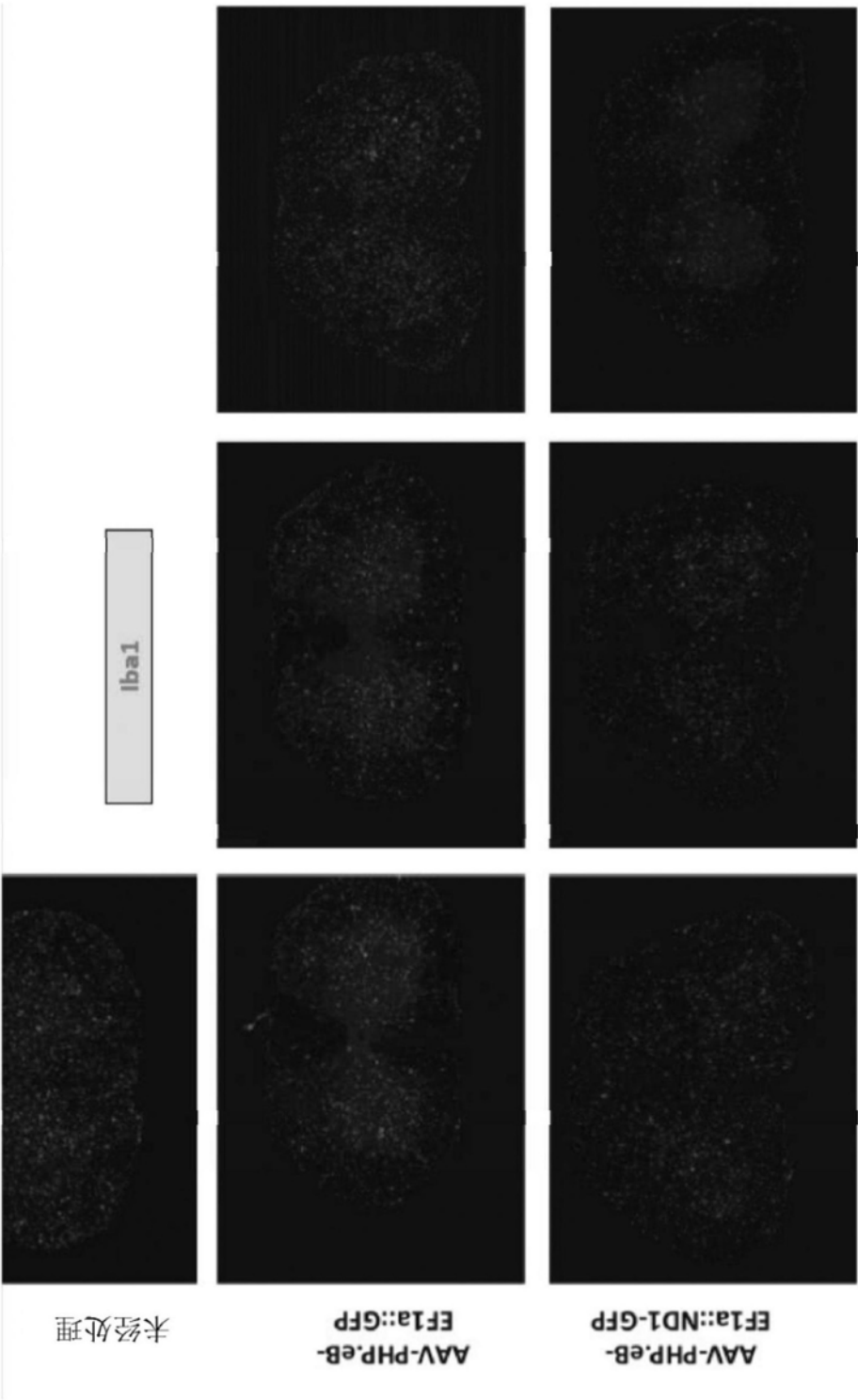


图24C

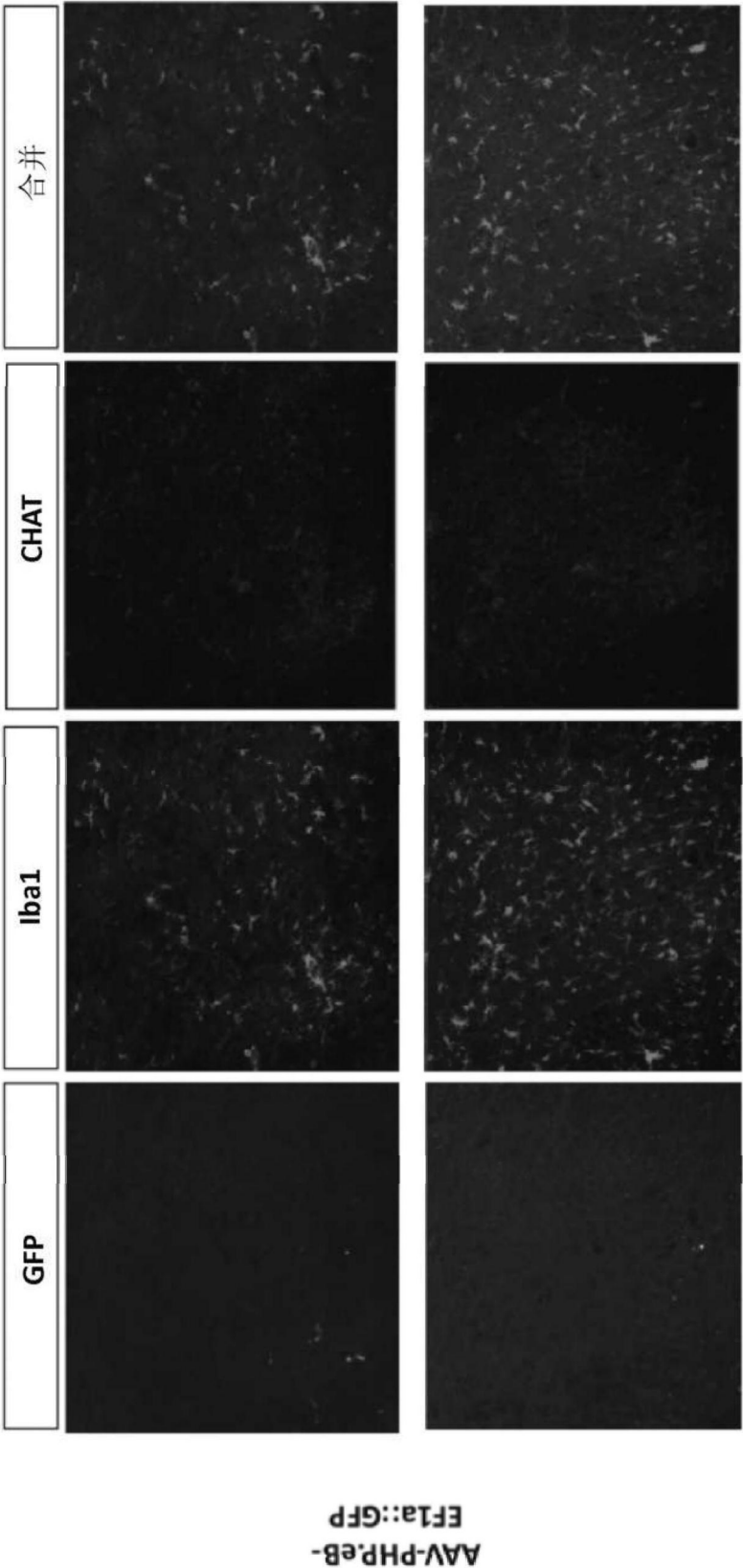


图24D

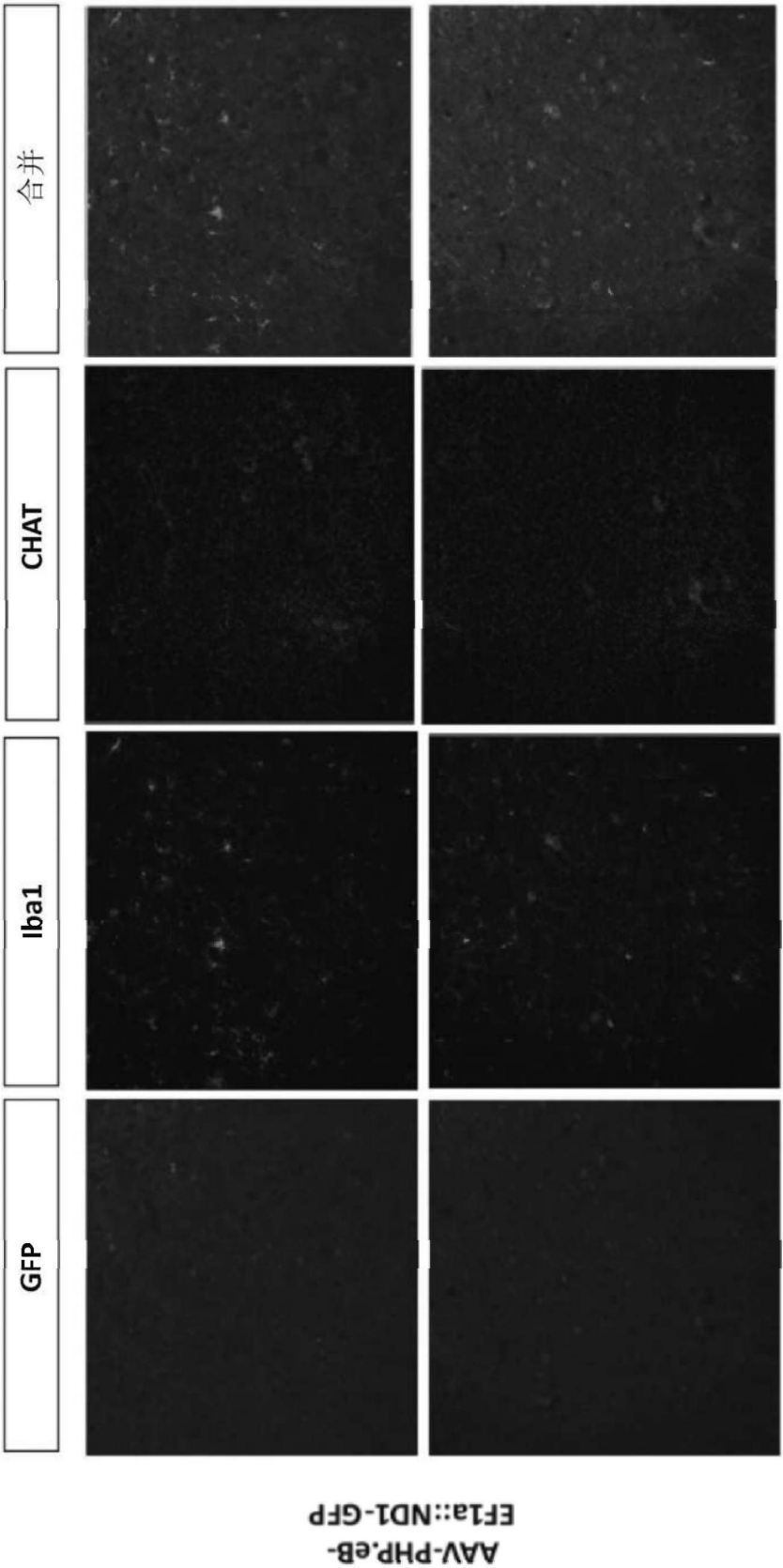


图24E

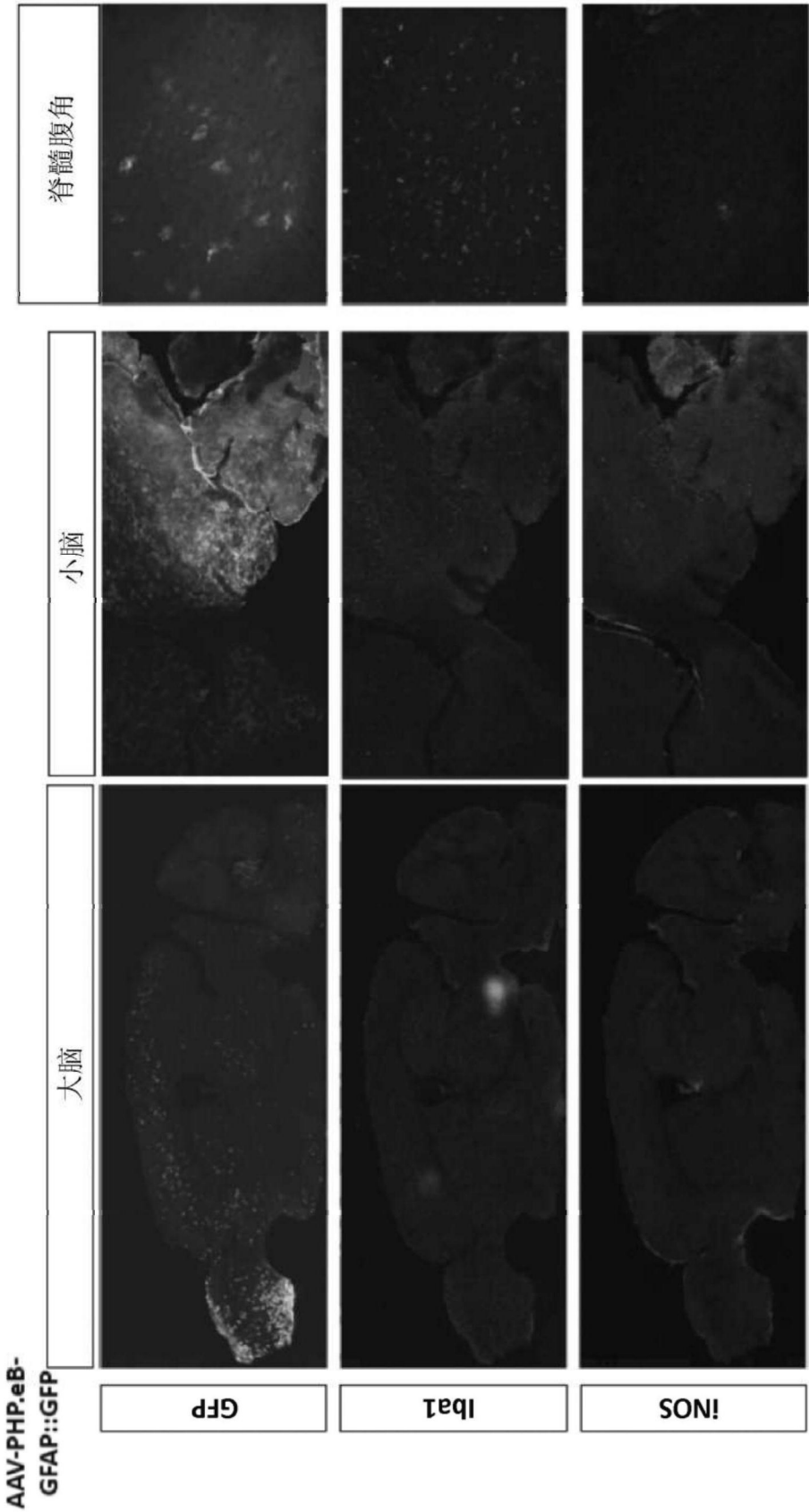


图24F

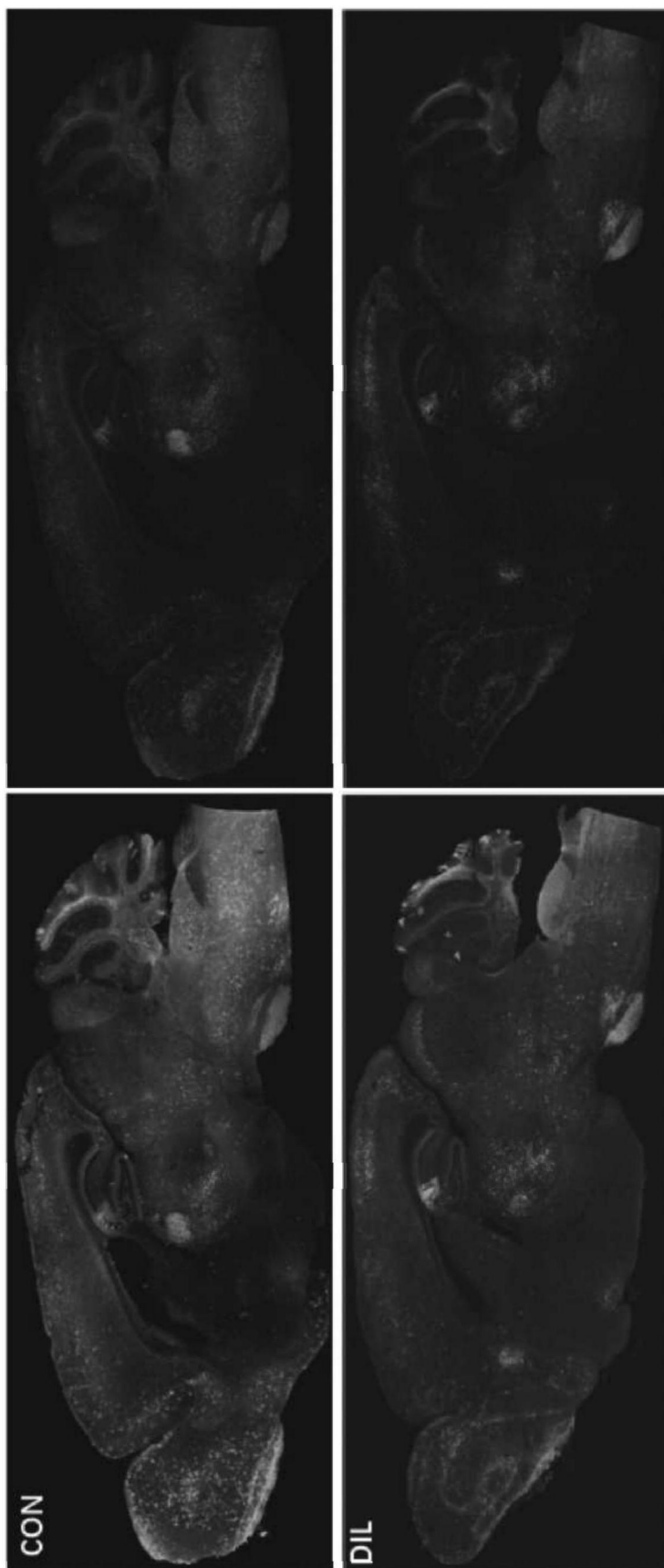


图25A

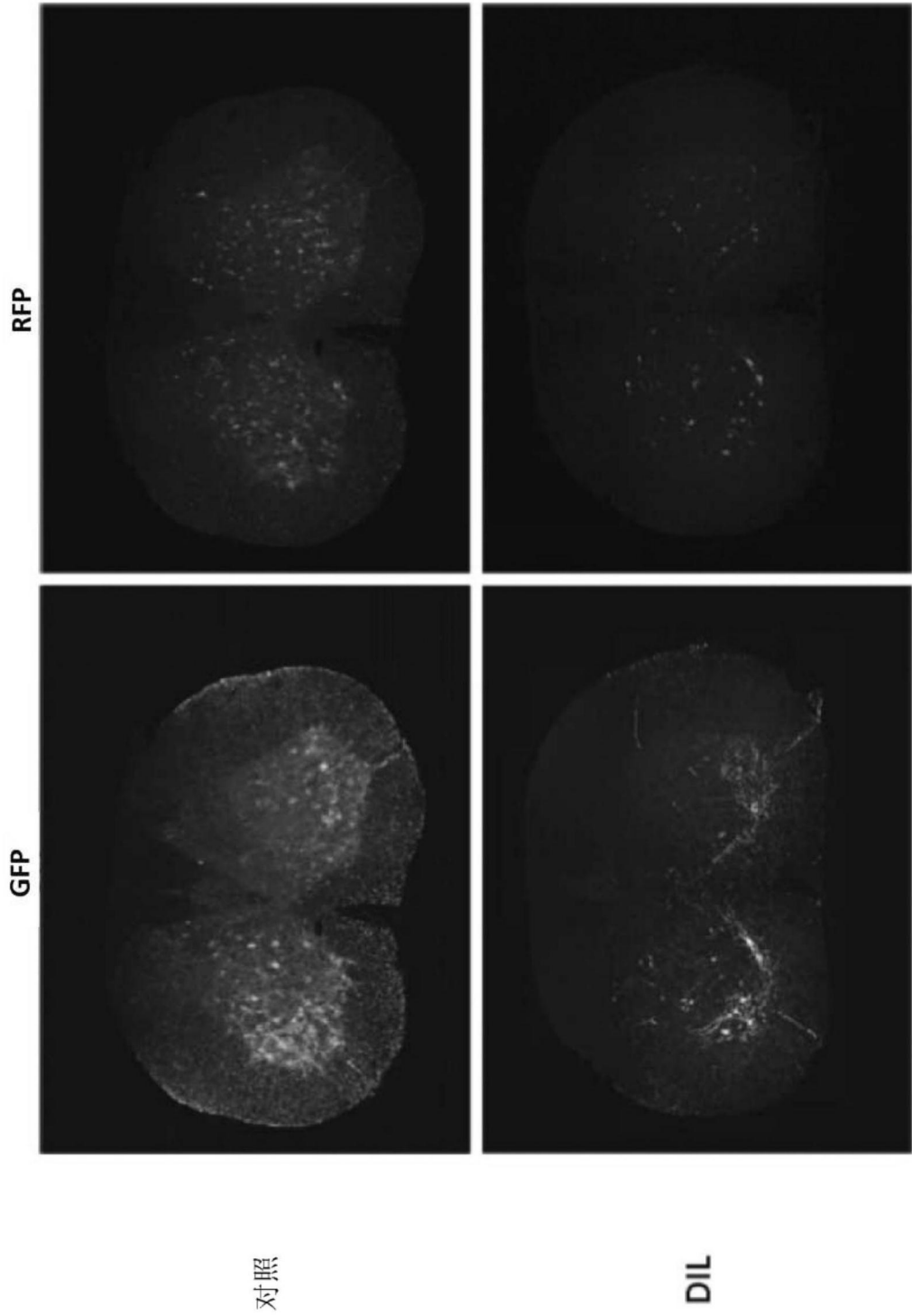


图25B

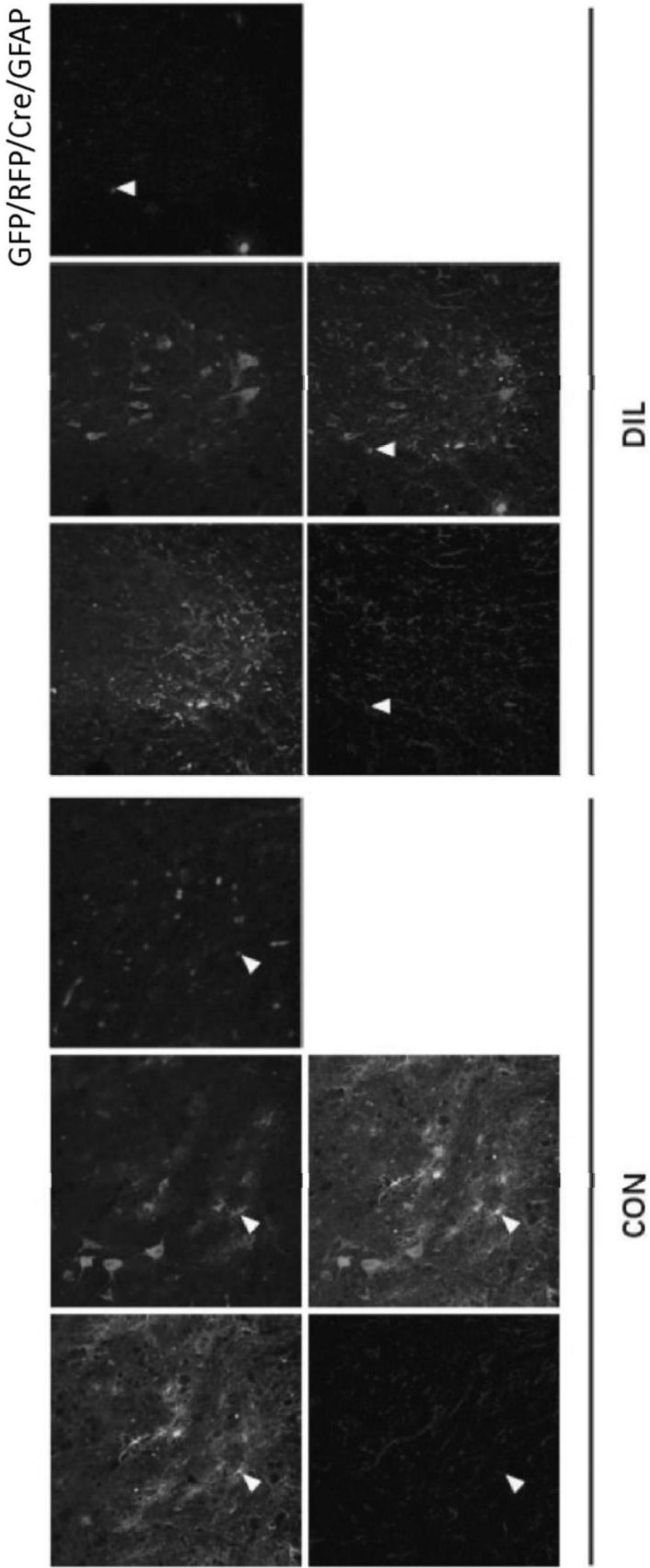


图25C

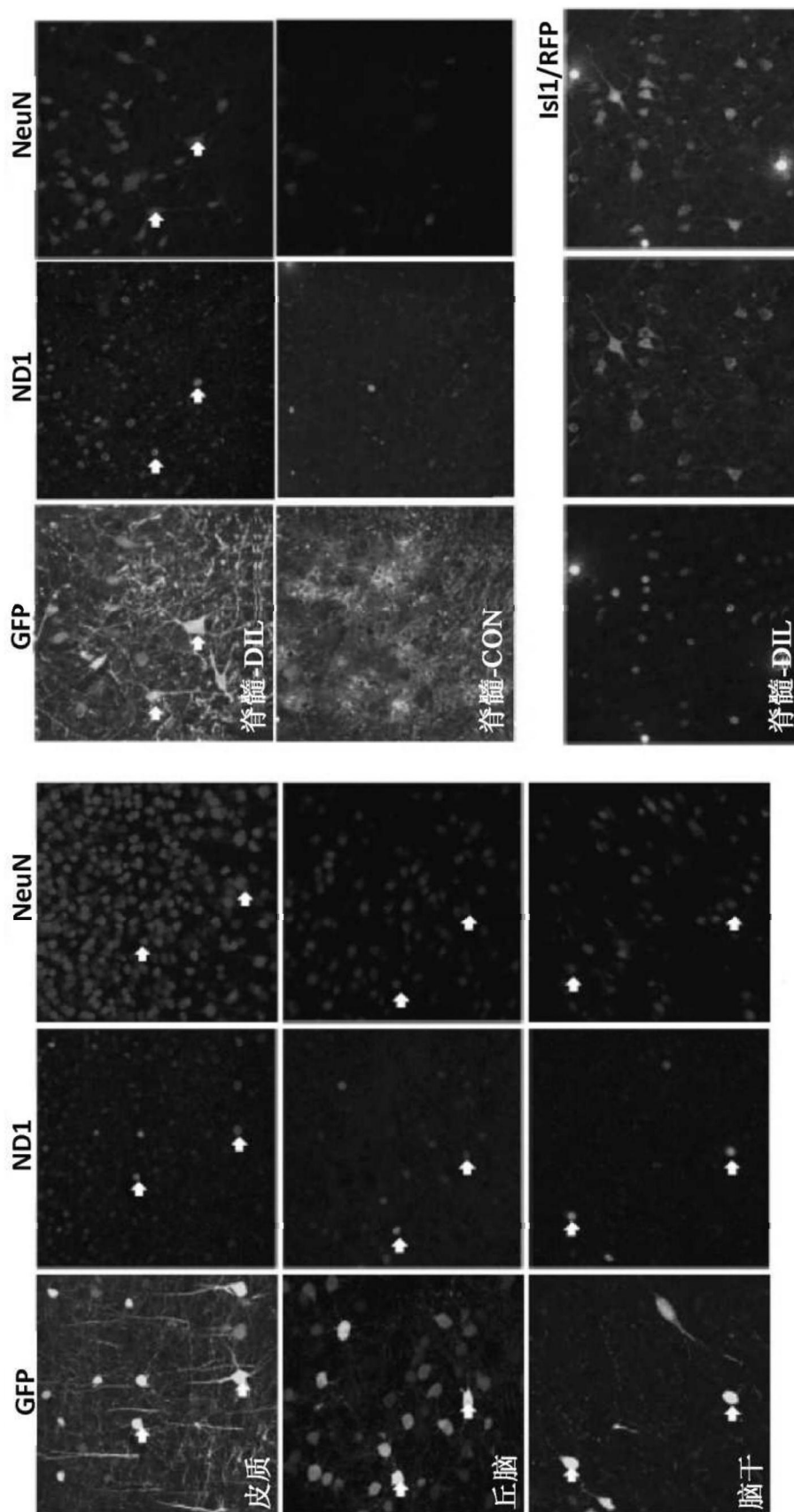


图25D

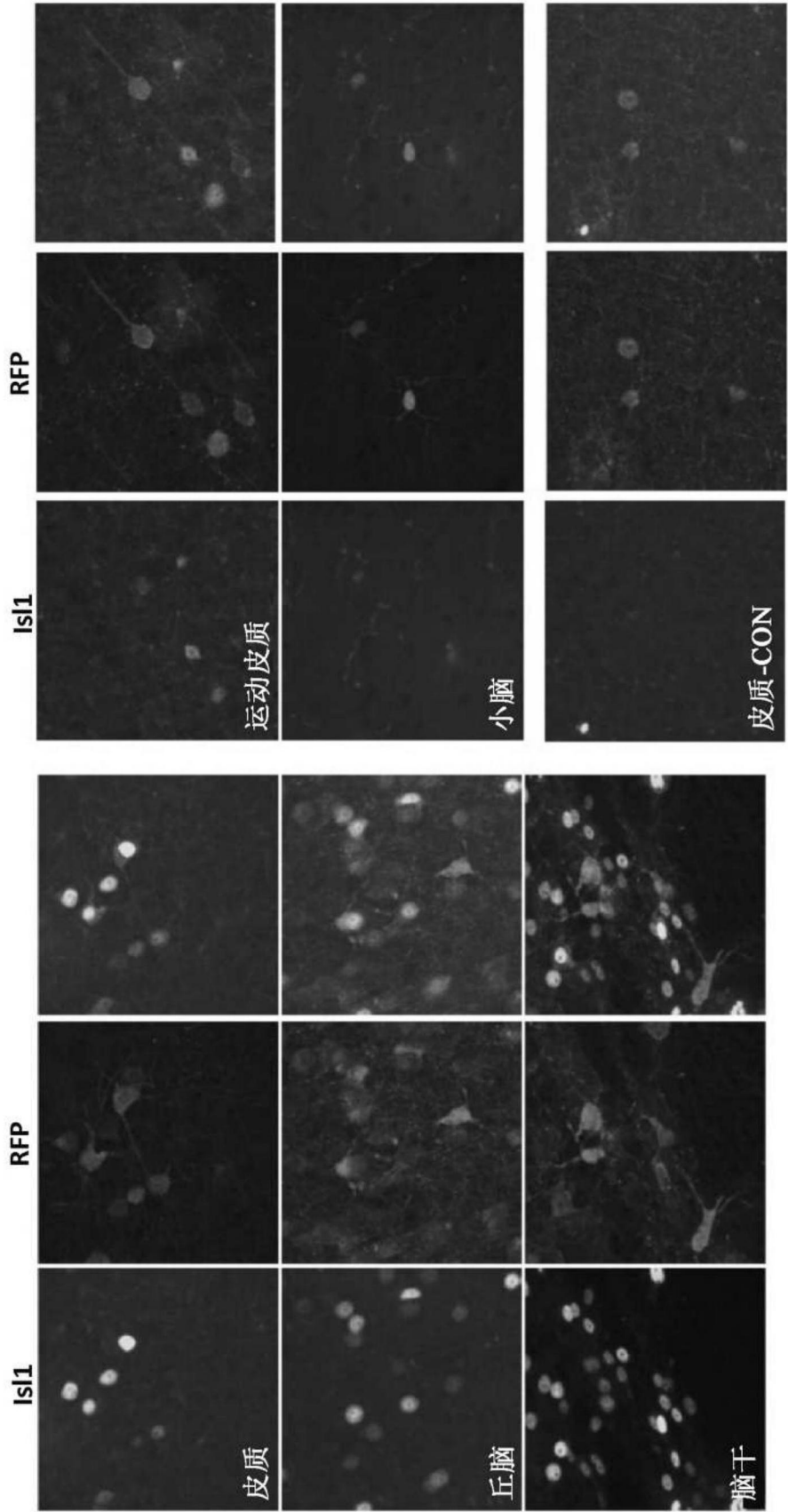


图25E

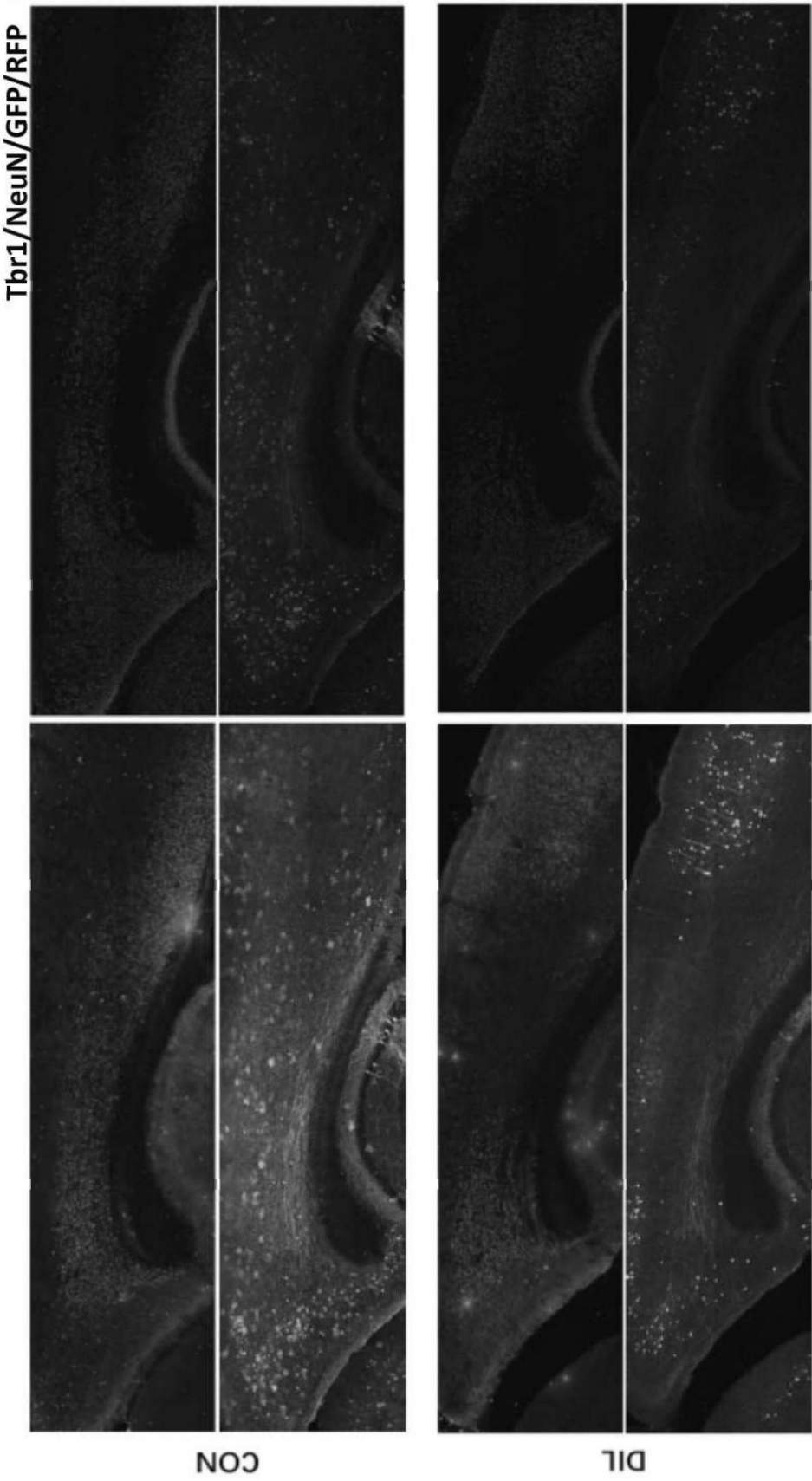


图25F

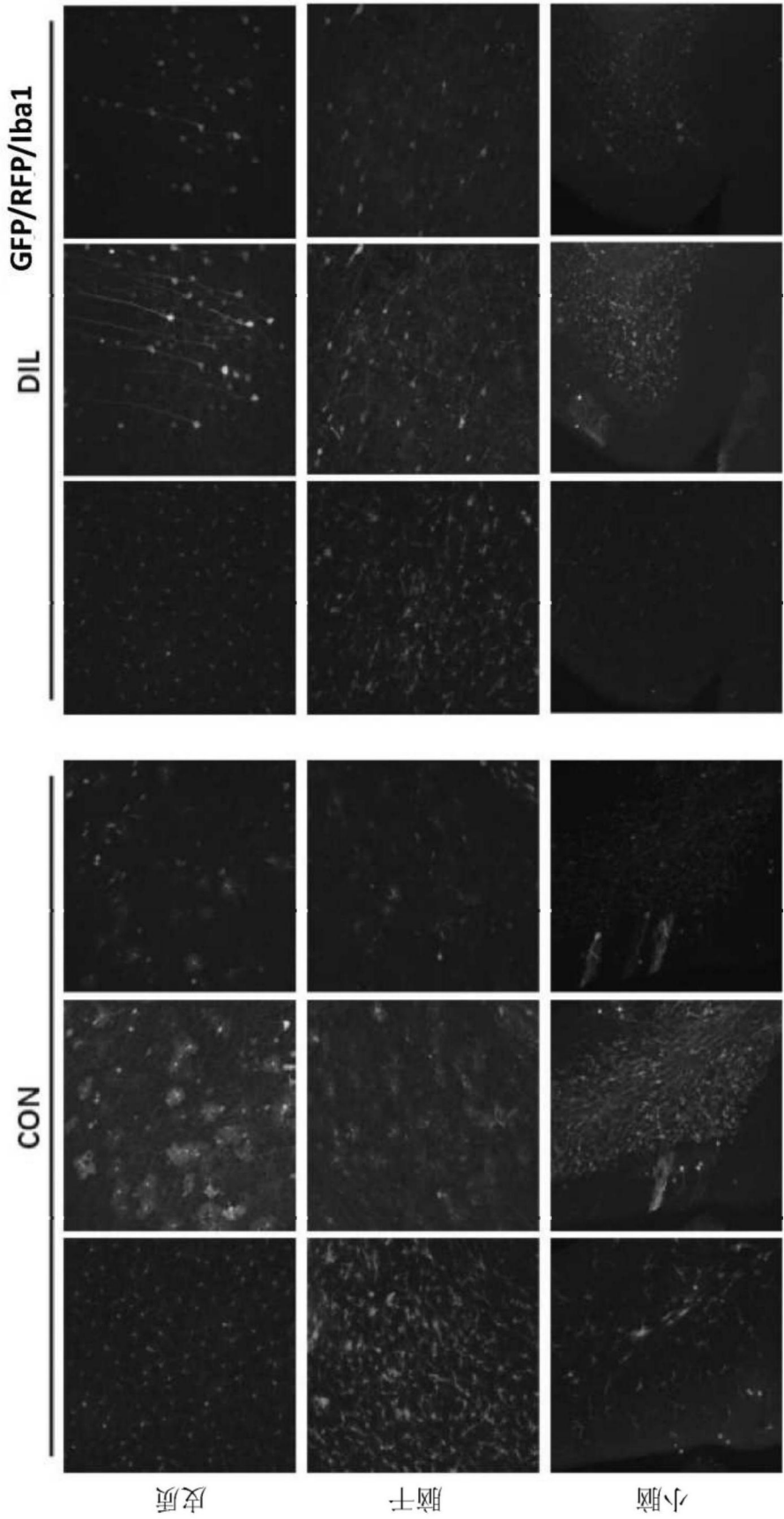


图25G

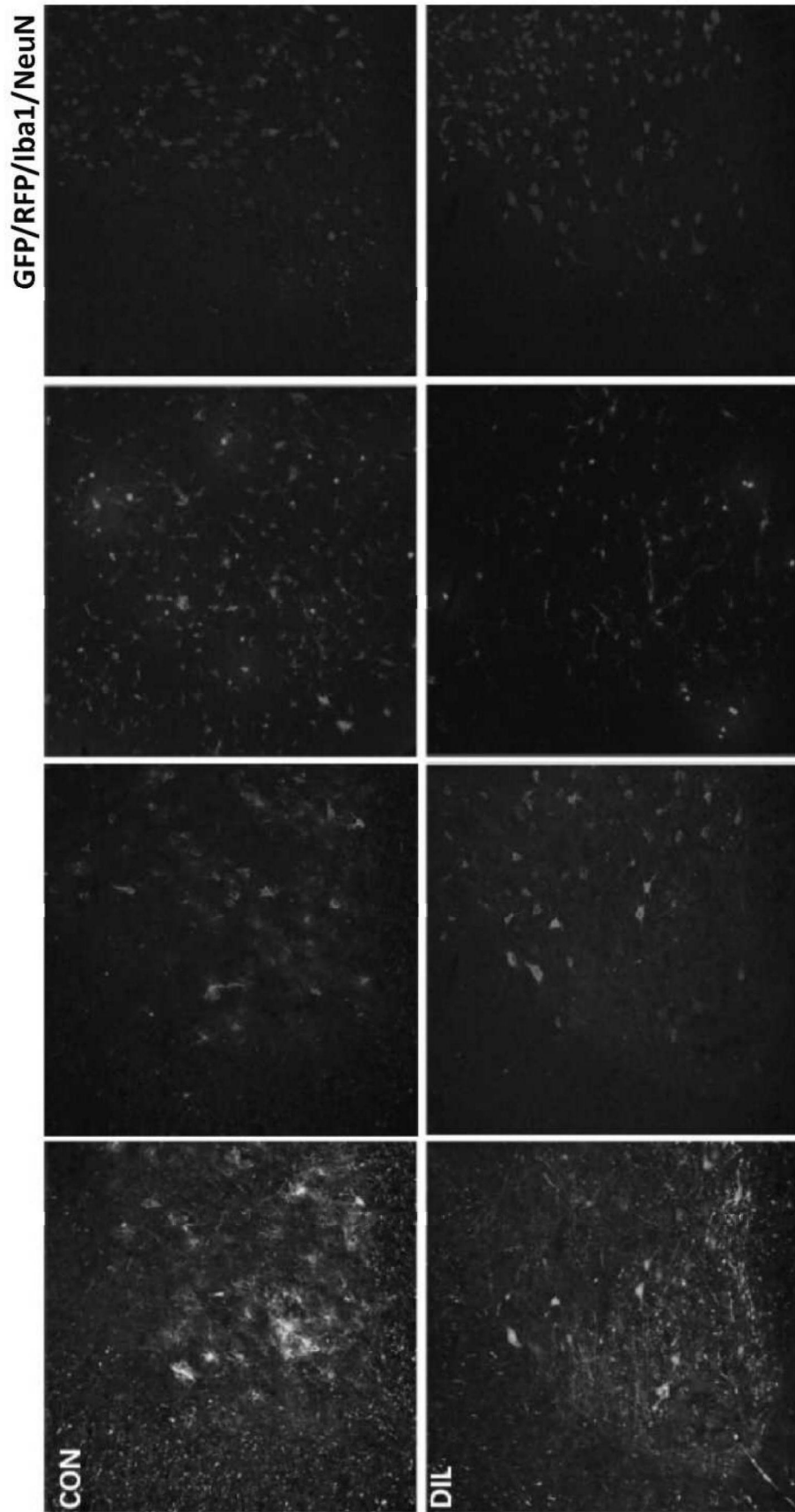


图25H

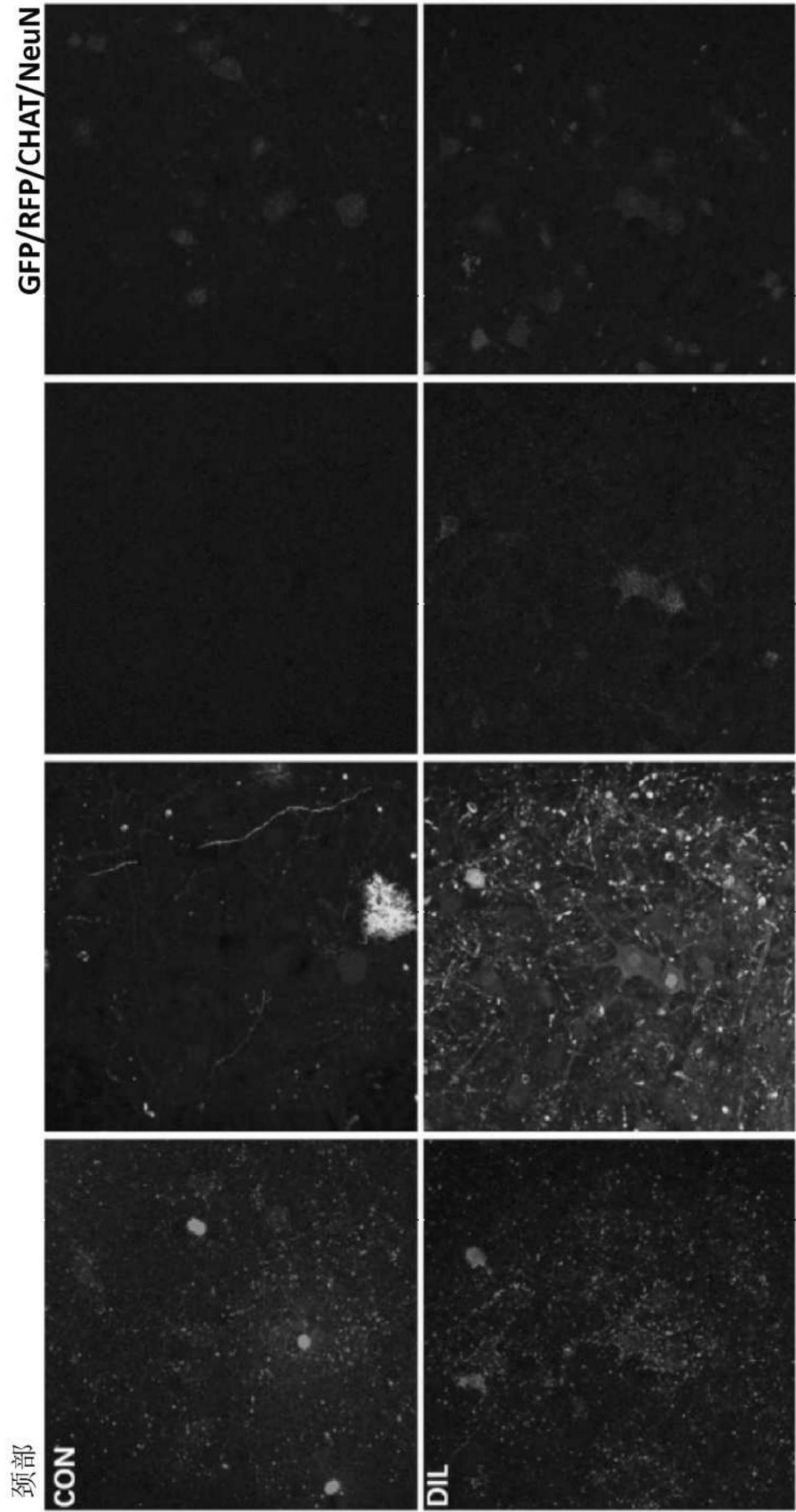


图25I

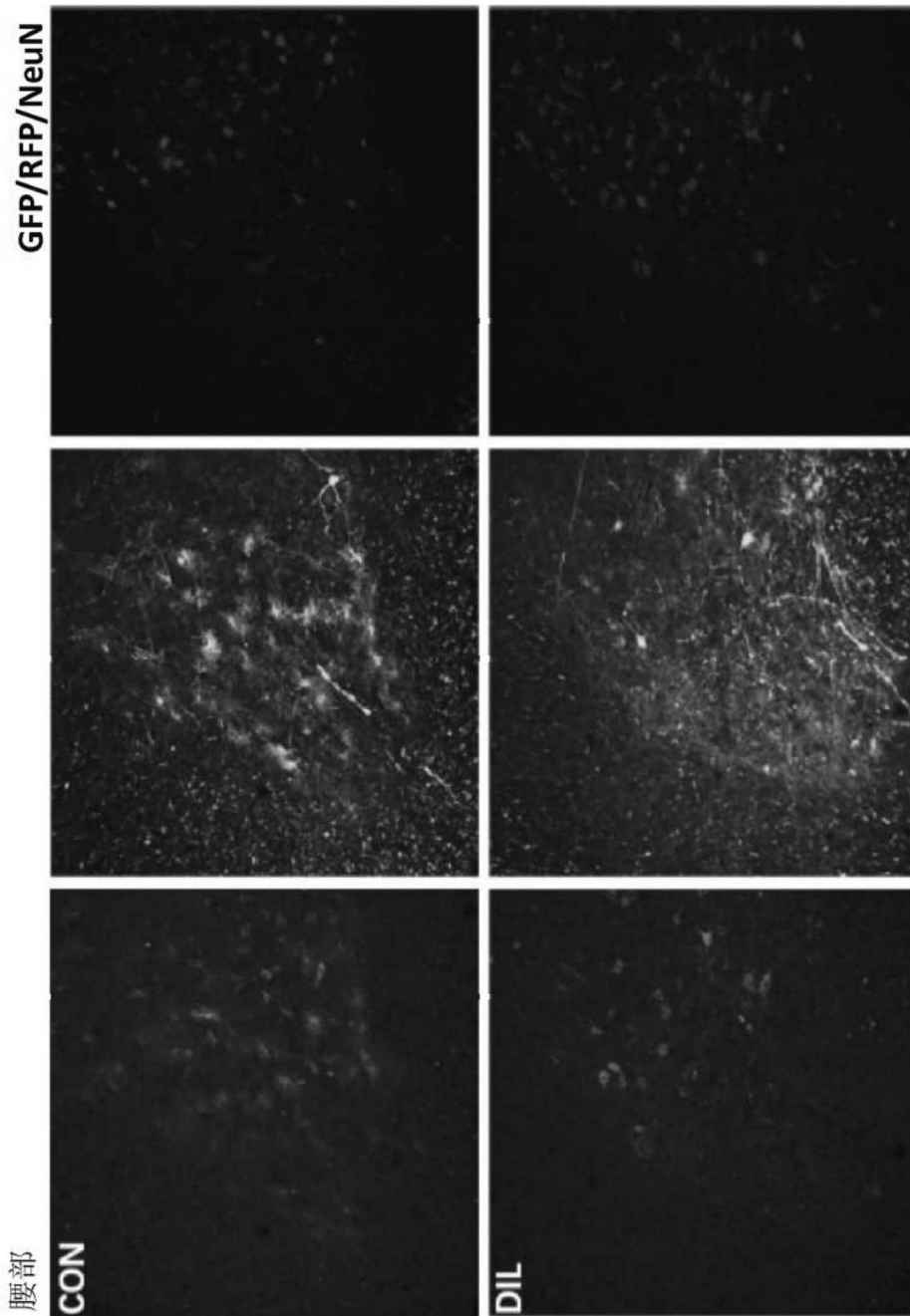


图25J

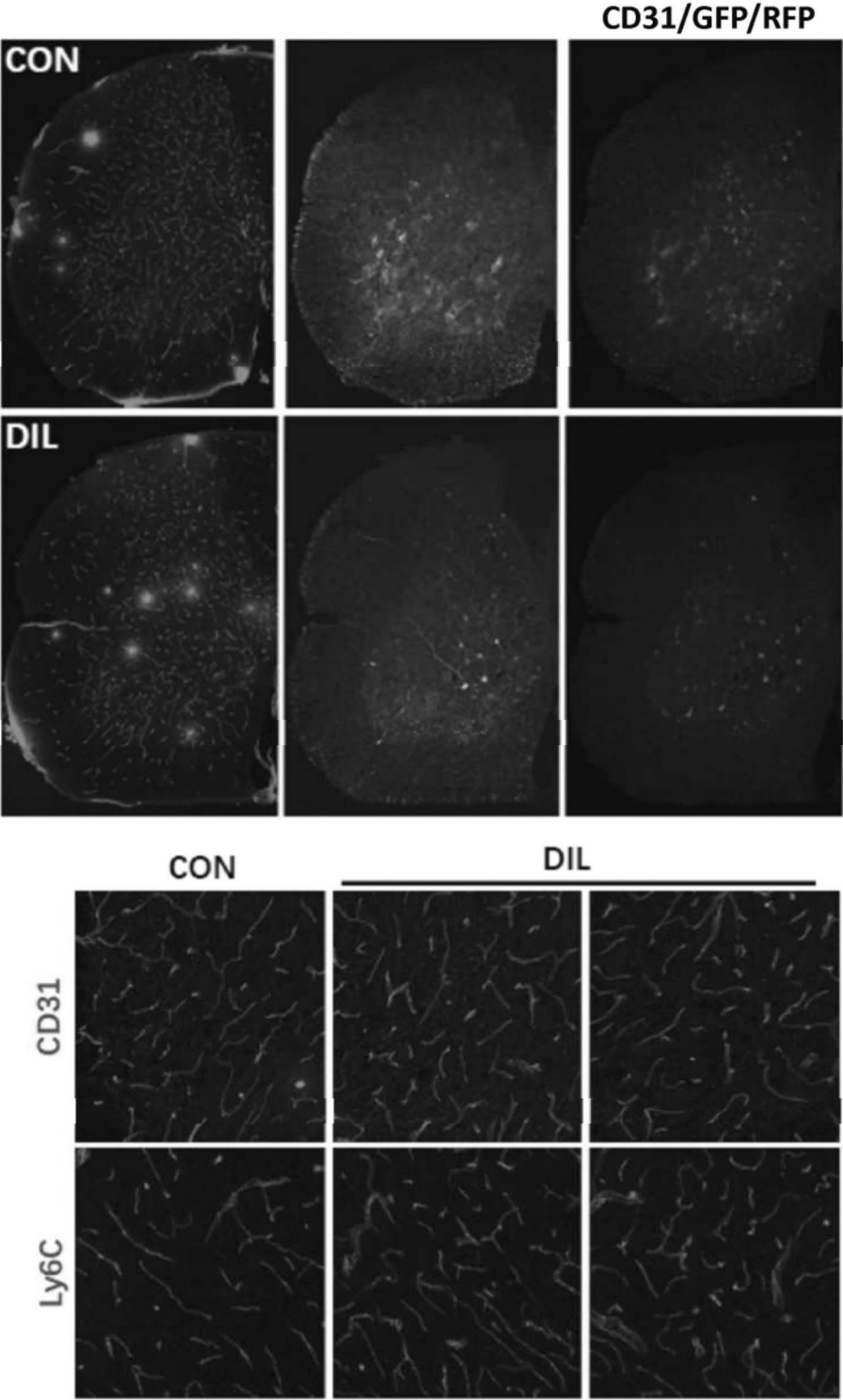


图25K

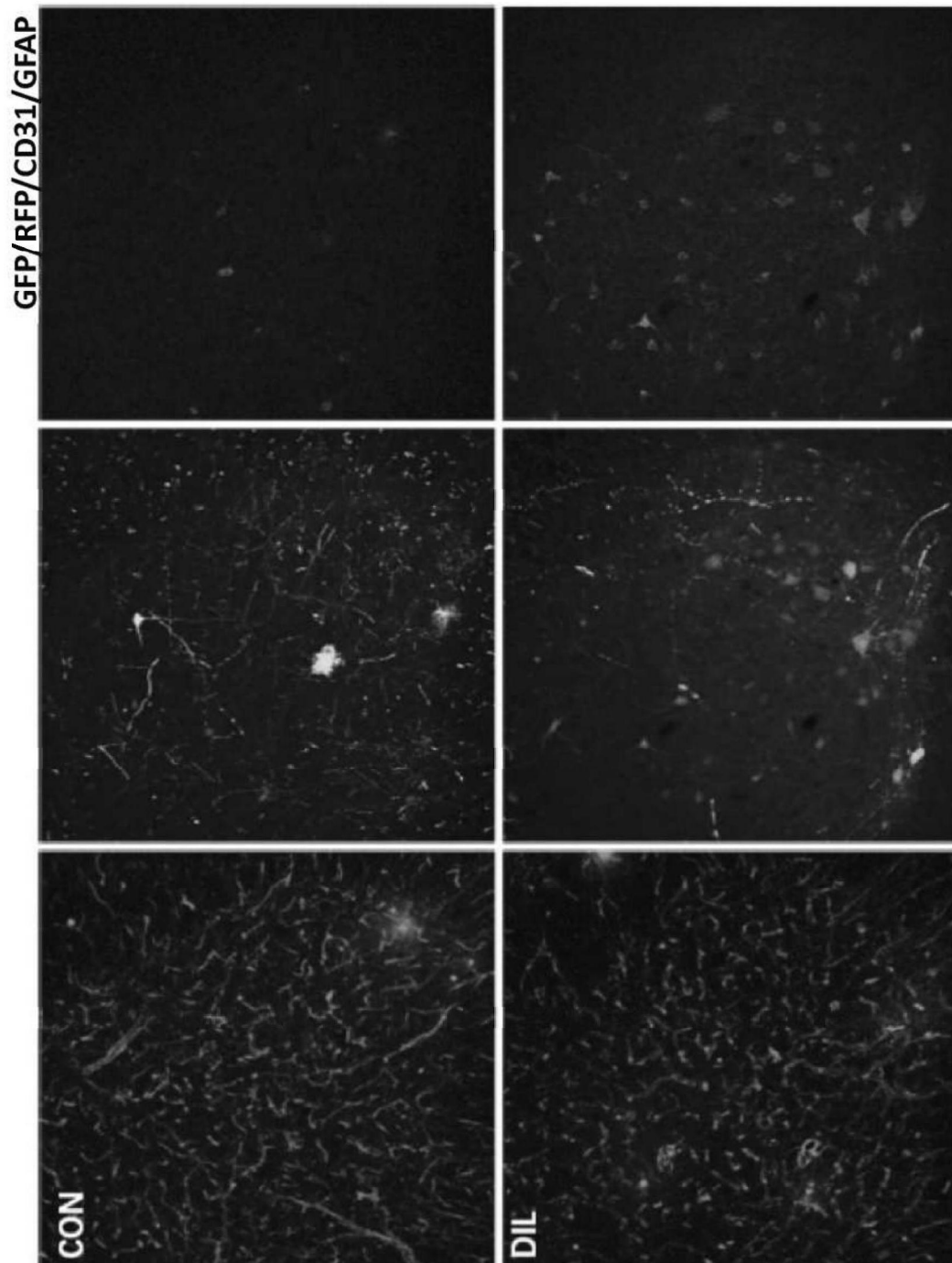


图25L

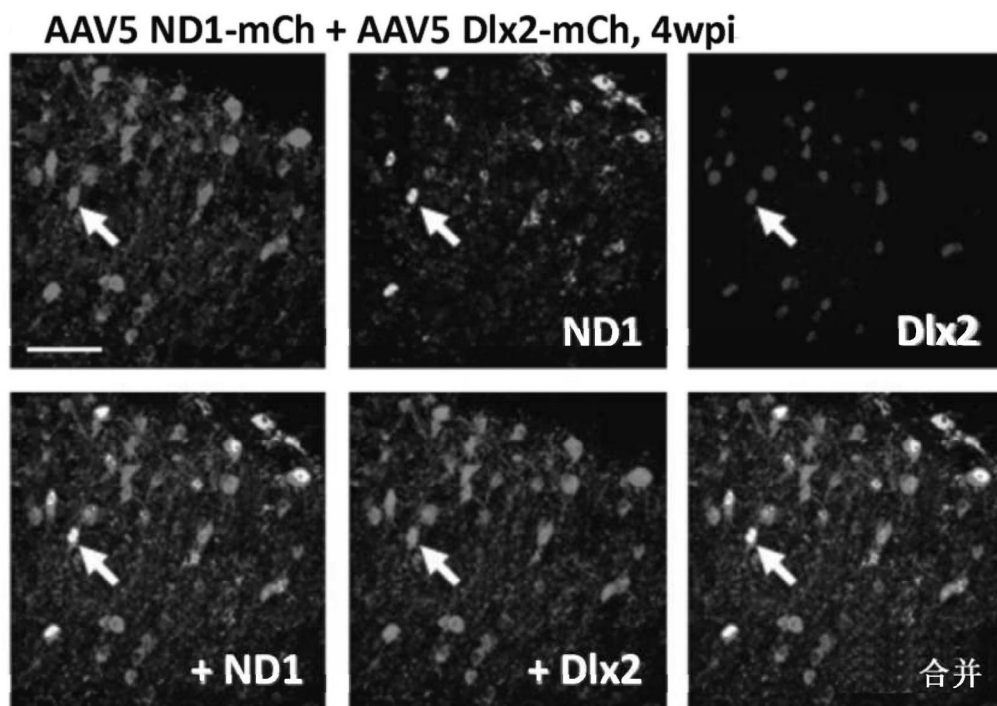


图26A

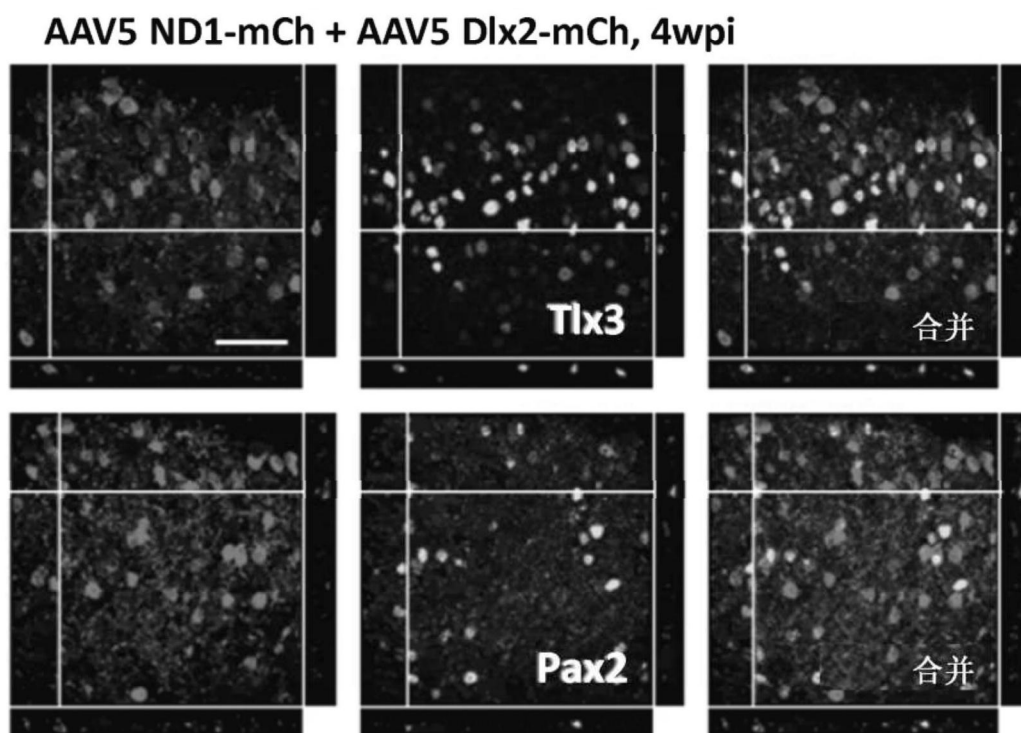


图26B

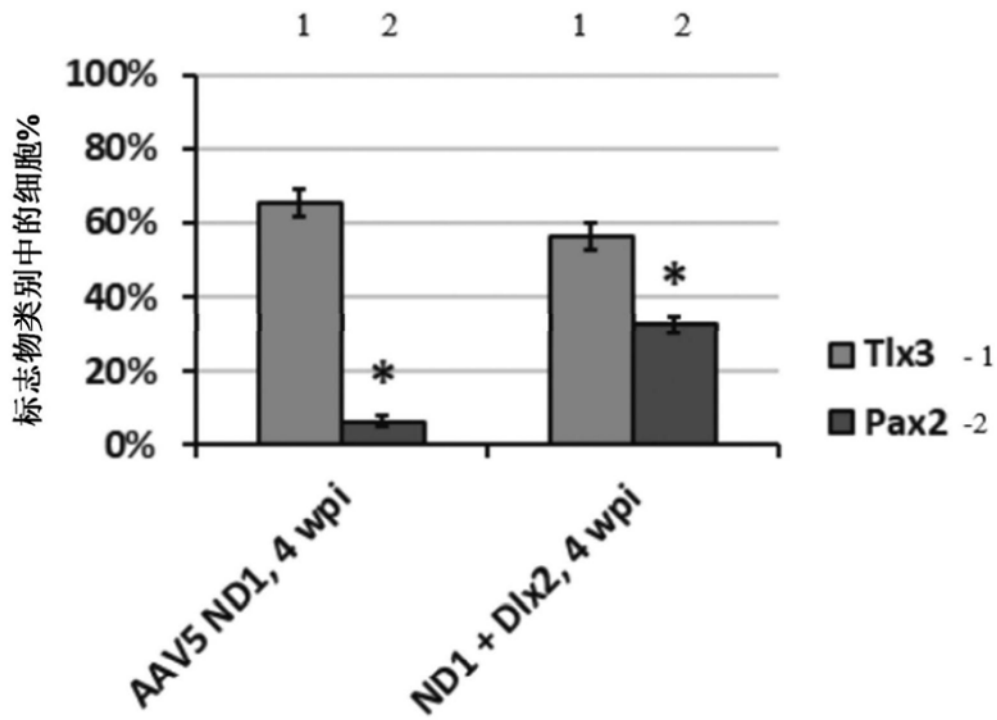


图26C

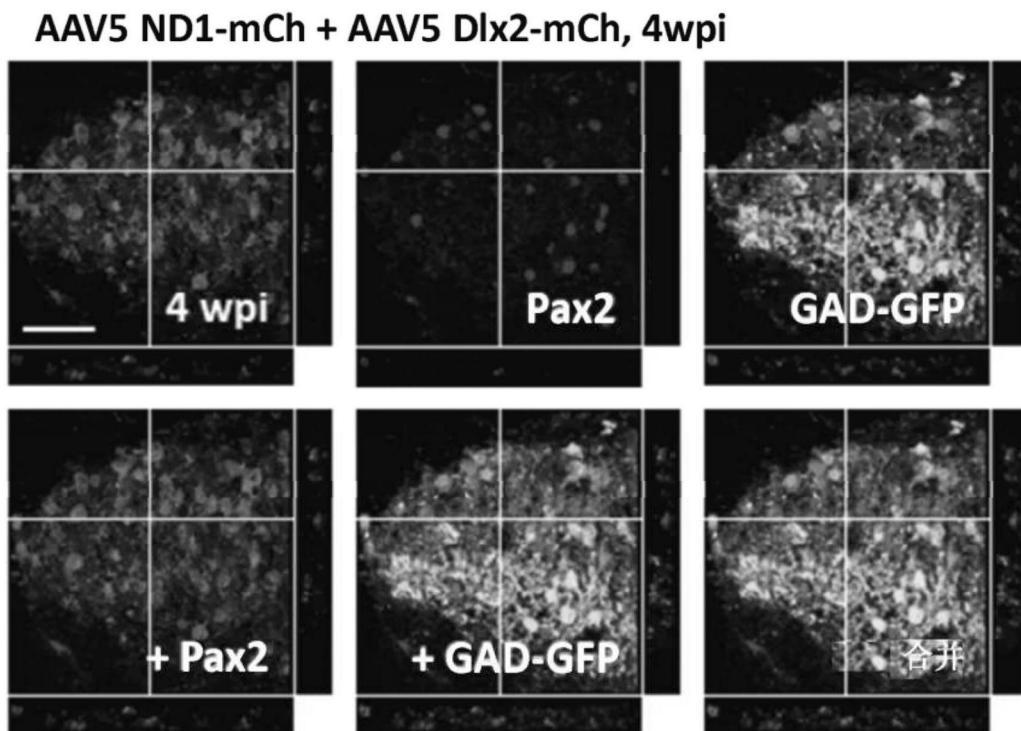


图26D

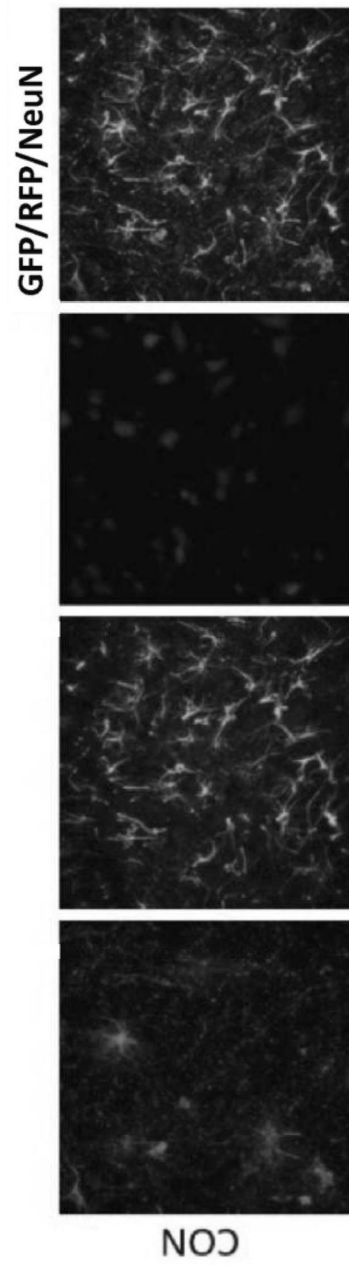


图27A

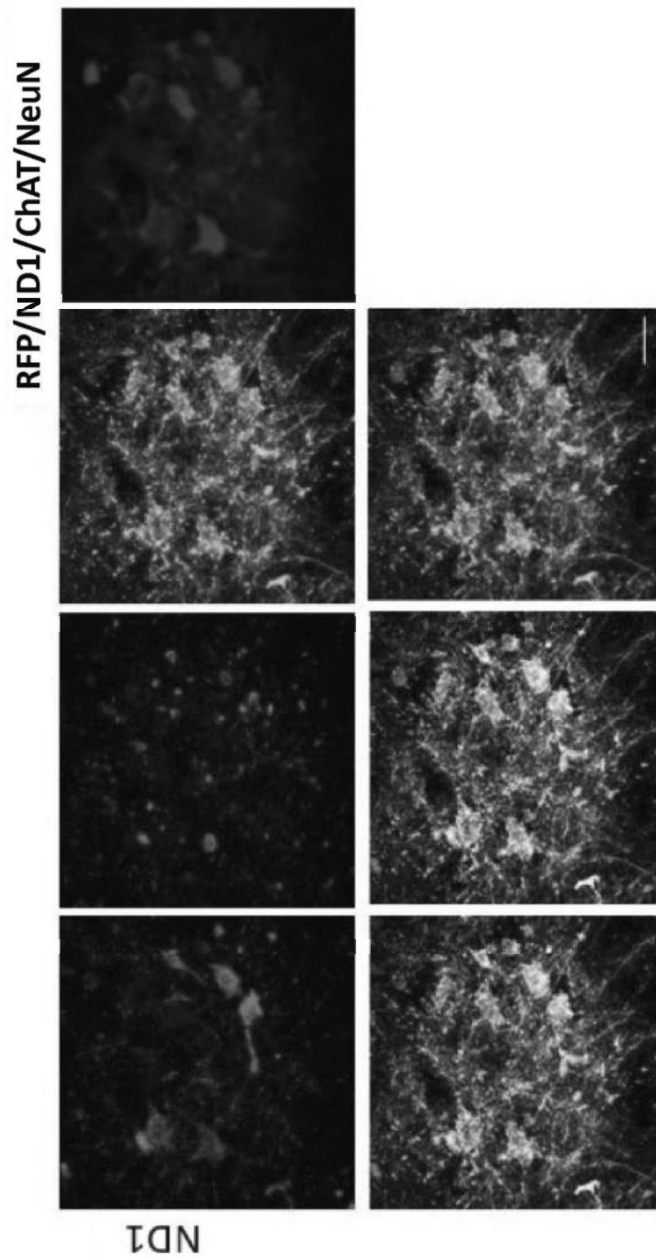


图27B

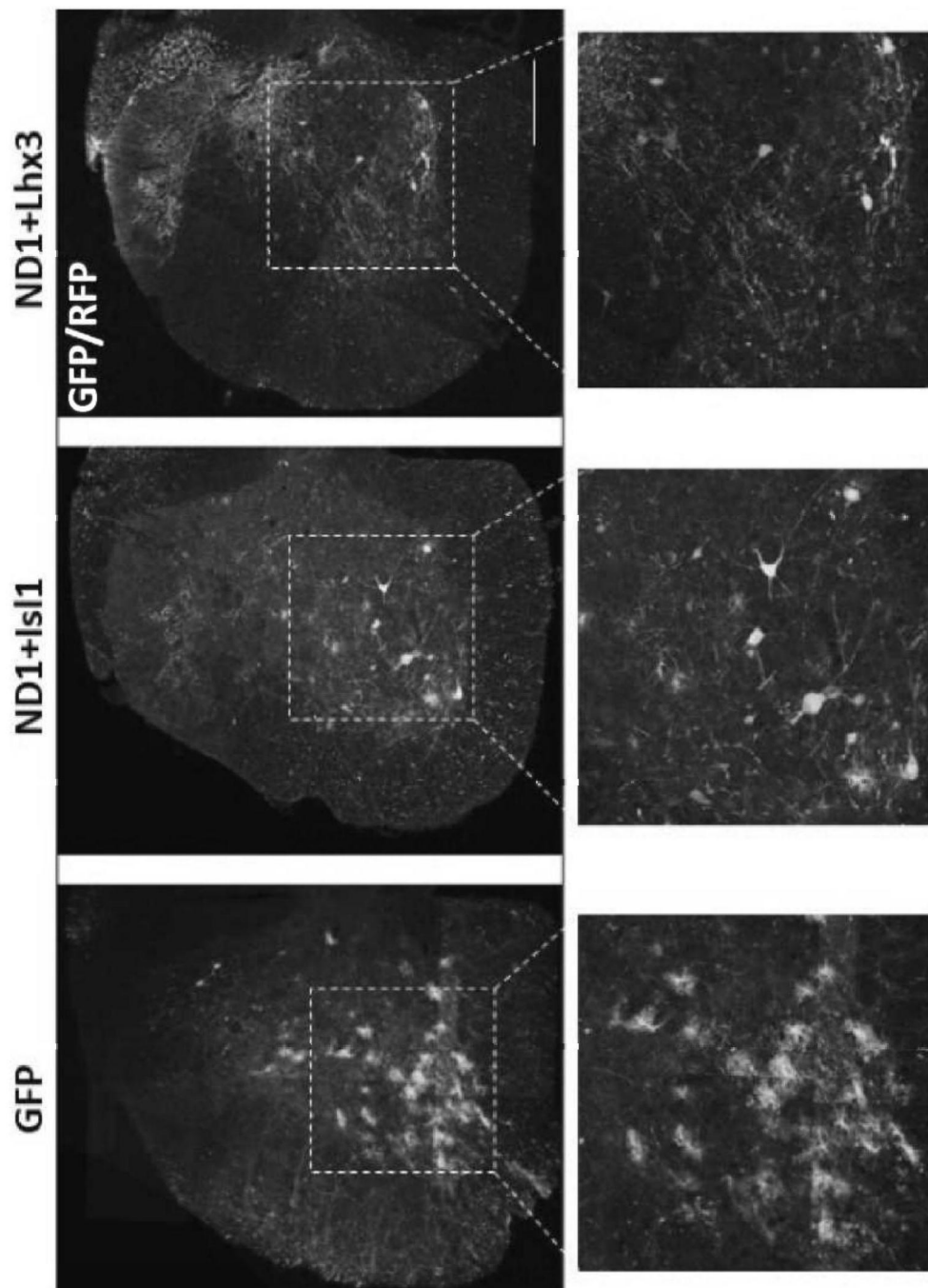


图28A

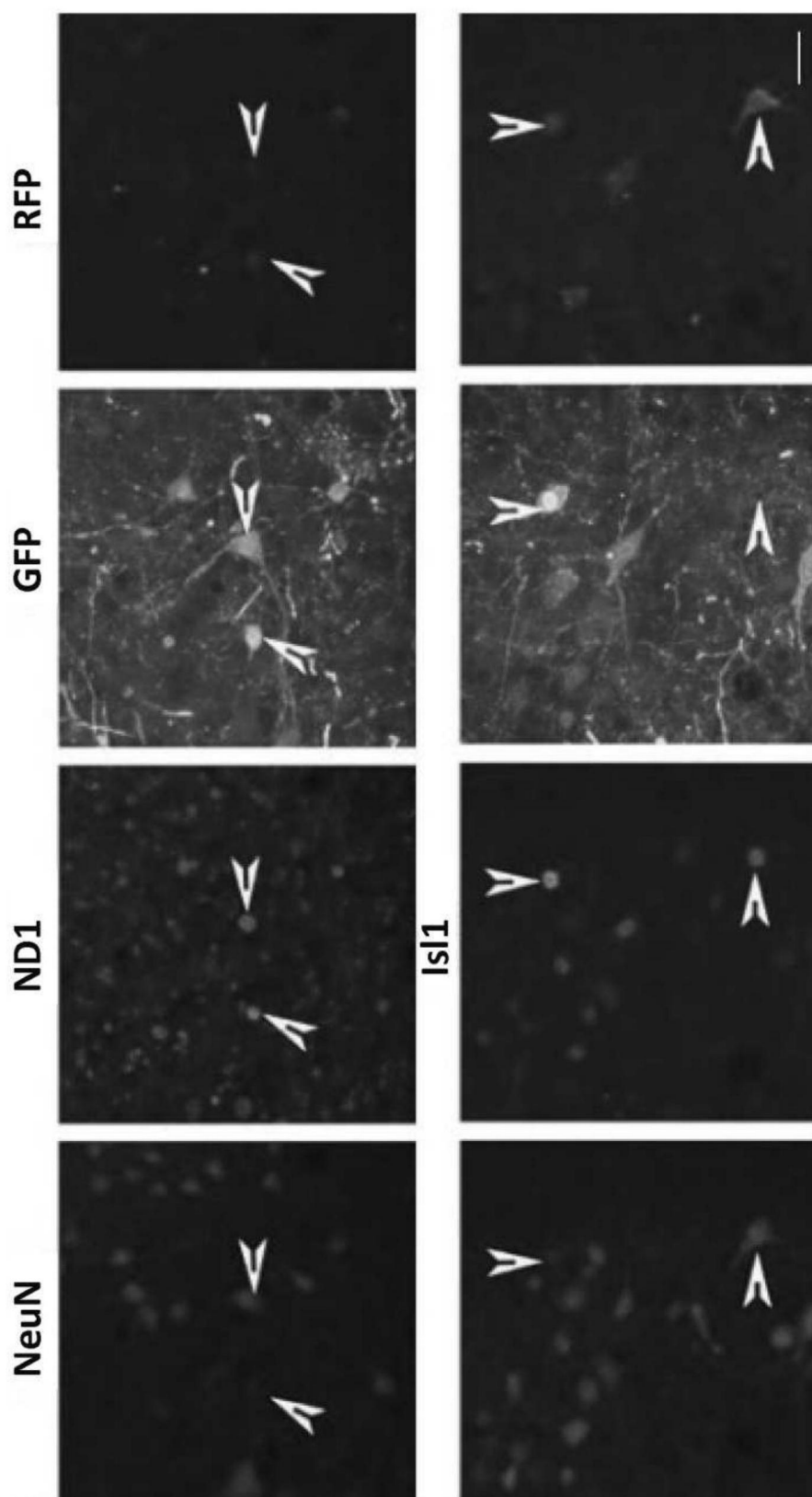


图28B

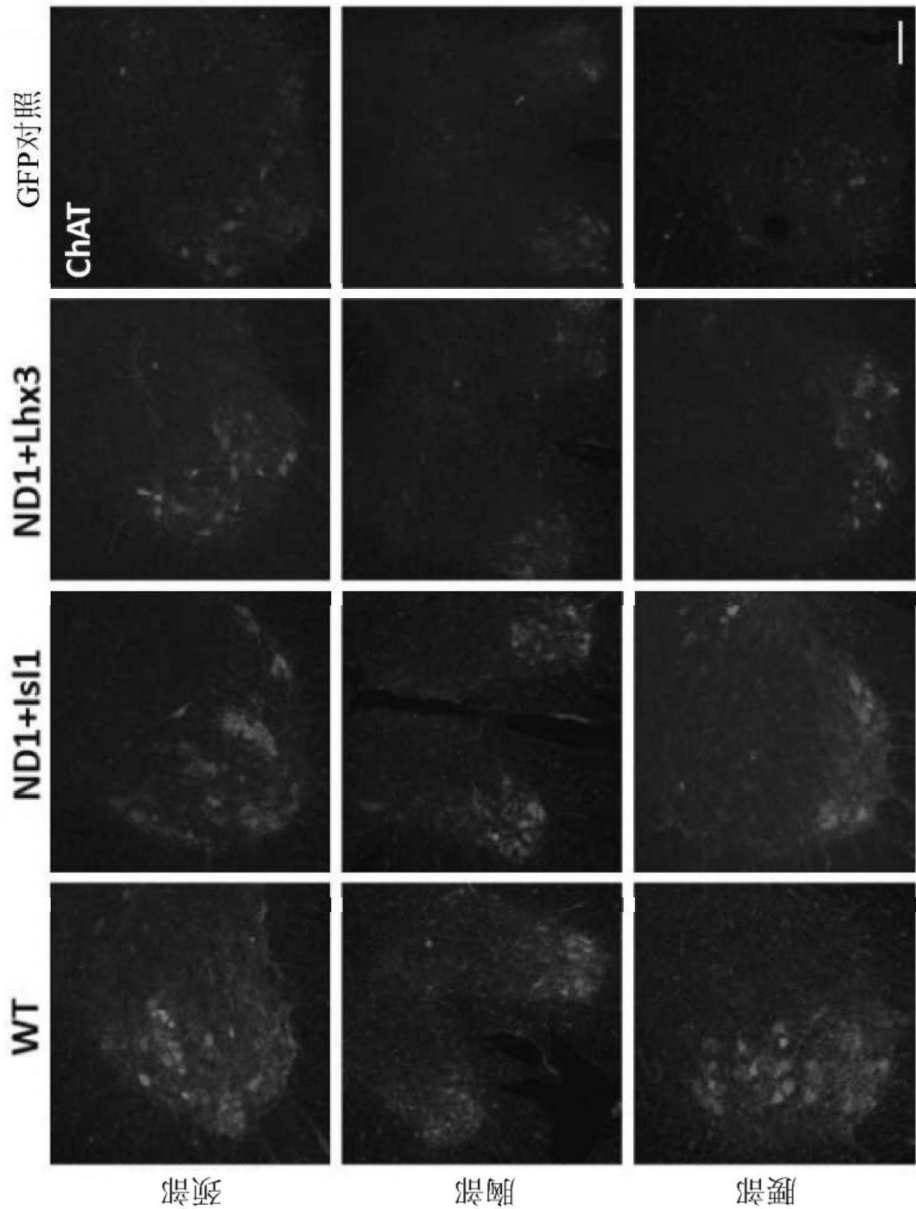


图29A

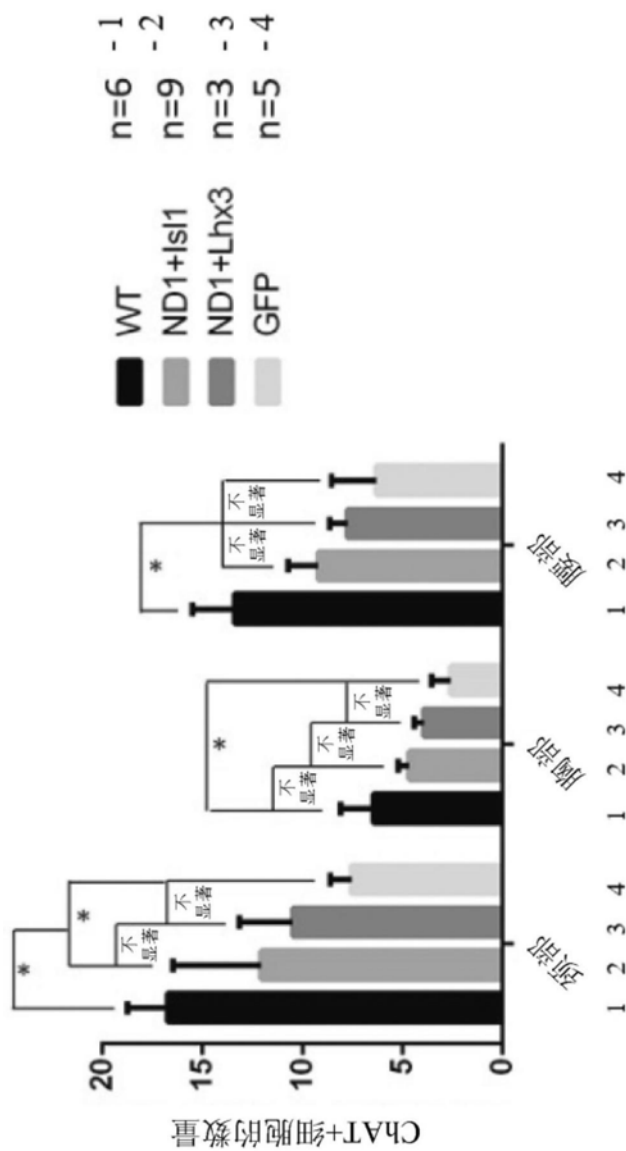


图29B

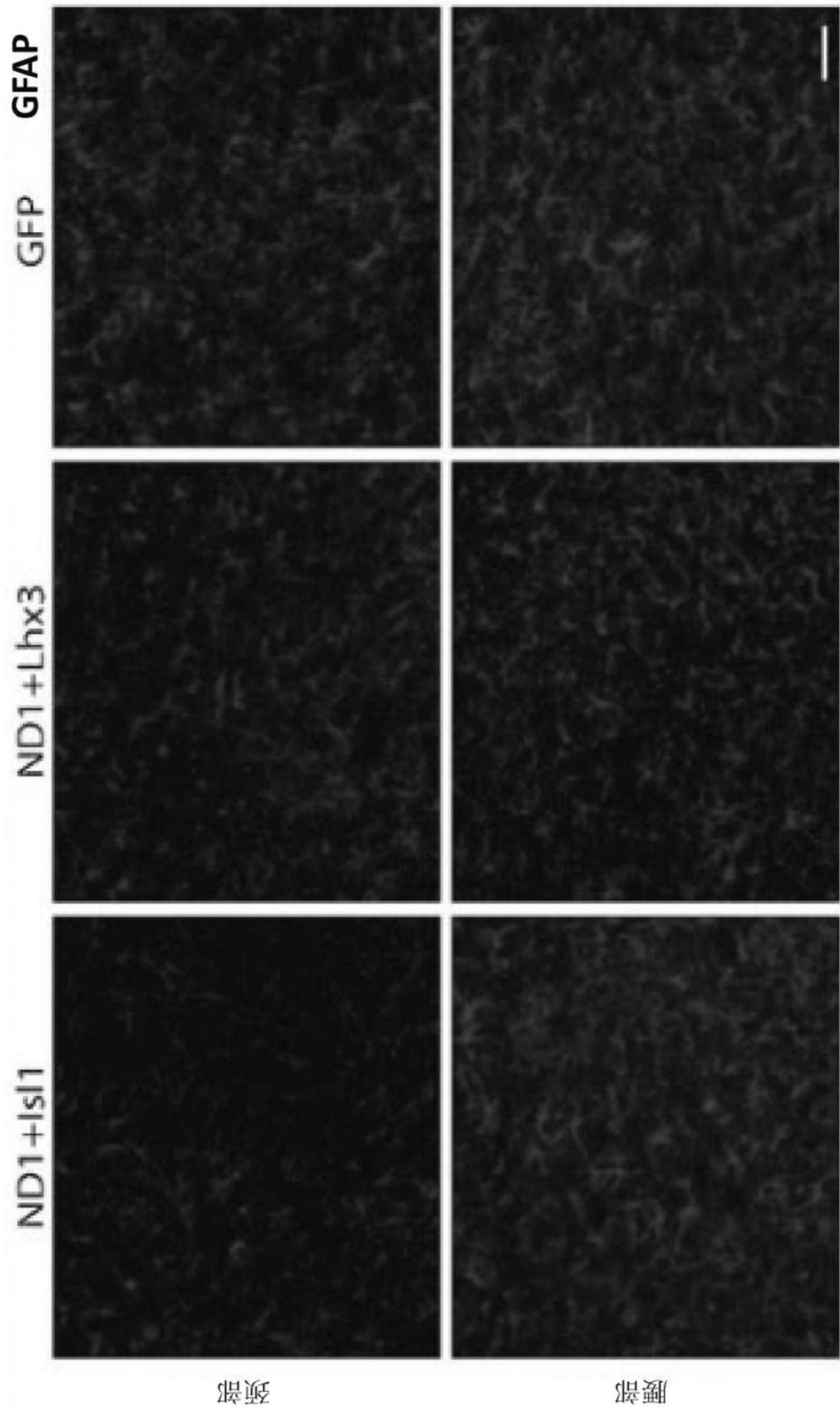


图30A

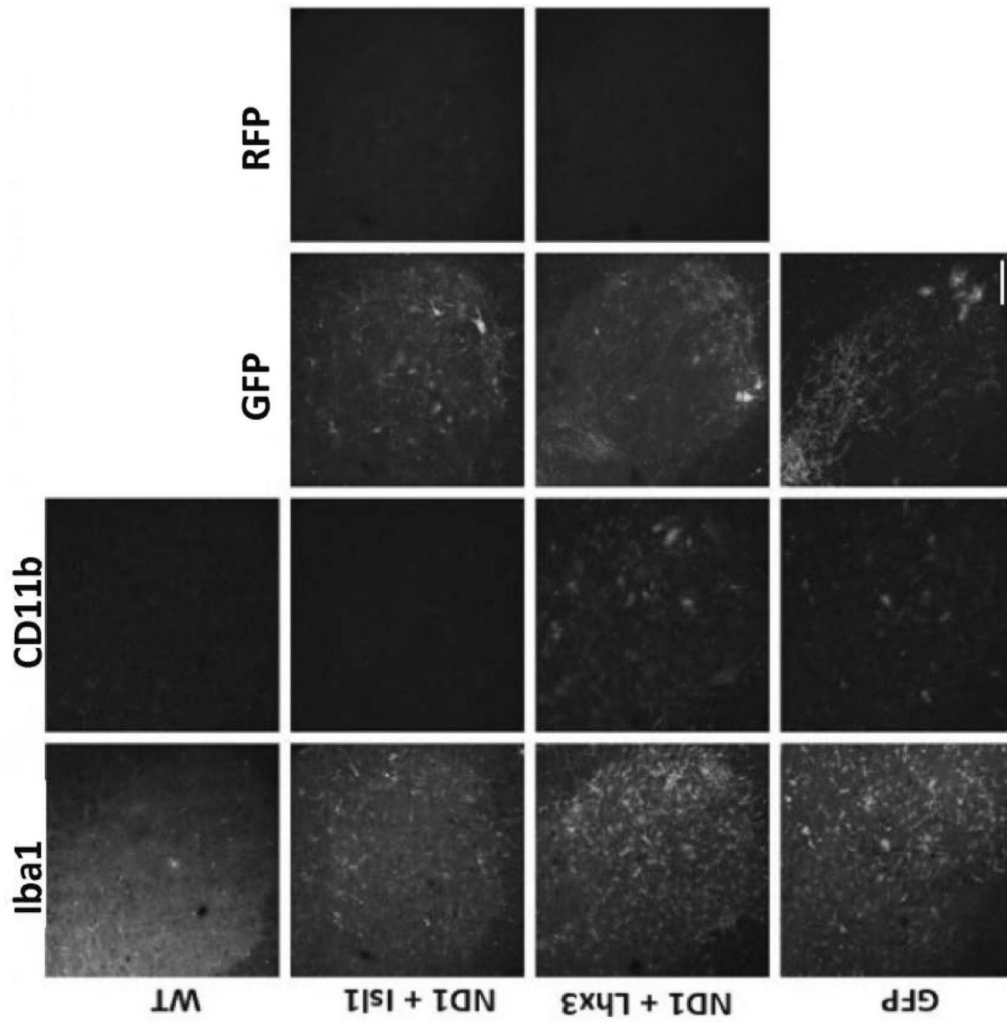


图30B

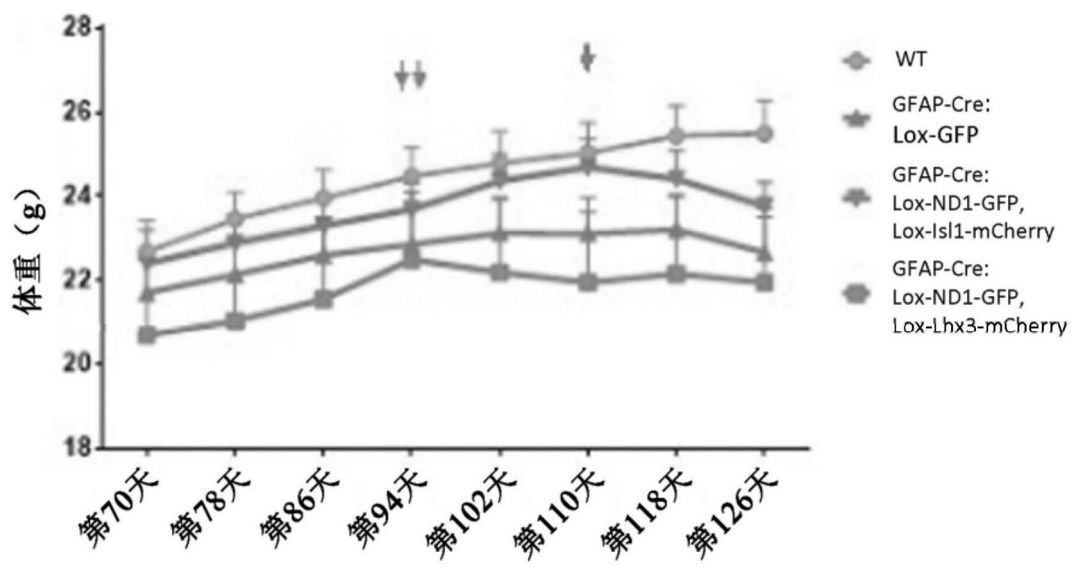


图31A

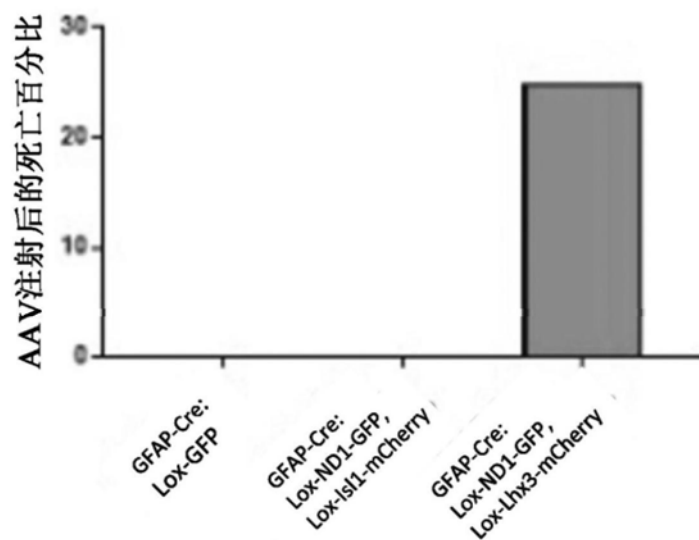


图31B

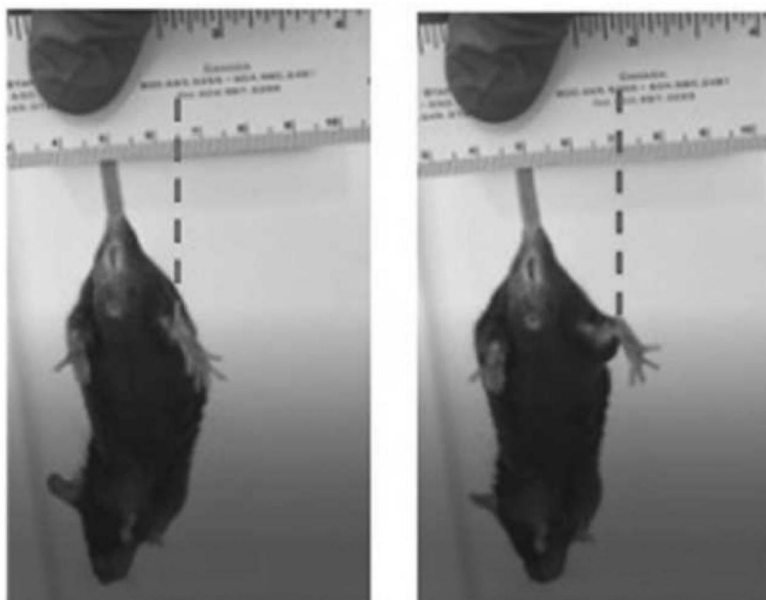


图31C

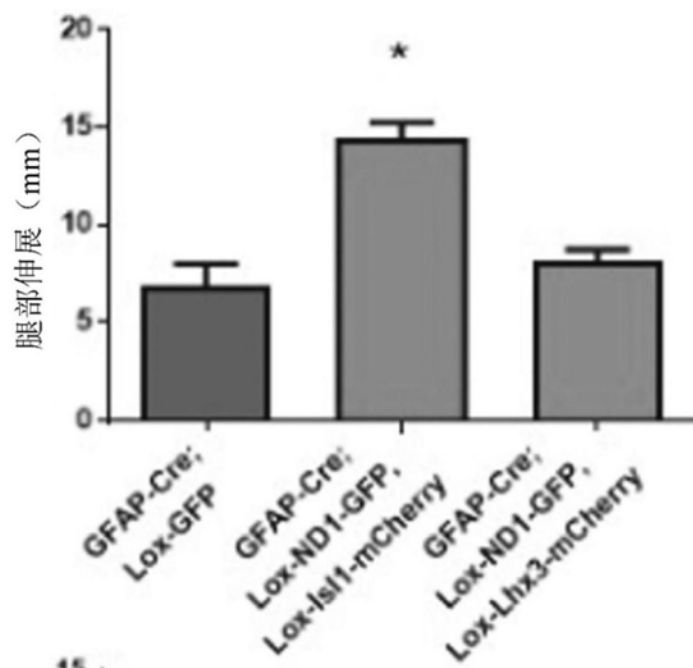


图31D

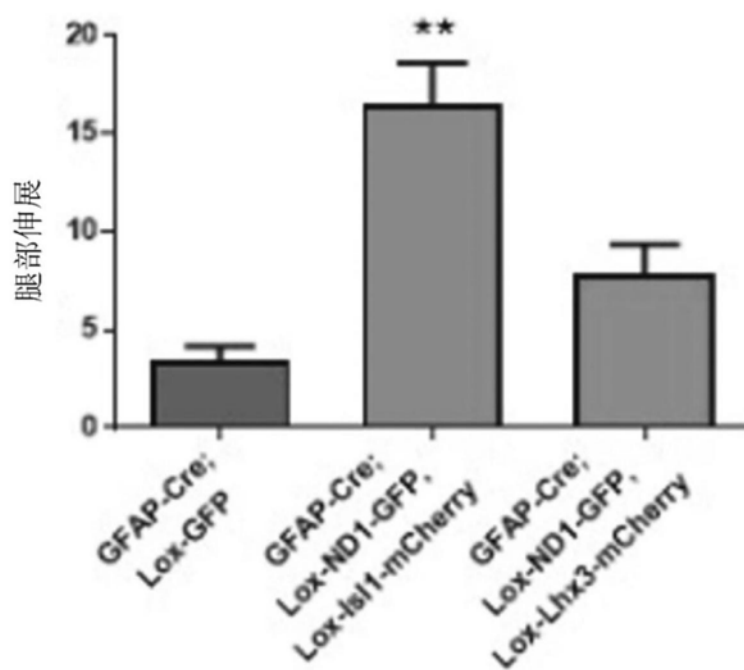


图31E

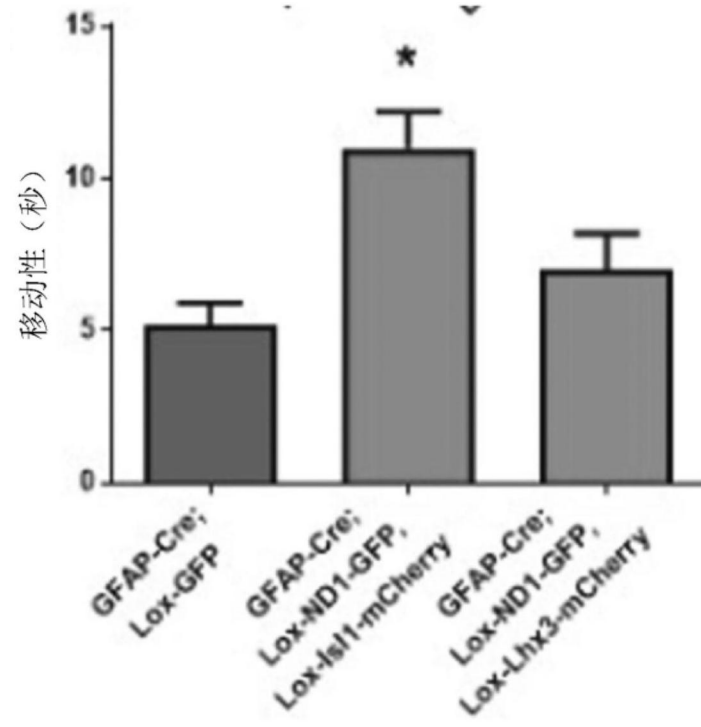


图31F

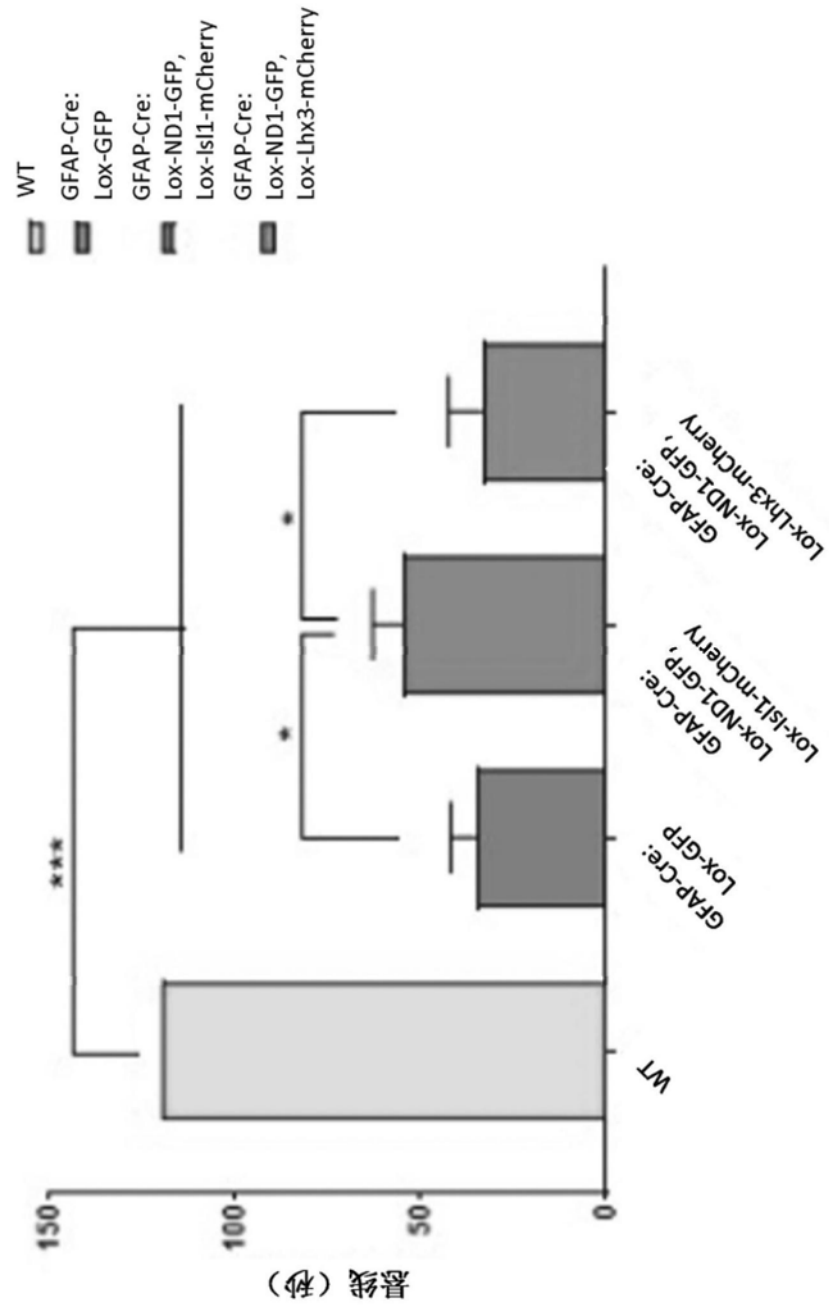


图31G

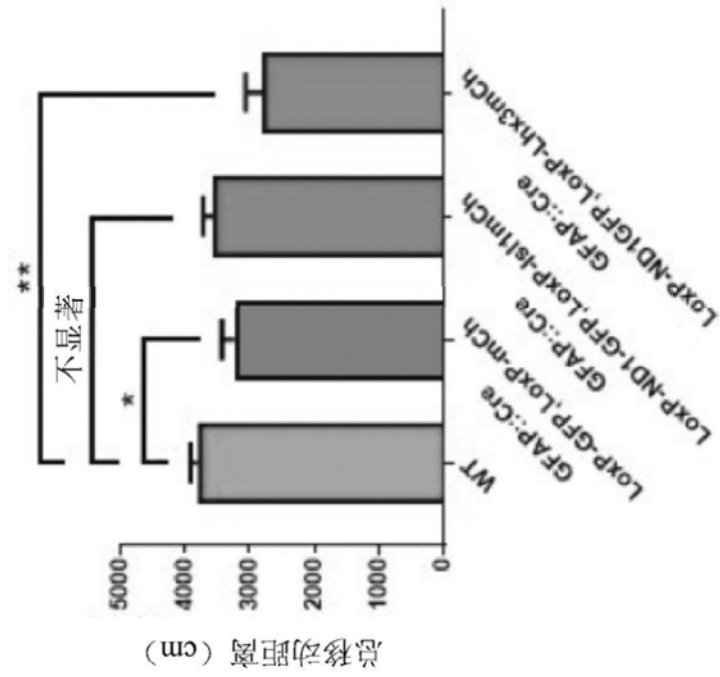


图32A

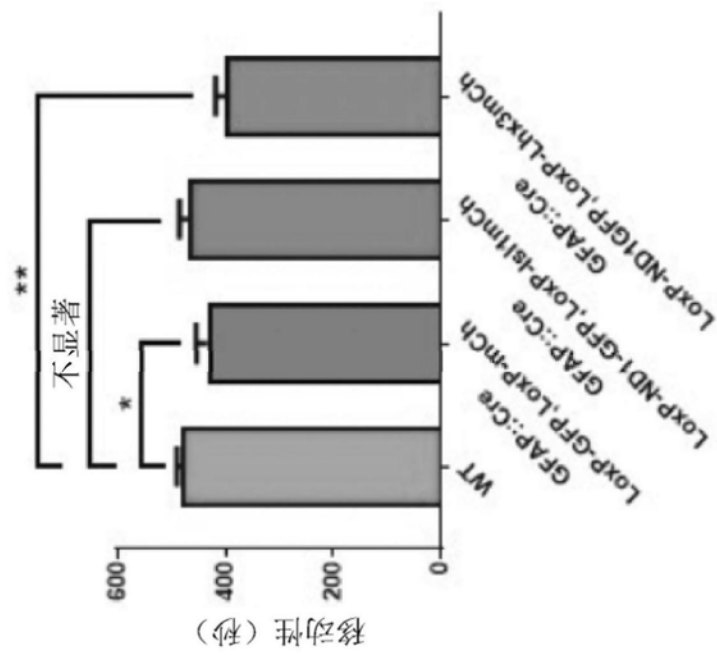


图32B

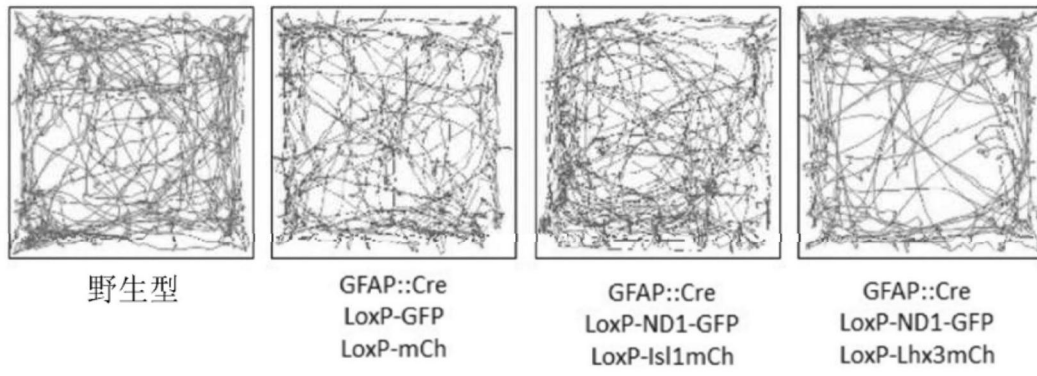


图32C

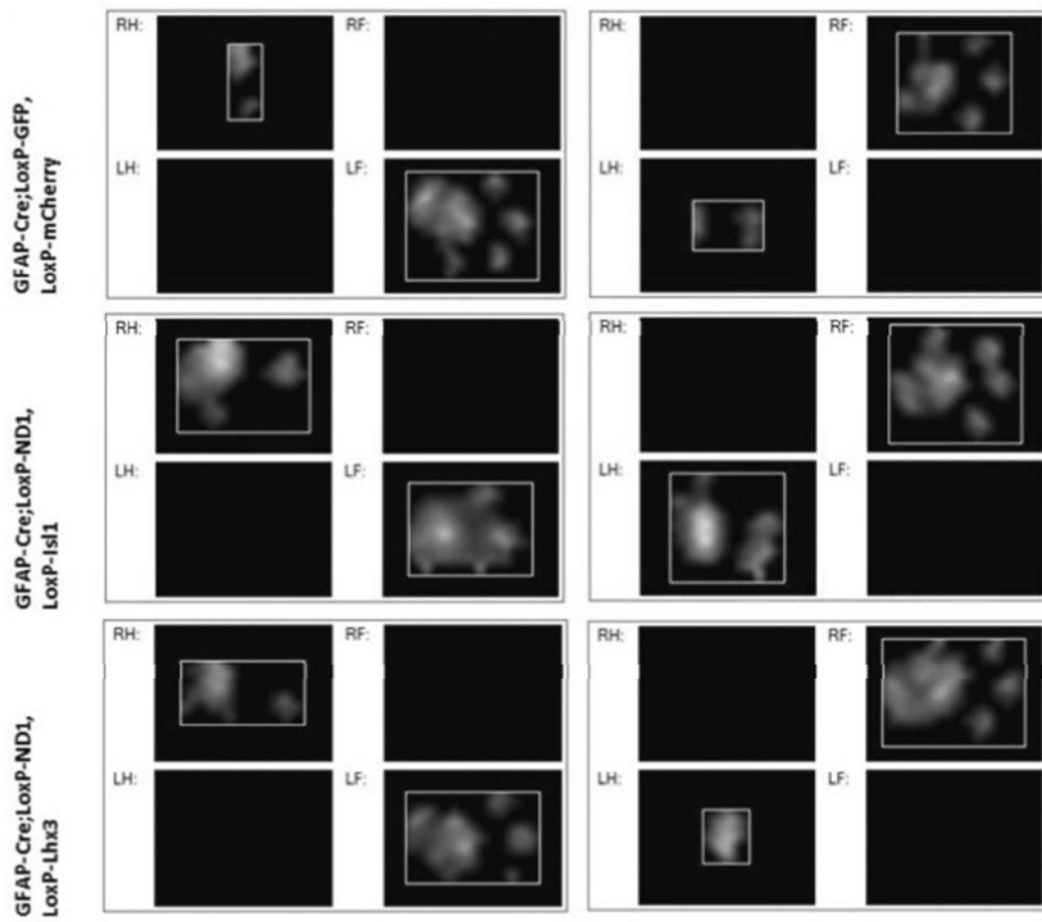


图33A

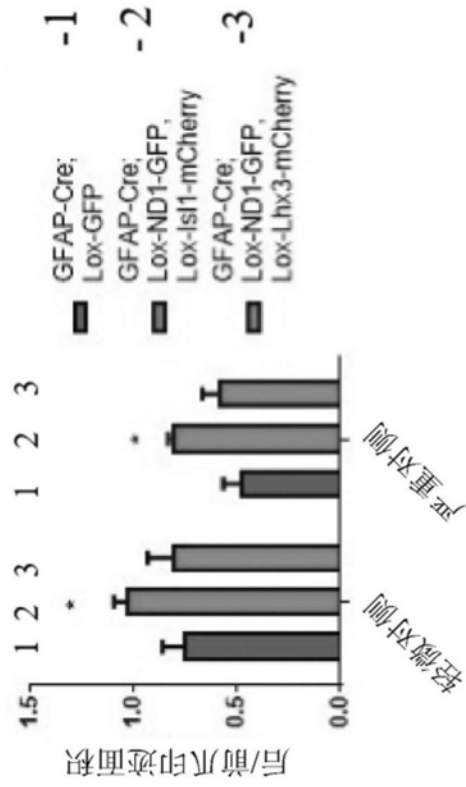


图33B

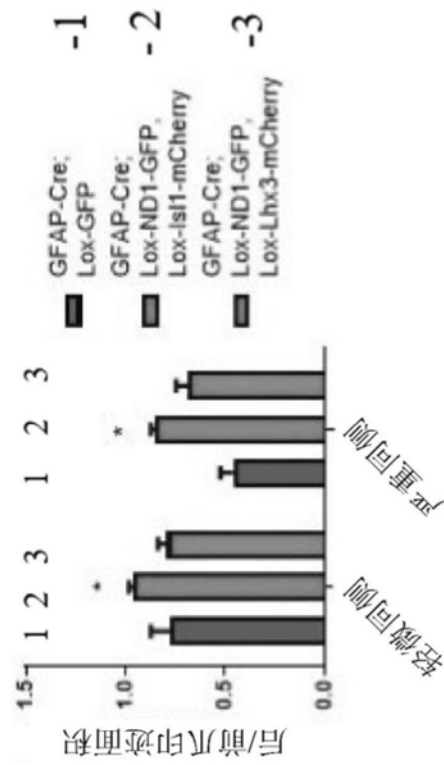


图33C