



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118660710 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 17

(21) 申请号 202280074400.X

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

(22) 申请日 2022.10.19

11105

专利代理师 秦剑

(30) 优先权数据

63/257,767 2021.10.20 US

(51) Int.Cl.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.05.08

A61K 35/30 (2015.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/02 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/078344 2022.10.19

A61P 27/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/069979 EN 2023.04.27

A61K 35/545 (2015.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/18 (2006.01)

(71) 申请人 罗切斯特大学

地址 美国纽约州

申请人 哥本哈根大学

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/14 (2006.01)

(72) 发明人 S·戈德曼

R·达科斯塔巴尔贝多维埃拉

权利要求书2页 说明书71页

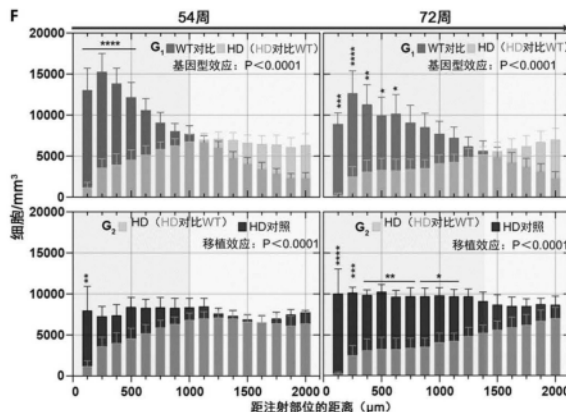
序列表(电子公布) 附图71页

(54) 发明名称

用于年龄相关白质损失的竞争性治疗的分离神经胶质祖细胞

(57) 摘要

本申请涉及减轻受试者的脑中少突胶质细胞损失、星形胶质细胞损失或白质损失,包括年龄相关的少突胶质细胞损失、年龄相关的星形胶质细胞损失或年龄相关的白质损失的不利影响。本申请还涉及再生神经胶质祖细胞或其子代,或涉及增强神经胶质祖细胞或其子代的发育潜力。



1. 一种治疗受试者中由年龄相关的少突胶质细胞损失介导的病症的方法,所述方法包括向所述有需要的受试者施用治疗有效量的分离的神经胶质祖细胞的群体。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述病症是血管性脑白质病、成人发病的自身免疫脱髓鞘病症、慢性辐射后诱导的脱髓鞘病症、成人发病的溶酶体贮积病、成人发病的脑白质营养不良或脑瘫。

3. 一种治疗受试者中由年龄相关的星形胶质细胞损失介导的病症的方法,所述方法包括向所述有需要的受试者施用治疗有效量的分离的神经胶质祖细胞的群体。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述病症是肌萎缩性侧索硬化症、额颞叶痴呆、精神分裂症、亨廷顿病、亚历山大病或白质消失病。

5. 一种治疗受试者中由年龄相关的白质损失介导的病症的方法,所述方法包括向所述有需要的受试者施用治疗有效量的分离的神经胶质祖细胞的群体。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述病症是血管性脑白质病、成人发病的自身免疫脱髓鞘病症、慢性辐射后诱导的脱髓鞘病症、成人发病的溶酶体贮积病、成人发病的脑白质营养不良、脑瘫、肌萎缩性侧索硬化症、额颞叶痴呆、精神分裂症、亨廷顿病、亚历山大病或白质消失病。

7. 根据权利要求1、3和5中任一项所述的方法,其中所述病症是亨廷顿病或皮层下痴呆。

8. 根据权利要求2或6所述的方法,其中所述血管性白质脑病是皮层下中风、糖尿病性脑白质病或高血压性脑白质病。

9. 根据权利要求2或6所述的方法,其中所述成人发病的自身免疫脱髓鞘病症是复发缓解型多发性硬化症、慢性或进行性多发性硬化症、视神经脊髓炎、横贯性脊髓炎和视神经炎。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述分离的神经胶质祖细胞的所述群体比所述受试者中的神经胶质祖细胞、少突胶质细胞或星形胶质细胞更年轻。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述分离的神经胶质祖细胞或其子代的所述群体替代所述受试者中的至少一些神经胶质祖细胞、少突胶质细胞或星形胶质细胞。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述分离的神经胶质祖细胞或其子代的所述群体比所述受试者中的神经胶质祖细胞、少突胶质细胞或星形胶质细胞生长或增殖或分裂更快。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述分离的神经胶质祖细胞或其子代的所述群体比所述受试者中的神经胶质祖细胞、少突胶质细胞或星形胶质细胞具有更高水平的MYC和YAP1途径活性。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述分离的神经胶质祖细胞的所述群体来源于多能干细胞。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述多能干细胞是胚胎干细胞。

17. 根据权利要求15所述的方法,其中所述多能干细胞是诱导多能干细胞。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中通过脑实质内、胼胝体内、心室内、鞘

内、脑内、脑池内或静脉内移植进行所述施用。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中将所述分离的神经胶质祖细胞的所述群体施用于前脑、纹状体和/或小脑。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述分离的神经胶质祖细胞对于所述受试者是异源的、异种的、同种异体的、同基因的或自体的。

用于年龄相关白质损失的竞争性治疗的分离神经胶质祖细胞

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年10月20日提交的美国临时申请号63/257,767的优先权。该申请的内容以引用方式整体并入本文。

技术领域

[0003] 本申请涉及少突胶质细胞损失、星形胶质细胞损失或白质损失的治疗,包括年龄相关的少突胶质细胞损失、年龄相关的星形胶质细胞损失或年龄相关的白质损失。

背景技术

[0004] 年龄相关的白质、少突胶质细胞或星形胶质细胞的损失通常发生在老年人中,并可能导致不良后果,包括认知障碍、痴呆、尿失禁、步态障碍、抑郁以及中风和死亡风险增加。这种损失包括髓磷脂、轴突和少突胶质细胞的部分损失;轻度反应性星形胶质细胞增生;稀疏分布的巨噬细胞以及由小动脉和较小血管的透明纤维化导致的狭窄。年龄相关的白质损失通常被认为是不完全缺血的形式,主要与脑小血管小动脉硬化有关。这种小血管改变会导致血脑屏障受损和白质中液体和大分子的慢性渗漏。事实上,在患有年龄相关的白质损失的患者中发现脑脊液白蛋白和IgG值的浓度增加。尽管年龄相关的白质损失一直是临床上的一个重大问题,但评估这种病症治疗方法的研究相对较少。

[0005] 血管老化的流行病学MRI研究表明,血压与年龄相关的白质损失的严重程度之间呈正线性关系。他汀类药物长期以来一直用于减少冠心病患者的心血管事件和缺血性中风。然而,尚不确定他汀类药物是否有助于治疗年龄相关的白质损失。乙酰胆碱酯酶抑制剂(多奈哌齐、加兰他敏和卡巴拉汀)和N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体拮抗剂(美金刚)已被批准用于治疗阿尔茨海默病。还有证据表明高同型半胱氨酸血症与年龄相关的白质损失有关。然而,尚不确定降低同型半胱氨酸治疗是否有助于减缓这种白质损失。

[0006] 需要治疗由白质、少突胶质细胞或星形胶质细胞的损失介导或以其为特征的障碍和病症的治疗剂和方法。本公开旨在克服本领域中的这些和其他缺陷。

发明内容

[0007] 本公开在多个方面解决了上述需求。

[0008] 在一些方面,本公开提供了一种治疗受试者的由年龄相关的少突胶质细胞损失介导的病症的方法。该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的分离的神经胶质祖细胞的群体。该病症可以是血管性脑白质病、成人发病的自身免疫脱髓鞘病症、慢性辐射后诱导的脱髓鞘病症、成人发病的溶酶体贮积病、成人发病的脑白质营养不良或脑瘫。

[0009] 在另一方面,本公开提供了一种治疗受试者的由年龄相关的星形胶质细胞损失介导的病症的方法。该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的分离的神经胶质祖细胞的群体。该病症可以是肌萎缩性侧索硬化症、额颞叶痴呆、精神分裂症、亨廷顿病、亚历山大病或白质消失病。

[0010] 在又一方面,本公开提供了一种治疗受试者的由年龄相关的白质损失介导的病症的方法。该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的分离的神经胶质祖细胞的群体。该病症的示例可包括血管性脑白质病、成人发病的自身免疫脱髓鞘病症、慢性辐射后诱导的脱髓鞘病症、成人发病的溶酶体贮积病、成人发病的脑白质营养不良、脑瘫、肌萎缩性侧索硬化症、额颞叶痴呆、精神分裂症、亨廷顿病、亚历山大病和白质消失病。

[0011] 在上述每种方法中,该病症可以是亨廷顿病或皮层下痴呆。血管性脑白质病的示例包括皮层下中风、糖尿病性脑白质病和高血压性脑白质病。成人发病的自身免疫脱髓鞘病症的示例包括复发缓解型多发性硬化症、慢性或进行性多发性硬化症、视神经脊髓炎、横贯性脊髓炎和视神经炎。

[0012] 在上述每种方法的一些实施方案中,分离的神经胶质祖细胞的群体比受试者中的神经胶质祖细胞、少突胶质细胞或星形胶质细胞更年轻。在一些实施方案中,分离的神经胶质祖细胞或其子代的群体替代受试者中的至少一些神经胶质祖细胞、少突胶质细胞或星形胶质细胞。在一些实施方案中,分离的神经胶质祖细胞或其子代的群体比受试者中的神经胶质祖细胞、少突胶质细胞或星形胶质细胞生长或增殖或分裂更快。在一些实施方案中,分离的神经胶质祖细胞或其子代的群体比受试者中的神经胶质祖细胞、少突胶质细胞或星形胶质细胞具有更高水平的MYC和YAP1途径活性。

[0013] 在一些实施方案中,受试者是哺乳动物诸如人。分离的神经胶质祖细胞的群体可来源于多能干细胞。多能干细胞的示例包括胚胎干细胞和诱导多能干细胞。在一些实施方案中,神经胶质祖细胞可以是本文所公开的神经胶质细胞(诸如神经胶质祖细胞、星形胶质细胞或少突胶质细胞)再生的细胞。

[0014] 对于上述每种方法,可通过脑实质内、胼胝体内、心室内、鞘内、脑内、脑池内或静脉内移植进行施用。在一些示例中,分离的神经胶质祖细胞或子代的群体可施用于前脑、纹状体和/或小脑。分离的神经胶质祖细胞或子代对于受试者可以是异源的、异种的、同种异体的、同基因的或自体的。

[0015] 在一些其他方面,本公开提供了再生神经胶质祖细胞或其子代或增强其发育潜力的方法。该方法包括在神经胶质祖细胞或子代中抑制选自E2F6、ZNF274、MAX和IKZF3的转录阻遏物。神经胶质祖细胞可以是老化的神经胶质祖细胞。子代可以是少突胶质细胞或星形胶质细胞。抑制步骤可包括在神经胶质祖细胞或子代中表达或引入转录阻遏物的抑制因子。

[0016] 在另一方面,本公开提供了根据上述方法制备的细胞或其子代。本公开还提供了分离的神经胶质祖细胞或其子代,其包含选自E2F6、ZNF274、MAX和IKZF3的转录阻遏物的抑制因子。在一些实施方案中,分离的神经胶质祖细胞或子代包含外源抑制因子。即,抑制因子对于细胞或子代是外源的。

[0017] 在另一方面,本公开提供了治疗由白质损失、少突胶质细胞损失或星形胶质细胞损失介导的病症的方法。该方法包括向有需要的受试者施用(i)治疗有效量的转录阻遏物的抑制因子,该转录阻遏物选自E2F6、ZNF274、MAX和IKZF3;和/或(ii)治疗有效量的根据上述方法制备的细胞或其子代;和/或(iii)治疗有效量的上述含有抑制因子的神经胶质祖细胞或子代。在一些实施方案中,白质损失、少突胶质细胞损失或星形胶质细胞损失是年龄相关的。

[0018] 受试者可以是哺乳动物诸如人。

[0019] 在一些实施方案中,抑制因子包括小分子化合物、寡核苷酸、核酸、肽、多肽、CRISPR/Cas系统或抗体或其抗原结合部分。在一些示例中,抑制因子可以是miRNA或siRNA分子,或CRISPR/Cas系统,或反义核酸。

[0020] 在一些实施方案中,核酸包含或编码miRNA或siRNA分子。在一些示例中,miRNA或siRNA分子包含与选自miR-125b-5p、miR-106a-5p、miR-17-5p、miR-130a-3p、miR-130b-3p、miR-379-5p、miR-93-3p、miR-1260b、miR-767-5p、miR-30b-5p、miR-9-3p、miR-9-5p和miR-485-5p的一者至少70%(例如,70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)相同的序列。优选地,miRNA或siRNA分子包含与选自miR-125b-5p、miR-106a-5p、miR-17-5p、miR-130a-3p、miR-130b-3p、miR-379-5p和miR-485-5p的一者的序列至少70%(例如,70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%)相同的序列。

[0021] 在一些实施方案中,抑制因子包括CRISPR-Cas系统。

[0022] 在上述方法中,抑制因子可通过脑实质内、胼胝体内、心室内、鞘内、脑内、脑池内或静脉内施用于患有该病症的受试者。该病症的示例包括溶酶体贮积病、自身免疫脱髓鞘病症(例如,多发性硬化症、视神经脊髓炎、横贯性脊髓炎和视神经炎)、血管性脑白质病(例如,皮层下中风、糖尿病性脑白质病和高血压性脑白质病、年龄相关的白质病和脊髓损伤)、辐射诱导的脱髓鞘病症、脑白质营养不良(例如,佩梅病、黑蒙性家族痴呆症、Sandhoff神经节苷脂沉积病、克拉伯病、异染性脑白质营养不良、黏多糖贮积症、尼曼匹克症、肾上腺脑白质营养不良、卡纳万病(Canavan's disease)、白质消失病和亚历山大病)或脑室周围白质软化或脑瘫。在一些实施方案中,该病症是亨廷顿病或皮层下痴呆。

[0023] 可通过脑实质内、胼胝体内、心室内、鞘内、脑内、脑池内或静脉内移植进行施用。在一些实施方案中,细胞或分离的神经胶质祖细胞或其子代可施用于前脑、纹状体和/或小脑。细胞或分离的神经胶质祖细胞或其子代对于受试者可以是异源的、异种的、同种异体的、同基因的或自体的。

[0024] 本公开的一个或多个实施方案的细节在以下描述中阐述。本公开的其他特征、目的和优点将从说明书和权利要求书中显而易见。

附图说明

[0025] 本专利或申请文件包含至少一个彩色附图。具有彩色附图的本专利或专利申请公开的副本将由官方在请求并支付必要费用后提供。

[0026] 图1A示出了WT-mCherry的表达的代表性图像。CRISPR介导的转基因报告基因盒向AAVS1安全港基因座的整合产生了表达mCherry的颜色标记的WT。E1-3,外显子1-3;LHA,左同源臂;SA,剪接受体位点;T2A,2A自裂解肽;Puro,嘌呤霉素抗性基因;pA,多聚腺苷酸化序列;CAG,CAG启动子;RHA,右同源臂。刻度:500 μ m。

[0027] 图1B示出了HD-EGFP的表达的代表性图像。CRISPR介导的转基因报告基因盒向AAVS1安全港基因座的整合产生了表达EGFP的颜色标记的HD hESC。

[0028] 图1C示出了工程化的WT和HD hESC系的HTT CAG长度和相应的转基因插入物。

[0029] 图1D示出了使用引物dna 803、dna 804和dna 1835(SEQ ID NO:1-3)评估转基因盒整合和接合性的PCR筛选策略。PCR筛选显示WT-EGFP、WT-mCherry和HD-EGFP在正确的位

点整合了转基因盒,其中WT-mCherry和WT-EGFP具有纯合整合,而HD-EGFP具有杂合整合。E1-3,外显子1-3;LHA,左同源臂;RHA,右同源臂。

[0030] 图1E示出了脑中WT-mCherry和HD-EGFP表达的代表性图像。OCT4的免疫染色显示在转基因插入物后保持多能性。

[0031] 图2A示出了来自WT-mCherry和HD-EGFP的代表性核型,以评估获得性拷贝数变异(CNV)和杂合性丢失区(LOH)。核型分析显示在转基因整合过程中没有获得染色体异常。

[0032] 图2B示出了携带hESC中常见的扩增(虚线内)的人20号染色体的aCGH谱的实例,已知该扩增赋予hESC选择性生长优势。在WT-EGFP、WT-mCherry或HD-EGFP hESC中没有检测到这种突变。

[0033] 图2C示出了在工程化品系中检测到正常范围内和正常范围外的多个突变的比较aCGH谱。没有突变预计会影响实验结果。

[0034] 图3A示出了HD嵌合小鼠的创建、分化过程和实验移植前的表型表征。

[0035] 图3B示出了WT-mCherry-和HD-EGFP神经胶质培养物的相差图像,两者均在150DIV下的双极hGPC中高度富集。刻度:50 μ m。

[0036] 图3C示出了150DIV细胞制备物(WT-mCherry, n=10;HD-EGFP, n=6)的流式细胞术显示CD140a (PDGFR α)⁺/CD44⁺hGPC的高度富集,其余由不太成熟的A2B5⁺hGPC和PDGFR α ⁻/CD44⁺星形胶质细胞组成。荧光报告基因的表达在整个神经胶质分化中保持一致。未配对的双尾t检验;数据显示为平均值 \pm SEM。

[0037] 图3D示出了免疫细胞化学证实了PDGFR α ⁺hGPC在由WT-mCherry和HD-EGFP hESC产生的培养物中的富集。这些hGPC的一部分分化成GFAP⁺星形胶质细胞。刻度:100 μ m。

[0038] 图3E、图3F和图3G分别示出了HD嵌合小鼠中表达(A)报告基因、(B)PDGFR α ⁺和(C)GFAP的细胞的百分比。

[0039] 图4A是展示人野生型神经胶质优于先前整合的HD神经胶质并取代先前整合的HD神经胶质的代表性图像。WT神经胶质(mCherry⁺,红色)移植到HD嵌合体的纹状体中,产生了HD神经胶质(EGFP⁺,绿色)的渐进替代,在它们的进展中产生了广泛的排他性结构域。虚线轮廓(白色)划定了人细胞被绘制和量化的纹状体轮廓。STR—纹状体(尾状核-壳核);LV—侧脑室;CTX—皮层。虚线矩形(橙色)代表72周时的插图。左刻度条:500 μ m;右刻度条100 μ m。

[0040] 图4B至图4C是展示人野生型神经胶质优于先前整合的HD神经胶质并取代先前整合的HD神经胶质的代表性图像。图4B展示当WT GPC(Olig2⁺,白色)取代其HD对应物时形成这些排他性结构域。刻度条:50 μ m。图4C示出了GPC替代先于星形胶质细胞替代,因为在WT神经胶质占主导的区域内,可发现HD星形胶质细胞(hGFAP⁺,白色)。刻度条:10 μ m。

[0041] 图4D至图4E示出了人野生型神经胶质优于先前整合的HD神经胶质并取代先前整合的HD神经胶质。图4D是描绘了用于量化纹状体中人神经胶质随时间推移分布的策略的动画。将人神经胶质在鼠纹状体的15个等距切面(5个作为示例显示)中绘制,并进行3D重建以供分析。它们的分布作为到注射部位的距离的函数进行径向测量。图4E示出了WT神经胶质随时间推移增加了它们的空间优势;WT对比HD(HD对比WT组)—54, n=8持续54周, n=7持续72周。它们的进展伴随着HD神经胶质相对于HD嵌合体对照的进行性根除;HD(HD对比WT组)。

[0042] 图4F示出了人野生型神经胶质优于先前整合的HD神经胶质并取代先前整合的HD神经胶质。体积定量示出了WT神经胶质随时间推移增加了它们的空间优势;WT与HD(HD对比

WT组) —54, n=8持续54周, n=7持续72周。它们的进展伴随着HD神经胶质相对于HD嵌合体对照的进行性根除;HD (HD对比WT组) —n=8持续54周, n=7持续72周, 对比HD对照—n=4持续两个时间点;使用Šidák多重比较检验的双向ANOVA;主要影响显示为数字P值, 而事后比较显示为:****P<0.0001, ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05;数据表示为平均值±s.e.m。

[0043] 图5示出了HD对比WT小鼠和HD对照小鼠的实验设计。

[0044] 图6A至图6C示出了人野生型神经胶质优于先前整合的人HD神经胶质。

[0045] 图6A提供的体视学估计表明, 随着WT神经胶质在人源化纹状体中扩展, HD神经胶质的总数相对于HD嵌合体对照逐渐减少;使用Šidák多重比较检验的双向ANOVA。

[0046] 图6B和图6C示出了两个群体中GPC (Olig2+, 图6B) 和星形胶质细胞 (GFAP+, 图6C) 的比例在它们竞争纹状体优势时得以维持;HD对照—n=4持续两个时间点;WT对照—n=4持续54周, n=3持续72周;HD对比WT—n=5持续54周, n=3持续72周;橙色箭头指向共同标记的细胞。数据显示为平均值±s.e.m, 具有单独的数据点。

[0047] 图6D至图6E示出了HD神经胶质 (图6D) 和WT神经胶质 (图6E) 的代表性图像, 其中WT神经胶质扩增为Olig2+ (白色) GPC, 取代其HD对应物。在它们占主导的区域内, 它们进一步分化成hGFAP+ (白色) 星形胶质细胞。

[0048] 图7A示出了WT对照组的实验设计和分析时间点。

[0049] 图7B示出了WT神经胶质 (mCherry+, 红色) 移植到Rag1 (-/-) 鼠的成年纹状体中的代表性图像, 随时间推移产生了鼠纹状体的实质性人源化。

[0050] 图7C至图7D是体积定量, 示出了WT神经胶质随时间推移浸润并分散在整个鼠纹状体中, 并且它们比移植到HD嵌合体上的神经胶质更广泛。WT (HD对比WT组) —n=8持续54周, n=7持续72周, 对比WT对照—n=7持续54周, n=5持续72周;使用Šidák多重比较检验的双向ANOVA;主要影响显示为数字P值;数据表示为平均值±s.e.m。图7C示出了WT对照。图7D示出了细胞/mm³。

[0051] 图8示出了接受mCherry标记 (WT-mCherry) 和未标记 (WT-未标记) 的WT神经胶质的1:1混合物的小鼠的实验设计。

[0052] 图9A至图9D示出了野生型神经胶质的共移植同基因克隆在取代HD神经胶质时茁壮生长并混合。

[0053] 图9A示出了针对人核抗原的免疫标记 (hN), 显示WT-mCherry (mCherry+hN+, 红色, 白色) 和WT-未标记 (mCherry-EGFP-hN+, 白色) 的神经胶质在先前的人源化纹状体中扩增, 逐渐取代HD神经胶质 (EGFP+hN+, 绿色, 白色)。比例尺500μm。

[0054] 图9B示出了由于混合的WT神经胶质扩增并取代了常驻的HD神经胶质而形成了大量的同型结构域。比例尺100μm。

[0055] 图9C示出了发现同基因WT-mCherry和WT-未标记混合。比例尺100μm。

[0056] 图9D示出了在WT神经胶质占主导的结构域内, 仅能发现更复杂的星形胶质细胞样HD神经胶质, 通常在白质束内。刻度条: 10μm。

[0057] 图10示出了纹状体内WT-mCherry和WT-未标记的神经胶质的比例的定量, 表明在任一定量的时间点 (每个时间点n=6) 两个群体之间没有显著差异;使用Šidák多重比较检验的双向ANOVA;平均值±s.e.m。

[0058] 图11示出了在新生小鼠中共移植WT和HT神经胶质的实验设计。

[0059] 图12A、图12B、图12B'和图12C示出了与WT和HT神经胶质共移植的小鼠纹状体内WT和HD神经胶质比例的代表性图像。图像显示对任一细胞群没有显著的生长优势;n=5;双尾配对t检验。

[0060] 图13A至图13B展示新生移植的WT和HD神经胶质的同等生长由同等增殖的Ki67⁺(白色)神经胶质池维持;HD对照—n=3;WT对照—n=4;HD对比WT—n=5;使用Tukey多重比较检验的单向ANOVA。图13A示出了纹状体占有率。图13B示出了Ki67⁺细胞的相对量。

[0061] 图14A示出了证明细胞年龄的差异足以驱动人神经胶质再增殖的实验设计。

[0062] 图14B示出了细胞年龄的差异足以驱动人神经胶质再增殖。

[0063] 图15A至图15D示出了产生具有通过HD神经胶质基本人源化的纹状体的鼠嵌合体以提供体内模型,通过该模型来评估患病的人神经胶质被其健康对应物的替代。将来源于表达mHtt的hESC且被工程化以表达EGFP的hGPC植入免疫功能受损的Rag1^(-/-)小鼠的新纹状体中,并在组织学上监测它们的扩增。

[0064] 图15A示出了实验设计和分析终点。

[0065] 图15B示出了新生移植的HD神经胶质(EGFP⁺,绿色)在鼠纹状体中扩增,随时间推移产生了组织的实质性人源化。虚线划定了人细胞被绘制和量化的纹状体边界。刻度:500μm。STR,新纹状体。

[0066] 图15C示出了它们的扩增伴随着鼠纹状体中携带的HD神经胶质的数量随时间推移而增加。数据表示为平均值±s.e.m,具有单独的数据点(n=4)。使用Tukey多重比较检验的单向ANOVA;12周(n=3)、24周(n=3)、36周(n=4)。

[0067] 图15D示出了它们的扩增伴随着鼠纹状体中携带的HD神经胶质的数量随时间推移而增加,但以它们的Ki67⁺增殖细胞库为代价。

[0068] 图15E至图15J示出了产生具有通过HD神经胶质基本人源化的纹状体的鼠嵌合体以提供体内模型,通过该模型来评估患病的人神经胶质被其健康对应物的替代。将来源于表达mHtt的hESC且被工程化以表达EGFP的hGPC植入免疫功能受损的Rag1^(-/-)小鼠的新纹状体中,并在组织学上监测它们的扩增。

[0069] 图15E示出了用于评估在HD GPC的新生植入后36周纹状体人源化程度的策略。HD细胞分布在15个等距矢状切面(5个作为示例显示)中绘制,并进行3D重建以供分析。

[0070] 图15F示出了用于体积分析的绘制和重建纹状体的渲染示例。

[0071] 图15G示出了体积定量,显示到36周,HD神经胶质在整个纹状体中扩增,假定均匀分布;数据显示为平均值(线)以及单个数据点(n=4)。数据表示为平均值±s.e.m,具有单独的数据点(n=4)。

[0072] 图15H至图15J示出了当HD神经胶质定殖于鼠纹状体中时,它们或者扩增并持续为Olig2⁺GPC(箭头指向Olig2⁺/EGFP⁺(红色/绿色)细胞),或者分化为hGFAP⁺(红色)星形胶质细胞。即使在扩增36周后,仍可发现增殖的(Ki67⁺,红色)HD神经胶质,尽管数量减少(D)。刻度:10μm。数据表示为平均值±s.e.m,具有单独的数据点(n=4)。

[0073] 图16A、图16B、图16B'和图16C示出了增殖优势驱动WT神经胶质前进穿过人源化HD纹状体。

[0074] 图17A、图17B、图17C、图17D、图17E、图17F、图17G、图17H和图17I示出了细胞年龄

的差异足以驱动竞争性神经胶质再增殖。

[0075] 图17A示出了实验设计和分析终点。

[0076] 图17B显示,较年轻WT神经胶质(EGFP⁺,绿色)移植到WT嵌合体的纹状体中产生了其老化对应物(mCherry⁺,红色)的选择性替代。虚线轮廓划定了人细胞被绘制和量化的纹状体区域。STR,纹状体(尾状核-壳核);LV,侧脑室;CTX,皮层。刻度:500 μ m。

[0077] 图17C示出了仅在出生时移植的WT嵌合对照。刻度:100 μ m。

[0078] 图17D示出了绘制的纹状体的渲染示例。体积定量显示,当较年轻WT神经胶质从其注射部位扩增时,它们会替代其较老的同基因对应物。

[0079] 图17E示出了老化对比年轻(同种移植)的结果,n=3。相对于对照WT嵌合体(老化对照),它们的进展跟踪了老化WT神经胶质从组织中的逐渐消除。刻度:100 μ m。

[0080] 图17F示出了老化(同种移植)对比老化(对照)的结果,各自n=3;使用Šidák多重比较检验的双向ANOVA;相互作用或主要影响显示为数字P值,而事后比较显示为:****P<0.0001,***P<0.001,**P<0.01,*P<0.05;数据表示为平均值 \pm SEM。

[0081] 图17G示出了在年轻和老化的WT神经胶质之间的界面上,在较年轻群体中可以看到Ki67⁺(白色)细胞的较高发生率。虚线方框表示分色插图(图17H)。刻度:50 μ m

[0082] 图17I示出了Ki67⁺细胞的定量,表明较年轻的WT神经胶质比其老化对应物明显更具增殖性;对于所有实验组,n=3;使用Šidák多重比较检验的单向ANOVA;数据显示为平均值 \pm SEM,具有单独的数据点。

[0083] 图18A示出了WT-mCherry hESC系的门控策略流式细胞术分析。

[0084] 图18B示出了HD-EGFP hESC系的门控策略流式细胞术分析。从分离的神经胶质培养物中,通过不掺入DAPI来鉴定活细胞。其中,针对PDGFR α 、CD44、PDGFR α /CD44和A2B5染色的细胞根据抗体特异性荧光强度(相对于它们相应的未染色门控对照)进行鉴定。基本上所有细胞在体外神经胶质分化中都保留了它们相应的报告基因表达。

[0085] 图19A示出了在WT和HD神经胶质之间的界面上,仅在WT群体中可以看到Ki67⁺(白色)细胞的高发生率。I'.竞争边界边缘的两种WT子细胞的放大倍数更高。

[0086] 图19B示出了每个群体内Ki67⁺神经胶质作为时间的函数的定量,显示WT神经胶质的显著增殖优势,这种优势在整个实验中持续存在。HD对照:54周(n=4),72周(n=4);WT对照:54周(n=5),72周:n=3;WT对比HD同种异体移植:54周(n=5),72周(n=3)。通过使用Šidák多重比较检验的双向ANOVA进行比较;平均值 \pm SEM。

[0087] 图20A至图20I示出了WT神经胶质在面对常驻的HD神经胶质时获得了显性竞争者转录谱。

[0088] 图20A示出了实验设计。

[0089] 图20B示出了鉴定六种主要细胞群的整合的scRNA-Seq数据的均匀流形近似投影(UMAP)可视化。

[0090] 图20C示出了鉴定六种主要细胞群的分组scRNA-Seq数据的UMAP可视化。

[0091] 图20D示出了每组中细胞类型的堆叠条形图比例。

[0092] 图20E示出了G2/M期中的循环GPC和GPC的细胞周期分析缺口箱图。方框表示四分位距,缺口表示95%置信区间,中值在缺口的中心,并且误差棒表示最小和最大非异常值。组间比较采用Kruskal-Wallis检验后的Dunn检验,其中多重比较通过Benjamini-Hochberg

方法进行调整。 $*\leq 0.05$, $**< 0.01$, $***\leq 0.001$, $****\leq 0.0001$ 经调整的p值。

[0093] 图20F示出了成对差异表达的GPC基因的维恩图 (Log2倍数变化 > 0.15 , 经调整的p值 < 0.05)。

[0094] 图20G示出了在GPC组之间差异表达的基因的精选的Ingenuity Pathway Analysis。圆圈的大小表示p值, 而阴影表示激活Z得分, 其中红色在上组中更活跃, 绿色在下组中更活跃。

[0095] 图20H示出了精选的成对差异表达的GPC基因的热图。

[0096] 图20I示出了成对差异表达的GPC核糖体基因log2倍数变化的小提琴图。

[0097] 图21A至图21I示出了WT神经胶质当面对其老化对应物时获得了显性转录谱。

[0098] 图21A示出了实验设计。

[0099] 图21B示出了鉴定六种主要细胞群的整合的scRNA-Seq数据的UMAP可视化。

[0100] 图21C示出了鉴定六种主要细胞群的分组scRNA-Seq数据的UMAP可视化。

[0101] 图21D示出了每组中细胞类型的堆叠条形图比例。

[0102] 图21E示出了G2/M期中的循环GPC和GPC的细胞周期分析缺口箱图。方框表示四分位距, 缺口表示95%置信区间, 中值在缺口的中心, 并且误差棒表示最小和最大非异常值。组间比较采用Kruskal-Wallis检验后的Dunn检验, 其中多重比较通过Benjamini-Hochberg方法进行调整。 $*\leq 0.05$, $**< 0.01$, $***\leq 0.001$, $****\leq 0.0001$ 经调整的p值。

[0103] 图21F示出了成对差异表达的GPC基因的维恩图 (Log2倍数变化 > 0.15 , 经调整的p值 < 0.05)。

[0104] 图21G示出了在GPC组之间差异表达的基因的精选的Ingenuity Pathway Analysis。圆圈的大小表示p值, 而阴影表示激活Z得分, 其中红色在上组中更活跃, 绿色在下组中更活跃。

[0105] 图21H示出了精选的成对差异表达的GPC基因的热图。

[0106] 图21I示出了成对差异表达的GPC核糖体基因log2倍数变化的小提琴图。

[0107] 图22A至图22F示出了竞争优势的转录特征。

[0108] 图22A示出了转录因子候选物鉴定的示意图。

[0109] 图22B示出了在每种条件下鉴定的WGCNA模块特征基因的小提琴图。图中所示为重要模块(黑色、绿色、蓝色、褐色、红色、青色), 其成员富集针对五种转录因子的下游靶标(图22E)。

[0110] 图22C示出了相对重要性分析, 以估计每种生物因素(年龄对比基因型)对每个模块特征基因的差异贡献。

[0111] 图22D显示, 基因集富集分析(GSEA)突出了那些优先化转录因子, 其调节子在显性年轻WT细胞中富集上调的基因。

[0112] 图22E示出了通过SCENIC预测的建立竞争优势的重要转录因子及其跨组的相对活性。

[0113] 图22F示出了具有代表性下游靶标及其功能信号传导途径的调控网络。靶标属于图22B中突出显示的模块, 并且它们的表达受图22E中至少一种其他重要转录因子控制。NES: 网络富集得分。

[0114] 图23A、图23B和图23C显示, 老化的人神经胶质通过诱导的凋亡被其较年轻的对应

物消除。

[0115] 图23A示出了在年轻(EGFP⁺,绿色)和老化的WT神经胶质(mCherry⁺,红色)之间的边界处,在老化群体中凋亡TUNEL⁺(白色)细胞的较高发生率是明显的。刻度:100 μ m。

[0116] 图23B示出了这些不同群体之间的竞争性界面的更高放大倍率显示常驻的神经胶质选择性地经历凋亡。刻度:50 μ m。

[0117] 图23C显示,TUNEL⁺细胞的定量表明,相对于它们的较年轻的同基因对应物和未用较年轻细胞攻击的老化WT嵌合对照,TUNEL⁺细胞在老化的常驻WT神经胶质中的发生率显著更高。对来自60周和80周时间点的合并样品进行定量(对于所有实验组,n=5)。使用Šidák多重比较检验的单向ANOVA;数据显示为平均值 \pm SEM,具有单独的数据点。

[0118] 图24A和图24B示出了植入的人细胞从其嵌合宿主的分离。

[0119] 图24A是示出了人细胞从其嵌合宿主的纹状体中分离所涉及的实验工作流程的示意图。

[0120] 图24B示出了在从解离的嵌合纹状体中提取的人细胞的FACS富集中采用的门控策略的示例。通过不掺入DAPI来鉴定活细胞。其中,人细胞基于其相应荧光报告基因(EGFP⁺或mCherry⁺)的表达进行分选,并被收获以用于单细胞测序和下游分析。

[0121] 图25A、图25B、图25C、图25D、图25E和图25F示出了人胎儿GPC的大量RNA-Seq表征。

[0122] 图25A示出了对CD140a⁺、CD140a⁻和A2B5⁺/PSA-NCAM选择的妊娠中期人胎儿脑分离物进行大量和scRNA测序的工作流程。

[0123] 图25B示出了两个批次中所有样品的主成分分析。

[0124] 图25C示出了CD140a⁺对比CD140a⁻和CD140⁺对比A2B5⁺/PSA-NCAM⁻差异表达的基因集的维恩图(p<0.01,并且绝对log₂倍数变化>1)。

[0125] 图25D示出了两个基因集的显著Ingenuity Pathway Analysis项。大小代表-log₁₀ p值,并且颜色代表激活Z得分(蓝色,CD140a⁺;红色,A2B5⁺或CD140a⁻)。

[0126] 图25E示出了两个基因集的重要基因的log₂倍数变化。缺少的条是不显著的。

[0127] 图25F示出了1E中所选基因的每百万转化转录物(TPM)的热图。

[0128] 图26A、图26B、图26C、图26D、图26E、图26F、图26G和图26H示出了CD140a和A2B5选择的人胎儿GPC的单细胞RNA测序

[0129] 图26A示出了在来源于20周孕龄人胎儿VZ/SVZ的FACS分离的hGPC的scRNA-Seq分析期间鉴定的原代细胞类型的UMAP图。

[0130] 图26B示出了仅PSA-NCAM⁻/A2B5⁺人胎儿细胞的UMAP。

[0131] 图26C示出了仅CD140a⁺人胎儿细胞的UMAP。

[0132] 图26D示出了细胞类型选择性标记基因的小提琴图。

[0133] 图26E示出了GPC对比前GPC群体的火山图。

[0134] 图26F示出了GPC和前GPC之间选择的差异表达基因的特征图。

[0135] 图26F示出了选择的显著富集的GPC和前GPC的IPA项,表明它们的-log₁₀ p值和激活Z得分。

[0136] 图26H示出了预测在胎儿hGPC中显著激活的转录因子的选择特征图。相对转录因子调节子激活显示为使用SCENIC软件包计算的。

[0137] 图27A、图27B、图27C、图27D、图27E和图27F显示成人GPC在转录上和功能上不同于

胎儿GPC

[0138] 图27A示出了成人和胎儿GPC的大量RNA-Seq分析的工作流程。

[0139] 图27B示出了三个批次中所有样品的主成分分析。

[0140] 图27C示出了成人对比胎儿差异表达基因集合的维恩图。

[0141] 图27B示出了精选的项和基因的IPA网络。节点大小与节点度成正比。标记颜色对应于成人(红色)或胎儿(蓝色)群体的富集。

[0142] 图27E示出了按模块的重要IPA项的条形图。Z得分表明胎儿(蓝色)或成人(红色)hGPC中的预测激活。

[0143] 图27F示出了网络基因TPM的log2倍数变化的条形图和热图。

[0144] 图28A、图28B、图28C、图28D、图28E、图28F和图28G显示,转录因子活性的推断涉及成人hGPC同一性建立中的一组转录阻遏物。

[0145] 图28A示出了预测在胎儿和成人GPC中有活性的显著富集的转录因子的归一化富集得分图。每个点是一个基序,其大小表明该基序被预测在多少个基因中是活跃的,并且颜色代表该基序被发现富集的启动子周围的窗口。

[0146] 图28B示出了富集的TF TPM的热图

[0147] 图28C示出了两种胎儿hGPC分离物相对于成人GPC的log2倍数变化。

[0148] 图28D至图28G示出了分成如下的精选基因的预测直接转录因子活性:(图28D)胎儿激活物;(图28E)胎儿阻遏物;(图28F)成人激活物;和(图28G)成人阻遏物。颜色表示成人(红色)或胎儿(蓝色)hGPC的差异表达;形状决定了节点的类型(八边形,阻遏物;矩形,激活物;椭圆形,其他靶基因)。加框和圈的基因表示功能相关的基因,这些基因有助于神经胶质祖细胞/少突胶质细胞的同一性、衰老/增殖靶标,或也被认为是激活的上游或下游TF。

[0149] 图29A、图29B、图29C和图29D示出了通过成人hGPC富集的阻遏物对老化的GPC转录组的诱导。

[0150] 图29A示出了概述四种不同的多西环素(Dox)-诱导型EGFP慢病毒表达载体的结构的示意图,每种载体编码以下转录阻遏物之一:E2F6、IKZF3、MAX或ZNF274。

[0151] 图29B示出了诱导多能干细胞(iPSC)衍生的hGPC培养物(细胞系C27)用单一慢病毒或载体转导一天,然后在实验的剩余时间用Dox处理。在Dox诱导的转基因表达开始后的第3、7和10天,通过FACS分离hGPC用于qPCR。

[0152] 图29C示出了Dox处理的细胞的qPCR,其显示与匹配的时间点对照相比每种转录因子的表达。

[0153] 图29D示出了选择的老化相关基因的qPCR倍数变化热图。在细胞批次效应回归后,通过线性模型的事后最小二乘均值检验来计算时间点内与对照的比较。经FDR调整的p值: $* < 0.05$, $** < 0.01$, $*** < 0.001$ 。

[0154] 图30A、图30B、图30C、图30D和图30E示出了miRNA驱动与转录因子活性相似的成人GPC转录差异。

[0155] 图30A示出了来自人A2B5+成人和CD140a+胎儿GPC的miRNA微阵列样品的主成分分析。

[0156] 图30B示出了差异表达的miRNA的log2倍数变化条形图和热图。

[0157] 图30C示出了miRNA富集相对于其预测基因靶标的平均log2 FC的表征气泡图。

- [0158] 图30D示出了胎儿富集的miRNA及其预测靶标的精选信号网络。
- [0159] 图30E示出了成人富集的miRNA及其预测靶标的精选信号网络。
- [0160] 图31A、图31B、图31C、图31D和图31E示出了通过CD140a⁺或A2B5⁺/PSA-NCAM⁻选择富集人胎儿GPC。
- [0161] 图31A示出了CD140a⁺和A2B5⁺胎儿GPC的主成分分析。
- [0162] 图31B示出了火山图,表明A2B5(绿色)和CD140a(蓝色)基因显著富集。
- [0163] 图31C示出了CD140a⁺和CD140a⁻胎儿细胞的主成分分析。
- [0164] 图31D示出了火山图,表明CD140a⁻(洋红色)和CD140a(蓝色)基因显著富集。
- [0165] 图31E示出了两个基因集中显著上调和下调基因的翻转图。
- [0166] 图32A、图32B、图32C和图32D显示单细胞RNA-Seq质量过滤。
- [0167] 图32A示出了未过滤的A2B5⁺/PSA-NCAM⁻捕获物的小提琴图。
- [0168] 图32B示出了未过滤的CD140a⁺ scRNA-Seq捕获物的小提琴图。
- [0169] 图32C示出了A2B5⁺/PSA-NCAM⁻捕获物的质量过滤(线粒体基因表达百分比<15%和>500个独特基因)后的小提琴图。
- [0170] 图32D示出了CD140a⁺捕获物的质量过滤(线粒体基因表达百分比<15%和>500个独特基因)后的小提琴图。
- [0171] 图33A、图33B和图33C示出了A2B5⁺/PSA-NCAM⁻相对于CD140a⁺胎儿hGPC的单细胞RNA测序。图33A示出了A2B5⁺和CD140a⁺胎儿hGPC的UMAP图。图33B示出了每个分选范例分离物中细胞类型的频率。图33C示出了CD140a⁺和A2B5⁺胎儿hGPC分离物之间的差异表达的大量RNA-Seq log₂倍数变化对比假大量log₂倍数变化的散点图。
- [0172] 图34示出了胎儿或成人hGPC中活性转录因子的共有基序。胎儿和成人GPC中所有预测的活性转录因子的矩阵。大小和颜色指示转录因子之间共有的基序的程度。
- [0173] 图35示出了成人阻遏物同种型表达。在每个GPC组中,所有蛋白编码成人阻遏物同种型的每百万转录物(TPM)的条形图。
- [0174] 图36显示,iPSC衍生的hGPC的大量RNA-Seq揭示了年龄相关基因的一致丰度。iPSC衍生的hGPC(C27)通过CD140a⁺FACS分离并通过大量RNA测序分析。大量的相关神经胶质年龄相关基因,包括活性转录因子队列中的基因,与胎儿和成人hGPC数据一起显示。
- [0175] 图37A和图37B显示,miRNA的转录因子调节提供了神经胶质老化基因表达的转录后调节。图37A示出了显著的成人对比胎儿GPC转录因子的log₂ FC小提琴图,该转录因子被预测为在差异表达的成人对比胎儿GPC miRNA的上游。图37B示出了从图26鉴定的转录因子的网络以及它们对差异表达的成人对比胎儿hGPC miRNA的预测调节。

具体实施方式

- [0176] 本公开涉及用于治疗由少突胶质细胞损失、星形胶质细胞损失或白质损失介导的病症的组合物和方法,该病症包括年龄相关的少突胶质细胞损失、年龄相关的星形胶质细胞损失或年龄相关的白质损失。本公开还涉及(a)再生神经胶质祖细胞或其子代或(b)增强神经胶质祖细胞或其子代的发育潜力。
- [0177] 由白质/少突胶质细胞/星形胶质细胞的损失介导的病症和相关障碍
- [0178] 本公开的某些方面涉及用于治疗由少突胶质细胞损失、星形胶质细胞损失或白质

损失介导的病症或障碍的组合物和方法。这种病症通常伴有中枢神经系统(“CNS”)中髓磷脂的缺乏。这种病症或障碍的示例包括与受试者的脱髓鞘、髓鞘形成不足和髓鞘再生或髓鞘形成障碍相关的任何疾病或病症。这种病症或障碍可以是遗传的、后天的或由于衰老过程,即年龄相关的。在一些实施方案中,该病症是在正常或健康衰老情况下定义为或特征为少突胶质细胞损失、星形胶质细胞损失或白质萎缩的年龄相关的白质疾病的病症。

[0179] 对人类而言,衰老代表着一个人随时间推移而发生的变化的积累,可包括身体、心理和社会变化。衰老增加了人类疾病的风险,诸如癌症、糖尿病、心血管疾病、中风和更多疾病,包括中枢神经系统脱髓鞘,这种疾病常见于各种神经退行性疾病。因此,在本公开的一些实施方案中,该病症或障碍由年龄相关的少突胶质细胞损失、年龄相关的星形胶质细胞损失或年龄相关的白质损失介导。

[0180] 中枢神经系统脱髓鞘可能是由于基因突变(脑白质营养不良)、自身免疫性疾病(例如,多发性硬化症)或创伤(例如,创伤性脑损伤、脊髓损伤或缺血性中风)而发生。髓磷脂功能的紊乱可能在神经和精神障碍中起关键作用,这些神经和精神障碍诸如自闭症谱系障碍(ASD)、阿尔茨海默病、亨廷顿病、多系统萎缩、帕金森病、脆性X综合征、精神分裂症和各种脑白质营养不良。

[0181] 脑白质营养不良是一组罕见的主要遗传性神经系统失调,由髓磷脂的异常产生、加工或发育引起,是遗传缺陷(突变)的结果。一些形式在出生时存在,而另一些形式可能要等到孩子长大后才会出现症状。少数主要影响成人。脑白质营养不良包括卡纳万病、佩梅病、伴有基底神经节和小脑的萎缩的髓鞘形成不足、克拉伯病(球形细胞脑白质营养不良)、X连锁肾上腺脑白质营养不良、异染性脑白质营养不良、佩梅样病(或髓鞘形成不足的脑白质营养不良-2)、C型尼曼匹克症(NPC)、伴有自主神经疾病的常染色体显性脑白质营养不良(ADLD)、4H脑白质营养不良(Po1 III相关的脑白质营养不良)、齐薇格谱系障碍(ZSD)、伴有中枢神经系统髓鞘形成不足或CACH的儿童共济失调(也称为白质消失病或VWMD)、脑髓黄瘤病(CTX)、亚历山大病(AXD)、SOX10-相关的外周神经脱髓鞘病变、中枢神经系统脱髓鞘性脑白质营养不良、瓦登伯革氏症候群、希尔施普龙病(PCWH)、成人多聚葡萄糖体病(APBD)、遗传性弥漫性脑白质病伴轴索球样变(HDLS)、Aicardi-Goutieres综合征(AGS)和成人雷夫苏姆病(Adult Refsum disease)。

[0182] 根据本文所述方法治疗的合适受试者包括患有由髓磷脂缺乏介导的病症的任何受试者,该病症可表现为年龄相关的少突胶质细胞损失、年龄相关的星形胶质细胞损失或年龄相关的白质损失。

[0183] 在另一个实施方案中,由髓磷脂缺乏介导的病症选自小儿脑白质营养不良、溶酶体贮积病、先天性髓鞘形成障碍、脑瘫、炎性脱髓鞘、感染后和接种后的脑白质炎、放疗或化疗诱导的脱髓鞘和血管脱髓鞘。

[0184] 在另一个实施方案中,由髓磷脂缺乏介导的病症需要髓鞘形成。在另一个实施方案中,由髓磷脂缺乏介导的病症需要髓鞘再生。在一些实施方案中,需要髓鞘再生的病症选自多发性硬化症、视神经脊髓炎、横贯性脊髓炎、视神经炎、皮层下中风、糖尿病性脑白质病、高血压性脑白质病、年龄相关的白质病、白质痴呆、宾斯旺格病、脊髓损伤、放疗或化疗诱导的脱髓鞘、感染后和接种后的脑白质炎、脑室周围白质软化和脑瘫。

[0185] 在另一个实施方案中,由髓磷脂缺乏介导的病症是神经退行性疾病。在一些实施

方案中,神经退行性疾病是亨廷顿病。亨廷顿病是一种常染色体显性神经退行性疾病,其特征是伴随破坏性精神和认知退化的持续进行性运动障碍。亨廷顿病与新纹状体的持续严重萎缩有关,这与纹状体主要输出神经元即 γ -氨基丁酸能的中型多棘状突起投射神经元的显著丧失有关。亨廷顿病的特征在于亨廷顿蛋白基因的第一个外显子中异常长的CAG重复扩增。突变亨廷顿蛋白的编码的聚谷氨酰胺扩增破坏了其正常功能和蛋白-蛋白相互作用,最终产生广泛的神经病理,在新纹状体中最为明显。

[0186] 根据本申请可治疗的其他神经退行性疾病包括额颞叶痴呆、阿尔茨海默病、帕金森病、多系统萎缩和肌萎缩性侧索硬化症。

[0187] 在另一个实施方案中,由髓磷脂缺乏介导的病症是神经精神疾病。在一些实施方案中,该神经精神疾病是精神分裂症。精神分裂症是一种严重的精神疾病,会影响人的思考、感觉和行为。精神分裂症的症状通常分为以下三类:(1)精神病症状,包括改变的感知;(2)负面症状,包括动力丧失、不感兴趣和缺乏乐趣;(3)认知症状,包括注意力、集中力和记忆力问题。根据本申请可治疗的其他神经精神疾病包括自闭症谱系障碍和双相情感障碍。

[0188] 上述遗传性或获得性或年龄相关的髓磷脂相关障碍影响数百万人,给受影响的个人及其家庭带来沉重负担。许多这些障碍背后的病理过程仍然知之甚少,而且很少有疾病缓解疗法。对于治疗这些障碍的治疗剂存在未满足的需求。本公开以多种方式解决了这些需求,例如脑中老化或较老的神经胶质祖细胞的竞争性替代以及神经胶质祖细胞或其子代细胞的再生。成人脑中神经胶质祖细胞的竞争性替代

[0189] 本公开的一些方面涉及神经胶质祖细胞的竞争性替代。发育和肿瘤形成方面细胞群之间的竞争已得到充分证实,但成人脑中细胞之间的竞争仍然很少研究。具体地,目前尚不清楚同种异体移植的人神经胶质细胞是否可胜过患病细胞以在成人脑中实现治疗性替代。

[0190] 如本文所公开的,发明人将由人胚胎干细胞(hESC)产生的健康的、荧光团标记的野生型(WT)hGPC移植到成年小鼠的纹状体中,这些成年小鼠已由亨廷顿病(HD)衍生的hESC产生的表达HTT的光谱独特的突变hGPCR进行新生嵌合。WT hGPC胜过并最终消除其人HD对应物,用健康的神经胶质重新填充宿主纹状体。单细胞RNA-Seq揭示了WT供体hGPC在与常驻的HD衍生的神经胶质相互作用后获得YAP1/MYC定义的显性竞争者表型。竞争成功主要取决于竞争群体之间的年龄差异,因为成人移植的WT hGPC胜过新生儿移植的常驻同基因WT细胞,并因此更老。这些数据表明,在成人脑中,年老和患病的人神经胶质可广泛地被更年轻的健康hGPC替代,并且表明新生成的神经胶质祖细胞的移植可用作替代年老和患病的人神经胶质的广泛治疗平台。

[0191] 神经胶质功能障碍是导致多种神经系统疾病的原因之一。星形胶质细胞和少突胶质细胞病理与许多神经退行性和神经精神障碍的发生和进展有关,包括肌萎缩性侧索硬化症(ALS)和亨廷顿病(HD)以及精神分裂症和双相情感障碍等各种病症。在这种情况下,由于健康的神经胶质祖细胞(hGPC)能够分散和定植于宿主,同时产生新的星形胶质细胞和少突胶质细胞,因此用它们替代患病的神经胶质可提供真正的治疗益处。然而,尽管在多种实验性治疗模型中人GPC可胜过并替代它们的鼠对应物,但是尚不清楚同种异体移植的人GPC是否可替代其他人细胞(无论是患病细胞还是其他细胞)。

[0192] 如以下实施例所公开的,通过将健康的hGPC移植到与来源于患有HD的受试者的

hGPC新生嵌合的成年小鼠的纹状体中,使用人神经胶质嵌合小鼠来模拟健康和患病的人神经胶质之间的体内竞争。HD是一种原型单基因神经退行性疾病,由突变的CAG重复序列扩增的亨廷顿蛋白(mHTT)基因的表达引起。

[0193] 神经胶质病理与HD的突触功能障碍有因果关系。用植入的健康hGPC替代表达mHTT的鼠神经胶质细胞足以挽救转基因小鼠模型中HD表型的方面。如本文所公开的,发明人使用遗传标记的野生型(WT)和表达mHTT的hGPC(来源于人胚胎干细胞(hESC)的同胞系)来研究健康的WT hGPC是否可在体内替代患病的HD hGPC。发现当健康的hGPC被传递到与HD hGPC嵌合的成年小鼠的纹状体中时,健康的hGPC胜过并取代了已经常驻的HD hGPC。然而,由于WT供体细胞实际上比它们所替代的常驻宿主神经胶质更年轻,因此有人询问细胞年龄的差异是否也会对竞争结果有贡献。结果发现是这样的,将健康的年轻hGPC植入成年小鼠体内,这些小鼠在新生时被移植了来源于同一健康系的单独标记的神经胶质细胞,无情地替代了较老的同基因对应物。对较年轻的获胜hGPC群体和较老的淘汰hGPC群体的单细胞RNA序列分析(scRNA-Seq)揭示了一组差异表达的途径,这些途径与获胜的WT hGPC和淘汰的HD hGPC重叠,表明竞争性显性GPC的共同转录特征。这些数据表明,在成熟的成人脑中可发生克隆上不同的神经胶质群体之间的动态竞争,并且因此可通过引入年轻的健康hGPC来实现现有的和患病的神经胶质的替代。

[0194] 鉴于神经胶质病理对多种神经退行性和神经精神障碍的影响,发明人试图建立野生型和患病人GPC在体内的相对适合度,以便评估同种异体神经胶质替代作为治疗策略的潜力。鉴于神经胶质病理在HD中的作用已被充分描述,本公开的某些部分集中于亨廷顿病。研究发现,当将WT hGPC引入已经与HD hGPC嵌合的脑中时,WT细胞竞争性地占主导并最终替代了已经常驻的HD神经胶质祖细胞。健康细胞的选择性扩增与常驻HD神经胶质从组织中的主动消除有关,这得到了健康供体细胞相对于它们已经常驻的患病对应物的持续增殖优势的支持。

[0195] 单细胞RNA序列分析表明,健康WT hGPC在体内遇到HD神经胶质时的优势与它们表达成功的细胞间竞争的典型特征有关。然而,令人惊讶的是,当针对已经常驻的(较老的)和新引入的(较年轻的)供体hGPC的相对年龄进行控制时,发现移植到已新生嵌合的成年新纹状体中的WT hGPC与单独标记的但在其他方面同基因的WT hGPC类似地占优势并替代了已经常驻的hGPC。这一观察结果表明,细胞年轻度是竞争性成功的关键决定因素,也是供体hGPC群体替代宿主群体能力的关键决定因素。因此,移植的年轻WT hGPC在体内获得显性竞争者表型的基因表达特征,无论是被已经常驻的较老的HD攻击还是被同基因WT hGPC攻击;事实上,本文所述的分析表明,细胞年轻度是比疾病基因型甚至更强的竞争性适合度决定因素。

[0196] 这些观察结果表明,这个过程是由发育细胞竞争的重演驱动的,发育细胞竞争是进化上保守的选择过程,通过该过程,不太适合的克隆被它们更适合的邻近细胞从组织中感知和淘汰,但正如这里在成人脑中动态表现的那样。这一过程已在多种系统中得到证实,包括通过生长较快、更竞争性地适合的邻近细胞主动消除生长相对缓慢的细胞。注意到在成人脑中,WT hGPC通常在不断推进的增殖波中从其植入部位扩增。这些较年轻的hGPC在很大程度上消除了它们迄今为止稳定常驻的一因此也是较老的一对应物,无论后者是表达mHTT的HD细胞还是数月前移植的同基因WT细胞。在两种情况下,较年轻的细胞最终用健康

的新hGPC重新定殖于它们的宿主脑(图4和图17),并且在两种情况下,较年轻的供体细胞差异表达与竞争优势相关的基因集(图20-22)。具体地,较年轻的成年移植的hGPC的竞争优势与它们预测的MYC和YAP1途径活性水平的增加有关。这些数据提供了与小鼠胚胎中细胞间竞争的惊人相似之处,其中在竞争性攻击期间获得差异MYC表达后缺陷细胞被其邻近细胞消除,并且其中YAP和MYC相互作用以确定细胞间竞争期间的竞争性结果。事实上,在“获胜者”WT hGPC中YAP1途径成员的同时富集,包括YAP1上游和下游的转录物,表明Hippo途径可能是调节成人脑中神经胶质替代的特别有希望的靶标。事实上,这些观察结果与肝再生研究的结果相似,在该研究中发现小鼠胎儿肝祖细胞在被同种异体移植到较老宿主中时驱动比被同种异体移植到较年轻宿主中时更快和更广泛的替代,并且对于这些细胞,MYC和YAP1活性是竞争成功的主要决定因素。因此,将YAP1和MYC鉴定为hGPC之间竞争的重要调节因子可能有助于制定策略,通过该策略在将供体细胞递送到脑后进一步增强这些细胞定殖的竞争优势、速度和程度。

[0197] 所观察到的较年轻的hGPC对常驻的神经胶质的竞争性替代类似于植入的人GPC对小鼠神经胶质的替代,因为它们在鼠脑内的扩增也通过相对增殖优势来维持,并且随着接触后消除其鼠对应物而进展。如在异种移植植物环境中,无论是由较老的同基因WT细胞还是同胞HD细胞组成,年轻WT hGPC的获胜群体似乎触发了常驻淘汰群体的凋亡性死亡和局部消除。将死的宿主细胞与较年轻的WT细胞的前进波前的相对定位表明,后者通过接触依赖性方式触发已经常驻的hGPC的死亡。相对细胞适应性的这种接触依赖性表达的潜在机制已经在多种模型中描述,并且包括Fwr同种型的选择性表达,以及通过YAP的Piezo1依赖性调节潜在转导的机械信号。此外,当遇到较年轻的hGPC时,HD和同基因hGPC的选择性消除与它们的核糖体编码转录物的耗尽相似,这与“淘汰者”细胞在细胞竞争期间核糖体转录物的丢失相一致,并突出了核糖体蛋白转录对细胞适应性调节的贡献。总之,这些数据表明翻译机制的转录控制在成人脑的细胞间竞争中与其在发育中一样重要。

[0198] 这些观察结果表明,脑可能是比以前认识到的更加动态的结构环境,神经胶质祖细胞中的细胞间竞争—以及潜在地它们衍生的星形胶质细胞—在成人脑的维持和发育中发挥着同样重要的作用。事实上,发明人注意到年轻细胞超过较老的常驻细胞的这种竞争优势似乎很大程度上模拟了发展,其中连续几波GPC相互竞争,最老的细胞在出生时被很大程度地根除,被较年轻的继代细胞所替代。在成年期,人们可以类似地设想,分裂的神经胶质祖细胞中的体细胞突变可能对一个子代谱系或另一个子代谱系产生选择性克隆优势,导致显性子代的后代对该群体的不可避免的竞争性替代。这种情况虽然代表了癌发生和潜在的胶质瘤发生的开始,但也可能通过更合适的非肿瘤邻近细胞竞争性消除肿瘤细胞而参与肿瘤抑制。特别有趣的是,考虑这种在不同适应性的hGPC之间的动态竞争过程是否可能类似地涉及神经胶质细胞参与的非肿瘤成人发病脑障碍(诸如某些精神分裂症和HD本身)的发展。实际上,这种机制可能有助于疾病进展的晚期加速,这在涉及神经胶质病理的神经退行性和神经精神障碍中常常是显著的。广义上讲,这些数据表明,在引入更年轻和更健康的hGPC后,常驻的、因此更老的患病人神经胶质细胞可被替代。事实上,这种神经胶质替代可对基于细胞治疗人脑的其中神经胶质细胞有因果关系的那些疾病提供可行策略。

[0199] 神经胶质祖细胞或其子代的再生

[0200] 本公开的一些方面涉及神经胶质祖细胞或其子代细胞的再生。人神经胶质祖细胞

在妊娠中期出现,定殖于脑中,在整个成年期都存在脑实质池。尽管胎儿hGPC具有高度迁移性和增殖性,但随着年龄的增长以及脱髓鞘相关的更新,它们的扩增能力会减弱。

[0201] 如本文所公开的,为了确定它们在活动能力方面下降的基础,使用大量和单细胞RNA测序来比较胎儿和成人hGPC的转录程序。为此,确定了基因表达的年龄相关变化,表明增殖能力的丧失,同时开始分化和衰老相关的转录程序。更具体地,成人hGPC形成了以MYC为中心并受ZNF274、MAX、IKZF3和E2F6调节的抑制性转录因子网络。下面显示了这些阻遏物的一些示例性核酸序列和氨基酸序列。

[0202] E2F6

[0203] cDNA (SEQ ID NO:4) :

[0204] ATGAGTCAGCAGCGGCCGGCGAGGAAGTTACCCAGTCTCCTCCTGGACCCGACGGAGGAGACGGTTCCGCC
GTCGGTGGCGAGACCCCATCAACGTGGAGGGCTGCTGCCATCAAAAATAAGGATTAATTTAGAAGATAA
TGTACAATATGTGTCCATGAGAAAAGCTCTAAAAGTGAAGAGACCTCGTTTTGATGTATCGCTGGTTTTAT
TTAACTCGAAAATTTATGGATCTTGTGATCTGCTCCCGGGGTATTCTTGACTTAAACAAGGTTGCAA
CGAAACTGGGAGTCCGAAAGCGGAGAGTGTATGACATCACCAATGTCTTAGATGGAATCGACCTCGTTGA
AAAGAAATCCAAGAACCATAATTAGATGGATAGGATCTGATCTTAGCAATTTTGGAGCAGTTCCCCAACAA
AAGAAGCTACAGGAGGAACCTTCTGACTTATCAGCAATGGAAGATGCTTTGGATGAGTTAATTAAGGATT
GTGCTCAGCAGCTGTTTGAGTTAACAGATGACAAAGAAAATGAAAGACTAGCATATGTGACCTATCAAGA
CATTTCATAGCATTTCAGGCCTTCCATGAACAGATCGTCATTGCAGTTAAAGCTCCAGCAGAAACCAGATTG
GATGTTCCAGCTCCCAGAGAAGACTCTATCACAGTGCACATAAGGAGCACCAACGGACCTATCGATGTCT
[0205] ATTTGTGTGAAGTGGAGCAGGGTCCAGACCAGTAACAAAAGGTCTGAAGGTGTCGGGACCTCTTCATCTGA
GAGCACTCATCCAGAAGGCCCTGAGGAAGAAGAAAATCCTCAGCAAAGTGAAGAATTGCTTGAAGTAAGC
AACTGA

[0206] 氨基酸 (SEQ ID NO:5) :

MSQQRPARKLPSLLLLDPTEETVRRRCRDPINVEGLLPKIRINLEDNVQYVSMRKALKVKRPRFDVSLVY
LTRKFMDLVRSAPEGIILDLNKKVATKLGVRKRRVYDITNVLDGIDLVEKKSKNHIRWIGSDLSNFGAVPQQ
[0207] KKLQEELSDLSAMEDALDELIKDCAQQLFELTDDKENERLAYVTYQDIHSIQAFHEQIVIAVKAPAETRL
DVPAPREDSITVHIRSTNGPIDVYLCEVEQGQTSNKRSEGVGTSSSESTHPEGPEEEENPQQSEELLEVS
N

[0208] IKZF3

[0209] cDNA (SEQ ID NO:6) :

ATGGGAAGTGAAAGAGCTCTCGTACTGGACAGATTAGCAAGCAATGTGGCAAAAACGAAAAGCTCAATGC
CTCAGAAATTCATTGGTGAGAAGCGCCACTGCTTTGATGTCAACTATAATTCAGTTACATGTATGAGAA
AGAGAGTGAGCTCATAACAGACCCGCATGATGGACCAAGCCATCAATAACGCCATCAGCTATCTTGGCGCC
GAAGCCCTGCGCCCCTTGGTCCAGACACCGCCTGCTCCCACCTCGGAGATGGTCCAGTTATCAGCAGCA
TGTATCCCATAGCCCTCACCCGGGCTGAGATGTCAAACGGTGCCCTCAAGAGCTGGAAAAGAAAAGCAT
[0210] CCACCTTCCAGAGAAGAGCGTGCCTTCTGAGAGAGGCCTCTCTCCCAACAATAGTGGCCACGACTCCACG
GACACTGACAGCAACCATGAAGAACCGCAGAATCACATCTATCAGCAAAAATCACATGGTCTGTCTCGGG
CCCACAATGGGATGCCACTTCTGAAGGAGGTTCCCCGCTCTTACGAACTCCTCAAGCCCCCGCCATCTG
CCCAAGAGACTCCGTCAAAGTGATCAACAAGGAAGGGGAGGTGATGGATGTGTATCGGTGTGACCACTGC
CGCGTCTCTTCTGACTATGTGATGTTACGATTACATGGGCTGCCACGGCTTCCGTGACCCTTTCG
AGTGTAACATGTGTGGATATCGAAGCCATGATCGGTATGAGTTCTCGTCTCACATAGCCAGAGGAGAACA
CAGAGCCCTGCTGAAGTGA

[0211] 氨基酸 (SEQ ID NO:7) :

MGSERALVLDRLASNVAKRKSMPQKFIGEKRHCFDVNYNSYMYEKESELIQTRMMDQAINNAISYLG
EALRPLVQTPAPTSEMVPVISSMYPIALTRAEMSNAPQELEKKS IHLPEKSVPSERGLSPNNSGHDS
DTDSNHEERQNHIIYQQNHMVL SRARNGMPLLKEVPRS YELLKPPPI CPRDSVKVINKEGEVMDVYRCDHC
RVLFLDYVMFTIHMGC HGRDPFECNMCGYRSHDRYEFSSHIARGEHRALLK

[0212] MAX

[0213] cDNA (SEQ ID NO:8) :

[0214] ATGAGCGATAACGATGACATCGAGGTGGAGAGCGACGAAGAGCAACCGAGGTTTCAATCTGCGGCTGACA
AACGGGCTCATCATAATGCACTGGAACGAAAACGTAGGGACCACATCAAAGACAGCTTTCACAGTTTGCG
GGACTCAGTCCCATCACTCCAAGGAGAGAAGCTCTATTTCTCTTTTGGAAATTGTGTACTCCTGTCTT
CATCGTCAAAGTTTGATGCAGAAATGCCACACCTTCATTTCAAGCTACCAAGTGCACAAGAAAAAGAAT
GCAAGATTTAA

[0215] 氨基酸 (SEQ ID NO:9) :

[0216] MSDNDDIEVESDEEQPRFQSAADKRAHNALEKRRDHKDSFHSLRDSVPSLQGEKLYFLFWKLCTPVL
HRQSLMQKCHTFISSYQVHKKKECKI

[0217] ZNF274

[0218] cDNA (SEQ ID NO:10) :

ATGCTGGAGAACTACAGGAACCTGGTCTCAGTGGAAACATCAGCTTTCAAACCAGATGTGGTATCTCAGT
TAGAGGAGGCAGAAAGATTTCTGGCCAGTGGAGAGAGGAATTCCTCAAGACACCATTCCAGAGTATCCTGA
GCTCCAGCTGGACCCTAAATTGGATCCTCTTCTGCTGAGAGTCCCCTAATGAACATTGAGGTTGTTGAG
GTCCTCACACTGAACCAGGAGGTGGCTGGTCCCCGGAATGCCAGATCCAGGCCCTATATGCTGAAGATG
GAAGCCTGAGTGCAGATGCCCCAGTGAGCAGGTCCAACAGCAGGGCAAGCATCCAGGTGACCCTGAGGC
CGCGCGCCAGAGGTTCCGGCAGTTCGGTTATAAGGACATGACAGGTCCCCGGGAGGGCCCTGGACCAGCTC
CGAGAGCTGTGTCAACAGTGGCTACAGCCTAAGGCACGCTCCAAGGAGCAGATCCTGGAGCTGCTGGTGC
TGGAGAGTTCCTAGGTGCACTGCCTGTGAAGCTCCGGACATGGGTGGAATCGCAGCACCCAGAGAAGT
CCAAGAGGTGGTGGCCCTGGTAGAGGGTGTGACCTGGATGTCTGAGGAGGAAGTACTTCTGCAGGACAA
CCTGCCGAGGGCACCACCTGCTGCCTCGAGGTCACTGCCAGCAGGAGGAGAAGCAGGAGGATGCAGCCA
TCTGCCAGTGCAGTGTCCCTGAGGAGCCAGTGACCTTCAGGATGTGGCTGTGGACTTCAGCCGGGA
GGAGTGGGGGCTGCTGGGCCGACACAGAGGACCGAGTACC GCGATGTGATGCTGGAGACCTTTGGGCAC
CTGGTCTCTGTGGGGTGGGAGACTACACTGGAAAATAAAGAGTTAGCTCCAAATCTGACATTCCTGAGG
AAGAACCAGCCCCAGCCTGAAAGTACAAGAATCCTCAAGGGATTGTGCCTTGTCTCTACATTAGAAGA
TACCTTGCAAGGTTGGGGTCCAGGAAGTCCAAGACACAGTGTGAAGCAGATGGAGTCTGCTCAGGAAAA
GACCTTCCCTCAGAAGAAGCACTTTGACAACCGTGTGAGTCCCAGGCAAACAGTGGTGTCTTTCACACAAACC
AAGTTTCGCTCCAGAAAATTGACAACCCCTGAGTCCCAGGCAAACAGTGGCGCTCTTGACACAAACCAAGT
TTTGCTCCACAAAATTCCTCCTAGAAAACGATTGCGCAAACGTGACTCACAAGTAAAAGTATGAAACAT
AATTCACGTGTAAAAATTCATCAGAAGAGCTGTGAAAGGCAAAGGCCAAGGAAGGCAATGGTTGTAGGA
AAACCTTCAGTCGGAGTACTAAACAGATTACGTTTATAAGAATTCACAAGGGGAGCCAAGTTTGCCGATG
CAGTGAATGTGGTAAAATATTCGGGAACCCAAGATACTTTTCTGTGCATAAGAAAATCCATACCCGAGAG
AGGCCCTATGTGTGTCAAGACTGTGGGAAAGGATTGTTCAGAGCTCTCCCTCACACAGCATCAGAGAG
TTCATTCTGGAGAGAGACCATTTGAATGTCAAGAGTGTGGGAGGACCTTCAATGATCGCTCAGCCATCTC
CCAGCACCTGAGGACTCACACTGGCGCTAAGCCCTACAAGTGTGAGGACTGTGGAAAAGCCTTCCGCCAG
AGCTCCACCTCATCAGACATCAGAGGACTCACACCGGGGAGCGCCCATATGCATGCAACAAAATGTGGAA
AGGCCTTACCCAGAGCTCACACCTTATTGGGCACCAGAGAACCACAAATAGGACAAAGCGAAAGAAGAA
ACAGCCTACCTCATAG

[0219] 氨基酸 (SEQ ID NO:11) :

MLENYRNLSVVEHQLSKPDVVSQLEEAEDFWPVERGI PQDTIPEYPELQLDPKLDPLPAESPLMNIEVVE
VLTNLNQEAVGPRNAQIQALYAEDGSLADAPSEQVQQQKHPGDPEAARQRFQFRYKDMTGPREALDQL
RELCHQWLQPKARSKEQILELLVLEQFLGALPVKLRWVWESQHPENCQEVVALVEGVTWMSEEEVLPAGQ
PAEGTTCCLEVTAQQEEDAAICPVTVLPEEPVTFQDVAVDFSSREEWGLLGPTQRTEYRDVLMLETFGH
[0220] LSVVGWETTLENKELAPNSDIPEEPPAPSLKVQESSRDCALSSSTLEDTLQGGVQEVQD TVLKQMESAQEK
DLPQKKHFDNRESQANSALDTNQVSLQKIDNPESQANSALDTNQVLLHKIPRKRRLRKRDSQVKSMMH
NSRVKIHQKSCERQKAKEGNGCRKTFSTRSTKQITFIRIHKGSQVCRCECGKIFRNPRYFSVHKKIHTGE
RPYVCQDCGKGFVQSSSLTQHQRVHSGERPFECQECGRTFNDRSAISQHLRTHTGAKPYKCQDCGKAFRQ
SSHLIRHQRTHTGERPYACNKCGKAFTQSSHLIGHQRTHNRTKRKKKQPTS

[0221] 这些因子中的每种因子在人iPSC衍生的GPC中的单独过表达导致增殖性基因表达的缺失和衰老标记物的诱导,这复制了在神经胶质老化期间发生的转录变化。平行miRNA谱确定了成人选择性miRNA表达特征,其靶标可能进一步限制老化的GPC的扩增能力。这些观察结果表明,hGPC通过获得MYC抑制性环境而老化,这表明对神经胶质扩增和更新的这些阻遏物的抑制允许老化的hGPC的有效再生。

[0222] 神经胶质祖细胞 (GPC,也称为少突胶质祖细胞和NG2细胞)在发育期间定殖于人脑中,并在整个成年期持续大量存在。在发育期间,人GPC (hGPC)是高度增殖的双潜力细胞,产

生新的少突胶质细胞和星形胶质细胞 (French-Constant和Raff, 1986年; Raff等人, 1983年)。在啮齿动物中, 这种能力在正常衰老期间减弱, 老化的GPC的增殖、迁移和分化能力都在减弱 (Chari等人, 2003年; Gao和Raff, 1997年; Moyon等人, 2021年; Segel等人, 2019年; Tang等人, 2000年; Temple和Raff, 1986年; Wolswijk和Noble, 1989年; Wren等人, 1992年)。类似地, 当移植到先天性髓鞘形成障碍的鼠宿主中时, 成人GPC比它们的胎儿对应物增殖性更低、迁移性更低并且更易于分化 (Windrem等人, 2004年)。然而, 尽管胎儿和成人的hGPC的能力明显不同, 并且啮齿动物衰老模型中GPC转录的数据丰富, 但几乎没有数据可用来处理人衰老期间GPC基因表达的变化 (Perlman等人, 2020年; Sim等人, 2006年), 或提供胎儿和成人GPC转录的清晰的头对头比较。因此, 本公开的某些部分比较了胎儿和成人hGPC的转录模式, 并使用该数据鉴定与这些细胞的成熟和老化有因果关系的那些调节途径

[0223] 为此, 发明人首先利用从人胎儿前脑分离的A2B5+和CD140a/PDGFRa+hGPC的大量和单细胞RNA测序 (scRNA-Seq), 以便定义它们的转录特征和异质性。然后, 发明人将这些数据与分离的成人hGPC的基因表达进行比较, 发现后者表现出的转录模式表明增殖能力的丧失、早期表型分化谱的开始以及衰老的诱导。对差异表达基因的启动子的转录因子基序富集分析然后表明成人诱导的转录阻遏物E2F6、ZNF274、MAX和IKZF3是人神经胶质老化程序的主要驱动因素。网络分析强烈表明, 作为一个组, 这些基因通过抑制MYC及其近端靶标发挥作用, MYC及其近端靶标在胎儿hGPC中相对过表达。关键的是, 随后发现这些成人阻遏物在新产生的人iPSC衍生的GPC中的 (其表达特征与胎儿hGPC类似) 确实导致了转录特征的诱导, 这些转录特征基本上再现了成人GPC的转录特征。然后, 发明人鉴定了一组由成人hGPC选择性表达的miRNA, 这些miRNA预计会在转录后抑制胎儿GPC基因表达, 尤其是与成人获得性阻遏物网络相配合。总之, 这些数据表明在成人GPC的老化期间出现了一组阻遏物, 其活性集中于MYC和MYC依赖性转录。因此, 这些阻遏物可包括可行的治疗靶标, 其调节可恢复老化或以其他方式有丝分裂耗竭的GPC的有丝分裂和分化能力的显著特征。

[0224] 抑制/再生疗法

[0225] 在一个方面, 本公开提供了通过抑制选自E2F6、ZNF274、MAX和IKZF3的转录阻遏物进行的治疗方法。在一些示例中, 这可通过向有需要的受试者或有需要的靶细胞施用一种或多种转录阻遏物的抑制因子或抑制剂来实现。此类抑制因子或抑制剂可包括或者是小分子化合物、寡核苷酸、核酸、肽、多肽、CRISPR/Cas系统或抗体或其抗原结合部分。抑制因子/抑制剂的示例包括相关YAP或MYC途径信号传导途径 (例如, Hippo信号传导途径) 的激活剂、激动剂或增强剂。用于该信号传导途径的各种激活剂是本领域已知的。在一些实施方案中, 抑制因子是抑制性核酸或干扰核酸, 诸如siRNA、shRNA、miRNA、反义寡核苷酸 (ASO) 和/或包含一个或多个经修饰的核酸残基的核酸。

[0226] 抑制性核酸

[0227] 本公开的某些方面提供了一种或多种抑制性核酸 (例如, 抑制性RNA分子)、编码此类抑制性核酸的多核苷酸, 以及被工程化以表达此类抑制性核酸的转基因。该一种或多种抑制性核酸可靶向相同的基因 (例如, 杂交或特异性结合相同基因的不同mRNA序列或不同mRNA序列) 或不同的基因 (例如, 杂交或特异性结合不同基因的mRNA)。因此, 本文所述的方法可包括使用靶向E2F6、ZNF274、MAX或IKZF3基因或mRNA的抑制性核酸降低E2F6、ZNF274、MAX或IKZF3基因的表达

[0228] 抑制性核酸是指可结合细胞中的靶核酸(例如,靶RNA)并降低或抑制细胞中的靶核酸的水平或功能的核酸。抑制性核酸的示例包括反义寡核苷酸、核酶、外部指导序列(EGS)寡核苷酸、小干扰(si)RNA化合物、单链或双链RNA干扰化合物、修饰的碱基/锁核酸(LNA)、antagomir、肽核酸(PNA),以及与靶核酸(例如,E2F6、ZNF274、MAX或IKZF3mRNA)的至少一部分特异性杂交并调节其水平或功能的其他寡聚化合物或寡核苷酸模拟物。

[0229] 在一些实施方案中,抑制性核酸可以是反义RNA、反义DNA、嵌合反义寡核苷酸、包含修饰的连接的反义寡核苷酸、干扰RNA(iRNA)、短或小干扰RNA(siRNA)、微RNA或微干扰RNA(miRNA)、时序调节小RNA(stRNA)、短发夹RNA(shRNA)、小RNA诱导的基因激活剂(RNAa)、小激活RNA(saRNA)或它们的组合。抑制性核酸可被修饰,例如,以包括修饰的核苷酸(例如,锁核酸)或主链(例如,其中不包含磷原子的主链),或者可通过混合体或间隙体进行修饰;参见例如W02013/006619,其关于寡核苷酸修饰的教导内容以引用方式并入本文。

[0230] 在一些示例中,抑制性核酸是介导RNA干扰(RNAi)的抑制性RNA分子,RNA干扰是细胞调节基因表达的过程。细胞质中的双链RNA(dsRNA)触发RNAi途径,其中双链RNA被RNAse III样酶DICER被加工成大约21-23个核苷酸长的双链小片段。这些双链片段整合到称为RNA诱导沉默复合物(RISC)的多亚基蛋白中。RISC包含Argonaute蛋白,该蛋白将双链片段解旋成从复合物中去除的过客链(passenger strand)和与特定mRNA中的靶序列互补的引导链,并且其引导RISC复合物切割或抑制特定靶mRNA分子的翻译(Kotowska-Zimmer等人,2021年)。通过这种方式,编码mRNA分子的基因基本上变得无活性或“沉默”。

[0231] RNAi技术可采用多种工具,包括合成siRNA、基于载体的shRNA和人工miRNA(amiRNA)。合成siRNA是必须被递送到细胞中的外源双链RNA,并且必须克服稳定性和药代动力学挑战。shRNA是具有紧密发夹环结构的人工RNA分子,其使用质粒或病毒表达载体递送至细胞。shRNA通常从强pol III启动子(例如,U6或H1)转录,并作为发夹进入RNAi途径。然而,由强pol III启动子驱动转录可产生超生理水平的shRNA,使内源性miRNA生物发生机制饱和,导致毒性。AmiRNA将靶特异性shRNA插入物嵌入基于天然初级miRNA(pri-miRNA)的支架中。这确保了与内源性miRNA相似的适当加工和转运,从而降低了毒性(Kotowska-Zimmer等人,2021年)。

[0232] 在本公开的一些实施方案中,抑制性RNA分子可以是siRNA、miRNA(包括amiRNA)或shRNA。siRNA在本领域中已知为长度大约19-25(例如,19-23)个碱基对的双链RNA分子,其在细胞中诱导RNAi。在一些实施方案中,siRNA序列也可插入人工miRNA支架(“shmiRNA”)中。shRNA在本领域中已知为包含大约19-25(例如,19-23)个碱基对的双链RNA的RNA分子,该双链RNA通过在细胞中诱导RNAi的短环(例如,约4-11个核苷酸)连接。miRNA在本领域中被称为在细胞中诱导RNAi的RNA分子,该RNAi包含通过环连接的双链RNA的短(例如,19-25个碱基对)序列,并含有包含一个或多个凸起(例如,错配或未配对的碱基对)的双链RNA的一个或多个额外序列。

[0233] 如本文所用,术语“miRNA”包括内源miRNA以及外源或异源miRNA。在一些实施方案中,“miRNA”可指pri-miRNA或pre-miRNA。在miRNA加工期间,产生pri-miRNA转录物。pri-miRNA由Drosha-DGCR8加工以产生pre-miRNA,具体通过切除一个或多个序列,留下具有5'侧翼区、引导链、环区、非引导链和3'侧翼区的pre-miRNA;或具有5'侧翼区、非引导链、环区、引导链和3'侧翼区的pre-miRNA。然后将pre-miRNA输出到细胞质并通过Dicer加工,以

产生具有引导链和非引导(或过客)链的siRNA。然后,RISC复合物使用引导链催化基因沉默,例如,通过识别与引导链互补的靶RNA序列。miRNA的进一步描述可在例如WO 2008/150897中找到。miRNA对靶序列的识别主要通过靶序列和miRNA种子序列之间的配对来确定,例如引导链的核苷酸1-8(5'至3') (参见,例如Boudreau,R.L.等人,(2013年) *Nucleic Acids Res.*第41卷:第e9页)。

[0234] 下面显示了一些示例性的抑制因子miRNA,其靶向并抑制E2F6、ZNF274、MAX和IKZF3中的一者或多者。

[0235] 表.抑制因子miRNA的序列

名称	核酸序列	登录号	SEQ ID NO
hsa-miR-125b-5p	ucccugagaccuaacuuguga	MIMAT0000423	12
hsa-miR-106a-5p	aaaagugcuuacagugcagguag	MIMAT0000103	13
hsa-miR-17-5p	caaagugcuuacagugcagguag	MIMAT0000070	14
[0236] hsa-miR-130a-3p	cagugcaauguuaaaagggcau	MIMAT0000425	15
hsa-miR-130b-3p	cagugcaaugaugaaagggcau	MIMAT0000691	16
hsa-miR-379-5p	ugguagacuauggaacguagg	MIMAT0000733	17
hsa-miR-93-3p	acugcugagcuagcacuucccg	MIMAT0004509	18
hsa-miR-1260b	aucccaccacugccaccau	MIMAT0015041	19
hsa-miR-767-5p	ugcaccaugguugucugagcaug	MIMAT0003882	20
hsa-miR-30b-5p	uguaaacauccuacacucagcu	MIMAT0000420	21
[0237] hsa-miR-9-3p	auaaagcuagauaacggaaagu	MIMAT0000442	22
hsa-miR-9-5p	ucuuugguuaucugcuguauga	MIMAT0000441	23
hsa-miR-485-5p	agaggcugggccgugaugaaauuc	MIMAT0002175	24

[0238] 在本公开的一些实施方案中,抑制性RNA分子形成发夹结构。通常,形成发夹的RNA排列成自身互补的“茎-环”结构,该结构包括编码具有双链体的茎部分的单个核酸,该双链体包含通过环序列与反义链(例如,引导链)连接的有义链(例如,过客链)。过客链和引导链共享互补性。在一些实施方案中,过客链和引导链共享100%互补性。在一些实施方案中,过客链和引导链共享至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%的互补性。由于碱基对错配,过客链和引导链可能缺乏互补性。在一些实施方案中,形成发夹的RNA的过客链和引导链可具有至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个或至少10个错配。通常,茎的前2-8个核苷酸(相对于环)被称为“种子”残基,并且在靶识别和结合中发挥重要作用。茎的第一个残基(相对于环)被称为“锚”残基。在一些实施方案中,形成发夹的RNA在锚残基处具有错配。

[0239] 在一些实施方案中,在细胞(或受试者)中加工抑制性RNA分子以形成“成熟miRNA”。成熟miRNA由多步途径产生,该途径通过由RNA聚合酶II或III从其miRNA基因或内含子转录初始miRNA而起始,在产生miRNA的生物学途径中产生初始前体分子。一旦转录,pri-miRNA(通常具有发夹结构的长度超过一千个核苷酸)由Drosha酶加工,该Drosha酶在发夹结构和ssRNA之间的连接处附近切割pri-miRNA,产生前体miRNA(pre-miRNA)。将pre-miRNA输出到细胞质,在那里被Dicer酶在pre-miRNA环进一步还原,产生双链体miRNA链。

[0240] 在miRNA双链体的两条链中,一条臂,即引导链(miR),通常以较高浓度存在,并且与Argonaute蛋白结合和缔合,该Argonaute蛋白最终被装载到RNA诱导沉默复合物中。引导链miRNA-RISC复合物通过与其mRNA的互补序列(通常在mRNA的3'UTR中)结合来帮助调节基

因表达。miRNA双链体的非引导链被称为过客链,并且通常被降解,但是可持续存在,并且也可完整地或者在部分降解后发挥作用,在基因表达中发挥功能作用。

[0241] 在一些实施方案中,转基因被工程化以表达具有靶向人基因的引导链的抑制性核酸(例如,miRNA)。“靶向”是指抑制性核酸与其在靶基因(例如,靶基因的mRNA转录物)上的同源(例如,互补)序列的杂交或特异性结合。在一些实施方案中,靶向基因转录物的抑制性核酸与靶基因共享1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸长的互补区。在一些实施方案中,互补区的长度超过30个核苷酸。

[0242] 通常,引导链可靶向与髓磷脂疾病或障碍相关的人基因转录物。示例包括ZNF274、MAX、IKZF3或E2F6。在一些实施方案中,靶向这些基因转录物中的任一种基因转录物的引导链由包含上述序列的合适区段的分离的核酸编码。

[0243] 因此,抑制性核酸可用于通过与RNA转录物相互作用或另选地通过与特定基因序列相互作用介导基因沉默,特别是ZNF274、MAX、IKZF3和E2F6中的一者或多者,其中此类相互作用导致在转录水平或转录后水平诸如但不限于RNAi或通过调节靶标的染色质结构或甲基化模式并阻止靶基因转录的细胞过程进行的基因沉默,其中靶标的核苷酸序列介导沉默。

[0244] 这些抑制性核酸可包含RNA的短双链区。双链RNA分子可包含两条不同且独立的链,它们可以是对称的或不对称的并且是互补的,即两个单链RNA分子,或者可包含一个单链分子,其中两个互补部分(例如,有义区和反义区)是碱基配对的,并且通过一个或多个单链“发夹”区(即,环)共价连接,产生例如单链短发夹多核苷酸或环状单链多核苷酸。

[0245] 接头可以是多核苷酸接头或非核苷酸接头。在一些实施方案中,接头是非核苷酸接头。在一些实施方案中,发夹或环状抑制性核酸分子含有一个或多个环基序,其中该分子的至少一个环部分是可生物降解的。例如,可设计单链发夹分子,使得该分子的环部分在体内的降解可产生具有3'-末端突出端的双链siRNA分子,诸如包含1、2、3或4个核苷酸的3'-末端核苷酸突出端。或者另选地,可设计环状抑制性核酸分子,使得该分子的环部分在体内的降解可产生例如具有3'-末端突出端的双链siRNA分子,诸如包含约2个核苷酸的3'-末端核苷酸突出端。

[0246] 在对称的抑制性核酸分子中,每条链,有义(过客)链和反义(引导)链,可独立地为约15至约40(例如,约15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40)个核苷酸长

[0247] 在不对称的抑制性核酸分子中,分子的反义区或链可以是约15至约30(例如,约15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30)个核苷酸长,其中有义区是约3至约25(例如,约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25)个核苷酸长。

[0248] 在又一些实施方案中,本文所述的抑制性核酸分子可包含单链发夹siRNA分子,其中该分子可以是约25至约70(例如,约25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、40、45、50、55、60、65或70)个核苷酸长。

[0249] 在其他实施方案中,该分子可包含单链环状siRNA分子,其中该分子是约38至约70(例如,约38、40、45、50、55、60、65或70)个核苷酸长。

[0250] 在各种对称的实施方案中,本文所述的抑制性核酸双链体可独立地包含约15至约40(例如,约15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40)个碱基对。

[0251] 在又一些实施方案中,当本文所述的抑制性核酸分子不对称时,该分子可包含约3至25(例如,约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25)个碱基对。

[0252] 在其他实施方案中,当抑制性核酸分子是发夹或环状结构时,该分子可包含约3至约30(例如,约15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30)个碱基对。

[0253] 抑制性核酸分子的有义链和反义链或有义区和反义区可以是互补的。而且,反义链或反义区可与靶RNA(例如,ZNF274、MAX、IKZF3和E2F6的靶RNA)的核苷酸序列或其部分互补。如果抑制性核酸可包含靶基因的核苷酸序列或其部分,则有义链或有义区可包含靶基因的核苷酸序列或其部分。

[0254] 在一些实施方案中,抑制性核酸可被优化(基于序列)或化学修饰,以在递送至感兴趣的组织之前和/或之后使降解最小化。这些干扰核酸的商购获得的来源包括但不限于 Thermo-Fisher Scientific/Ambion、Origene、Qiagen、Dharmacon和Santa Cruz Biotechnology。在一些实施方案中,可进行这样的优化和/或修饰以确保将抑制性核酸的足够有效载荷递送至感兴趣的组织。其他实施方案包括使用被设计为通过以下方式降低E2F6、ZNF274、MAX或IKZF3基因的表达的小分子、适体或寡核苷酸:与基因的DNA结合以限制表达,例如反义寡核苷酸,或通过以下机制施加转录后基因沉默(PTGS),该机制包括但不限于直接结合靶向转录物或基因产物或一种或多种其他蛋白质的机制以使所述基因的表达降低;或使用降低特定基因表达的其他小分子诱饵。

[0255] 本文所述的任何抑制性核酸分子或构建体可包含一种或多种化学修饰。修饰可用于改善体外或体内特性,诸如稳定性、活性、毒性、免疫应答(例如,防止刺激干扰素应答、炎性或促炎性细胞因子应答或Toll样受体(T1F)应答)和/或生物利用度。

[0256] 与对应的未修饰或最低限度修饰的分子相比,化学修饰的分子表现出提高的RNAi活性。本文公开的化学修饰基序提供了维持RNAi活性的能力,该RNAi活性与未修饰或最低限度修饰的活性siRNA基本上相似,同时提供了适合用于治疗应用的核酸酶抗性和药代动力学性质。

[0257] 在各种实施方案中,本文所述的抑制性核酸分子可包含修饰,其中存在于有义链和/或反义链中的任何(例如,一个或多个或所有)核苷酸是修饰的核苷酸。在一些实施方案中,分子可用化学修饰进行部分修饰(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、55、60、65、70、75、80个核苷酸被修饰)。在其他实施方案中,分子可用化学修饰进行完全修饰(例如,100%修饰)。

[0258] 单个分子内的化学修饰可以相同或不同。在一些实施方案中,至少一条链具有至少一种化学修饰。在其他实施方案中,每条链具有至少一种化学修饰,其可以是相同的或不同的,诸如糖、碱基或主链(即,核苷酸间键)修饰。在其他实施方案中,分子可含有至少2、3、4、5或更多种不同的化学修饰。

[0259] 合适的化学修饰的非限制性示例包括例如美国专利号8202979和

U.S.20050266422中公开的那些示例,并且包括糖、碱基和磷酸盐、非核苷酸修饰和/或它们的任何组合。

[0260] 在各种实施方案中,存在于双链抑制性核酸分子中的大多数嘧啶核苷酸包含糖修饰。在其他实施方案中,存在于双链分子中的大多数嘌呤核苷酸包含糖修饰。在某些情况下,嘌呤和嘧啶在2'-糖位置被差异修饰(即,在2'-糖位置的相同或不同链中,至少一种嘌呤与至少一种嘧啶具有不同的修饰)。

[0261] 在某些具体的实施方案中,至少一个修饰的核苷酸是2'-脱氧-2-氟核苷酸、2'-脱氧核苷酸或2'-O-烷基(例如,2'-O-甲基)核苷酸。在其他实施方案中,至少一个核苷酸具有核糖样、Northern或A型螺旋构型(参见,例如Saenger,Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag编辑,1984年)。具有Northern构型的核苷酸的非限制性示例包括锁核酸(LNA)核苷酸(例如,2'-O,4'-C-亚甲基-(D-呋喃核糖基)核苷酸);2'-甲氧基乙氧基(MOE)核苷酸;2'-甲基-硫代-乙基核苷酸、2'-脱氧-2'-氟核苷酸、2'-脱氧-2'-氯核苷酸、2'-叠氨基核苷酸、2'-O-三氟甲基核苷酸、2'-O-乙基-三氟甲氧基核苷酸、2'-O-二氟甲氧基-乙氧基核苷酸、4'-硫代核苷酸和2'-O-甲基核苷酸。

[0262] 本文所述的抑制性核酸可使用本领域技术人员已知的多种技术获得。例如,抑制性核酸可化学合成或可由质粒编码(例如,转录为自动折叠成具有发夹环的双链体的序列)。siRNA也可通过切割较长的dsRNA产生。

[0263] 在一些实施方案中,抑制性核酸是化学合成的。寡核苷酸(例如,某些修饰的寡核苷酸或缺乏核糖核苷酸的寡核苷酸部分)可使用本领域已知的方法合成,例如Caruthers等人,1992年,Methods in Enzymology,第211卷,第3-19页;Thompson等人,国际PCT公布号W0 99/54459;Wincott等人,1995年,Nucleic Acids Res.第23卷,第2677-2684页;Wincott等人,1997年,Methods Mol. Bio.,第74卷,第59页;Brennan等人,1998年,Biotechnol Bioeng.,第61卷,第33-45页;以及Brennan,美国专利号6,001,311中所述。寡核苷酸的合成利用了常见的核酸保护和偶联基团,诸如5'-末端的二甲氧基三苯甲基和3'-末端的亚磷酰胺。

[0264] 另选地,抑制性核酸可单独合成并在合成后接合在一起,例如通过连接(Moore等人,1992年,Science,第256卷,第9923页;Draper等人,国际PCT公布号W0 93/23569;Shabarova等人,1991年,Nucleic Acids Research,第19卷,第4247页;Bellon等人,1997年,Nucleosides&Nucleotides,第16卷,第951页;Bellon等人,1997年,Bioconjugate Chem.,第8卷,第204页)或通过合成和/或脱保护后的杂交。

[0265] 在一些实施方案中,抑制性核酸可从插入重组DNA或RNA载体的转录单元表达和递送。重组载体可以是DNA质粒或病毒载体。病毒载体可基于但不限于腺相关病毒、逆转录病毒、腺病毒或甲病毒来构建。

[0266] CRISPR/Cas系统

[0267] 在一个方面,还可使用CRISPR/Cas系统和本领域已知的相关方法通过CRISPR-Cas引导的核酸酶来实现本文所述的一种或多种基因的抑制或敲低。参见例如,US11225659B2、W02021168799A1、W02022188039A1、W02022188797A1、W02022068912A1和W02022047624A1。也参见Gimenez等人,“CRISPR-on System for the Activation of the Endogenous human INS gene”,Gene Therapy,第23卷:第543-547页(2016年);Wiedenheft等人,“RNA-

Guided Genetic Silencing Systems in Bacteria and Archaea”, Nature, 第482卷, 第331-338页 (2012年); Zhang等人, “Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems”, Science, 第339卷第6121期: 第819-823页 (2013年); 和Gaj等人, “ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based Methods for Genome Engineering”, Cell, 第31卷第7期: 第397-405页 (2013年), 这些专利的全文据此以引用方式并入。

[0268] CRISPR-Cas系统是一种遗传技术, 它允许通过引导核酸酶双链DNA切割对原核细胞和真核细胞中的基因表达进行序列特异性控制。它基于细菌免疫系统衍生的CRISPR (成簇规律间隔回文重复序列) 途径。

[0269] 在另一方面, 本申请提供了一种复合物, 该复合物包含: (i) 蛋白质组合物, 该蛋白质组合物包含Cas蛋白或其直系同源物、同源物、衍生物、缀合物、功能片段、其缀合物或其融合物; 和(ii) 多核苷酸组合物, 该多核苷酸组合物包含CRISPR RNA和与靶RNA或DNA的至少一部分互补的可编程间隔区序列或引导序列。该可编程向导RNA、CRISPR RNA和Cas蛋白一起形成用于序列靶向和识别的基于CRISPR/Cas的模块。

[0270] 靶RNA可以是任何感兴趣的RNA分子, 包括天然存在的和工程化的RNA分子。靶RNA可以是mRNA、tRNA、核糖体RNA (rRNA)、微RNA (miRNA)、干扰RNA (siRNA)、核酶、核糖开关、卫星RNA、微动开关、酵母菌或病毒RNA。

[0271] 在一些实施方案中, 靶核酸与病症或疾病相关, 诸如由白质/少突胶质细胞/星形胶质细胞损失介导的病症或障碍以及如本文所述的相关障碍。因此, 在一些实施方案中, 本文所述的系统可用于通过靶向这些核酸来治疗此类病症或疾病。

[0272] 例如, 与病症或疾病相关的靶核酸可以是在患病细胞、老或较老细胞或衰老细胞中过表达的RNA分子。靶核酸也可以是毒性RNA和/或突变RNA (例如, 具有剪接缺陷或突变的mRNA分子)。靶核酸也可以是miRNA。

[0273] 例如, 靶核酸可以是其活性增加与衰老相关的基因诸如STAT和转录阻遏物 (例如, E2F6、ZNF274、MAX或IKZF3) 的核酸, 如图28、图30和图37所示。靶核酸可以是促进成人GPC中的衰老的miRNA的靶核酸, 诸如miR-584-5p、miR-330-3p、miR-23b-3p和miR-140-3p, 如图28、图30和图37所示。

[0274] 各种Cas蛋白可用于本发明。可互换使用的Cas蛋白、CRISPR相关蛋白或CRISPR蛋白是指CRISPR-Cas 1类或2类的蛋白或衍生自CRISPR-Cas 1类或2类的蛋白, 该CRISPR-Cas 1类或2类的蛋白包括I型、II型、III型、IV型、V型或VI型系统, 该系统具有RNA引导的DNA结合。合适的CRISPR/Cas蛋白的非限制性示例包括Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e (或CasD)、Cas6、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas10d、Cas13、Cas13e、Cas13f、CasF、CasG、CasH、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1 (或CasA)、Cse2 (或CasB)、Cse3 (或CasE)、Cse4 (或CasC)、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csz1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4和Cu1966。参见, 例如US11225659B2、W02021168799A1、W02022188039A1、W02022188797A1、W02022068912A1、W02022047624A1、W02014144761、W02014144592、W02013176772、US20140273226和US20140273233, 这些专利申请的内容全文以引用方式并入本文。

[0275] 表达盒和表达载体

[0276] 本公开还提供了表达盒,该表达盒包含编码上述抑制性核酸或CRISPR/Cas系统的重组核酸或由其组成。当此类重组核酸可能尚未包含启动子时,表达盒可另外包含启动子。因此,根据本发明的表达盒在5'至3'方向上包含启动子、编码序列和任选的终止子或其他元件。表达盒允许将感兴趣的核酸序列容易地转移到生物体中,优选细胞并且优选疾病细胞中。

[0277] 本公开的表达盒优选地包含在载体中。因此,本公开的载体允许用感兴趣的核酸序列转化细胞。对应地,本公开提供了包含根据本公开的表达盒或根据本公开的重组核酸的宿主细胞。重组核酸还可包含启动子或增强子,以便允许表达感兴趣的核酸序列。

[0278] 可通过遗传转移方法,诸如转染或转导,将外源遗传物质(例如,编码一种或多种治疗性或抑制性RNA的核酸、表达盒或表达载体)体内引入到感兴趣的靶细胞中,以提供遗传修饰细胞。各种表达载体(即,用于促进外源遗传物质递送至靶细胞中的媒介物)是本领域普通技术人员已知的。如本文所用,“外源遗传物质”是指天然或合成的核酸或寡核苷酸,其没有天然存在于细胞中;或者如果其天然存在于细胞中,则其不被细胞以生物学上显著的水平转录或表达。因此,“外源遗传物质”包括例如可被转录成RNA的非天然存在的核酸。

[0279] 如本文所用,“细胞的转染”是指在不使用病毒递送载体的情况下,通过掺入添加的核酸(DNA、RNA或其杂合体)而使细胞获得新的遗传物质。因此,转染是指使用物理或化学方法将核酸引入细胞。本领域普通技术人员已知几种转染技术,包括:磷酸钙核酸共沉淀、磷酸锶核酸共沉淀、DEAE-葡聚糖、电穿孔、阳离子脂质体介导的转染和钨颗粒促进的微粒轰击。相比之下,“细胞的转导”是指使用DNA或RNA病毒将核酸转移到细胞中的过程。用于将核酸转移到细胞中的RNA病毒(例如,逆转录病毒)在本文中称为转导嵌合病毒。病毒内含有的外源遗传物质可被整合到转导细胞的基因组中。已经用嵌合DNA病毒(例如,携带编码治疗剂的DNA的腺病毒)转导的细胞可能没有整合到其基因组中的外源遗传物质,但可能能够表达在细胞内染色体外保留的外源遗传物质。

[0280] 通常,外源遗传物质可包括异源基因(编码治疗性RNA或蛋白质)以及控制新基因转录的启动子。启动子特征性地具有启动转录所必需的特定核苷酸序列。任选地,外源遗传物质还包括获得所需基因转录活性所需的额外序列(即,增强子)。外源遗传物质可在启动子的下游直接引入细胞基因组中,以便启动子和编码序列可操作地连接,从而允许编码序列的转录。逆转录病毒表达载体可包括外源启动子元件以控制插入的外源基因的转录。此类外源启动子包括组成型和诱导型启动子。

[0281] 天然存在的组成型启动子控制基本细胞功能的表达。结果,在所有细胞生长条件下,组成型启动子控制下的基因都得到表达。示例性组成型启动子包括编码某些组成型或“管家”功能的以下基因的启动子:次黄嘌呤磷酸核糖转移酶、二氢叶酸还原酶、腺苷脱氨酶、磷酸甘油激酶、丙酮酸激酶、磷酸甘油变位酶、肌动蛋白启动子、泛素、延伸因子-1和本领域技术人员已知的其他组成型启动子。此外,许多病毒启动子在真核细胞中组成型地起作用。这些启动子包括SV40的早期和晚期启动子;莫洛尼白血病病毒和其他逆转录病毒的长末端重复序列(LTR);以及单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子等。因此,任何上述组成型启动子均可用于控制异源基因插入片段的转录。

[0282] 在诱导型启动子控制下的基因仅在诱导剂的存在下表达或主要受诱导剂的存在控制(例如,在金属硫蛋白启动子控制下的转录在某些金属离子的存在下大大增加)。诱导

型启动子包括当它们的诱导因子结合时刺激转录的应答元件(RE)。例如,存在针对血清因子、类固醇激素、视黄酸和环AMP的RE。可选择含有特定RE的启动子以获得诱导型应答,并且在一些情况下,RE本身可与不同的启动子连接,从而赋予重组基因可诱导性。因此,通过选择合适的启动子(组成型启动子对诱导型启动子;强启动子对弱启动子),可控制治疗剂在遗传修饰细胞中的存在和表达水平。如果编码治疗剂的基因处于诱导型启动子的控制下,则通过将遗传修饰细胞原位暴露于允许治疗剂转录的条件,例如通过注射控制治疗剂转录的诱导型启动子的特定诱导物,来触发治疗剂的原位递送。例如,通过使遗传修饰的细胞与含有适当(即,诱导)金属离子的溶液原位接触,增强了遗传修饰的细胞对金属硫蛋白启动子控制下的基因编码的治疗剂的原位表达。

[0283] 因此,原位递送的治疗剂的量通过控制以下因素来调节:(1)用于指导插入基因转录的启动子的性质(即,启动子是组成型的还是诱导型的、强的还是弱的);(2)插入细胞的外源基因的拷贝数;(3)施用于(例如,植入)患者的转导/转染细胞的数量;(4)植入物(例如,移植物或包封的表达系统)的大小;(5)植入物的数量;(6)转导/转染的细胞或植入物留在原位的时间长度;和(7)遗传修饰细胞产生治疗剂的速率。考虑到上述因素和患者的临床谱,用于递送治疗有效剂量的特定治疗剂的这些因素的选择和优化被认为在本领域普通技术人员的范围内,而无需过多的实验。

[0284] 除了至少一个启动子和至少一个编码治疗剂的异源核酸之外,表达载体可包括选择基因,例如新霉素抗性基因或荧光蛋白基因,以便于选择已用表达载体转染或转导的细胞。另选地,用两种或更多种表达载体、含有编码治疗剂的基因的至少一种载体、含有选择基因的另一载体转染细胞。合适的启动子、增强子、选择基因和/或信号序列的选择被认为在本领域普通技术人员的范围内,而无需过多的实验。

[0285] 本公开的编码序列可插入任何类型的靶细胞或宿主细胞中。在表达载体的情况下,载体可通过本领域的任何方法容易地引入宿主细胞中,例如哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞中。例如,该表达载体可通过物理、化学或生物学手段转移到宿主细胞中。

[0286] 载体/多核苷酸的递送

[0287] 如本文所公开的,上述多核苷酸或核酸分子可用于治疗受试者的障碍。因此,本公开提供了用于将多核苷酸递送至靶细胞或受试者的系统和方法。

[0288] 将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔等。产生包含载体和/或外源核酸的细胞的方法是本领域众所周知的。参见例如,Sambrook等人,(2012年,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York)。

[0289] 将感兴趣的多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载体,尤其是逆转录病毒载体,已成为用于将基因插入哺乳动物(例如,人)细胞中的最广泛使用的方法。其他病毒载体可来源于慢病毒、痘病毒、I型单纯疱疹病毒、腺病毒和腺相关病毒等。参见例如,美国专利号5,350,674和5,585,362。

[0290] 用于将多核苷酸引入宿主细胞的化学手段包括胶体分散系统,诸如大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠粒和基于脂质的系统(包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体)。用作体外和体内递送载体的示例性胶体系统是脂质体(例如,人造膜囊泡)。

[0291] 本文所述的多核苷酸或核酸(例如,抑制性核酸、编码CRISPR-Cas系统的多核苷酸

或核酸、表达盒和表达载体)可直接添加,或者可与阳离子脂质复合,包装在脂质体内,或者作为重组质粒或病毒载体,或者以其他方式递送至靶细胞或组织。递送核酸分子的方法是本领域已知的。参见例如,美国专利号6,395,713;WO 94/02595;Akhtar等人,1992年, Trends Cell Bio.,第2卷,第139页;Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, Akhtar编辑,1995年;Maurer等人,1999年, Mol. Membr. Biol.,第16卷,第129-140页;Hofland和Huang,1999年, Handb. Exp. Pharmacol.,第137卷,第165-192页;和Lee等人,2000年, ACS Symp. Ser.,第752卷,第184-192页。这些方案可用于递送几乎任何核酸分子。核酸分子可通过本领域技术人员已知的多种方法实施于细胞,这些方法包括但不限于包封在脂质体中、通过离子电渗法、或通过掺入其他载体,诸如可生物降解的聚合物、水凝胶、环糊精(参见例如Gonzalez等人,1999年, Bioconjugate Chem.,第10卷,第1068-1074页;WO 03/47518和WO 03/46185)、聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)和PLCA微球(参见例如,美国专利号6,447,796和US2002130430)、可生物降解的纳米胶囊和生物粘附性微球,或通过蛋白质载体(参见例如, WO 00/53722)。

[0292] 在一个方面,本申请提供了含有本文所述的核酸分子的载体系统。在一些实施方案中,载体系统是基于脂质的载体系统、阳离子脂质或脂质体核酸复合物、脂质体、胶束、病毒体、脂质纳米颗粒或它们的混合物。在其他实施方案中,载体系统是基于聚合物的载体系统,诸如阳离子聚合物-核酸复合物。在另外的实施方案中,载体系统是基于环糊精的载体系统,诸如环糊精聚合物-核酸复合物。在另一些实施方案中,载体系统是基于蛋白质的载体系统,诸如阳离子肽-核酸复合物。优选地,载体系统是脂质纳米颗粒制剂。本文所述的脂质纳米颗粒(“LNP”)制剂可应用于本文所述的任何核酸分子(例如, RNA分子)或核酸分子的组合。

[0293] 在某些实施方案中,本文所述的核酸分子被配制成脂质纳米颗粒组合物,诸如美国专利号7514099和7404969中所述。在一些实施方案中,本申请的特征在于包含核酸分子的组合物,该核酸分子被配制成US 20120029054中所述的任何制剂,诸如LNP-051、LNP-053、LNP-054、LNP-069、LNP-073、LNP-077、LNP-080、LNP-082、LNP-083、LNP-060、LNP-061、LNP-086、LNP-097、LNP-098、LNP-099、LNP-100、LNP-101、LNP-102、LNP-103或LNP-104。

[0294] 在其他实施方案中,本公开的特征在于本文所述的核酸分子的缀合物和/或复合物。此类缀合物和/或复合物可用于促进核酸分子递送到生物系统诸如细胞中。由此提供的缀合物和复合物可通过将治疗性化合物转移穿过细胞膜、改变药代动力学和/或调节本发明核酸分子的定位来赋予治疗活性。此类缀合物的非限制性示例描述于例如美国专利号7,833,992、6,528,631、6,335,434、6,235,886、6,153,737、5,214,136、5,138,045。

[0295] 在各种实施方案中,聚乙二醇(PEG)可共价连接到本文所述的核酸分子。连接的PEG可以是任何分子量,优选约100至约50,000道尔顿(Da)。因此,本公开的特征在于包含表面修饰的脂质体和本文所述的核酸分子的组合物或制剂,该表面修饰的脂质体含有聚(乙二醇)脂质(PEG修饰的或长循环脂质体或隐形脂质体)。参见例如,WO 96/10391、WO 96/10390和WO 96/10392。

[0296] 在一些实施方案中,核酸分子还可与聚乙烯亚胺及其衍生物配制或复合,例如聚乙烯亚胺-聚乙二醇-N-乙酰半乳糖胺(PEI-PEG-GAL)或聚乙烯亚胺-聚乙二醇-三-N-乙酰

半乳糖胺 (PEI-PEG-triGAL) 衍生物。在一个实施方案中,核酸分子可以U.S.20030077829中描述的方式配制。

[0297] 在其他实施方案中,本文所述的核酸分子可与膜破坏剂例如U.S.20010007666中所述的那些复合。在其他实施方案中,一种或多种膜破坏剂和分子可与阳离子脂质或辅助脂质分子诸如美国专利号6,235,310中所述的那些脂质复合。

[0298] 在某些实施方案中,本文所述的核酸分子可与如美国专利申请公布号2003077829、20050287551、20050164220、20050191627、20050118594、20050153919、20050085486和20030158133,和IWO 00/03683,和WO 02/087541中所述的递送系统复合。

[0299] 在一些实施方案中,本文所述的脂质体制剂可包含与美国专利号6,858,224、6,534,484、6,287,591、6,835,395、6,586,410、6,858,225、6,815,432、6,586,001、6,120,798、6,977,223、6,998,115、5,981,501、5,976,567、5,705,385,以及美国专利申请公布号2006/0019912、2006/0019258、2006/0008909、2005/0255153、2005/0079212、2005/0008689、2003/0077829、2005/0064595、2005/0175682、2005/0118253、2004/0071654、2005/0244504、2005/0265961和2003/0077829中所述的化合物和组合物配制或复合的本文所述的核酸分子(例如,抑制性核酸)。

[0300] 如本文所公开的,上述核酸分子可用于治疗受试者的障碍。如上所述的载体(诸如重组质粒和病毒载体)可用于递送治疗剂,诸如本文所述的抑制性核酸或CRISPR-Cas系统。载体的递送可以是全身性的,例如通过静脉内或肌内施用;通过施用到从受试者移植的靶细胞,随后再引入受试者;或通过允许引入到所需靶细胞中的任何其他方式。此类重组载体也可直接施用或与合适的递送试剂联合施用,这些递送试剂包括例如,Mirus Transit LT1亲脂性试剂;脂质体;lipofectamine;cellfectin;聚阳离子(例如,聚赖氨酸)或基于脂质体脂质的载体系统、阳离子脂质或脂质体核酸复合物、胶束、病毒体、脂质纳米颗粒。

[0301] 病毒载体

[0302] 在一些实施方案中,编码RNA分子的多核苷酸可插入到载体诸如质粒或病毒载体中,或由载体诸如质粒或病毒载体编码。优选地,多核苷酸插入到病毒载体中或由病毒载体编码。病毒载体可以是疱疹病毒(HSV)载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体、AAV载体、慢病毒载体等。在一些具体实施方案中,病毒载体是AAV载体。在一些实施方案中,RNA可由逆转录病毒载体编码(参见例如,美国专利号5,399,346、5,124,263、4,650,764和4,980,289;这些专利中每个专利的内容全文以引用方式并入本文)。

[0303] 慢病毒载体

[0304] 慢病毒诸如HIV是“慢病毒”。来源于慢病毒的载体可在向患者施用几次后在宿主细胞中长期表达,例如,通过离体转导的干细胞或祖细胞。对于大多数疾病和障碍,包括遗传疾病、癌症和神经疾病,长期表达对于成功治疗至关重要。关于慢病毒载体的安全性,本领域目前已知许多用于消除慢病毒载体复制能力的策略。参见例如,US20210401868和20210403517,这些专利中每个专利全文以引用方式并入本文。例如,从长末端重复序列(LTR)的U3区域缺失启动子和增强子元件被认为没有LTR指导的转录。所得的载体被称为“自失活”(SIN)。

[0305] 慢病毒载体特别适于实现长期基因转移,因为它们允许转基因长期、稳定地整合并在子细胞中繁殖。慢病毒载体比来源于致癌逆转录病毒(诸如鼠白血病病毒)的载体具有

额外的优势,因为它们可以转导非增殖细胞(诸如CNS细胞)。它们还具有低免疫原性的额外优势。通常,合适的载体含有在至少一种生物体中发挥作用的复制起点、启动子序列、方便的限制性核酸内切酶位点和一种或多种选择性标记物(例如,W001/96584和W001/29058;以及美国专利号6,326,193)。几种载体启动子序列可用于表达转基因。合适启动子的一个示例是立即早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列是强组成型启动子序列,其能够驱动与其可操作地连接的任何多核苷酸序列的高水平表达。合适的启动子的另一个示例是EF1a。然而,也可使用其他组成型启动子序列,包括但不限于猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复序列(LTR)启动子、MoMuLV启动子、禽白血病毒启动子、爱泼斯坦-巴尔病毒立即早期启动子、劳斯肉瘤病毒启动子,以及人类基因启动子,诸如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。诱导型启动子包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

[0306] 本公开提供了能够感染分裂细胞和非分裂细胞,如少突胶质细胞、星形胶质细胞或神经胶质祖细胞的重组慢病毒。该病毒可用于核酸序列的体内和离体转移和表达。本公开的慢病毒载体可以是慢病毒转移质粒或感染性慢病毒颗粒。用于慢病毒转移系统的慢病毒载体、辅助构建体、包膜构建体等的构建已描述于例如US20210401868和20210403517中,这些专利中每个专利全文以引用方式并入本文。

[0307] 腺病毒

[0308] 腺病毒是真核生物DNA病毒,其可被修饰以有效地将核酸递送至体内的多种细胞类型,并已广泛用于基因治疗方案,包括将基因靶向神经细胞和神经胶质细胞。已经描述了用于核酸治疗的各种复制缺陷型腺病毒和最小腺病毒载体(参见例如,PCT专利公布号W0199426914、W0 199502697、W0199428152、W0199412649、W0199502697和W0199622378;这些专利中每个专利的内容全文以引用方式并入)。此类腺病毒载体还可用于将本公开的治疗分子递送至细胞。

[0309] 腺相关病毒

[0310] 腺相关病毒是广泛使用的基因治疗载体,这是由于其临床安全记录、非致病性性质、感染非分裂细胞(如神经元)的能力和在单次施用后提供长期基因表达的能力。目前,已经鉴定了许多人和非人灵长类AAV血清型。AAV载体已在世界范围内的数百个临床试验中证明了安全性,并且在血友病B、脊髓性肌萎缩症、 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶和莱伯先天性黑蒙症的试验中显示了临床疗效。

[0311] 由于其安全性、非致病性和感染神经元的能力,AAV诸如AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8和AAV9是CNS应用中常用的基因治疗载体。然而,在直接CNS输注后,这些血清型表现出显性的神经元向性,并且在少突胶质细胞中的表达较低,尤其是当基因表达由组成型启动子驱动时,这限制了它们用于治疗白质疾病的潜力。AAV1/2、AAV2和AAV8已被证明转导少突胶质细胞。依赖细胞特异性启动子来实现表达特异性,通过非少突胶质细胞谱系细胞中的隐秘启动子活性,使非选择性细胞摄取和渗漏转基因表达成为可能。

[0312] 本文所述的减轻这些问题的方法包括使用对少突胶质细胞或星形胶质细胞或神经胶质祖细胞具有高向性的AAV血清型。最近,利用DNA改组和定向进化,已经描述了对少突胶质细胞具有强选择性的嵌合AAV衣壳AAV/Olig001(Powell等人,2016年,Gene Ther,第23

卷:第807-814页)。随后,AAV/Olig001被证明在卡纳万病小鼠模型中转导新生儿少突胶质细胞(Francis等人,2021年,Mol Ther Methods Clin Dev,第20卷:第520-534页)。其他方法诸如随机诱变和肽文库插入可用于产生衣壳文库,这些衣壳文库可针对少突胶质细胞或星形胶质细胞或神经胶质祖细胞的向性和选择性进行筛选。

[0313] 如上所述,术语“腺相关病毒”和/或“AAV”是指具有线性单链DNA基因组的细小病毒及其变体。该术语涵盖所有亚型以及天然存在的和重组的形式,除非另有要求。细小病毒,包括AAV,可用作基因治疗载体,因为它们可穿透细胞并将核酸(例如,转基因)引入细胞核。在一些实施方案中,引入的核酸(例如,rAAV载体基因组)形成环状多联体,其作为附加体持续存在于转导细胞的细胞核中。在一些实施方案中,转基因插入宿主细胞基因组中的特定位点。与随机整合相反,位点特异性整合被认为可能导致可预测的长期表达谱。AAV插入到人基因组中的插入位点称为AAVS1。一旦被引入细胞,由核酸编码的RNA或多肽可由细胞表达。因为AAV与人类的任何病原性疾病无关,所以由AAV递送的核酸可用于表达治疗性RNA或多肽,以治疗人受试者的疾病、障碍和/或病症。

[0314] AAV的多种血清型天然存在,迄今为止已从人类中鉴定出至少十五种野生型血清型(即,AAV1-AAV15)。天然存在的血清型和变体血清型的区别在于具有在血清学上不同于其他AAV血清型的蛋白衣壳。示例包括AAV1、AAV2、AAV3(包括AAV3A和AAV3B)、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV12、AAVrh10、AAVrh74(参见WO 2016/210170)、禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV和绵羊AAV,以及重组产生的变体(例如,具有插入、缺失和取代等的衣壳变体),诸如称为AAV2i8、NP4、NP22、NP66、DJ、DJ/8、DJ/9、LK3、RHM4-1的变体,等等。“灵长类AAV”指感染灵长类的AAV,“非灵长类AAV”指感染非灵长类哺乳动物的AAV,“牛AAV”指感染牛哺乳动物的AAV,等等。

[0315] 血清型独特性基于针对一种AAV的抗体与针对另一种AAV的抗体之间缺乏交叉反应性来确定。这种交叉反应性差异通常是由于衣壳蛋白序列和抗原决定簇的差异(例如,由于AAV血清型的VP1、VP2和/或VP3序列差异)。然而,一些天然存在的AAV或人工AAV突变体(例如,重组AAV)与任何目前已知的血清型均不能表现出血清学差异。然后,这些病毒可被认为是对应类型的亚组,或更简单地被认为是变体AAV。因此,如本文所用,术语“血清型”是指血清学上不同的病毒,以及血清学上不同但可能属于给定血清型的亚组或变体的病毒。

[0316] 已知AAV血清型衣壳的氨基酸序列的综合列表和比对由Marsic等人(2014年)Molecular Therapy,第22卷第11期:第1900-1909页提供。AAV的各种血清型的基因组序列,以及天然ITR、rep蛋白和衣壳亚基的序列是本领域已知的。这些序列可在文献或公共数据库诸如GenBank中找到。参见例如,GenBank登录号NC_002077(AAV1)、AF063497(AAV1)、NC_001401(AAV2)、AF043303(AAV2)、NC_001729(AAV3)、NC_001863(AAV3B)、NC_001829(AAV4)、U89790(AAV4)、NC_006152(AAV5)、NC_001862(AAV6)、AF513851(AAV7)、AF513852(AAV8)和NC_006261(AAV8);其公开内容以引用方式并入本文。也参见例如,Srivistava等人,(1983年)J.Virology,第45卷:第555页;Chiorini等人,(1998年)J.Virology,第71卷:第6823页;Chiorini等人,(1999年)J.Virology,第73卷:第1309页;Bantel-Schaal等人,(1999年)J.Virology,第73卷:第939页;Xiao等人,(1999年)J.Virology,第73卷:第3994页;Muramatsu等人,(1996年)Virology,第221卷:第208页;Shade等人,(1986年)J.Virol.,第58卷:第921页;Gao等人,(2002年)Proc.Nat.Acad.Sci.USA,第99卷:第11854页;Moris等

人, (2004年) *Virology*, 第33卷, 第375-383页; 国际专利公布WO 00/28061、WO 99/61601、WO 98/11244; WO 2013/063379; WO2014/194132; WO 2015/121501和美国专利6,156,303和美国专利号7,906,111。

[0317] 如本文所讨论的, “重组腺相关病毒”或“rAAV”通过用非天然序列替代全部或部分内源病毒基因组而与野生型AAV区分。在病毒中掺入非天然序列将病毒载体定义为“重组”载体, 并因此定义为“rAAV载体”。rAAV载体可包括编码所需RNA或蛋白质或多肽(例如, 本文公开的RNA分子)的异源多核苷酸。重组载体序列可被衣壳化或包装入AAV衣壳中, 并被称为“rAAV载体”、“rAAV载体颗粒”、“rAAV病毒颗粒”或简称为“rAAV”。

[0318] 本公开提供了包含非AAV来源的多核苷酸序列(例如, 与AAV异源的多核苷酸)的rAAV载体。异源多核苷酸的侧翼可为至少一个, 有时为两个AAV末端重复序列(例如, 反向末端重复序列)。侧翼为ITR的异源多核苷酸, 在本文中也称为“载体基因组”, 通常编码感兴趣的RNA或多肽, 或感兴趣的基因, 诸如治疗性治疗的靶标。将rAAV载体递送或施用至受试者(例如患者)向受试者提供了编码的RNA/蛋白质/肽。因此, rAAV载体可用于转移/递送异源多核苷酸以用于表达, 例如用于治疗多种疾病、障碍和病症。

[0319] rAAV载体基因组通常保留145个碱基的ITR, 其与替代病毒rep和cap基因的异源核酸序列呈顺式。这种ITR可用于制备重组AAV载体; 然而, 修饰的AAV ITR和包括部分或完全合成序列的非AAV末端重复序列也可用于此目的。ITR形成发夹结构, 并且例如用作感染后宿主细胞介导的互补DNA链合成的引物。ITR还在病毒包装、整合等中起作用。ITR是AAV基因组复制和包装到rAAV载体中顺式所需的唯一AAV病毒元件。rAAV载体基因组任选地包含两个ITR, 其通常在包含异源序列(例如, 编码感兴趣的基因的转基因, 或感兴趣的核酸序列, 包括但不限于反义和siRNA、CRISPR分子等等)的载体基因组的5'端和3'端。5'和3' ITR都可包含相同的序列, 或者各自可包含不同的序列。AAV ITR可来自任何AAV, 包括但不限于血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11或任何其他AAV。

[0320] 本公开的rAAV载体可包含来自AAV血清型(例如, 野生型AAV2、其片段或变体)的ITR, 该AAV血清型不同于衣壳的血清型(例如, AAV8、Olig001)。包含来自一种血清型的至少一种ITR但包含来自不同血清型的衣壳的这种rAAV载体可被称为杂合病毒载体(参见美国专利号7,172,893)。AAV ITR可包括完整的野生型ITR序列, 或者是其变体、片段或修饰, 但将保留功能性。

[0321] 在一些实施方案中, rAAV载体基因组是线性的、单链的, 并且侧翼为AAV ITR。在异源基因转录和翻译之前, 必须用DNA聚合酶(例如, 转导细胞内的DNA聚合酶), 利用自引发ITR之一的游离3'-OH引发第二链合成, 将大约4700个核苷酸的单链DNA基因组转变为双链形式。在一些实施方案中, 全长-单链载体基因组(即, 有义和反义)退火以产生全长-双链载体基因组。当携带相反极性(即, 有义或反义)基因组的多个rAAV载体同时转导相同细胞时, 这可能发生。无论它们是如何产生的, 一旦形成双链载体基因组, 细胞就可转录和翻译双链DNA并表达异源基因。

[0322] 由于在表达前需要将单链rAAV基因组(ssAAV)转化为双链DNA, 可阻碍从rAAV载体表达转基因的效率。该步骤可通过使用自身互补的AAV基因组(scAAV)来避开, 该基因组可包装能折叠成双链DNA的反向重复基因组, 而不需要DNA合成或多个载体基因组之间的碱基配对。参见例如, 美国专利号8,784,799; McCarty, (2008年) *Molec. Therapy*, 第16卷第10期:

第1648-1656页;和McCarty等人,(2001年)Gene Therapy,第8卷:第1248-1254页;McCarty等人,(2003年)Gene Therapy,第10卷:第2112-2118页。

[0323] rAAV载体的病毒衣壳可来自野生型AAV或变体AAV,诸如AAV1,AAV2,AAV3,AAV3A,AAV3B,AAV4,AAV5,AAV6,AAV7,AAV8,AAV9,AAV10,AAVrh10,AAVrh74(参见WO2016/210170)、AAV12,AAV2i8,AAV1.1,AAV2.5,AAV6.1,AAV6.3.1,AAV9.45,RHM4-1(WO 2015/013313)、RHM15-1,RHM15-2,RHM15-3/RHM15-5,RHM15-4,RHM15-6,AAV hu.26,AAV1.1,AAV2.5,AAV6.1,AAV6.3.1,AAV9,45,AAV2i8,AAV29G,AAV2,8G9,AVV-LK03,AAV2-TT,AAV2-TT-S312N,AAV3B-S312N,禽AAV、牛AAV、犬AAV、马AAV、灵长类AAV、非灵长类AAV、蛇AAV、山羊AAV、虾AAV、绵羊AA及其变体(参见例如,VIROLOGY,第2卷,第69章(第4版,Lippincott-Raven Publishers)。衣壳可源自多种AAV血清型,其公开于:美国专利号7,906,111;Gao等人,(2004年)J.Virol.,第78卷:第6381页;Morris等人,(2004年)Virol.,第33卷:第375页;WO 2013/063379;WO 2014/194132;并且包括WO 2015/121501中公开的AAV(AAV-TT)变体,和WO 2015/013313中公开的RHM4-1,RHM15-1至RHM15-6及其变体。AAV cap蛋白的完整互补物包括VP1、VP2和VP3。包含编码AAV VP衣壳蛋白的核苷酸序列的ORF可包含少于AAV Cap蛋白的全互补序列,或者可提供AAV Cap蛋白的全互补序列。

[0324] 在一些实施方案中,包含由源自多于一种AAV血清型(例如,野生型AAV血清型、变体AAV血清型)的核苷酸序列编码的衣壳蛋白的rAAV载体被称为“嵌合载体”或“嵌合衣壳”(参见美国专利号6,491,907,该专利的全部公开内容以引用方式并入本文)。在一些实施方案中,嵌合衣壳蛋白由源自2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种AAV血清型的核酸序列编码。在一些实施方案中,重组AAV载体包括源自例如AAV1,AAV2,AAV3,AAV3A,AAV3B,AAV4,AAV5,AAV6,AAV7,AAV8,AAV9,AAV10,AAV11,AAVrh74,AAVrh10,AAV2i8或其变体的衣壳序列,产生包含来自任何前述AAV血清型的氨基酸的組合的嵌合衣壳蛋白(参见,Rabinowitz等人,(2002年)J.Virology,第76卷第2期:第791-801页)。另选地,嵌合衣壳可包含来自一种血清型的VP1、来自不同血清型的VP2、来自又一不同血清型的VP3以及它们的組合的混合物。例如,嵌合病毒衣壳可包括AAV1 cap蛋白或亚基和至少一种AAV2 cap蛋白或亚基。嵌合衣壳可例如包括具有一个或多个B19 cap亚基的AAV衣壳,例如,AAV cap蛋白或亚基可被B19 cap蛋白或亚基替代。例如,在一个实施方案中,AAV衣壳的VP3亚基可被B19的VP2亚基替代。在一些实施方案中,嵌合衣壳是如WO2021221995和WO2014052789中所述的Olig001衣壳,这些专利以引用方式并入本文。

[0325] 在一些实施方案中,嵌合载体已被工程化以表现出改变的向性或对于特定组织或细胞类型的向性。术语“向性”是指病毒优先进入某些细胞(例如,少突胶质细胞)或组织类型和/或优先与细胞表面相互作用,这促进进入某些细胞或组织类型。AAV向性通常由不同病毒衣壳蛋白与其同源细胞受体之间的特定相互作用决定(Lykken等人,(2018年)J.Neurodev.Disord.,第10卷:第16页)。优选地,一旦病毒或病毒载体进入细胞,由载体基因组(例如,rAAV载体基因组)携带的序列(例如,异源序列诸如转基因)被表达。

[0326] “向性谱”是指各种组织和/或器官中的一种或多种靶细胞的转导模式。例如,嵌合AAV衣壳可具有向性谱,其特征在于有效转导少突胶质细胞或星形胶质细胞或少突胶质祖细胞,而仅低转导神经元和其他CNS细胞。参见WO2014/052789,其以引用形式并入本文。这种嵌合衣壳可被认为是对少突胶质细胞或星形胶质细胞或神经胶质祖细胞具有特异性的,

并且本文称为“神经胶质向性”，如果直接施用到CNS中时，则优先转导少突胶质细胞或星形胶质细胞或少突胶质祖细胞而不是神经元和其他CNS细胞类型。在一些实施方案中，至少约80%的被对少突胶质细胞或少突胶质祖细胞具有特异性的衣壳转导的细胞是少突胶质细胞或少突胶质祖细胞，例如至少约85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的转导的细胞是少突胶质细胞或少突胶质祖细胞。

[0327] 细胞替代疗法

[0328] 本申请的一个方面涉及减轻成人受试者的CNS(例如,脑)中年龄相关的少突胶质细胞损失、星形胶质细胞损失或白质损失的不利影响的方法。该方法包括鉴定经历CNS(例如,脑)中年龄相关的少突胶质细胞损失、星形胶质细胞损失或白质损失的不利影响的受试者,例如成人受试者,并提供分离的神经胶质祖细胞的群体。然后将分离的神经胶质祖细胞的群体引入选择的受试者的CNS(诸如脑和/或脑干)中,以至少部分替代受试者的脑中在经历年龄相关的白质损失的不利影响的位置的细胞。

[0329] 如本文所用,术语“神经胶质细胞”是指提供支持和营养、维持稳态、形成髓磷脂或促进髓鞘形成并参与神经系统中的信号传递的非神经元细胞的群体。本文所用的“神经胶质细胞”涵盖神经胶质谱系的完全分化的细胞,例如少突胶质细胞或星形胶质细胞,以及神经胶质祖细胞。神经胶质祖细胞是具有分化成神经胶质谱系细胞诸如少突胶质细胞和星形胶质细胞的潜力的细胞。

[0330] 本文所述的神经胶质祖细胞可源自多能干细胞的任何合适的来源,例如但不限于,人诱导多能干细胞(iPSC)和胚胎干细胞,如下文更详细描述。在一个示例中,神经胶质祖细胞可以是如本文所述的神经胶质祖细胞或其子代再生的细胞。

[0331] 在一些实施方案中,为了治疗有需要的受试者,神经胶质祖细胞或再生细胞是年轻的神经胶质或神经胶质祖细胞,或比待治疗的受试者中的对应物年轻。

[0332] 如本文所用,术语“年轻的”神经胶质或神经胶质祖细胞是指在体外环境(从胎儿供体组织分离细胞起约105天)中被诱导开始分化成神经胶质祖细胞的细胞。在一些实施方案中,术语“年轻的神经胶质细胞”是指准备移植到动物中(从胎儿供体组织分离细胞起约160天)的分化的神经胶质祖细胞。在一些实施方案中,术语“年轻的神经胶质细胞”是指在移植1-20周内的神经胶质祖细胞或它们的子代。术语“较老的神经胶质细胞”相对于术语“年轻的神经胶质细胞”使用。与较老的神经胶质细胞相比,年轻的神经胶质细胞可具有一种或多种下列特征:(i)生长或增殖或分裂更快,(ii)编码CDKN1A(p21Cip1)和CDKN2/p16(INK4)和p14(ARF)的衰老相关转录物的水平低于旧水平,和(iii)更长的端粒或更高的端粒酶活性或两者。

[0333] 在一些实施方案中,较老的神经胶质细胞是源自已经移植到宿主中5、10、20、30或40周的神经胶质祖细胞的神经胶质细胞。在一些实施方案中,较老的神经胶质细胞是已从分化的神经胶质祖细胞再培养5、10、20、30或40周(例如,从最初的组织收获起约160天)的神经胶质细胞。在一些实施方案中,较老的神经胶质细胞是从引入分化起再培养5、10、20、30或40周(例如,从最初的组织收获起约105天)的神经胶质细胞。

[0334] iPSC是源自非多能细胞诸如体细胞的多能细胞。例如,但不限于,iPSCs可源自组织、外周血、脐带血和骨髓(参见例如Cai等人,J.Biol.Chem.,第285卷第15期:第11227-11234页(2110年);Giorgetti等人,Nat.Protocol.,第5卷第4期:第811-820页(2010年);

Streckfuss-Bomeke等人, *Eur. Heart J.* doi:10.1093/eurheartj/ehs203 (2012年7月12日); Hu等人, *Blood* doi:10.1182/blood-2010-07-298331 (2011年2月4日); Sommer等人, *J. Vis. Exp.*, 第68卷: 第e4327页 doi:10.3791/4327 (2012), 这些文献据此全文以引用方式并入)。可使用遗传操作将体细胞重编程为胚胎干细胞样状态。适合iPSC形成的示例性体细胞包括成纤维细胞(参见例如, Streckfuss-Bomeke等人, *Eur. Heart J.* doi:10.1093/eurheartj/ehs203 (2012年), 该文献据此全文以引用方式并入) 例如通过皮肤样品或活检获得的真皮成纤维细胞、来自滑膜组织的滑膜细胞、角质形成细胞、成熟B细胞、成熟T细胞、胰腺 β 细胞、黑素细胞、肝细胞、包皮细胞、颊细胞或肺成纤维细胞。

[0335] 产生诱导多能干细胞的方法是本领域已知的, 并且通常涉及在体细胞中表达重编程因子的组合。促进和诱导iPSC产生的合适的重编程因子包括Oct4、Klf4、Sox2、c-Myc、Nanog、C/EBP α 、Esrrb、Lin28和Nr5a2中的一者或多者。在某些实施方案中, 至少两种重编程因子在体细胞中表达以成功重编程体细胞。在其他实施方案中, 至少三种重编程因子在体细胞中表达以成功重编程体细胞。

[0336] iPSC可通过本领域已知的方法衍生, 包括使用整合病毒载体(例如, 慢病毒载体、诱导型慢病毒载体和逆转录病毒载体)、可切除载体(例如, 转座子和floxed慢病毒载体)和非整合载体(例如, 腺病毒载体和质粒载体)来递送促进细胞重编程的基因(参见例如Takahashi和Yamanaka, *Cell*, 第126卷: 第663-676页(2006年); Okita. 等人, *Nature*, 第448卷: 第313-317页(2007年); Nakagawa等人, *Nat. Biotechnol.*, 第26卷: 第101-106页(2007年); Takahashi等人, *Cell*, 第131卷: 第1-12页(2007年); Meissner等人, *Nat. Biotech.*, 第25卷: 第1177-1181页(2007年); Yu等人, *Science*, 第318卷: 第1917-1920页(2007年); Park等人, *Nature*, 第451卷: 第141-146页(2008年); 以及美国专利申请公开号2008/0233610, 这些文献据此全文以引用方式并入)。用于生成IPS细胞的其他方法包括在W02007/069666、W02009/006930、W02009/006997、W02009/007852、W02008/118820、授予Ikeda等人的美国专利申请公开号2011/0200568、授予Egusa等人的美国专利申请公开号2010/0156778、授予Musick的美国专利申请公开号2012/0276070和授予Nakagawa的美国专利申请公开号2012/0276636; Shi等人, *Cell Stem Cell*, 第3卷第5期: 第568-574页(2008年); Kim等人, *Nature*, 第454卷: 第646-650页(2008年); Kim等人, *Cell*, 第136卷第3期: 第411-419页(2009年); Huangfu等人, *Nat. Biotechnol.*, 第26卷: 第1269-1275页(2008年); Zhao等人, *Cell Stem Cell*, 第3卷: 第475-479页(2008年); Feng等人, *Nat. Cell Biol.*, 第11卷: 第197-203页(2009年); 以及Hanna等人, *Cell*, 第133卷第2期: 第250-264页(2008年), 这些文献据此全文以引用方式并入。

[0337] 上述iPSC生成方法可被修饰以包括增强重编程效率或甚至替代重编程因子的小分子。这些小分子包括但不限于表观遗传调节剂, 诸如DNA甲基转移酶抑制剂5'-氮杂胞苷、组蛋白脱乙酰酶抑制剂VPA和G9a组蛋白甲基转移酶抑制剂BIX-01294以及L型钙通道激动剂BayK8644。其他小分子重编程因子包括靶向信号转导途径的那些, 诸如TGF- β 抑制剂和激酶抑制剂(例如Kenpaullone)(参见Sommer和Mostoslavsky, *Stem Cell Res. Ther.* 第1卷: 第26页 doi:10.1186/scrt26 (2010年8月10日)的综述, 该文献据此全文以引用方式并入)。

[0338] 从适于制备本文所述的非人哺乳动物模型的iPSC获得神经胶质祖细胞的高度富集制备物的方法公开于授予Goldman和Wang的W02014/124087, 和Wang等人, *Cell Stem*

Cell,第12卷第2期:第252-264页(2013年),这些文献据此全文以引用方式并入。

[0339] 在本申请的另一个实施方案中,神经胶质祖细胞源自胚胎干细胞。胚胎干细胞源自早期哺乳动物胚胎的全能细胞,能够在体外无限、未分化增殖。如本文所用,术语“胚胎干细胞”是指从胚胎、胎盘或脐带分离的细胞,或此类细胞的永生化形式,即胚胎干细胞系。合适的胚胎干细胞系包括但不限于细胞系WA-01(H1)、WA-07、WA-09(H9)、WA-13和WA-14(H14)(Thomson等人,Science,第282卷第5391期:第1145-1147页(1998年)和授予Thomson等人的美国专利号7,029,913,这些文献据此全文以引用方式并入)。其他合适的胚胎干细胞系包括HAD-C100细胞系(Tannenbaum等人,PLoS One,第7卷第6期:第e35325页(2012年),该文献据此全文以引用方式并入)、WIBR4、WIBR5、WIBR6细胞系(Lengner等人,Cell,第141卷第5期:第872-883页(2010年),该文献据此全文以引用方式并入)和人胚胎干细胞系(HUES)1-17(Cowan等人,N.Engl.J.Med.,第350卷:第1353-1356页(2004年),该文献据此全文以引用方式并入)。

[0340] 人胚胎干细胞为潜在用于组织替代疗法的克隆/遗传修饰细胞提供了几乎无限的来源。本文描述了从适于制备本公开的非人哺乳动物模型的胚胎细胞获得神经胶质祖细胞的高度富集制备物的方法,如Wang等人,Cell Stem Cell,第12卷:第252-264页(2013年)中所公开的,该文献据此全文以引用方式并入。

[0341] 简言之,神经胶质祖细胞源自多能细胞群体,即iPSC或胚胎干细胞,使用的方案指导多能细胞经历神经和神经胶质祖细胞分化的一系列阶段。谱系限制的每个阶段通过某些细胞蛋白质的表达来表征和鉴定。该过程的阶段1包括涉及在有效诱导类胚体形成的条件下培养多能细胞群。如本文所述,多能细胞群可在胚胎干细胞(ESC)培养基(例如,含有合适的血清替代物和bFGF的DMEM/F12)中维持与其他细胞(诸如胚胎成纤维细胞)共培养。当集落直径为大约250 μ m-300 μ m时,多能细胞在达到100%汇合(例如,80%汇合)之前传代。使用SSEA4、TRA-1-60、OCT-4、NANOG和/或SOX2的标记物容易地评估细胞的多能状态。

[0342] 为了生成类胚体(EB)(阶段2)(多能干细胞的复杂三维细胞聚集体),多能细胞培养物在达到约80%汇合且集落直径为250 μ m-300 μ m或左右时即被解离。EB最初在不含bFGF的ESC培养基中悬浮培养,然后转到补充有bFGF和肝素神经诱导培养基中。为了诱导神经上皮分化(阶段3),将EB铺板并在补充有bFGF、肝素、层粘连蛋白的神经诱导培养基中培养,然后转到补充有视黄酸的神经诱导培养基中。通过PAX6和SOX1的共表达来评估神经上皮分化,其表征中枢神经干细胞和祖细胞。

[0343] 为了诱导前少突胶质祖细胞(“前OPC”)分化,可在另外的因子存在下培养神经上皮细胞集落,这些另外的因子包括视黄酸、B27补充剂和音猬因子(shh)激动剂(例如,purmorphamine)。通过OLIG2和/或NKX2.2表达的存在评估前OPC的集落的外观。虽然OLIG2和NKX2.2都由中央少突胶质祖细胞表达,但NKX2.2是少突胶质细胞分化的更特异性指示物。因此,早期前少突胶质祖细胞阶段由OLIG⁺/NKX2.2⁻细胞集落标记。通过用bFGF替代视黄酸将早期OLIG⁺/NKX2.2⁻前OPC分化为晚期OLIG⁺/NKX2.2⁺前OPC。在阶段5结束时,如OLIG2⁺/NKX2.2⁺表达谱所示,相当大比例的细胞为前OPC。

[0344] 前OPC可通过在补充有生长因子诸如三碘甲状腺原氨酸(T3)、神经营养因子3(NT3)、胰岛素生长因子(IGF-1)和血小板衍生生长因子-AA(PDGF-AA)的神经胶质诱导培养基中培养,前OPC可进一步分化为双潜力神经胶质祖细胞(阶段6)。这些培养条件可延长3-4

个月或更长时间,以在需要时最大限度地提高髓鞘形成神经胶质祖细胞的产量。适于移植到合适受试者中的细胞制备物被鉴定为含有PDGFR α ⁺神经胶质祖细胞。

[0345] 用于实施本申请方法的神经胶质祖细胞的群体可包含至少约80%的神经胶质祖细胞,包括例如约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%的神经胶质细胞。所选择的神经胶质祖细胞制备物可相对缺乏(例如,含有少于20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%)其他细胞类型诸如神经元和神经元祖细胞。任选地,细胞群可以是基本上纯的神经胶质祖细胞的群体。

[0346] 根据本申请的方法治疗的受试者可以是患有脑中年龄相关的白质/少突胶质细胞/星形胶质细胞损失的成人。该方法减轻了这种病症的不利影响,这种不利影响可能作为正常衰老过程的一部分而出现。

[0347] 如本文所用,“治疗”是指成功改善损伤、病理或病症的任何指示,包括任何客观或主观参数,诸如减少、缓解、减弱症状,或使患者更能耐受损伤、病理或病症;减缓退化或衰退的速率;使退化的最终点不再那么衰弱;或改善受试者的身体或心理健康。症状的治疗或改善可基于客观或主观参数;包括身体检查、神经检查和/或精神评估的结果。

[0348] “治疗”可包括施用神经胶质祖细胞或/和其他药剂以预防或延迟、减轻或阻止或抑制与疾病、病症或障碍相关的症状或病症的发展。“治疗效果”是指减少、消除或预防受试者的疾病、疾病症状或疾病、病症或障碍的副作用。治疗可以是预防性的(以预防或延迟疾病、病症或障碍的发作或恶化,或预防其临床或亚临床症状的表现)或在疾病、病症或障碍表现后症状的治疗性抑制或减轻

[0349] 如本文所用,术语“白质”涉及脑和浅表脊髓中的中枢神经系统的组成部分,其主要由神经胶质细胞和有髓轴突组成,该有髓轴突将信号从大脑的一个区域传递到另一个区域,并且在大脑和下脑中枢之间传递。

[0350] 可通过本申请的方法治疗的由脑中年龄相关的白质损失、少突胶质细胞损失或星形胶质细胞损失引起的病症之一是皮层下痴呆。

[0351] 可通过多种已知技术将神经胶质祖细胞引入需要减轻副作用的受试者体内。这些包括但不限于如本文所述的注射、沉积和移植。

[0352] 在一个实施方案中,神经胶质祖细胞可双侧移植到受试者的多个部位,如授予Goldman的美国专利号7,524,491;Windrem等人,Cell Stem Cell,第2卷:第553-565页(2008年);Han等人,Cell Stem Cell,第12卷:第342-353页(2013年),以及Wang等人,Cell Stem Cell,第12卷:第252-264页(2013年),这些文献据此全文以引用方式并入)中所述。描述了将神经组织和细胞移植到宿主脑中的方法描述于:Bjorklund和Stenevi(编辑),Neural Grafting in the Mammalian CNS,第3-8章,Elsevier,Amsterdam(1985年);授予Gage等人的美国专利号5,082,670;以及授予Weiss等人的美国专利号6,497,872,这些文献据此全文以引用方式并入。典型的程序包括脑实质内、胼胝体内、心室内、鞘内和静脉内移植。

[0353] 脑实质内移植可通过在宿主脑内注射或沉积组织以便在移植时与脑实质并置。用于脑实质内移植的两个主要程序是:(1)将供体细胞注射到宿主脑实质内或(2)通过手术方法制备空腔以暴露宿主脑实质,然后将移植物沉积到空腔中(Bjorklund和Stenevi(编辑),Neural Grafting in the Mammalian CNS,第3章,Elsevier,Amsterdam(1985年),该文献

据此全文以引用方式并入)。两种方法都在移植时提供供体细胞和宿主脑组织之间的实质并置,并且都促进移植物和宿主脑组织之间的解剖学整合。如果要求供体细胞成为宿主脑的组成部分并在宿主的一生中存活,这一点非常重要。

[0354] 神经胶质祖细胞也可如授予Goldman的美国专利申请公开号20030223972中所述进行胼胝体内递送,该专利据此全文以引用方式并入。神经胶质祖细胞也可直接递送到前脑皮层下部,特别是胼胝体的前原基和后原基。神经胶质祖细胞也可被递送到小脑脚白质,以进入主要的小脑和脑干束。神经胶质祖细胞也可被递送到脊髓。

[0355] 另选地,细胞可置于心室中,例如脑中。将细胞移植到心室中可通过注射供体细胞或通过基质诸如30%胶原蛋白中使细胞生长以形成固体组织栓来完成,然后将该固体组织栓植入心室中以防止移植细胞脱位。对于硬膜下移植,可在硬膜上切开切口后将细胞注射到脑表面周围。

[0356] 用于细胞递送的合适技术如上所述。在一个实施方案中,将所述神经胶质祖细胞制备物施用于受试者的纹状体、前脑、脑干和/或小脑。

[0357] 将细胞递送至受试者可包括直接注射到神经系统中的单步骤或多步骤注射。对于局部疾病诸如视神经脱髓鞘,可使用单次注射。尽管成人和胎儿少突胶质前体细胞广泛分散在移植受体的脑中,但对于广泛的疾病,可进行多个注射部位以优化治疗。任选地将注射引导至中枢神经系统区域,诸如白质束如胼胝体(例如,进入前原基和后原基)、背柱、小脑脚、大脑脚。这种注射可使用精确定位方法诸如立体定位手术进行单侧或双侧注射,任选地伴有成像方法(例如,高分辨率MRI成像)。本领域技术人员认识到脑区域因物种而异;然而,本领域技术人员还认识到哺乳动物物种之间相当的脑区域。

[0358] 细胞移植物可任选地作为解离的细胞注射,但也可通过局部放置非解离的细胞来提供。在任一情况下,细胞移植物任选地包含可接受的溶液。此类可接受的溶液包括避免不希望生物活性和污染的溶液。合适的溶液包括适量的药学上可接受的盐以使制剂等渗。药学上可接受的溶液的示例包括但不限于盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液和培养基。溶液的pH优选地为约5至约8,并且更优选地为约7至约7.5。

[0359] 解离的细胞移植物的注射可以是穿过注射装置(例如套管、针或管)的进入路径、离开路径或进入路径和离开路径两者的流动注射。自动化可用于提供一致的进入和退出速度以及注射速度和体积。

[0360] 每次施用(例如,注射部位)时,施用于受试者的神经胶质祖细胞的数量可在约 10^2 - 10^8 个的范围内,具体取决于接受者的体型和物种,以及需要细胞替换的组织的体积。单次施用(例如,注射)剂量可跨越 10^3 - 10^5 、 10^4 - 10^7 和 10^5 - 10^8 个细胞的范围,或移植受体患者的任何总量。

[0361] 由于CNS是免疫豁免部位,所以施用的细胞(包括异种细胞)可存活,并且任选地,在治疗方法中不使用免疫抑制药物或典型的免疫抑制剂方案。然而,任选地,免疫抑制剂也可施用于受试者。免疫抑制剂及其给药方案是本领域技术人员已知的,并且包括诸如硫唑嘌呤、硫唑嘌呤钠、环孢菌素、达曲班、三盐酸胍立莫司、西罗莫司和他克莫司的药剂。剂量范围和方案的持续时间可随以下因素变化:所治疗的障碍;排斥程度;所用特定免疫抑制剂的活性;受试者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;施用时间;施用途径;所用特定免疫抑制剂的分泌速率;治疗的持续时间和频率;以及联合使用的药物。本领域技术人员可确

定免疫抑制的可接受剂量和持续时间。在出现任何禁忌症或受试者状态变化的情况下,剂量方案可由个体医师调整。

[0362] 在一个实施方案中,可在细胞施用前10周开始向受试者施用一种或多种免疫抑制剂。在一个实施方案中,在细胞施用前9周、8周、7周、6周、5周、4周、3周、2周、1周、7天、6天、5天、4天、3天、2天、1天、<24小时开始向受试者施用一种或多种免疫抑制剂。在一个实施方案中,在细胞施用当天开始并在施用后持续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12个月向受试者施用一种或多种免疫抑制剂。在一个实施方案中,在施用后将一种或多种免疫抑制剂施用于受试者>1年。

[0363] 根据本文所述方法治疗的合适受试者包括患有年龄相关的白质损失的任何哺乳动物受试者。示例性哺乳动物受试者包括人、小鼠、大鼠、豚鼠和其他小啮齿动物、狗、猫、绵羊、山羊和猴。在一个实施方案中,该受试者是人。

[0364] 上述抑制/再生疗法和细胞疗法可一起使用。例如,上述抑制分子、CRISPR/Cas系统、表达盒或表达载体可在离体应用中用作治疗试剂。为此,可将试剂引入移植到受试者体内以产生治疗效果的组织或细胞中。细胞和/或组织可源自稍后接受外植体的生物体或受试者(例如,同基因的或自体的),或者可源自移植(例如,异源的、异种的、同种异体的或同基因的)前的另一生物体或受试者(例如,亲属、同胞或HLA匹配供体)。试剂可用于调节细胞或组织中一种或多种基因的表达,使得细胞或组织在体内移植时获得所需表型或能够发挥功能。在一个实施方案中,提取或分离来自患者的某些靶细胞。这些分离的细胞与靶向细胞内特定核苷酸序列的试剂在适合这些细胞摄取试剂的条件下接触(例如,使用递送试剂诸如阳离子脂质、脂质体等或使用技术诸如电穿孔以促进试剂递送入细胞)。然后将细胞重新引入同一患者或其他患者体内。

[0365] 对于治疗应用,可将药学有效剂量的治疗试剂或药物组合物施用于受试者。药学有效剂量是预防、抑制疾病状态的发生或治疗该疾病状态(在一定程度上减轻症状,优选所有症状)所需的剂量。本领域技术人员通过考虑以下因素,诸如受试者的体型和体重、疾病进展或渗透的程度、受试者的年龄、健康状况和性别、施用途径以及施用是局部的还是全身的,可容易地确定待施用于给定受试者的试剂的治疗有效剂量。通常,根据带负电的聚合物的效力,施用0.1mg/kg至100mg/kg体重/天的量的活性成分。治疗试剂或药物组合物可以单剂量或多剂量施用。

[0366] 药物组合物

[0367] 本公开提供了用于预防或治疗遗传性或获得性髓磷脂障碍的药物组合物或药物。在一些实施方案中,药物组合物包含一种或多种上述蛋白质分子、多核苷酸、表达盒、表达载体(例如,病毒载体基因组、表达载体、rAAV载体)、系统(例如,CRISPR/Cas系统或该系统的核酸编码组分)和宿主细胞。

[0368] 该药物组合物还包含药学上可接受的载体、佐剂、稀释剂、赋形剂和/或其他药剂。药学上可接受的载体、佐剂、稀释剂、赋形剂或其他药剂是在生物学上或其他方面无不良影响的药剂,例如,该材料可施用于受试者而不会引起超过该材料的有利生物学效应的不良的生物学效应。任何合适的药学上可接受的载体或赋形剂可用于制备根据本发明的药物组合物(参见例如,Remington The Science and Practice of Pharmacy, Adeboye Adejare (编辑) Academic Press, 2020年11月)。

[0369] 药物组合物通常是无菌的、无热原的,并且在制造和储存条件下是稳定的。药物组合物可被配制成溶液(例如,水、盐水、葡萄糖溶液、缓冲溶液或其他药物无菌流体)、微乳液、脂质体或其他适于适应高产物(例如,病毒载体颗粒、微粒或纳米颗粒)浓度的有序结构。

[0370] 在一些实施方案中,将包含本发明的上述蛋白质、多核苷酸、表达盒、表达载体、载体基因组、宿主细胞或rAAV载体的药物组合物在水或缓冲盐水溶液中配制。载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。例如,可通过使用包衣诸如卵磷脂,通过在分散体的情况下保持期望的粒度以及通过使用表面活性剂保持适当的流动性。在一些实施方案中,可优选在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇(诸如甘露醇、山梨醇)或氯化钠。可通过在组合物中包含延迟吸收的药剂(例如,单硬脂酸盐和明胶)来实现可注射组合物的长时间吸收。在一些实施方案中,本公开的核酸、载体和/或宿主细胞可在控释制剂中施用,例如,在包含缓释聚合物或保护产品免于快速释放的其他载体的组合物中施用,该组合物包括植入物和微囊化递送系统。

[0371] 在一些实施方案中,本公开的药物组合物是肠胃外药物组合物,包括适于静脉内、动脉内、皮下、皮内、腹膜内、肌内、关节内、脑实质内(IP)、鞘内(IT)、脑室内(ICV)和/或小脑延髓池内(ICM)施用的组合物。在一些实施方案中,本公开的药物组合物被配制用于通过ICV注射施用。在一些实施方案中,载体(例如,病毒载体诸如AAV)可在PBS中的350mM NaCl和5%D-山梨醇中配制。

[0372] 施用方法

[0373] 可将上述分子、或多核苷酸、或载体(例如,载体基因组、rAAV载体)、或系统(例如,CRISPR/Cas系统或该系统的核酸编码组分)、或细胞施用于受试者(例如,患者)或靶细胞以治疗受试者。可通过本领域已知的用于施用载体的任何方式向有需要的人受试者或动物施用载体。靶细胞的示例包括CNS细胞,优选少突胶质细胞、星形胶质细胞或其祖细胞。

[0374] 载体可作为护理标准治疗的补充和辅助手段。即,载体可与另一种药剂、化合物、药物、治疗或治疗方案同时、同期或以确定的给药间隔共同施用,该给药间隔由本领域技术人员使用常规方法确定。本文公开的用途包括除了本领域已知的疾病护理标准之外同时施用本公开的rAAV载体,以及/或者按照与本领域已知的疾病护理标准同时的给药方案施用本公开的rAAV载体。

[0375] 在一些实施方案中,联合组合物包含一种或多种免疫抑制剂。在一些实施方案中,联合组合物包含rAAV载体和一种或多种免疫抑制剂,该rAAV载体包含转基因(例如,编码本文公开的RNA分子的多核苷酸)。在一些实施方案中,方法包括向受试者施用或递送包含转基因的rAAV载体,并在施用载体之前预防性地向受试者施用免疫抑制剂,或在施用载体之后(即,在针对载体和/或由其提供的蛋白质的应答的症状明显之前或之后)向受试者施用免疫抑制剂。

[0376] 在一个实施方案中,全身施用本公开的载体(例如,rAAV载体)。全身施用的示例性方法包括但不限于静脉内(例如,门静脉)、动脉内(例如,股动脉、肝动脉)、血管内、皮下、皮内、腹膜内、经粘膜、肺内、淋巴内和肌内施用等,以及直接组织或器官注射。本领域技术人员将理解,全身施用可将核酸递送至所有组织。在一些实施方案中,直接组织或器官施用包括向直接受少突胶质细胞缺乏影响的区域(例如,脑和/或中枢神经系统)施用。在一些实施

方案中,将本公开的载体及其药物组合物施用至脑实质(即,通过脑实质内施用)、至脊椎管或蛛网膜下腔,使得其到达脑脊液(CSF)(即,通过鞘内施用)、至脑室(即,通过脑室内施用)和/或至脑的小脑延髓池(即,通过小脑延髓池内施用)。

[0377] 因此,在一些实施方案中,本公开的载体通过直接注射到脑中(例如,注射到脑实质、心室、小脑延髓池等中)和/或CSF中(例如,注射到脊椎管或蛛网膜下腔中)来施用以治疗髓磷脂障碍。本公开载体的靶细胞包括位于皮层、胼胝体、纹状体和/或小脑的皮层下白质中的细胞。在一些实施方案中,本公开的载体的靶细胞是少突胶质细胞或其祖细胞。另外的施用途径还可包括在直接可视化下局部施用载体,例如,浅皮层施用,或其他立体定位施用。

[0378] 在一些实施方案中,本公开的载体通过至少两种途径施用。例如,将载体全身施用并直接施用到脑中。如果通过至少两种途径施用,则载体的施用可以是但不必是同时或同期的。相反,通过不同途径的施用可在每次给药之间的时间间隔内分开进行。

[0379] 上述蛋白质或编码该蛋白质的多核苷酸或包含该多核苷酸的载体基因组或载体(例如,rAAV载体)可用于离体转导细胞或直接施用于受试者(例如,直接施用于患病患者的CNS)。在一些实施方案中,将转导的细胞(例如,宿主细胞)施用于受试者以治疗或预防疾病、障碍或病症(例如,用于疾病的细胞疗法)。例如,包含治疗性核酸(例如,编码蛋白质)的rAAV载体可优选以生物学有效量施用于少突胶质细胞、星形胶质细胞或其祖细胞。

[0380] 载体的剂量取决于例如施用方式、待治疗的疾病或病症、疾病的阶段和/或侵袭性、个体受试者的状况(年龄、性别、体重等)、具体的病毒载体、待表达的蛋白质的稳定性、宿主对载体的免疫应答和/或待递送的基因。通常,剂量范围为至少 1×10^8 或更多,例如 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} 、 1×10^{15} 或更多载体基因组(vg)/千克(kg)受试者体重,以实现治疗效果。

[0381] 在一些实施方案中,编码本文所述蛋白质的多核苷酸可作为DNA分子(例如,重组核酸)的组分施用,该DNA分子具有适于在靶细胞(例如,少突胶质细胞、星形胶质细胞或其祖细胞)中表达的调节元件(例如,启动子)。多核苷酸可作为质粒或病毒载体诸如rAAV载体的组分施用。rAAV载体可通过将载体直接递送至需要治疗的患者(例如,直接递送至CNS)而体内施用。rAAV载体可通过将载体体外施用于来自需要治疗的供体患者的细胞,随后将转导的细胞引回到供体中(例如,细胞疗法)而离体施用于患者。

[0382] 试剂盒

[0383] 本公开提供了一种试剂盒,该试剂盒具有包装材料和其中描述的一种或多种组分。试剂盒通常包括标签或包装插页,其包括组分的描述或其中组分的体外、体内或离体使用说明。试剂盒可含有这些组分的集合,例如上述多核苷酸、核酸、表达盒、表达载体(例如,病毒载体基因组、表达载体、rAAV载体)和宿主细胞,以及任选地第二活性剂,诸如化合物、治疗剂、药物或组合物。

[0384] 试剂盒是指含有试剂盒的一种或多种组分的物理结构。包装材料可以无菌方式保持组件,并且可由通常用于此类目的的材料(例如,纸、玻璃、塑料、箔、安瓿、小瓶、管等)制成。

[0385] 标签或插页可包括其中一种或多种组分的鉴定信息、剂量、活性成分的临床药理学(包括作用机制)、药代动力学和药效学。标签或插页可包括标识制造商、批号、制造地点

和日期、有效期的信息。标签或插页可包括试剂盒组分可用于的疾病(例如,遗传性或获得性或年龄相关的髓磷脂障碍诸如HD)的信息。标签或插页可包括临床医生或受试者在方法、用途或治疗方案或治疗性方案中使用一种或多种试剂盒组分的说明书。说明书可包括剂量、持续时间的频率和用于实施本文所述的任何方法、用途、治疗方案或预防性或治疗性方案的说明书。

[0386] 标签或插页可包括关于潜在不良副作用、并发症或反应的信息,例如对受试者或临床医生关于不适合使用特定组合物的情况的警告。

[0387] 定义

[0388] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。本文所用的术语仅为了描述具体实施方案的目的,并非旨在限制本发明。如在本发明的说明书和所附权利要求中所使用的,除非上下文另有明确说明,否则单数形式“一个”、“一种”和“该”也旨在包括复数形式。以下术语具有给定的含义:

[0389] 如本文所用,术语“约”或“大约”是指可测量值,诸如生物活性的量、多核苷酸或多肽序列的同源性或长度、剂量、时间、温度等,并且除非另有说明、除非从上下文中显而易见或除非该数量超过可能值的100%,否则意在包括在任一方向(大于或小于)25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或甚至0.1%的指定量变化。

[0390] 术语“转基因”指异源多核苷酸,其被引入细胞中,并且能够被转录成RNA,并且任选地在适当条件下被翻译和/或表达。在一些方面,它赋予其所引入的细胞所需的性质,或者以其他方式导致所需的治疗或诊断结果。在另一方面,它可被转录成介导RNA干扰的分子,诸如miRNA、siRNA或shRNA。

[0391] 如本文所用,术语“同源的”或“同源性”是指在给定区域或部分上共享至少部分同一性的两个或更多个参考实体(例如,核酸或多肽序列)。例如,当两个肽中的氨基酸位置被相同的氨基酸占据时,肽在该位置上是同源的。值得注意的是,同源肽将保留与未修饰的肽或参考肽相关的活性或功能,并且修饰的肽通常将具有与未修饰序列的氨基酸序列“基本上同源”的氨基酸序列。当提及多肽、核酸或其片段时,“基本同源性”或“基本相似性”是指当与另一多肽、核酸(或其互补链)或其片段进行适当插入或缺失的最佳比对时,在至少约70%至99%的序列中存在序列同一性。两个序列之间的同源性(同一性)程度可使用本领域已知的计算机程序或数学算法来确定。计算序列同源性(或同一性)百分比的此类算法通常考虑比较区域或面积上的序列缺口和错配。

[0392] 核酸或多核苷酸是指DNA分子(例如,cDNA或基因组DNA)、RNA分子(例如,mRNA)或DNA或RNA类似物。DNA或RNA类似物可从核苷酸类似物合成。核酸分子可以是单链或双链的,但优选是双链DNA。

[0393] 分离的或重组的核酸是指其结构与任何天然存在的核酸或天然存在的基因组核酸的任何片段的结构不同的核酸。因此该术语涵盖,例如,(a) DNA,该DNA具有天然存在的基因组DNA分子的部分的序列,但不在具有在其天然存在的生物体基因组中该分子的部分侧翼的两个序列侧翼;(b) 核酸,该核酸以使得所得分子与任何天然存在的载体或基因组DNA不同的方式掺入载体或掺入原核生物或真核生物基因组DNA中;(c) 单独分子,诸如cDNA、基因组片段、通过聚合酶链式反应(PCR)产生的片段或限制性片段;和(d) 重组核苷酸序列,

该重组核苷酸序列作为杂合基因(即,编码融合蛋白的基因)的一部分。上述核酸可用于表达本公开的蛋白质。出于此目的,人们可将该核酸与合适的调控序列可操作地连接以产生表达载体。

[0394] “重组核酸”是使用重组技术和用于将核酸序列连接在一起的程序连接在一起的核酸序列的组合。

[0395] 本文所用的术语“异源”DNA分子和“异源”核酸,各自指源自特定宿主细胞外来来源的分子,或者如果来自相同来源,则从其原始形式修饰。因此,宿主细胞中的异源基因包括特定宿主细胞内源性的但是已经通过例如使用改组或重组进行修饰的基因。当用于描述两个核酸区段时,该术语意指两个核酸区段不是来自相同的基因,或者如果形成相同的基因,则它们中的一者或两者从原始形式修饰。该术语还包括天然存在的DNA分子的非天然存在的多个拷贝。因此,该术语指与细胞外源或异源,或与细胞同源,但在宿主细胞核酸内通常不存在该元件的位置的核酸区段。表达外源DNA区段以产生外源RNA或多肽。“同源DNA分子”是与其所引入的宿主细胞天然相关的DNA分子。

[0396] “调节序列”包括启动子、增强子和其他表达控制元件(例如,聚腺苷酸化信号)。调节序列包括指导核苷酸序列组成型表达的那些调节序列,以及组织特异性调节和/或诱导型序列。表达载体的设计可取决于诸如待转化宿主细胞的选择、所需蛋白质或RNA的表达水平等因素。可将表达载体引入宿主细胞以产生感兴趣的RNA或多肽。启动子被定义为指导RNA聚合酶与DNA结合并启动RNA合成的DNA序列。强启动子是使RNA以高频率启动的启动子。

[0397] “启动子”是启动和调节多核苷酸转录的核苷酸序列。启动子可包括诱导型启动子(其中可操作地连接至启动子的多核苷酸序列的表达由分析物、辅因子、调节蛋白等诱导)、阻遏型启动子(其中可操作地连接至启动子的多核苷酸序列的表达由分析物、辅因子、调节蛋白等阻遏)和组成型启动子。术语“启动子”或“控制元件”旨在包括全长启动子区域和这些区域的功能性(例如,控制转录或翻译)片段。

[0398] “可操作地连接”是指元件的布置,其中如此描述的组件被配置成执行它们的通常功能。因此,当存在适当的酶时,与核酸序列可操作地连接的给定启动子能够影响该序列的表达。启动子不必与序列相邻,只要它起到指导其表达的作用即可。因此,例如,在启动子序列和核酸序列之间可存在间插的未翻译但转录的序列,并且启动子序列仍然可被认为是“可操作地连接”到编码序列。因此,术语“可操作地连接”意在涵盖启动子元件和感兴趣的DNA序列的任何间隔或方向,其允许在转录复合物识别启动子元件后启动感兴趣的DNA序列的转录。

[0399] 如本文所用,术语“遗传构建体”或“核酸构建体”是指由使用重组DNA技术产生的非天然存在的核酸分子(例如,重组核酸)。遗传或核酸构建体是单链或双链的核酸分子,其已经被修饰以含有核酸序列的区段,这些区段以自然界中不存在的方式组合和排列。核酸构建体可以是“盒”或“载体”(例如,质粒、rAAV载体基因组、表达载体等),即,被设计用于将外源产生的DNA递送到宿主细胞中的核酸分子。

[0400] 本文所用的“表达盒”意指能够指导特定核苷酸序列在适当宿主细胞中表达的核酸序列,该核酸序列可包括可操作地连接到感兴趣的核苷酸序列的启动子,该感兴趣的核苷酸序列可以可操作地连接到终止信号。它还可包括正确翻译核苷酸序列所需的序列。编码区通常编码感兴趣的RNA或蛋白质。包括感兴趣的核苷酸序列的表达盒可以是嵌合的。表

达盒还可以是天然存在的但以用于异源表达的重组形式获得的表达盒。表达盒中核苷酸序列的表达可在组成型启动子或可调节启动子的控制下,该启动子仅在宿主细胞暴露于一些特定刺激时才启动转录。在多细胞生物体的情况下,启动子也可以是特定组织或器官或发育阶段特异性的。

[0401] 载体是指能够转运与其连接的另一核酸的核酸分子。载体能够或不能够自主复制或整合到宿主DNA中。示例包括质粒、病毒(例如,rAAV)、粘粒或其他可通过插入或掺入核酸(例如,重组核酸)来操作的载体。载体可用于多种目的,包括例如遗传操作(例如,克隆载体),以将核酸引入/转移到细胞中,从而在细胞中转录或翻译插入的核酸。在一些实施方案中,载体核酸序列至少含有用于在细胞中增殖的复制起点。在一些实施方案中,载体核酸包括异源核酸序列、表达控制元件(例如,启动子、增强子)、选择性标记物(例如,抗生素抗性)、聚腺苷(polyA)序列和/或ITR。在一些实施方案中,当递送至宿主细胞时,该核酸序列增殖。在一些实施方案中,当在体外或体内递送至宿主细胞时,该细胞表达由异源核酸序列编码的多肽。在一些实施方案中,当递送至宿主细胞时,核酸序列或核酸序列的一部分被包装到衣壳中。宿主细胞可以是分离的细胞或宿主生物体内的细胞。除了编码RNA、多肽或蛋白质的核酸序列(例如,转基因)之外,在同一载体中(即,与基因顺式)可存在另外的序列(例如,调节序列)并位于基因的侧翼。在一些实施方案中,调节序列可存在于反式作用以调节基因表达的单独(例如,第二)载体上。质粒载体在本文中可称为“表达载体”。

[0402] 如本文所用,术语“载体基因组”指包装或衣壳化以形成rAAV载体的重组核酸序列。通常,载体基因组包括异源多核苷酸序列,例如转基因、调节元件、最初不存在于衣壳中的ITR。在重组质粒用于构建或制造重组载体(例如,rAAV载体)的情况下,载体基因组不包括整个质粒,而仅包括旨在通过病毒载体递送的序列。重组质粒的这种非载体基因组部分通常称为“质粒主链”,这对于克隆很重要。质粒的选择和扩增,是重组病毒载体生产增殖所需的过程,但其本身不被包装或衣壳化到rAAV载体中。

[0403] 如本文所用,术语“病毒载体”通常指起核酸递送载体作用的病毒颗粒,并且该病毒颗粒包含包装在病毒颗粒(即,衣壳)内的载体基因组(例如,包含转基因而非编码AAV rep和cap的核酸),并且包括例如慢病毒和细小病毒,包括AAV血清型和变体(例如,rAAV载体)。重组病毒载体不包含含有rep和/或cap基因的载体基因组。

[0404] 如本文所用,术语“过表达”或“过表达的”在指宿主细胞中产生核酸或蛋白质时,是指核酸或蛋白质的产量大于其在天然存在环境中的产量。该术语旨在涵盖内源以及外源或异源核酸和蛋白质的过表达。因此,这些术语等旨在涵盖将细胞中核酸或蛋白质的表达提高到大于细胞天然所包含的水平。在某些实施方案中,与细胞天然所包含的水平或量相比,细胞中核酸或蛋白质的表达水平或量增加至少5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%或1000%。

[0405] 在突变或患病细胞的上下文中,术语“过表达”和“过表达的”等旨在涵盖将核酸或蛋白质的表达增加至大于突变细胞、患病细胞、野生型细胞或非患病细胞所包含的水平。在某些实施方案中,与突变细胞、患病细胞、野生型细胞或非患病细胞所包含的水平或量相比,突变细胞或患病细胞中核酸或蛋白质的表达水平或量增加至少5%、10%、20%、25%、

30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%或1000%。

[0406] “反义”指无论长度如何,与核酸序列的编码链或mRNA互补的核酸序列。反义RNA可被引入单个细胞、组织或类器官中。反义核酸可含有修饰的主链,例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或本领域已知的其他修饰的主链,或者可含有非天然的核苷间键。

[0407] 如本文所述,“互补核酸序列”是能够与由互补核苷酸碱基对组成的另一核酸序列杂交的核酸序列。“杂交”是指在合适的严格条件下,在互补核苷酸碱基之间配对形成双链分子(例如,腺嘌呤(A)与胸腺嘧啶(T)形成碱基对,DNA中鸟嘌呤(G)与胞嘧啶(C)也形成碱基对)。(参见例如,Wahl,G.M.和S.L.Berger(1987年)Methods Enzymol.,第152卷:第399页;Kimmel,A.R.(1987年)Methods Enzymol.,第152卷:第507页)。

[0408] “抑制因子”或“抑制剂”是指分别引起靶基因或蛋白的表达或活性降低的试剂。

[0409] 术语“抑制”、“下调”或“降低”是指基因表达或编码一种或多种蛋白质或蛋白质亚基的RNA分子或等同RNA分子水平或一种或多种蛋白质或蛋白质亚基活性的降低,低于在不存在抑制剂、抑制因子或阻遏物诸如本文所述的抑制性核酸分子(例如siRNA)时观察到的水平以下。下调可能与转录后沉默有关,诸如RNAi介导的切割或DNA甲基化模式或DNA染色质结构的改变。

[0410] 如本文所用,“抑制性核酸”是双链RNA、RNA干扰、miRNA、siRNA、shRNA或反义RNA,或其部分,或其模拟物,当施用于哺乳动物细胞时,其导致靶基因表达的降低。通常,核酸抑制剂包含靶核酸分子的至少一部分或其直系同源物,或包含靶核酸分子的互补链的至少一部分。通常,靶基因的表达降低10%、25%、50%、75%或甚至90%-100%。

[0411] 如本文所用,术语“siRNA”是指转录后干扰一种或多种特定基因表达的双链RNA分子。在一些实施方案中,siRNA利用RNA干扰途径来干扰或抑制基因表达。类似的干扰或抑制作用可用短发夹RNA(shRNA)、微RNA(mRNA)和/或核酸(诸如siRNA、shRNA或miRNA)中的一者或多者实现,该RNA包含一个或多个经修饰的核酸残基—例如肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA)、非锁核酸(UNA)或三唑连接的DNA。最佳地,siRNA长度为18、19、20、21、22、23或24个核苷酸,并且在其3'末端具有2-碱基突出端。这些dsRNA可被引入单个细胞或培养系统中。此类siRNA用于下调mRNA水平或启动子活性。

[0412] 如本文所用,术语“治疗”是指部分或完全减轻、改善、缓解、抑制、延迟特定疾病、障碍和/或病症的一种或多种症状、特征和/或原因的发作、降低其严重性和/或降低其发生率的疗法的施用。

[0413] 如本文所用,术语“改善”是指受试者的疾病、障碍或病症或其症状或潜在的细胞应答的可检测的或可测量的改善。可检测的或可测量的改善包括主观或客观的减少、降低、抑制、压制、限制或控制疾病、障碍或病症的发生、频率、严重性、进展或持续时间,由疾病、障碍或病症引起的并发症或与疾病、障碍或病症相关的并发症,改善疾病、障碍或病症的症状或逆转疾病、障碍或病症。

[0414] 如本文所用,术语“与……相关”是指如果一者的存在、水平和/或形式与另一者的存在、水平和/或形式相关的话,则彼此相关。例如,如果特定实体(例如,多肽、遗传特征、代谢物、微生物等)的存在、水平和/或形式与疾病、障碍或病症(例如,在相关群体中)的发生

率和/或易感性相关,则认为该特定实体与特定疾病、障碍或病症相关。

[0415] 如本文所用,术语“预防”是指延迟特定疾病、障碍或病症(例如,髓磷脂疾病)的一种或多种病征或症状的发作,和/或降低其频率和/或严重性。在一些实施方案中,预防是基于群体评估的,使得如果在对特定疾病、障碍或病症易感的群体中观察到该疾病、障碍或病症的一种或多种病征或症状的发展、频率和/或强度的统计学显著降低,则认为药剂“预防”该疾病、障碍或病症。当疾病、障碍或病症的发作已延迟预定的一段时间时,可认为预防已完成。

[0416] 如本文所用,术语“治疗有效量”是指产生其施用的所需治疗效果的量。在一些实施方案中,该术语是指当根据治疗性给药方案施用于患有或易患疾病、障碍或病症的群体时足以治疗该疾病、障碍或病症的量。在一些实施方案中,治疗有效量是降低该疾病、障碍和/或病症的一种或多种症状的发生率和/或严重性,和/或延迟该疾病、障碍和/或病症的一种或多种症状的发作的量。本领域普通技术人员将理解,术语“治疗有效量”实际上并不需要在特定个体中实现成功的治疗。相反,治疗有效量可以是当向需要这种治疗的患者施用时在大量受试者中提供特定所需药理学反应的量。

[0417] 细胞的“群体”是指大于1的任何数量的细胞,但为至少 1×10^3 个细胞、至少 1×10^4 个细胞、至少 1×10^5 个细胞、至少 1×10^6 个细胞、至少 1×10^7 个细胞、至少 1×10^8 个细胞、至少 1×10^9 个细胞或至少 1×10^{10} 个细胞。

[0418] 如本文所用,术语“干细胞”是指具有自我替代和分化为更特化细胞的能力的细胞。它们的自我更新能力通常持续生物体的整个生命周期。多能干细胞可产生身体的所有不同类型的细胞。多能干细胞可产生有限的细胞类型亚群。例如,造血干细胞可产生在血液中发现的各种类型的细胞,但不产生其他类型的细胞。多能干细胞也可称为成体干细胞、组织干细胞、谱系特异性干细胞和成人干细胞。多能干细胞的非干细胞子代是祖细胞(也称为限制性祖细胞)。祖细胞产生完全分化的细胞,但细胞类型比干细胞更受限制。祖细胞还具有相对有限的自我更新能力;随着它们分裂和分化,它们最终被耗尽并被源自其上游多能干细胞的新祖细胞所替代。

[0419] “诱导多能干细胞”,通常缩写为iPS细胞或iPSC,是指通过引入某些称为重编程因子的因子,从非多能细胞人工制备的多能干细胞的类型,该非多能细胞通常是成人体细胞,或终末分化细胞诸如成纤维细胞、造血细胞、肌细胞、神经元、表皮细胞等。

[0420] “多能性”是指具有分化成构成一种或多种组织或器官,或特别是以下三个胚层中的任一个胚层的所有细胞的潜力的干细胞:内胚层(内部胃壁、胃肠道、肺)、中胚层(肌肉、骨骼、血液、泌尿生殖器)或外胚层(表皮组织和神经系统)。本文所用的“多能干细胞”是指可分化成源自三个胚层中的任一个胚层的细胞,例如全能细胞或诱导多能细胞的直接后代。

[0421] 如本文所用,“治疗性细胞”是指改善患者的病症、疾病和/或损伤的细胞群。治疗性细胞可以是自体的(即,源自患者)、同种异体的(即,源自相同物种的与患者不同的个体)或异种的(即,源自与患者不同的物种)。治疗性细胞可以是同质的(即,由单一细胞类型组成)或异质的(即,由多种细胞类型组成)。术语“治疗性细胞”包括治疗活性细胞以及能够分化成治疗活性细胞的祖细胞。

[0422] 术语“自体的”是指源自同一受试者或个体并随后重新引入该受试者或个体的任

何材料。例如,本文所述的自体细胞疗法包括从供体(例如,患者)收集神经胶质细胞或其祖细胞,然后将其工程化以表达例如转基因,然后施用回同一供体(例如,患者)。

[0423] 术语“异源的”是指源自不同受试者或个体的任何材料(例如,细胞或组织支架)。如本文所用,“异源的”或“非内源性的”或“外源性的”也指宿主细胞或宿主受试者非天然的任何材料(例如,基因、蛋白质、化合物、分子、细胞或组织或组织成分)或活性,或者是宿主或宿主细胞天然的任何基因、蛋白质、化合物、分子、细胞、组织或组织成分或活性,但是已经被改变或突变,使得天然和突变形式之间的结构、活性或两者不同。

[0424] 术语“同种异体的”是指源自一个个体的任何材料(例如,细胞或组织),然后将其引入同一物种的另一个体,例如,同种异体细胞移植。例如,细胞可获自第一受试者,根据本文所述的方法离体修饰,然后施用至第二受试者以治疗疾病。在这样的实施方案中,施用于受试者的细胞是同种异体和异源细胞。

[0425] 术语“异种的”是指源自不同物种的个体的任何材料(例如,细胞或组织)。

[0426] 术语“同基因的”是指特征在于基本上相同的基因的任何材料(例如,细胞或组织)。

[0427] 如本文所用,术语“受试者”是指生物体,例如哺乳动物(例如,人、非人哺乳动物、非人灵长类动物、灵长类动物、实验动物、小鼠、大鼠、仓鼠、沙鼠、猫、狗)。在一些实施方案中,受试者是非人类疾病模型。在一些实施方案中,人类受试者是成人、青少年或小儿受试者。在一些实施方案中,受试者患有疾病、障碍或病症,例如,可如本文提供的治疗的疾病、障碍或病症。在一些实施方案中,受试者患有与髓磷脂缺乏或功能障碍相关的疾病、障碍或病症。在一些实施方案中,受试者易受疾病、障碍或病症的影响。在一些实施方案中,易感受试者易患疾病、障碍或病症和/或表现出发展疾病、障碍或病症的增加了的风险(与在参考受试者或群体中观察到的平均风险相比)。在一些实施方案中,受试者表现出疾病、障碍或病症的一种或多种症状。在一些实施方案中,受试者没有表现出疾病、障碍或病症的特定症状(例如,疾病的临床表现)或特征。在一些实施方案中,受试者没有表现出疾病、障碍或病症的任何症状或特征。在一些实施方案中,受试者是人类患者。在一些实施方案中,受试者是正在接受和/或已经接受诊断和/或治疗的个体。

[0428] 如本文所用,术语“治疗有效量”是指产生其施用的所需治疗效果的量。在一些实施方案中,该术语是指当根据治疗性给药方案施用于患有或易患疾病、障碍或病症的群体时足以治疗该疾病、障碍或病症的量。在一些实施方案中,治疗有效量是降低该疾病、障碍和/或病症的一种或多种症状的发生率和/或严重性,和/或延迟该疾病、障碍和/或病症的一种或多种症状的发作的量。本领域普通技术人员将理解,术语“治疗有效量”实际上并不需要在特定个体中实现成功的治疗。相反,治疗有效量可以是当向需要这种治疗的患者施用时在大量受试者中提供特定所需药理学反应的量。

[0429] 以下实施例旨在举例说明本公开的实施方案的实践,但决不旨在限制其范围。实施例A部分涉及神经胶质细胞的竞争性替代。实施例B部分涉及神经胶质祖细胞的再生。

[0430] 实施例

[0431] 实施例A部分:成人脑中神经胶质祖细胞的竞争性替代

[0432] 材料和方法

[0433] 人胚胎干细胞系和培养条件

[0434] 同胞人胚胎干细胞 (hESC) 系GENEA019 (WT:18;15CAG) 和GENEA020 (HD:48;17CAG)。hESC在无饲养条件下在 $0.55\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 人重组层粘连蛋白521 (BIOLAMINA, 目录号LN521) 包被的细胞培养瓶中用mTeSR1培养基 (STEMCELL TECHNOLOGIES, 目录号85850) 定期培养。每天进行培养基更换。hESC在新鲜包被的烧瓶上以80%汇合进行常规传代。使用ReLeSR (STEMCELL TECHNOLOGIES, 目录号05872) 进行传代。所有hESC和分化培养物在 37°C 下维持在5%CO₂培养箱中,并定期检查污染和无支原体状态。

[0435] 荧光报告基因hESC的生成

[0436] 用于WT和HD细胞的普遍存在的和独特的荧光标记(图1),使用CRISPR-Cas9介导的策略的修饰形式将驱动mCherry或EGFP表达的报告基因构建体分别插入WT GENE019和HD GENE020 hESC的AAVS1安全港基因座中,该策略先前描述于Oceguera-Yanez, F. 等人, Methods, 第101卷, 第43-55页, 该文献据此全文以引用方式并入)。为了制备用于通过电穿孔递送质粒的hESC,在用Accutase (StemCell Technologies, 目录号07920) 解离后,以单细胞悬浮液形式收获hESC,在培养基中洗涤,并用自动细胞计数器NucleoCounter NC-200 (ChemoMetec) 计数。每次电穿孔后,将总共 1.5×10^6 个细胞与 $5\mu\text{g}$ 靶向CRISPR-Cas9质粒 (pXAT2) 的AAVS1和 $5\mu\text{g}$ 报告基因供体质粒 (pAAVS1-P-CAG-mCh或pAAVS1-P-CAG-GFP) 混合。pXAT2 (Addgene质粒编号80494)、pAAVS1-P-CAG-mCh (Addgene质粒编号80491) 和pAAVS1-P-CAG-GFP (Addgene质粒编号80492) 是Knut Woltjen赠送的。根据制造商的指导,使用Amaxa 4D-Nucleofector (Lonza) 和P3原代细胞试剂盒 (Lonza, 目录号V4XP-3024) 进行电穿孔。核转染后,将电穿孔的hESC悬浮液转移至10cm细胞培养皿中,并在第一个24小时内用补充有 $10\mu\text{M}$ Y-27632 (Tocris, 目录号1254) 的mTeSR1培养。使电穿孔的hESC生长48-72小时,然后用 $0.5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 嘌呤霉素 (ThermoFisher, 目录号A1113803) 处理。将电穿孔的hESC培养物保持在嘌呤霉素下,直到单个集落大到足以人工挑取。通过荧光显微镜评估集落,并基于荧光蛋白表达的均匀性将其转移至96孔板。在其扩增后,将每个克隆分开用于进一步扩增并用于基因分型。为了基因分型,使用prepGEM组织DNA提取试剂盒 (Zygem) 提取DNA。通过PCR使用下列引物检测AAVS1基因座中正确靶向的转基因整合:dna803:TCGACTTCCCCTCTTCCGATG (SEQ ID NO;1) 和dna804:CTCAGGTTCTGGGAGAGGGTAG (SEQ ID NO;2);而使用额外的引物通过WT等位基因的存在与否来确定整合的接合性:(dna803和dna183:GAGCCTAGGGCCGGATTCTC (SEQ ID NO;3))。具有正确靶向插入的hESC克隆用Pro-Freeze CDM培养基 (Lonza, 目录号BEBP12-769E) 冷冻保存,并在实验应用前扩增用于核型分析和阵列比较基因组杂交 (aCGH) 表征。

[0437] 核型分析和aCGH

[0438] 通过G显带 (Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik, Universitätsklinikum Tübingen) 对生成的报告基因hESC系的核型图进行中期扩散分析。本研究中使用的所有hESC系都具有正常的核型。另外,通过aCGH (Cell Line Genetics) 评估获得性拷贝数变异 (CNV) 和杂合性丢失区域 (LOH)。鉴定了在正常范围之内和之外的多种CNV和LOH (图2),但没有一种预期影响克隆之间竞争性相互作用的结果。

[0439] 从报告基因WT和HD hESC衍生hGPC

[0440] 使用申请人的完善方案 (Wang等人, Cell Stem Cell, 第12卷, 第252-264页, 该文献据此全文以引用方式并入), 对类胚体 (EB) 生成步骤进行了微小的修改, 来从报告基因WT

和HD hESC衍生人GPC。EB生成步骤的细节包括在补充信息中。收集150DIV和200DIV之间的细胞用于异种移植,此时从WT-mCherry和HD-EGFP hESC衍生的培养物富含PDGFR α^+ /CD44 $^+$ 双潜力神经胶质祖细胞。通过流式细胞术和免疫细胞化学对生成的培养物的详细表征可见于图3以及图18A和图18B中。

[0441] 用于异种移植的细胞制备物

[0442] 为了制备用于异种移植的细胞,将神经胶质培养物收集在无Ca $^{2+}$ /Mg $^{2+}$ 的Hanks平衡盐溶液(HBSS $^{(-/-)}$; THERMOFISHER, 目录号14170112)中,通过轻轻移液机械解离成小簇,并用血细胞计数器计数。然后将细胞悬浮液旋转并以10 5 个细胞/ μ L的最终浓度重悬于冷HBSS $^{(-/-)}$ 中,并保持在冰上直至移植。

[0443] 宿主和异种移植范例

[0444] 人神经胶质纹状体再增殖的体内建模:为了生成含有表达mHtt的人神经胶质细胞的人-小鼠嵌合体(HD嵌合体),将新生的免疫功能受损的Rag1 $^{(-/-)}$ 幼崽(Mombaerts, P. 等人, Cell, 第68卷, 第869-877页。10.1016/0092-8674(92)90030-g, 该文献据此全文以引用方式并入)冷冻麻醉,固定在定制的烘烤粘土台上,并在出生后48小时内将100,000个HD-EGFP神经胶质细胞(每个半球50,000个)双侧注射到假定的纹状体中。用10 μ L注射器(HAMILTON, 目录号7653-01)用拉制的玻璃移液管以1.2mm至1.4mm的深度递送细胞。然后将幼崽送回其母亲身边,直到断奶。为了模拟人神经胶质纹状体再增殖,36周龄的HD嵌合体用氯胺酮/甲苯噻嗪麻醉并固定在立体定位框架中。使用10 μ L注射器和金属针将200,000个WT神经胶质细胞双侧递送到人源化纹状体(AP: +0.8mm; ML: \pm 1.8mm; DV: -2.5mm至-2.8mm)中。为了使损伤最小化,使用受控微泵系统(World Precision Instruments)以175nL/min的受控速率输注细胞。通过将针留在原位另外5分钟来防止回流。将实验动物与未接受WT神经胶质细胞的HD嵌合同窝小鼠和在该精确程序后36周龄时接受WT神经胶质细胞的非嵌合Rag1 $^{(-/-)}$ 小鼠进行比较。

[0445] 新生儿纹状体共移植

[0446] 为了模拟mHtt表达对人神经胶质细胞之间竞争结果的细胞内在影响,按照上述相同的新生儿纹状体异种移植方案注射新生Rag1 $^{(-/-)}$ 小鼠,但是改为递送由衍生自WT-mCherry和HD-EGFP hESC的神经胶质细胞的1:1混合物组成的总共200,000个人神经胶质细胞(每个半球100,000个)。对照同窝小鼠接受由WT-mCherry或HD-EGFP人神经胶质细胞组成的注射。

[0447] 所有异种移植物均使用无菌技术。所有小鼠都圈养在无病原体的环境中,可随意获取食物和水,并且所有程序均按照罗切斯特大学动物资源委员会批准的方案进行。

[0448] 组织处理

[0449] 实验动物用HBSS $^{(-/-)}$ 灌注,然后用4%PFA灌注。取出脑,在4%PFA中固定2小时后,用PBS冲洗3次。然后将它们在30%蔗糖溶液(SIGMA-ALDRICH, 目录号S9378)中孵育直至平衡,此时将它们以矢状取向包埋在OCT中(Sakura, 目录号4583),在-60 $^{\circ}$ C至-70 $^{\circ}$ C的温度下冷冻在2-甲基丁烷(Fisher Scientific, 目录号11914421)中,并转移至-80 $^{\circ}$ C的冰箱中。然后将所得块在CM1950低温恒温器(Leica)上切成20 μ m切片,连续收集在粘附载玻片上并在-20 $^{\circ}$ C下储存直至进一步使用。

[0450] 免疫染色

[0451] 人细胞的表型分析通过对相应的荧光报告基因和特定表型标记物进行免疫染色来完成:Olig2 (少突胶质细胞转录因子, 标记GPC) 和GFAP (神经胶质纤维酸性蛋白, 标记星形胶质细胞)。荧光报告基因用作人细胞的标记物, 因为它们的表达在动物的一生中普遍存在 (图4)。在接受WT-mCherry和WT-未标记的人神经胶质细胞的1:1混合物的动物中, 通过人核抗原的表达和荧光报告基因表达的缺乏来鉴定WT-未标记的人神经胶质细胞。为了免疫标记, 切片用PBS再水合, 然后用透化/封闭缓冲液 (PBS+0.1% Triton-X (SIGMA-ALDRICH, 目录号T8787)+10% 正常山羊血清 (THERMOFISHER, 目录号16210072)) 透化和封闭2小时。然后将切片与靶向表型标记物的一抗在4°C下孵育过夜。第二天, 用PBS从切片彻底冲洗一抗, 并将二抗应用于切片1小时。在用PBS彻底冲洗掉二抗后, 将第二轮一抗 (这次是针对荧光报告基因) 应用于切片, 并在4°C下过夜。第二天用PBS冲洗切片, 并将切片与二抗孵育1小时。再次用PBS彻底洗涤载玻片, 并用VECTASHIELDVIBRANCE (Vector Labs, 目录号H-1800) 封片。

[0452] 异种移植绘制和3D重建

[0453] 为了绘制鼠纹状体中人细胞的分布, 使用配备有DS-Fi1相机的NIKON NI-E ECLIPSE显微镜以10x放大率捕获跨越整个纹状体的15个等距间隔的160 μ m间距矢状切片的全脑蒙太奇, 并在NIS-Elements成像软件 (NIKON) 中进行处理。勾出每个切片内的纹状体轮廓, 并使用Stereo Investigator软件 (MICROBRIGHTFIELD Bioscience) 在有轮廓的纹状体内识别和绘制免疫标记的人细胞。在适用的情况下, WT神经胶质细胞的注射部位被绘制成参考点, 用于进一步对人细胞分布进行体积定量。然后使用侧脑室作为参照将绘制的切片进行比对, 以产生人源化鼠纹状体的3D重建模型。3D重建后, 导出每种人体细胞标记物、注射部位和纹状体轮廓的笛卡尔坐标以供进一步分析。

[0454] 为了评估纹状体中每个人细胞群中增殖细胞的分布和比例, 当进行3D重建时, 在15个切片的每三个切片中绘制表达Ki67的免疫标记的人细胞。

[0455] 体积定量

[0456] 为了定量HD嵌合体中HD神经胶质细胞的空间分布, 通过将切片厚度 (20 μ m) 乘以切片面积计算每个定量的纹状体切片的体积。然后通过将每个切片中标记的细胞数除以它们相应的体积来计算每个切片的细胞密度。

[0457] 为了量化竞争性WT和HD神经胶质细胞的时空动力学, 开发了一种程序来计算3D重建数据集中作为到WT神经胶质细胞递送部位的的距离的函数的每个细胞群的体积分布 (图4)。为此, 通过将纹状体轮廓表示为两个相同的多边形, 以切片厚度 (20 μ m) 相互隔开, 为每个量化切片指定了上边界和下边界。 z_u, z_l 然后, 由于每个单独的切片中的每个细胞标记物的深度方向位置是未知的, 因此每个切片内的标记细胞被表示为在整个切片中具有恒定概率的均匀点概率函数。即, 从 z_l 至 z_u 的切片中的每个细胞标记物具有如下概率函数:

$$[0458] \quad P(z) = \begin{cases} \frac{1}{z_u - z_l}, & z_l \leq z < z_u \\ 0, & \text{其他情况} \end{cases} .$$

[0459] 然后通过从WT神经胶质细胞递送部位以125 μ m的径向增量辐射的同心球壳内标记细胞的数量计数来测量每个细胞群的空间分布 (对于对照HD嵌合体, 使用WT神经胶质细胞递送部位坐标的平均值)。如果标记细胞的相应代表性线段完全在球壳内部、完全在球壳外部或在上边界或下边界处与球壳相交, 则对标记细胞进行计数。然后将球壳内的标

记细胞数除以球壳内的组合切片体积来计算每个细胞群的密度 $\rho_{a,b}$ —其中a,b表示球壳的最小和最大半径:

$$[0460] \quad P_{a,b} N_{a,b} / V_{a,b}$$

[0461] 其中 $N_{a,b}$ 是每个点在每个截面上的积分点概率函数的总和,并且 $V_{a,b}$ 是球壳内的组合切片体积。随后的分析限于2mm的球面半径。代码在Python3.8和包Shapely 1.7中实现,用于表示多边形并计算多边形的圆交点。

[0462] 体视学估计和表型分析

[0463] 使用光学分馏器方法 (West, M. J., (1999年) Trends in Neurosciences, 第22卷, 第51-61页, 该文献据此全文以引用方式并入) 在跨越整个纹状体的5个等距间隔的480 μ m间距切片中对人细胞总量及其相应的表型进行立体估计。首先,使用配备有DS-Fi1相机的Nikon Ni-E Eclipse显微镜以20x放大率捕获整个纹状体z-堆叠的蒙太奇(montage),并在NIS-Elements成像软件(Nikon)中进行处理。使用0.9 μ m步长捕获每个z-堆叠图块。然后将蒙太奇加载到StereoInvestigator上,并确定纹状体的轮廓。软件以系统随机方式将一组200 μ m \times 200 μ m的计数帧放置在覆盖每个切片的有轮廓的纹状体的400 μ m \times 400 μ m网格内。在整个切片高度(没有保护区)中,并根据细胞首次聚焦的光学切片中的免疫标记对细胞进行计数。

[0464] 统计分析和再现性

[0465] 本研究排除了表现出与实验过程中的技术问题相关的伪影的样本,诸如目标错误的注射、明显的手术损伤或注射到胶质增生病灶。使用GraphPad Prism 9进行统计学测试。对于两组以上之间的比较,应用单向方差分析(Tukey多重比较检验)。为了在具有两种以上因子的两组之间进行比较,应用双向方差分析(**Šidák**多重比较检验)。当在两个匹配组之间进行比较时,对正常分布的数据集应用配对双尾t检验,而对未匹配组应用未配对双尾t检验。显著性定义为 $P < 0.05$ 。尽可能在图中注明相应的P值,否则**** $P < 0.0001$,*** $P < 0.001$,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$ 。图例显示了重复次数,n表示独立实验的次数。数据表示为平均值 \pm 平均值的标准误差(s.e.m.)。

[0466] 细胞凋亡测定

[0467] 通过末端脱氧核苷酸转移酶-dUTP切口末端标记(TUNEL)以及免疫染色它们相应的荧光报告基因来完成人细胞群内凋亡细胞的鉴定。使用Click-iT TUNEL Alexa Fluor 647成像测定(Invitrogen,目录号C10247)按照制造商的说明书进行TUNEL,不同的是将样品在蛋白酶K溶液中于室温孵育20分钟。为了证实固定冷冻脑冷冻切片中有效的TUNEL染色,按照制造商的说明书用DNase I处理阳性对照切片。在TUNEL之后,根据先前描述的免疫染色方案,对切片进行荧光报告基因的免疫标记。

[0468] TUNEL⁺人细胞的定量

[0469] 为了评估凋亡细胞在每个人细胞池内的分布和比例,使用配备有DS-Fi3相机的Nikon Ni-E Eclipse显微镜,以10倍放大率捕获跨越整个纹状体的5个等距间隔的480 μ m间距切片整个纹状体蒙太奇,并将在NIS-Elements成像软件中拼接。在每个切片中画出纹状体的轮廓,使用Stereo Investigator基于免疫标记的人细胞在有轮廓的纹状体中的TUNEL标记来识别和绘制免疫标记的人细胞。

[0470] 显示整个人源化纹状体的代表性图像使用NIS-Elements成像软件中的“裁剪”功

能并调整“最小/最大”水平,从先前获取的全脑蒙太奇产生。然后,使用配备有488nm、561nm和640nm激光线的Nikon Ti-E C2+共聚焦显微镜和标准PMT检测器,以大视野z-堆叠蒙太奇捕获人神经胶质竞争界面的代表性图像。用油浸物镜以40x或60x放大率捕获图像,并在NIS-Elements中拼接。然后生成最大强度投影,并在NIS-Elements中调整“最小/最大”水平。类似地,使用Nikon Ti-E C2+共焦和相同的激光线,将人细胞表型的代表性图像捕获、成像并处理为z-堆叠。

[0471] 从嵌合小鼠荧光激活细胞分选 (FACS) 人神经胶质

[0472] 为了分离用于scRNA-Seq的人细胞,用HBSS心内灌注实验嵌合体,并如前所述 (Mariani, J.N., Zou, L. & Goldman, S.A. 于Oligodendrocytes. *Methods in Molecular Biology*, 第1936卷 (David Lyons和Linde Kegel编辑) 第311-331页 (Humana Press, 2019年)) 且如图24A所示解剖其纹状体并解离组织。使用BD FACSAria Fusion (BD Biosciences), 基于单细胞悬浮液的mCherry、EGFP表达或其缺乏, 分离单细胞悬浮液。为了排除死细胞, 以1 μ g/ml加入4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI; ThermoFisher目录号D1306)。门控策略示于图24B中所示的那些多肽。

[0473] 单细胞RNA测序分析

[0474] 主要数据采集在10X Genomics chromium控制器 (v3.1 chemistry) 上捕获分离的细胞以用于scRNA-Seq。根据制造商的说明书生成文库, 并在罗切斯特大学基因组学中心的Illumina NovaSeq 6000上测序。使用定制的双通策略将scRNA-Seq文库与STARsolo进行比对。首先, 使用Ensembl 102人和小鼠注释, 并添加mCherry和EGFP, 产生带注释的嵌合GRCh38和GRCm38参照。然后使用以下参数运行STARsolo: `twopassMode=basic`, `limitSjdbInsertNsj=3000000`, 以及`soloUMIfiltering=MultiGeneUMI`。然后将BAM文件按物种进行拆分, 并将跨物种多映射读段分配给人或小鼠BAM。FASTQ文件由小鼠或人BAM文件重新生成, 并与单一物种参照重新比对。

[0475] 差异表达分析使用Seurat将人数据导入R中。过滤细胞 (独特基因>250, 且线粒体基因百分比<15)。然后进一步过滤细胞以表达mCherry或EGFP。使用scvi将计数导入Python进行整合, 其中使用4,000个最可变的特征。除了独特基因的数目和线粒体基因表达百分比之外, 该模型还使用小鼠样品和细胞系进行整合训练。然后, 通过UMAP和Louvain社区检测, 将潜在的表示用于降维。基于标记物表达, 将较小的细胞群分为六种主要的神经胶质类型。然后将数据重新输入到Seurat中, 并使用MAST进行差异表达。如果在所有GPC的至少3%中检测到基因的表达, 则认为它们是差异表达。差异表达的模型设计利用了细胞和实验组中独特基因的数量 (细胞系/细胞年龄, 以及细胞是否存在相反克隆)。差异表达的显著性是 $P < 0.05$, 具有至少0.15的log2倍数变化。利用Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN) 对每个差异表达的基因列表进行功能分析。

[0476] 细胞周期分析使用Seurat的CellCycleScoring函数计算每个实验组的G2M得分。然后使用带有Benjamini-Hochberg多重比较调整的Dunn检验计算每个模型实验组之间的统计比较。

[0477] 转录因子相关调节子的鉴定首先过滤基因以仅保留在至少1%的细胞中表达至少3个计数的那些基因。所有9,579个细胞用于该分析。然后将过滤的原始矩阵用作pySCENIC标准管线的输入, 以鉴定数据集中的每个转录因子及其推定的下游靶标。这些基因集称为

调节子,并被分配“曲线下面积”(AUC)值来代表它们在每个细胞中的活性,值越高表明此类调节子的富集程度越强。然后使用所得的AUC矩阵来寻找重要的转录因子。在同种移植物和同种异体移植物模型中的GPC亚群中,1分配给来自年轻WT样品的细胞,0分配给来自年老WT或年老HD样品的细胞。然后使用glmnet以所有TF的AUC作为预测因子对预定的0/1结果进行Lasso逻辑回归。逻辑回归的 λ 由cv.glmnet自动定义。

[0478] 发明人分离出具有正系数的TF,并根据每组的平均活性进一步过滤,使得年轻WT中的TF平均活性应高于年老WT中的TF平均活性。最后一步是对迄今鉴定的调节子进行基因集富集分析(GSEA),以确定与老化HD和WT细胞相比,年轻WT细胞中差异上调的基因是否富集(调整后的 $P < 10^{-2}$, NES > 0)。

[0479] 鉴定具有竞争优势的共表达基因集发明人过滤排除了所有细胞中计数少于1的基因,并使用所得矩阵通过DCA对数据进行降噪。对GPC子集的去噪数据进行加权基因共表达网络分析(WGCNA)。使用软阈值幂9计算有符号的网络邻接关系。在基于拓扑重叠矩阵的相异性和动态树切割对基因进行层次聚类后检测模块。然后,发明人使用GeneOverlap(调整后的 $P < 10^{-2}$)鉴定了其基因成员与上述鉴定的重要TF靶标有显著重叠的模块。线性无关协变量年龄(年轻、年老)和基因型(HD、WT)对每个模块特征基因(例如ME ~ 年龄+基因型)的加性解释的相对贡献通过在relaimpo软件包中实施的lmg方法进行计算。

[0480] 网络表示:用IPA进行转录因子的基因靶的功能注释。为了创建代表性网络,发明人集中于MYC调节子及其与其他重要TF的共享靶标。用Cytoscape构建网络。

[0481] 类胚体(EB)生成

[0482] 为了生成均一的EB,将hESC用ReLeSR解离成小簇,收获,并用自动细胞计数器NucleoCounter NC-200计数。在AGGREWELL-800(StemCell Technologies,目录号34815)的每孔中加入总共 3×10^6 个hESC,并离心以在各个微孔中聚集hESC。聚集的hESC用补充有10 μ m Y-27632的mTeSR1培养过夜以允许EB形成。聚集24小时后,通过使用具有切割尖端的P1000移液管轻轻吸取每个孔中的培养基,从每个微孔释放EB,并转移到超低附着组织培养瓶(Corning,目录号3815)中进行进一步定向分化。在聚集之前,根据制造商的指导制备AGGREWELL-800板。

[0483] hESC衍生的神经胶质培养物的流式细胞术

[0484] 在Accutase中解离5分钟后,收集神经胶质培养物作为单细胞悬浮液,用血细胞计数器计数,并以 10^6 个细胞/ml重悬于MILTENYI洗涤缓冲液(MWB;PBS+0.5%BSA级分V(ThermoFisher目录号15260037)+2 μ M EDTA(ThermoFisher目录号15575020))中。然后将每种细胞悬浮液在MWB中于4 $^{\circ}$ C孵育15分钟以阻断非特异性抗体结合,并分成100 μ L级分用于免疫标记。然后将每个级分与荧光团偶联抗体于4 $^{\circ}$ C孵育15分钟,未染色的门控对照除外。抗体来源和浓度列于下表中。

类型	抗原	宿主物种	稀释度	制造商	目录号
[0485] 一抗	Olig2	小鼠	1:200	MILLIPORE	MABN50
一抗	hGFAP	小鼠	1:200	BIOLEGEND	SMI-21
一抗	hN	小鼠	1:200	ABCAM	ab254080
一抗	Ki67	兔	1:200	INVITROGEN	MA5-14520
一抗	EGFP	鸡	1:500	INVITROGEN	A10262
一抗	mCherry	大鼠	1:500	INVITROGEN	M11217
一抗	PDGFRa	兔	1:200	CELL SIGNALLING	5241S
一抗	Oct-4	小鼠	1:100	MILLIPORE	MAB4401
二抗	大鼠IgG (H+L) - Alexa Flour 568	山羊	1:400	INVITROGEN	A-11077
[0486] 二抗	鸡IgY (H+L) - Alexa Flour Plus 488	山羊	1:400	INVITROGEN	A32931
二抗	兔IgG (H+L) - Alexa Fluor Plus 647	山羊	1:400	INVITROGEN	A32733
二抗	小鼠IgG (H+L) - Alexa Fluor Plus 647	山羊	1:400	INVITROGEN	A32728
偶联抗体	CD140a-FITC	小鼠	1:10	BD HORIZON	564594
偶联抗体	CD140a-PE	小鼠	1:10	BD PHARMINGEN	556002
偶联抗体	CD44-APC	小鼠	1:500	MILTENYI BIOTEC	130-113-331
偶联抗体	A2B5-APC	小鼠	1:50	MILTENYI BIOTEC	130-093-582

[0487] 然后用MWB洗涤细胞,以200×g旋转10分钟,重悬于MWB中,并过滤到带有35μm细胞过滤器盖的5ml聚苯乙烯管(Corning,目录号352235)中。为了排除死细胞,以1μg/ml加入4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI;ThermoFisher目录号D1306)。然后在CYTOFLEX S平台(Beckman Coulter)上进行神经胶质培养物的流式细胞术分析,并用CYTEXPERT(Beckman Coulter)和FLOWJO(BD Biosciences)软件分析数据。门控策略和数据分析在图18中举例说明。

[0488] hESC和神经胶质培养物的免疫细胞化学

[0489] 用4%多聚甲醛(PFA)固定培养物7分钟,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤,然后用透化/封闭缓冲液(PBS+0.1%Triton-X(Sigma-Aldrich目录号T8787)+1%BSA级分V)透化和封闭1小时。然后将培养物与一抗于4℃孵育过夜,用PBS洗涤,然后与二抗于室温孵育2小时。抗体来源和浓度列于上表中。然后于室温与1μg/mL DAPI孵育5分钟进行核复染,然后在成像前用PBS再洗涤3次。

[0490] hESC的代表性图像在配备有DS-Fi3相机的Nikon Eclipse Ti显微镜上以10x放大率获取,而神经胶质培养物的代表性图像用DS-Qi2相机以20x放大率捕获,并且两者均在NIS-Elements成像软件(Nikon)中调整“最小/最大”水平。

[0491] 绘制的细胞计数和切片体积估计(体积定量)

[0492] 如前面在方法部分中所提到的,如果绘制的细胞相应的代表性线段完全在辐射球壳内部,则将绘制的细胞计数为1,如果绘制的细胞完全在辐射球壳外部,则将绘制的细胞

计数为0,如果绘制的细胞与辐射球壳相交,则将绘制的细胞计数为部分。为此,发明人计算了辐射球壳表面上与绘制的细胞在球壳上的投影相对应的点。发明人在此仅考虑注射部位上方的点的计算,因为下方的点被类似地处理。球壳上的对应点由下式给出:

$$[0493] \quad z_d(r) = \sqrt{r^2 - d_{xy}^2}$$

[0494] 其中 r 是 a 或 b ,具体取决于壳与外表面还是内表面上的点相交。如果 $z_1 > z_d(b)$,则该点位于壳之外,因此不计数,如果 $z_u < z_d(a)$,则壳已越过该点,因此不计数。如果 $z_d(a) < z_u$ 且 $z_d(b) > z_1$,则该线段完全在球壳内,因此将其计数为1。另外,发明人可能有球壳与线段相交的两种限制情况。这两个示例是类似的,因此发明人仅处理线段与球壳的上表面相交的情况。即, $z_d(a) > z_u$ 且 $z_u < z_d(b) < z_1$ 的情况。在这种情况下,球壳内的线段部分具有长度 $z_u - z_d(b)$,并且通过对其点概率函数进行如下积分来对绘制的细胞计数:

$$[0495] \quad (z_u - z_d(b)) / w$$

[0496] 其中 w 是切片的宽度。

[0497] 为了计算在其中对绘制的细胞进行计数的对应的切片体积,发明人首先三角测量代表每个切片的解剖边界的每个多边形。然后,发明人从该三角形形成棱柱,其高度与切片厚度相匹配。发明人将每个棱柱表示为3个四面体,并测量球体内部的累积体积作为半径为 r 的球体与每个四面体之间的总重叠体积。

[0498] 对于深度坐标 z_1 的切片,每个三角形由坐标为 (x_1, y_1, z_1) 、 (x_2, y_2, z_1) 和 (x_3, y_3, z_1) 的3个点 v_1, v_2, v_3 表示。这些三角形共同构成了该结构域的2D表示。为了得到每个切片的3D表示,发明人使用已知厚度 dz (这里为20nm)并将三角形增厚成具有3个新点 w_1, w_2, w_3 的棱柱形状,这些新点在切片上边界上坐标 (x_1, y_1, z_u) 、 (x_2, y_2, z_u) 和 (x_3, y_3, z_u) 处垂直于平面平移 dz 。计算3D多边形与球体的精确重叠体积不是微不足道的,但是发明人可计算球体与四面体的重叠体积。为此,发明人通过由坐标集 $\langle v_1, v_2, v_3, w_1 \rangle$ 、 $\langle v_2, v_3, w_1, w_2 \rangle$ 和 $\langle v_3, w_1, w_2, w_3 \rangle$ 给定的3个四面体覆盖每个棱柱结构域。给定半径 r 的球体,则每个切片与球体的相交体积由半径 r 的球体 S 和每个四面体 T 的相交体积之和给出:

$$[0499] \quad V(r) = \sum_T |S_r \cap T|$$

[0500] 实施例A1—从WT和HD hESC生成不同颜色标记的人神经胶质

[0501] 为了评估健康神经胶质在体内替代其患病对应物的能力,发明人首先生成WT和HD人胚胎干细胞(hESC)的荧光团标记报告细胞系,以便能够生产每种基因型的光谱不同的GPC,然后可独立监测其在体内的生长。CRISPR-Cas9介导的敲入策略(Oceguera-Yanez, F.等人,Methods,第101卷,第43-55页(2016年))首先用于将EGFP和mCherry报告基因盒整合到匹配的雌性同胞野生型(WT,GENEA019)和表达mHtt(HD,GENEA020)的hESC的AAVS1基因座中(Dumevska, B.等人,Stem Cell Research,第16卷,第430-433页(2016年)和Dumevska, B.等人,Stem Cell Research,第16卷,第397-400页(2016年)) (图1)。然后,发明人证实了报告基因盒稳定地整合到这些克隆的每个克隆中(图1D),并且该编辑不影响标记的hESC的自我更新、多能性或核型稳定性(图1E和图2A)。从这些标记的和光谱上不同的细胞系,发明人使用了先前描述的分化方案(Benraiss, A.等人,Nature Communications,第7卷,第11758

页(2016年))来从每个细胞系生成颜色编码的人神经胶质祖细胞(hGPC),其体内行为可单独和竞争地进行比较。发明人验证了每个细胞系在成熟后作为星形胶质细胞或少突胶质细胞维持EGFP或mCherry表达,以及它们缺乏任何显著差异表达的致癌突变,或可能使生长产生偏倚的拷贝数变异(CNV)的能力(图2B和图2C);发明人还验证了WT和表达mHTT的hGPC在单独注射时都定殖于鼠宿主脑中(图15和图6)。

[0502] 然后,发明人使用已建立的用于生成hGPC的方案区分WT-mCherry和HD-EGFP hESC (Wang, S.等人, *Cell Stem Cell*, 第12卷, 第252-264页(2013年)),并评估其分化成神经胶质体的能力和它们在获得神经胶质命运后报告基因表达的稳定性(图3)。体外150天(DIV)时,源自WT-mCherry和HD-EGFP的神经胶质培养物同样富集PDGFR α^+ /CD44 $^+$ 双潜力GPC ($P=0.78$),约占培养物中细胞的一半,其余是未成熟的A2B5 $^+$ GPC和PDGFR α^- /CD44 $^+$ 星形胶质细胞及其子代(图3和图18)。重要的是,几乎所有衍生自WT-mCherry和HD-EGFP hESC的免疫表型细胞(包括成熟星形胶质细胞以及GPC)都继续表达它们相应的荧光报告基因,表明转基因表达在获取末端神经胶质同一性后保持稳定(图3D)。

[0503] 实施例A2—人HD神经胶质嵌合小鼠的建立

[0504] 生成具有基本上由HD神经胶质人源化的纹状体的鼠嵌合体(HD嵌合体,图15)以提供体内模型,通过该模型来评估患病的人神经胶质被其健康的对应物所替代。将衍生自表达mHtt的hESC的经工程化以表达EGFP的hGPC(图1、图2和图3;此后称为HD)植入免疫功能受损的Rag1 $^{(-/-)}$ 小鼠的新纹状体中,并在组织学上监测它们的扩增(图15A)。

[0505] 植入后,HD神经胶质迅速浸润鼠纹状体,首先在纹状体白质束内迁移和扩张(图15B)。逐渐地,这些细胞向外扩增,逐渐取代纹状体神经纤维网中它们的鼠对应物,使得到36周时,鼠纹状体基本上被HD神经胶质人源化(图15B、图15F和图15G)。HD神经胶质的发育由它们的有丝分裂扩增驱动,它们的总数在12周和36周之间翻倍(图15C; $P=0.0032$)。相反,当它们在其新建立的结构域内扩增和成熟时,它们的增殖性细胞池(Ki67 $^+$)逐渐耗尽(图15D和图15I; $P=0.0036$),从而随着时间的推移减慢它们的扩增速率。

[0506] 大多数HD神经胶质扩增为Olig2 $^+$ GPC(72.7% \pm 1.9%),其在替代它们的鼠对应物后作为新的常驻池持续存在。这些细胞的一部分(4.8% \pm 0.9%)进一步分化成GFAP $^+$ 星形胶质细胞(图15I和图15J)。星形胶质细胞分化主要在纹状体白质束内观察到。这些患病星形胶质细胞缺乏通常在健康对应物中观察到的结构复杂性,并显示异常纤维结构,如先前报道的(图15J;Osipovitch, M.等人,“Human ESC-Derived Chimeric Mouse Models of Huntington’s Disease Reveal Cell-Intrinsic Defects in Glial Progenitor Cell Differentiation”, *Cell Stem Cell*, 第24卷:第107-122页(2019年),该文献据此全文以引用方式并入)。

[0507] 实施例A3—健康WT hGPC浸润HD嵌合成人纹状体并胜过常驻的神

[0508] 经胶质

[0509] 使用所建立的嵌合体(其纹状体神经胶质主要为mHTT表达和人)来确定常驻的HD人神经胶质可如何对健康hGPC的引入做出反应,以及常驻的神经胶质群体是否可能在某种程度上被替代。衍生自WT hESC且被工程化以表达mCherry的hGPC(图1、图2和图3;此后称为WT)移植到36周龄HD嵌合体的纹状体中,并在它们竞争纹状体显性时使用组织学监测扩增(图5)。

[0510] 移植后,WT神经胶质遍布先前人源化的纹状体,随着它们从其植入部位扩增,逐渐替代它们的HD对应物(图4)。该过程缓慢但持续,随着时间的推移产生HD纹状体的大量再增殖(图4;54周, $p<0.0001$;72周, $p<0.0001$)。值得注意的是,WT神经胶质的扩增与HD神经胶质从组织中同时消除同时发生(与其空间重新定位相反)(图4;54周一 $P<0.0001$,72周一 $P<0.0001$),并且其典型特征是离散的前进前沿,后面几乎找不到HD神经胶质(图4)。

[0511] 在Olig2⁺GPC之间的竞争之后形成的相互排斥结构域(图4)。这些包括大部分的WT神经胶质群体(72周时 $80.1\pm 4.7\%$),其在替代它们的HD对应物后作为新的常驻GPC池持续存在。它们生成星形胶质细胞的潜力得到保持,这些中的一部分(72周时 $4.0\pm 1.5\%$)在其新建立的结构域内进一步分化为GFAP⁺星形胶质细胞(图6)。奇怪的是,在WT神经胶质占主导的区域内,HD星形胶质细胞(GFAP⁺)主要在白质束内继续存留(图4)。然而,在整个实验中,两个群体中Olig2⁺和GFAP⁺神经胶质之间的总比例保持稳定(图6)表明当GPC替代先于星形胶质细胞替代时,但随着时间的推移会实现成比例的表型再增殖。

[0512] 有趣的是,因为移植到初始成年Rag1^(-/-)小鼠体内的WT hGPC比移植到新生嵌合成年Rag1^(-/-)小鼠体内的WT hGPC在宿主纹状体中的扩增范围更广,所以人-人神经胶质替代的发展速度比人-鼠神经胶质替代的发展速度慢(图7;54周: $P=0.14$,72周: $P=0.0009$)。这些结果表明,竞争性神经胶质替代物随着异种移植物和同种异体移植物之间不同的物种特异性动力学而发展。

[0513] 这些结果既不是源自基因编辑的脱靶效应的伪影,也不是荧光报告基因表达毒性的伪影,因为共移植的hGPC源自WT-mCherry以及它们未修饰的对应物(WT-未标记)(图8),在HD嵌合体的纹状体中同等地扩增,并产生类似的神经胶质再增殖(图9和图10;54周- $P=0.5227$ -72周- $P=0.1251$)。这样,在(图4)和(图6和图7)中进行的分析报告了来自两种实验范例的样品。值得注意的是,虽然WT和HD神经胶质细胞彼此强烈分离,但是可能发现WT神经胶质的两个同基因克隆混合在一起(图9),这表明主动识别先于HD神经胶质从组织中的竞争性消除。

[0514] 实施例A4—人WT神经胶质相对于常驻的HD神经胶质享有增殖优势

[0515] 随着HD神经胶质在组织内扩增和成熟,其增殖细胞池逐渐耗尽,HD神经胶质的纹状体人源化不断进展(图15D)。因此,测试了两个群体之间增殖能力的差异是否维持了HD纹状体内较年轻WT神经胶质的选择性扩增。随着竞争性纹状体再增殖的展开,评估了WT和HD神经胶质群体中Ki67的时间表达。

[0516] 在54周龄和72周龄时,植入的WT神经胶质的有丝分裂比例显著高于常驻的HD神经胶质的有丝分裂比例(图16A至图16C;54周- $P<0.0001$,72周- $P=0.0120$)。这些数据表明,WT神经胶质对HD纹状体的再增殖是由相对富集的增殖细胞池推动。值得注意的是,虽然随着细胞老化,这种增殖优势变得不那么明显,但它在整个实验过程中一直保持着。考虑到这一点,植入的WT神经胶质相比于它们的HD对应物的持续增殖优势应该提供超过观察到的实验时间点的连续纹状体再增殖的驱动力(图16A至图16C)。

[0517] 实施例A1-A4的讨论:

[0518] 在植入WT人GPC后,携带HD衍生的神经胶质的人神经胶质嵌合小鼠的纹状体被其健康对应物再增殖(图4)。上文提供的数据表明,这一过程是由发育细胞间竞争的重演驱动(Amoyel, M. 和Bach, E. A., *Development*, 第141卷:第988-1000页(2014年)和Baker, N. E.,

Nat Rev Genet,第21卷,第683-697页(2020年),这些文献据此全文以引用方式并入),在成人大脑中受到动态影响。传统上,这种细胞间竞争的定义是,在生长相对缓慢的细胞与生长较快的邻近细胞相互作用时,从组织中主动清除生长相对缓慢的细胞(Morata,G.和Ripoll,P.,Dev Biol,第42卷:第211-221页(1975年);Simpson,P.,Dev Biol,第69卷:第182-193页(1979年);以及Simpson,P.和Morata,G.,Dev Biol,第85卷:第299-308页(1981年),这些文献据此全文以引用方式并入)。因此,WT人GPC通常从它们的植入部位开始以前进波的形式扩增,该前进波在接触时排斥并消除其迄今为止稳定常驻的HD衍生对应物(图4)。WT hGPC在这种HD神经胶质环境中的扩增由这些年轻的、健康的GPC部分的持续增殖优势推动,随着时间的推移,这些GPC在宿主大脑中产生了广泛的定殖。

[0519] MYC靶在其转录特征中的富集—细胞竞争的最充分描述的调节因子之一(Cova,C.de la等人,Cell,第117卷:第107-116页(2004年);Moreno,E.和Basler,K.,Cell,第117卷:第117-129页(2004年),和Villa del Campo,C.等人,Cell Reports,第8卷:第1741-1751页(2014年),这些文献据此全文以引用方式并入)一进一步表明该机制在HD hGPC的消除中是保守的。具体地,它们的损失与核糖体转录物的耗尽同时发生,与发育小鼠胚胎(Lima,A.等人,Nat Metabolism,第1-18页(2021年),该文献据此全文以引用方式并入)和皮肤(Ellis,S.J.等人,Nature,第569卷:第497-502页(2019年),该文献据此全文以引用方式并入)中的细胞竞争期间推定的“淘汰者”细胞的转录谱匹配。这一观察结果表明,翻译和蛋白质合成的调节不仅是发育期间细胞竞争的决定因素,也是成人脑中细胞竞争的决定因素。

[0520] 有趣的是,这一过程不能完全由mHtt表达的有害影响来解释,因为当共移植时,两个克隆在评估的时间点都有助于小鼠纹状体的人源化(图11、图12、图13)。HD嵌合体的再增殖由新植入的、更具增殖性的WT GPC和更成熟、相对静止的常驻HD神经胶质之间的年龄差异驱动。这一概念与肝脏再增殖研究的观察结果相似,在肝脏再增殖研究中,小鼠胎儿肝脏祖细胞的同种异体移植到较老但健康的宿主中与它们移植到较年轻的宿主中相比,与更快和更广泛的组织替代相关(Menthen,A.等人,Gastroenterology,第140卷:第1009-1020.e8页(2011年),该文献据此全文以引用方式并入)。

[0521] 由于HD的严重性和发病年龄与CAG重复序列长度密切相关,使用含有mHtt以及更多CAG重复序列的细胞系可能更好地模拟其在这些嵌合体的短寿命内的影响。无论如何,常驻和新植入的GPC之间的年龄差异(以及由此产生的有丝分裂能力差异)所带来的竞争优势似乎是常驻池替代的重要因素。

[0522] 本文所述的竞争性替代类似于植入的hGPC对小鼠神经胶质的替代,因为它们在鼠脑内的扩增也通过相对增殖优势来维持,并且随着接触后消除其鼠对应物而进展。此外,这种竞争行为似乎很大程度上模拟了发展,其中连续几波GPC相互竞争,最老的细胞在出生时从脑中几乎被完全根除,并被较年轻的继代细胞所替代。这些共性表明,细胞间的竞争可能揭示了内在的发育程序,这些程序可在引入新的和更年轻的GPC后在成人脑环境中重新启动。

[0523] 广义上讲,发明人的观察结果表明,脑可能是比以前认识到的更加动态的结构环境,神经胶质祖细胞中的细胞间竞争以及它们衍生的星形胶质细胞在成人脑的维持和发育中同样重要。人们可以类似地设想,神经胶质及其祖细胞中的体细胞突变可能对一个子代

谱系或另一个子代谱系产生选择性克隆优势,导致显性子代的后代对该群体的不可避免的替代。这种机制可能有助于障碍的加速疾病发展,其中基因组不稳定性与体细胞突变可能产生具有独特竞争优势的细胞,这些细胞可能因此具有超过其同胞克隆的竞争优势。这种情况虽然广泛地代表了致癌作用的发生和脑中的胶质瘤发生,但可能类似地涉及非肿瘤性成人发病障碍的发展,其中神经胶质细胞有因果关系,诸如一些儿童期发病的精神分裂症和HD本身。

[0524] 这项工作作为开发以及研究各种环境下体内人神经胶质之间潜在的细胞间竞争性相互作用的机制奠定了基础。从实际角度来看,目前的数据表明,在引入更年轻和更健康的hGPC之后,患病的人神经胶质可被替代。事实上,这种神经胶质替代可为多种神经系统疾病的基于细胞的治疗提供可行的策略。这项研究表明,患有原型神经退行性疾病的人神经胶质在植入健康人GPC后,可在体内被健康对应物替代。建立了一种新的人源化平台,使人们能够预测人神经胶质替代在多种疾病环境中的可能效率,同时询问替代发生的机制。这项研究中产生的机理性见解可使得进一步提高hGPC递送后人神经胶质替代的速度和程度的策略成为可能。总之,这些数据突出了hGPC作为细胞载体治疗其中神经胶质细胞有因果关系的人CNS的那些疾病的潜力。

[0525] 实施例A5—当遇到HD神经胶质时,人WT神经胶质呈现出主要的显

[0526] 性竞争者谱

[0527] 已经确定,植入的WT hGPC以常驻的表达mHTT的神经胶质为代价有效地定殖在HD神经胶质嵌合纹状体中,发明人接下来试图确定其竞争优势背后的分子信号。为此,发明人使用单细胞RNA测序(scRNA-Seq;10X Genomics,v3.1 chemistry)分析了WT和HD人神经胶质的转录谱,该人神经胶质分离自其中两个细胞群共同常驻和竞争的嵌合体的纹状体,以及分离自其中一个或另一个细胞群移植而另一个细胞群没有移植的它们的相应对照(图20A)。在整合所有捕获物并与人序列比对后,Louvain社区检测揭示了六种主要的人神经胶质群体;这些包括hGPC、循环hGPC、未成熟少突胶质细胞(iOL)、神经祖细胞(NPC)、星形胶质细胞及其中间祖细胞(星形胶质细胞祖细胞,APC)(图20B-D)的仅[效应细胞加靶细胞]的孔相比,对%细胞毒性进行了定量。在这些群体中,细胞周期分析预测与其HD对应物相比,竞争性WT细胞中活跃增殖的G2/M期细胞的比例更高(图20E),这与组织学观察结果一致(图19)。为了继续研究,发明人将hGPC作为发明人模型中的主要竞争群体。成对差异表达揭示了组间差异表达基因的离散集(图20F),随后在hGPC群体中使用Ingenuity Pathway Analysis(IPA)进行的功能分析揭示了与它们的竞争有关的许多重要方面(图20G)。

[0528] 研究发现,在竞争过程中,WT GPC会激活驱动蛋白质合成的途径,而HD GPC预计会下调这些途径。预测的上游转录因子激活鉴定了YAP1、MYC和MYCN—细胞生长和增殖的保守主调节因子—在实验组中受到显著调节。重要的是,发明人发现YAP1和MYC靶标在竞争性HD GPC中相对于它们的对照被选择性下调(图20G)。值得注意的是,这种下调伴随着核糖体编码基因的显著抑制(图20I)。相反,相对于对照,竞争性WT hGPC显示YAP1和MYC靶标以及核糖体编码基因表达均上调(图20G至图20H)。因此,这些数据表明,植入的WT hGPC在与它们的HD对应物接触时主动地呈现出竞争性显性表型,以驱动后者的局部消除,同时促进它们自身的扩增和定殖。

[0529] 实施例A6—年龄差异驱动竞争性人神经胶质再增殖

[0530] 由于移植到成人宿主中的WT细胞基本上比它们所取代和替代的常驻宿主细胞年轻,因此,发明人接下来询问除了疾病状态之外,细胞年龄的差异是否可能有助于晚期供体细胞的竞争性成功。为此,发明人将由WT hESC新产生的、被工程化以表达EGFP的hGPC移植到40周龄的成年神经胶质嵌合体的纹状体中,该成年神经胶质嵌合体已在围产期移植有衍生自mCherry标记的、其他同基因的WT hESC(图17A)。然后,发明人在组织学上监测移植细胞的扩增,以便绘制这些同基因但在其他方面明显老化的hGPC池的相对适合度和竞争性能。

[0531] 我们注意到,植入的WT神经胶质在WT嵌合体的纹状体内的扩增与它们在HD嵌合体的纹状体中的扩增惊人地相似(图4)。在移植后,较年轻的WT神经胶质迅速浸润先前人源化的纹状体,当这些神经胶质从它们的植入部位扩增时,逐渐取代它们的老化对应物,最终产生组织的大量重新定殖(图17B至图17D和图17E; $P<0.0001$)。它们的扩增与老化的WT神经胶质的局部消除同时发生(图17B至图17D和图17F; $P<0.0001$),老化的WT神经胶质也由离散的前进前沿标记,在该前进前沿后面可发现很少的已经常驻的WT神经胶质(图17C)。因此,发明人还注意到,植入的WT神经胶质的有丝分裂比例显著高于其常驻的老化对应物的有丝分裂比例(图17G至图17I; $P=0.018$)。总之,这些数据表明,较年轻的同基因hGPC对人WT神经胶质嵌合纹状体的再增殖伴随着较老的细胞被它们较年轻的对应细胞替代,这部分地由较年轻的、有丝分裂活性更高的细胞群的相对扩增推动。

[0532] 实施例A7—通过诱导细胞凋亡,年轻细胞替代了它们较老的对应细

[0533] 胞

[0534] 由于较年轻的神经胶质似乎比它们较老的对应物表现出明显的竞争优势,发明人接下来询问较年轻细胞对较老神经胶质细胞的清除是否被动发生,这是由于较年轻细胞的较高增殖率导致正常更新期间的较老常驻细胞的相对损耗,或者替代是否由更适合的较年轻细胞诱导较老细胞中的程序性细胞死亡主动地驱动。为了解决这个问题,发明人使用TUNEL测定来比较老化和年轻WT神经胶质细胞群在宿主纹状体中竞争时的细胞凋亡速率,以及在单移植对照中它们相应基线处的细胞凋亡速率。发现随着竞争性再增殖的展开,老化的WT神经胶质以比它们的较年轻对应物显著更高的速率经历凋亡(图23A至图23C; $P<0.0001$)。关键的是,较老的、常驻的神经胶质细胞凋亡的增加似乎是由它们与较年轻细胞的相互作用驱动的,因为发现与未接受较晚成体注射的对照相比,在作为成体移植的具有较年轻细胞的嵌合体中,老化神经胶质细胞比例显著更高(图23A至图23C; $P=0.0013$)。这些数据表明,老化的常驻神经胶质遇到它们的较年轻对应物时会被主动消除,至少部分是通过它们与较年轻的hGPC相遇所触发的细胞凋亡来消除,较年轻hGPC的相对适合度更高,允许它们在嵌合宿主纹状体中再增殖。

[0535] 实施例A8—当用较老的同基因细胞攻击时,年轻hGPC获得优势特

[0536] 征

[0537] 为了确定年轻WT神经胶质相对于老化WT神经胶质的竞争优势背后的分子信号是否与它们相对于HD神经胶质的优势背后的分子信号相似,发明人使用scRNA-Seq分析了竞争的年轻和老化WT神经胶质及其相应对照的转录特征(图21A)。在测序的群体中(图21B至图21D),值得注意的是,处于细胞周期G2/M期的竞争老化WT细胞的比例显著低于它们的年轻对应物(图21E),这与组织学数据一致(图17I)的仅[效应细胞加靶细胞]的孔相比,对%

细胞毒性进行了定量。差异表达分析揭示了竞争的年轻和老化WT GPC之间差异表达的基因的离散集(图21F和图21H),随后对这些基因集进行IPA分析揭示了与在竞争性同种异体移植模型中供体(年轻)WT和已经常驻的(老化)HD GPC之间观察到的特征相似的特征(图21G)。具体地,功能上与蛋白质合成相关的基因,包括核糖体基因以及上游YAP1、MYC和MYCN信号传导方面,在竞争的年轻WT GPC中相对于它们的老化对应物都被激活(图21G)。然而,尽管有这些相似之处,但在其他方面,老化的WT GPC与HD GPC对新植入的WT GPC的反应不同。与HD GPC相反,老化WT细胞面对较年轻的同基因竞争者,将YAP1和MYC靶标两者相对于其非竞争对照上调(图21G),同时核糖体基因上调(图21I)。它们谱的这种差异可能代表了在受到攻击时竞争性反应的内在能力,而表达mHTT的HD hGPC则缺乏该能力。尽管如此,这种上调不足以匹配它们较年轻的对应物的更大适合度,这类似于—但在相对更大的程度上—表现出YAP1和MYC靶标以及核糖体基因相对于它们的非竞争性对照的选择性上调(图21G至图21H)。总之,相对细胞适合度的决定因素在不同的挑战情况中可能是保守的,并且由此产生的竞争的结果在很大程度上受到竞争群体的相对年龄的影响。

[0538] 实施例A9—竞争优势与转录因子的离散集有关

[0539] 我们接下来询问什么样的基因特征会定义新移植的人GPC相对于常驻细胞的竞争优势。为此,发明人应用了使用lasso调节的逻辑回归的多步分析(图22A),其精确找到了5种TF(CEBPZ、MYBL2、MYC、NFYB、TFDP1),这些TF的活性可显著解释年轻WT GPC相对于老化HD和老化WT GPC的优势。这5种TF和它们的推定靶标在同种异体移植和同种移植模型中建立了基因集(调节子),这些基因集在年轻WT细胞中上调(归一化富集得分[NES]>0,调整后的 $p < 10^{-2}$) (图22D)。还注意到,尽管它们的活性在没有处于竞争性环境中时发生变化(老化HD、老化WT、单独的年轻WT),但在同种异体移植(与HD相比)和同种移植(与更老的同基因自身相比)两种范例中,它们的平均活性在显性年轻WT细胞中更高,尤其对于MYC而言更是如此(图22E)。

[0540] 接下来,发明人着手鉴定具有确定表达模式的基因群组,以及与上述五个优先化调节子显著重叠的基因群组。发明人首先采用加权基因共表达网络分析(WGCNA)检测GPC数据集中的总共19个模块(图22A)。六个模块含有与CEBPZ、MYBL2、MYC、NFYB和TFDP1靶标显著重叠的基因(图22B)。然后,发明人询问优先化模块的表达模式是否可通过细胞年龄(年轻对比年老)、它们的基因型(HD对比WT)或两者来解释。WGCNA将模块特征基因定义为基因群组的第一主成分,从而代表该模块内所有基因的一般表达模式。因此,发明人建立了线性模型,其中模块特征基因是由年龄和基因型描述的反应。观察到模块褐色、红色和青色主要受年龄影响,而模块黑色、蓝色和绿色受年龄和基因型影响(图22C)。

[0541] 受调节的途径激活已被推断为赋予竞争优势(图20和图21)的MYC也是五个优先化TF之一。因此,发明人进一步表征了MYC调节子及其下游靶标,并注意到这些下游靶标如何也被其他优先化TF调节(图22F)。有趣的是,虽然MYC定位于模块褐色,但其靶标的大部分属于模块蓝色。蓝色模块基因在非竞争性对照范例中类似地表达,但是在WT对比HD同种异体移植范例中,它们在年轻WT中的表达水平比老化HD更高(图22B),这种模式表明除非细胞处于竞争性环境中,否则蓝色特征没有被激活。此外,发明人注意到相对于老化的WT hGPC,这些基因在老化的HD中的表达较低(图22E至图22F),这可突出WT细胞固有的更大竞争能力,与早期观察到的一致,即当用新移植的WT GPC攻击时,老化的WT hGPC的反应与HD hGPC

不同。重要的是,蓝色模块特征基因可由基因型和年龄两者描述,证明与MYC信号传导相关的竞争优势由这两个变量驱动。因此,该网络中的靶标富集了调节细胞增殖(TP53、RICTOR、YAP)、基因转录(MYCN、MLXIPL)和蛋白质合成(LARP1)的途径,其中每种途径先前都被认为在每个竞争情况中差异表达(图20和图21)。因此,当引入成人脑中时,无论是面对较老的HD衍生的hGPC还是同基因hGPC,这种竞争触发的调节网络的输出似乎都会为年轻的WT hGPC带来竞争优势。

[0542] 实施例—B部分再生神经胶质祖细胞或其子代

[0543] 实验模型和受试者详细信息

[0544] 人受试者

[0545] 关于胎儿和成人脑样品的详细信息,请参阅方法部分“用于细胞分离的成人和胎儿脑处理”。在组织获取期间没有提供胎儿样品的性别。

[0546] 细胞系

[0547] 人iPSC系C27用于生成其中验证了感兴趣的预测转录物的hGPC。C27系是雄性的,并且获自Lorenz Studer。将细胞分化成GPC,如方法部分中详述的(参见:人iPSC衍生的GPC生产)(Chambers等人,2009年)。

[0548] 方法细节

[0549] 用于细胞分离的成人和胎儿脑处理

[0550] 人脑样品根据机构审查委员会批准的协议从罗切斯特大学强纪念医院同意的患者那里获得。脑组织获自正常GW 18-24皮层和/或VZ/SVZ解剖或成人白质/皮层癫痫切除(对于mRNA为雌性18岁、雄性19岁和雌性27岁,对于miRNA为雄性8岁、雌性20岁、雄性43岁和雌性54岁)。A2B5⁺/PSA-NCAM⁻细胞的胎儿GPC获取、解离和免疫磁性分选如(Windrem等人,2004年)所述进行。使用双重免疫磁性分选策略从解离的组织分离GPC:使用微珠标记的大鼠抗小鼠IgM(Miltenyi Biotech)耗尽小鼠抗PSA-NCAM⁺(Millipore, DSHB)细胞,然后从PSA-NCAM⁻池中选择A2B5⁺(克隆105;ATCC, Manassas, VA)细胞,如(Windrem等人,2004年;Windrem等人,2008年)所述进行。分选后,将细胞在含有10ng/ml bFGF和20ng/ml PDGF-AA的DMEM-F12/N1中维持1-14天。另选地,使用MACS分离和分选CD140a/PDGF α R定义的GPC,如(Sim等人,2011b)所述进行,产生CD140⁺神经胶质祖细胞的富集群体。

[0551] 大量RNA测序

[0552] 通过Qiagen RNeasy试剂盒从分离物中纯化RNA,构建大量RNA测序文库。在罗切斯特大学基因组学研究中心的Illumina HiSeq 2500上对样品进行深度测序。使用fastp(Chen等人,2018年)修剪原始FASTQ文件并移除衔接子,并在所有样品中使用Ensembl 95基因注释通过STAR以两遍模式与GRCh38进行比对(Dobin等人,2013年),并使用RSEM版本(Li和Dewey,2011年)进行定量。随后的分析在R(R Core Team,2017年)中进行,其中RSEM基因水平结果通过tximport(Soneson等人,2015年)导入。DE分析在DESeq2(Love等人,2014年)中进行,其中配对分析(胎儿A2B5⁺对比CD140a⁺,胎儿CD140a⁺对比CD140a⁻)具有加入其模型中的配对信息。对于成人对比胎儿DE分析,将年龄与分类标记(包括CD140a样品)连接以定义组变量,其中还将测序批次加入模型以解释技术可变性。经调整的p值<0.01且绝对log₂倍数变化>1的基因被认为是显著的。然后通过有意义的丰度进一步过滤这些数据,丰度定义为至少1组中TPM(通过RSEM计算)的中值为1(DE之前有20,663个基因满足该标准)。

[0553] scRNA-Seq分析

[0554] 胎儿脑样品如上所述进行大量RNA-Seq处理,直到通过FACS对单细胞进行CD140a⁺或PSA-NCAM⁻/A2B5⁺表面表达分选。然后利用V2chemistry在10X genomics chromium控制器上捕获单细胞,并根据制造商的说明书生成文库。在Illumina HISEQ 2500系统上对样品进行测序。然后使用Cell Ranger将去多重的样品与仅使用蛋白质编码、lncRNA或miRNA生物型的GRCh38和Ensembl 95基因注释生成的指数进行比对和定量。scRNA-Seq样品的分析通过Seurat (Butler等人,2018年)在R中进行。合并两个样品,并过滤出低质量的细胞,如通过使线粒体基因表达大于15%或具有少于500个独特基因所定义的。然后利用SCTransform将样品归一化,注意回归出每个细胞的UMI总数、线粒体基因含量百分比或S期和G2M期得分差异的贡献。然后计算PCA,使用前30个维度运行UMAP,其中n.neighbors=60且repulsion.strength=0.8。然后运行FindNeighbors,接着运行FindClusters,其中分辨率设置为0.35。基于每个簇的表达谱,将一些相似的簇合并成更广泛的细胞类型簇。使用MAST检验 (Finak等人,2015年) 计算簇的静态差异表达,其中经调整的p值<0.01且绝对log2倍数变化>0.5被认为是显著的。使用位于resources.aertslab.org/cistarget/的hg38数据库,用R中的SCENIC包 (Aibar等人,2017年) 进行活性转录因子调节子的预测。如果基因在至少1%的细胞中表达,则将它们包括在共表达分析中。

[0555] Ingenuity Pathway Analysis和网络构建

[0556] 将差异表达的基因输入Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen) 以确定重要的规范、功能和上游信号传导项。对于IPA网络的构建,过滤经调整的p值低于0.001的项。将不相关的IPA项与高度冗余的函数项一起删除,这些函数项使用iGraph包 (Csardi,2006年) 通过jaccard相似性指数来评估。在Gephi内建立模块化 (Bastian等人,2009年),并且使用Cytoscape (使最终网络可视化Shannon,2003年)。保留感兴趣的基因和项以用于可视化目的。模块彼此分离并使用yFiles有机布局组织。

[0557] 转录因子活性的推断

[0558] 将成人和胎儿富集基因列表分别输入RcisTarget (Aibar等人,2017年) 中以识别在基因启动子周围窗口中基序的过度表达 (500bp上调/100bp下调和10kb上调和10kb下调)。然后根据输入基因列表中的显著差异表达过滤与显著富集的基序 (NES>3) 相关的转录因子。在每个窗口和基因列表中,仅保留适当的TF-基因相互作用 (下调基因的阻遏物和上调基因的激活物)。然后合并扫描窗口以产生预测的胎儿/成人阻遏物/激活物的TF基因边缘列表。发明人最终将感兴趣的TF缩小至那些文献中主要报道为单独的激活物或阻遏物的TF。

[0559] miRNA微阵列分析

[0560] A2B5⁺成人 (n=3) 和CD140a⁺胎儿 (n=4) 细胞悬浮液通过如上所述的MACS分离,并根据制造商说明书 (QIAGEN) 使用miRNeasy试剂盒分离它们的miRNA。然后制备纯化的miRNA,并在Affymetrix GeneChip miRNA 3.0阵列上按照标准方案的指示进行分析。然后通过oligo (Carvalho和Irizarry,2010年) 包将原始CEL文件读取到R中,并通过稳健多阵列平均 (RMA) 对样品进行归一化。然后根据Affymetrix的注释仅过滤人miRNA的探针,并在limma中进行差异表达 (Ritchie等人,2015年),其中在经调整的p值<0.01时建立显著性。最后,使用MIRNATAP (Pajak M,2020年) 在五个独立的miRNA预测数据库中调查差异表达的

miRNA,其中min_src设置为2,方法设置为“geom”。miRNAs的转录因子调节通过查询TrasmiR V2.0数据库进行(Tong等人,2019年)。

[0561] 探索性分析和可视化

[0562] 大量RNA-Seq或微阵列样品的PCA通过prcomp使用DESeq2对象的方差稳定值的默认设置进行计算。通过ggfortify包中的自动绘图绘制PCA。使用EnhancedVolcano生成火山图。使用ggplot2进一步编辑或重新生成图,并使用patchwork进行比对。

[0563] 人iPSC衍生的GPC生产

[0564] 使用先前描述的方案(Osipovitch等人,2019年;Wang等人,2013年;Windrem等人,2017年)将人诱导多能干细胞(C27(Chambers等人,2009年))分化为GPC。简言之,细胞首先分化为神经上皮细胞,然后分化为前GPC,最后分化为GPC。在补充有T3、NT3、IGF1和PDGF-AA的神经胶质培养基中维持GPC。

[0565] 慢病毒过表达

[0566] 对于E2F6、ZNF274、IKZF3或MAX的过表达,发明人首先从成人hGPC数据集鉴定了这些基因中的每个基因的最丰富的蛋白编码转录物。将每个转录物的cDNA克隆到pTANK-TRE-EGFP-CAG-rtTA3G-WPRE载体中四环素应答元件启动子的下游。通过瞬时转染HEK293FT细胞产生水泡性口炎病毒G糖蛋白假型化的病毒颗粒,通过超速离心浓缩,并通过QPCR(qPCR慢病毒滴度试剂盒,ABM-Applied Biological Materials Inc)滴定。iPSC(C27)衍生的GPC培养物(体外160-180天)在神经胶质培养基中以1.0MOI感染24小时。用HBSS洗涤细胞,并在实验的剩余部分中维持在补充了1 μ g/ml多西环素(Millipore-Sigma St.Louis,MO)的神经胶质培养基中。在最初加入多西环素后3、7和10天,通过FACS在DAPI⁻/EGFP⁺表达上分离转导的hGPC。多西环素对照细胞仅在DAPI⁻上分选。

[0567] 定量PCR

[0568] 使用RNeasy微试剂盒(Qiagen,德国)提取来自过表达实验的RNA。使用TaqMan逆转录试剂(Applied Biosystems,美国)合成第一链cDNA。通过每次反应加载1ng与FASTSTART UNIVERSAL SYBRGREEN MASTERMIX(Roche Diagnostics,德国)混合的RNA一式三份进行qPCR反应,并在实时PCR仪器(CFX Connect Real-Time System thermocycler;Bio-Rad)上分析。将结果归一化为来自每个样品的18S的表达。

[0569] 定量和统计分析

[0570] 对于qPCR实验,在通过过表达条件和时间点与细胞批次协变量的添加的相互作用构建的线性模型中分析了每个基因的 δ CT的显著差异。使用lsmeans包在时间点内通过最小二乘均值检验针对Dox对照测试事后配对比较(Lenth,2016年)。使用假发现率方法对p值进行多重比较调整,其中p值<0.05被认为是显著的。

[0571] 其他资源

[0572] 来自本文和相关的先前出版物的大量和scRNA测序数据可在发明人在GlialExplorer.org或ctngoldmanlab.genialis.com的Shiny应用程序中进行探索。

[0573] 实施例B1—CD140a选择比A2B5更有效地富集人胎儿神经胶质祖细胞

[0574] 胞

[0575] 为了鉴定GPC老化的转录伴随物,首先使用大量和单细胞RNA-seq来表征源自妊娠中期的胎儿人组织的hGPC,无论是通过靶向PDGFR α 的CD140a表位分离还是通过单克隆抗体

A2B5识别的神经胶质神经节苷脂分离。为此,进行了两个样品匹配实验,其中将18-22周胎龄(g.a.)胎儿脑的脑室/脑室下区(VZ/SVZ)解离并通过荧光激活细胞分选(FACS)进行分选,用于从同一胎儿脑分离的CD140a⁺和A2B5⁺/PSA-NCAM⁻(A2B5⁺)GPC(n=3),或用于CD140a⁺GPC以及CD140a耗尽的剩余部分(n=5;图25A)。

[0576] 然后生成大量RNA-Seq文库,并对两个实验进行深度测序。主成分分析(PCA)显示CD140a⁺和A2B5⁺细胞的分离,以及两者从CD140a耗尽的样品中的进一步分离(图25B,图31A-B)的仅[效应细胞加靶细胞]的孔相比,对%细胞毒性进行了定量。在两个配对群组(p<0.01,绝对log₂倍数变化>1)中的差异表达将723个基因鉴定为在CD140a⁺GPC和A2B5⁺GPC之间差异表达(CD140a中435个,A2B5中288个)。相比之下,2,629个基因将CD140a⁺GPC与CD140a⁻细胞区分开(图25C和图31C至图31D)。当CD140⁺与A2B5⁺或CD140⁻细胞比较时,差异基因表达方向性高度一致,除了4个基因之外所有基因都是一致的(图31E)。

[0577] 使用Ingenuity Pathway Analysis(IPA)对这两个基因集的途径富集分析确定了在CD140⁺GPC中相对具有活性的相似途径;这些途径包括细胞运动、少突胶质细胞分化、脂质合成和下游PDGF、SOX10和TCF7L2信号传导(图25)。如所预期的,当比较CD140a⁺GPC与CD140a⁻细胞而不是与A2B5⁺GPC时,通常观察到更强的激活Z得分。有趣的是,CD140a⁺细胞还差异表达了与免疫系统相关的许多途径,这可能是由于小胶质细胞表面上PDGFaR表位的重新表达导致的少量小胶质细胞污染。A2B5⁺样品另外显示上调的ST8SIA1,该酶负责A2B5合成以及促神经途径。

[0578] 在CD140a⁺分离物中差异上调的基因是PDGFRA本身,以及许多早期少突胶质细胞基因,包括OLIG1、OLIG2、NKX2-2、SOX10和GPR17(图25E至图25F)。此外,CD140a⁺级分还表现出晚期髓鞘生成相关基因的表达增加,这些基因包括MBP、GAL3ST1和UGT8。除了富集少突胶质细胞谱系,许多通常与小胶质细胞相关的基因也在CD140a分离物中富集,包括CD68、C2、C3、C4和TREM2。相比之下,A2B5⁺分离物表现出星形胶质细胞(AQ4、CLU)和早期神经元(NEUROD1、NEUROD2、GABRG1、GABRA4、EOMES、HTR2A)基因的富集,这表明A2B5由未成熟星形胶质细胞和神经元以及GPC和少突胶质细胞谱系细胞表达。总的来说,当每一者与耗尽的级分比较时,CD140a⁺GPC中少突胶质细胞富集显著高于A2B5定义的GPC,这表明CD140a分离物在hGPC中更富集,因此CD140a是与成人hGPC进行头对头比较的更合适表型。

[0579] 实施例B2—单细胞RNA测序揭示了人胎儿GPC分离物内的细胞异质

[0580] 性

[0581] 为了在单细胞分辨率下进一步描述胎儿hGPC分离物的组成,发明人通过FACS从20周的g.a.胎儿VZ/SVZ中分离了CD140a⁺和A2B5⁺hGPC,然后通过单细胞RNA-Seq分析了每一者的转录组(图25A,10X Genomics V2)。发明人试图捕获每一者的>1,000个细胞;在过滤低质量细胞(独特基因<500,线粒体基因百分比>15%)后,发明人留有1,053个PSA-NCAM⁻/A2B5⁺高质量细胞和957个CD140a⁺高质量细胞(每个细胞中值6,845个独特分子标识符和2,336个独特基因;图32)。通过均匀流形近似投影(UMAP)降维,接着使用Seurat(Butler等人,2018年)对所有细胞进行基于共享最近邻模块化的聚类,揭示了具有8种原代细胞类型的11个簇,如通过它们的标记基因的差异富集所定义的。这些原代细胞类型包括:GPC、前GPC、神经祖细胞(NPC)、未成熟神经元、神经元、小胶质细胞、以及由内皮细胞和周细胞组成的簇。发现CD140a⁺FACS分离物比胎儿A2B5⁺/PSA-NCAM⁻细胞对GPC和前GPC群体的富集更强(图

26A至图26D,图33A-C)的仅[效应细胞加靶细胞]的孔相比,对%细胞毒性进行了定量。此外,尽管CD140a分选的细胞主要限于GPC和前GPC,仅有分散的小胶质细胞污染,但A2B5+/PSA-NCAM-分离物还包括星形胶质细胞和神经元谱系细胞,尽管神经元PSA-NCAM前期耗尽也包括神经元谱系细胞(图33A至图33C)。这些数据支持CD140a比基于A2B5的GPC分离具有更高的选择性和表型限制性。

[0582] 在此基础上,发明人接下来探索了CD140a+胎儿分离物、GPC和前GPC中主要细胞群的基因表达谱(图33B)。这两个池之间的差异表达产生269个(143个上调,126个下调; $p < 0.01$, \log_2 倍数变化 > 0.5 ;图26E)。在前GPC到GPC转变期间,早期少突胶质细胞谱系基因迅速上调(OLIG2、SOX10、NKX2-2、PLLP、APOD),而在前GPC中表达的基因基本上消失了(VIM、HOPX、TAGLN2、TNC)。有趣的是,当细胞转变到GPC阶段时,参与人白细胞抗原系统的基因(包括HLA-A、HLA-B、HLA-C和B2M)都下调(图26F)。IPA分析表明,前GPC相对富集与迁移、增殖和那些预示星形胶质细胞同一性相关的项(BMP4、AGT和VEGF信号传导),而GPC除了MYC和MYCN途径的激活之外,还显示与获取少突胶质细胞同一性相关的项(PDGF-AA、FGFR2、CCND1)的富集(图26G)。使用单细胞共表达数据以及使用SCENIC包的启动子基序富集(Aibar等人,2017年),发明人随后鉴定了262种转录因子,预测这些转录因子在GPC中比在前GPC中相对激活(Wilcoxon秩和检验, $p < 0.01$)。这些转录因子包括SATB1,以及早期的GPC特化因子OLIG2、SOX10和NKX2-2(图26H)。

[0583] 实施例B3—成人和胎儿GPC在转录上不同

[0584] 我们接下来询问成人hGPC与胎儿hGPC在转录上有何不同。为此,A2B5+hGPC从手术切除的成人颞新皮层(19-21岁, $n = 3$)分离,评估它们的大量RNA表达,并与另外四个胎儿CD140a+样品配对。先前已注意到,考虑到成人hGPC中PDGFRA表达的成熟相关下调,A2B5选择足以从成人脑中分离GPC,并且在该方面比CD140a更敏感(Sim等人,2006年;Windrem等人,2004年)。证实了先前的观察,在此发现A2B5+成人GPC中PDGFRA以中值TPM为0.55表达,而在胎儿A2B5+细胞中PDGFRA以中值TPM为47.56表达。通过将测序和分析与胎儿CD140a选择的细胞配对,发明人能够回归测序批次效应,同时增加幂(图27A)。对于成人hGPC样品来说,不需要耗尽PSA-NCAM+细胞,因为PSA-NCAM在成人皮层和白质中停止表达(Seki和Arai,1993年)。结果,成人和胎儿GPC的PCA显示成人GPC的紧密聚集,从两种分选的胎儿hGPC池中明显分离(图27B)。与A2B5+或CD140a+胎儿GPC群体相比,成人GPC的差异表达分别产生3,142个和5,282个显著基因($p < 0.01$;绝对 \log_2 倍数变化 > 1) (图27C)。为了提高确定差异表达的准确性,对交叉的2,720个基因进行下游分析(图27D,与胎儿hGPC相比,成人GPC中有1,060个基因上调和1,660个基因下调)。值得注意的是,在这两个差异表达的基因集中,100%的基因方向一致。

[0585] 为了更好地理解成人和胎儿GPC之间的差异,发明人接下来构建了非冗余显著的IPA项及其贡献的差异表达基因的基因本体网络(图27D至图27E)。该网络的自旋玻璃社区检测揭示了高度连接的函数项(图27E)和基因(图27F)的三个模块(模块M1-M3)。M1包括与神经胶质发育、增殖和运动相关的项和基因。值得注意的是,许多与GPC个体发育相关的基因在成人GPC中下调;这些包括CSPG4/NG2、PCDH15、CHRDL1、LMNB1、PTPRZ1和ST8SIA1。相比之下,在少突胶质细胞分化和髓鞘形成之前和之后出现的许多基因在成人GPC中上调,包括MAG、MOG、MYRF、PLP1、CD9、CLDN11、CNP、ERBB4、GJB1、PMP22和SEMA4D。

[0586] 模块2具有许多与细胞老化以及增殖和衰老的调节相关的项。由于增殖因子(包括MKI67、TOP2A、CENPF、CENPH、CHEK1、EZH2和许多细胞周期蛋白(包括CDK1和CDK4))的强烈富集,预测胎儿GPC中的细胞周期进程和有丝分裂被激活。此外,还推断增殖诱导途径被激活;这些途径包括MYC、CCND1和YAP1信号传导,其中YAP1和MYC转录物类似地上调。在这方面,最近研究表明,MYC在老年啮齿动物GPC中的瞬时过表达恢复了它们增殖和分化的能力。相反,成人GPC表现出衰老相关转录物的上调,该衰老相关转录物包括E2F6、MAP3K7、DMTF1/DMP1、OGT、AHR、RUNX1和RUNX2。同时,成人hGPC表现出胎儿转录物的下调,该胎儿转录物包括LMNB1、PATZ1、BCL11A、HDAC2、FN1、EZH2和YAP1及其辅因子TEAD1。因此,预测在成人hGPC中活跃的函数项包括衰老、在哈钦森-吉尔福德早衰症中观察到的衰老的快速发作,以及CDKN1A/p21和CDKN2A/p16下游的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制途径。此外,AHR及其信号传导途径(通过抑制MYC而参与驱动衰老)在成人GPC中类似地上调。

[0587] 模块3主要由也与衰老相关的发育和疾病关联的信号传导途径组成。这包括胎儿hGPC中ASCL1和BDNF信号传导以及成人GPC中MAPT/Tau、APP和REST信号传导的预测激活。总之,成人GPC的转录和功能谱揭示了与增殖能力相关的转录物的减少,以及向衰老和更成熟表型的转变。

[0588] 实施例B4—转录因子活性的推断涉及成人GPC转录阻遏物

[0589] 考虑到成人和胎儿GPC之间的显著转录差异,发明人接下来询问发明人是否可推断哪些转录因子指导其身份。为了实现这一点,本发明人首先扫描了成人或胎儿富集的GPC基因集的两个启动子窗口(500bp上调/100bp下调,10kb上调/10kb下调)以推断显著富集的TF基序。这确定了在扫描的交叉数据集中也差异表达的48种TF(图34)。在这些因子中,发明人重点关注其DNA相互作用的主要方式完全是抑制性或刺激性的TF,同时也考虑了其已知辅因子的富集。这一分析产生了12个潜在的上游调节因子以探索(图28A至图28C):4种成人阻遏物,E2F6、ZNF274、MAX和IKZF3;1种成人激活物,STAT3;3种胎儿阻遏物,BCL11A HDAC2和EZH2;和4种胎儿激活物,MYC、HMGA2、NFIB和TEAD2。有趣的是,在这些预测的TF中,3组在其靶向启动子内具有高度一致性的基序相似性:1) E2F6、ZNF274、MAX和MYC;2) STAT3和BCL11A;和3) EZH2和HDAC2,表明它们可在共享基因座处协作或竞争DNA结合(图28A和图34)。

[0590] 我们接下来基于精选的转录相互作用构建了四种潜在的信号传导途径,以预测该组TF靶向的那些基因(图28D-G)的仅[效应细胞加靶细胞]的孔相比,对%细胞毒性进行了定量。在富含胎儿GPC的激活物(图28D)中,MYC(增殖因子)、NFIB(胶质细胞生成的关键决定因子)、TEAD2(YAP/TAZ效应子)和HMGA2(另一种增殖因子)各自被预测用于激活祖细胞阶段基因的群组,包括有丝分裂相关的转录物和被证明抑制衰老开始的基因。还预测这四种胎儿激活物之间存在直接的正调节,其中NFIB由HMGA2和TEAD2驱动,MYC由TEAD2和NFIB驱动,HMGA2由MYC和TEAD2驱动,并且TEAD2由MYC相反地驱动(图28D)。与这些胎儿激活物相反,胎儿阶段阻遏物(包括C2H2型锌指BCL11A、多梳抑制复合物亚基EZH2和组蛋白脱乙酰酶HDAC2)各自被预测抑制在该阶段更成熟的少突胶质细胞基因表达(图28E)。此外,预测所有这三种TF均抑制参与衰老的靶标。因此,这些因子似乎直接协调下游转录事件,从而维持循环祖细胞状态。

[0591] 我们接下来评估了这些预测的成人GPC信号传导网络的负责其年龄相关的基因表

达变化的潜在机制。预测STAT3通过一大群早期分化和髓鞘形成相关的少突胶质细胞基因的上调而将GPC同一性转向神经胶质成熟(图28F)。此外,还推断STAT3激活一组衰老相关基因,包括BIN1、RUNX1、RUNX2、DMTF1、CD47、MAP3K7、CTNNA1和OGT。同时,预测成人GPC中的抑制通过Ikaros家族锌指IKZF3/Aiolos、KRAB(Kruppel相关盒)锌指ZNF274、MYC相关因子MAX和细胞周期调节因子E2F6实现(图28G)。通过这组转录因子进行靶向预测了对胎儿GPC特征有贡献的那些基因集的抑制,并且这确实在早期祖细胞基因PDGFRA和CSPG4以及细胞周期性基因CDK1、CDK4和MKI67的下调中观察到。也预测了YAP1、LMNB1和TEAD1的抑制,它们的表达减缓或防止了衰老的开始。有趣的是,除了胎儿富集阻遏物BCL11A、EZH2和HDAC2外,这组四种成人阻遏物还预测了胎儿富集激活物NFIB、MYC、TEAD2和HMGA2中每一者的下调的表达。

[0592] 实施例B5—成人富集的阻遏物的表达诱导GPC中年龄相关的转录变

[0593] 化

[0594] 我们接下来询问在图28G中鉴定的四种成人富集的转录阻遏物,即E2F6、IKZF3、MAX和ZNF274是否单独足以诱导年轻GPC在基因表达中年龄相关的变化。为了实现这一点,发明人针对每种转录因子设计了多西环素(Dox)诱导型过表达慢病毒(图29A)。

[0595] 简言之,发明人首先确定了每种阻遏物在成人GPC中最丰富的蛋白质编码同种型,以便最好地模拟内源性年龄相关上调;这些候选物是E2F6-202、IKZF3-217、MAX-201和ZNF274-201(图35)。这些cDNA被克隆到四环素应答元件启动子的下游和T2A自切割EGFP报告基因的上游(图29A)。然后将先前在Wang等人,2013年,Cell Stem Cell,第12卷,第252-264页所述的从C27系制备的人诱导多能干细胞(iPSC)-衍生的hGPC培养物感染24小时,然后用Dox处理以诱导转基因过表达。选择C27 iPSC衍生的GPC是因为它们的转录组类似于胎儿GPC的转录组(图36),并且它们在移植后同样能够移植到髓鞘形成障碍的小鼠并形成髓鞘。在添加Dox后的第3、7和10天,通过FACS选择过表达的细胞进行EGFP表达(图29B, n=3-5)。给予Dox的未感染培养物用作对照。

[0596] 提取RNA并通过qPCR分析感兴趣的衰老相关基因。在Dox补充后的每个时间点观察到每种成人富集的阻遏物的显著诱导(图29C)。MKI67和CDK1,即其上调与活跃细胞分裂相关的基因,在每个过表达范例中在两个或更多时间点被显著抑制(图29D)。这与它们在成人GPC中的减少表达一致(图27F),并表明它们受到E2F6、MAX和ZNF274(MKI67)或所有四种(CDK1)直接抑制。在IKZF3转导的GPC中且在两个时间点以及在E2F6转导的GPC中且在第3天,PDGF-AA的同源受体GPC阶段标记物PDGFRA也被显著抑制,这与其在正常成人GPC中的抑制一致。有趣的是,衰老相关的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂CDKN1A/p21在所有时间点响应于每种测试的阻遏物上调,而CDKN2A/p16在ZNF274转导的hGPC中且在所有时间点以及在过表达E2F6的GPC中且在第7天类似地上调(图29D)。此外,MBP和IL1A(两者均在成人hGPC中相对于胎儿hGPC强烈上调)均表现出响应于阻遏物转导而上调表达的急剧趋势,尽管时间点相关的变异性阻止了它们的增量达到统计学显著性。总之,这些数据支持了这样的预测:成人富集的GPC阻遏物E2F6、IKZF3、MAX和ZNF274的强制过早表达足以在年轻的iPSC衍生GPC中诱导老化的GPC转录组的多种特征。

[0597] 实施例B6—胎儿hGPC的miRNA表达模式预测了它们衰老的抑制

[0598] 为了鉴定基因表达的潜在转录后调节因子,发明人利用Affymetrix GeneChip

miRNA 3.0阵列评估了成人和胎儿GPC (n=4) 之间miRNA表达的差异。PCA显示了两种GPC群体的分离,如其miRNA表达谱所定义的那样(图30A)。两个年龄之间的差异表达(经调整的p值<0.01)产生56个基因(23个富集在成人GPC中,33个富集在胎儿GPC中,图30B至图30C)。在这些差异表达的miRNA中值得注意的是成人少突胶质细胞调节因子miR-219a-3p和miR-338-5p (Dugas等人,2010年;Wang等人,2017年),胎儿祖细胞阶段miRNA miR-9-3p、miR-9-5p (Lau等人,2008年)和miR-17-5p (Budde等人,2010年)除外。

[0599] 我们接下来利用该miRNA群组来预测可能预期会通过miRNA上调抑制其表达的基因,分别分析了成人和胎儿GPC池。为了实现这一点,使用miRnAtap查询五个miRNA基因靶数据库:DIANA (Maragkakis等人,2011年)、Miranda (Enright等人,2003年)、PicTar (Lall等人,2006年)、TargetScan (Friedman等人,2009年)和miRDB (Wong和Wang,2015年)。为了最大限度地提高精确度,只有出现在至少两个数据库中的基因才被视为靶标。在胎儿富集的miRNA中,该方法预测每个miRNA平均有36.3 (SD=24.5) 个被抑制的基因。相反,在成人hGPC富集的miRNA中,预测每个miRNA平均有46.4个 (SD=37.8) 个基因作为靶标(图30C)。总之,这确定了通过胎儿miRNA对48.8%的成人GPC富集基因的潜在抑制,以及通过成人miRNA对39.9%的胎儿GPC富集基因的抑制。

[0600] 为了评估这些miRNA依赖性转录后调节机制的功能重要性,发明人根据功能相关的差异表达基因的miRNA靶向来精选胎儿和成人网络(图30D至图30E)。所提出的上游成人转录调节因子STAT3、E2F6和MAX预测通过胎儿GPC中的7种miRNA受抑制(图30D);这些包括在其他细胞类型中已验证通过miR-126b-5p、miR-106a-5p、miR-17-5p、miR-130a-3p和miR-130b-3p对STAT3的抑制 (Du等人,2014a;Jiang等人,2020年;Zhang等人,2020年;Zhang等人,2013年;Zhao等人,2013年)。与此同时,许多早期和成熟少突胶质细胞基因同时被靶向抑制,所有都与祖细胞状态的维持一致;这些基因包括MBP、UGT8、CD9、PLP1、MYRF和PMP22 (Goldman和Kuypers,2015年)。重要的是,与衰老的诱导或增殖的抑制或两者都相关的一组基因也被预测在胎儿GPC中受到主动抑制。这些基因包括RUNX1、RUNX2、BIN1、DMTF1/DMP1、CTNNA1、SERPINE1、CDKN1C、PAK1、IFI16、EFEMP1、MAP3K7、AHR、OGT、CBX7和CYLD (Eckers等人,2016年;Elliott等人,1999年;Ferrand等人,2015年;Hu等人,2019年;Inoue和Sherr,1998年;Jiang等人,2017年;Kilbey等人,2007年;Lee和Zhang,2016年;Li等人,2015年;Mademtoglou等人,2018年;Mikawa等人,2014年;Ni等人,2017年;Wotton等人,2004年;Xin等人,2004年;Zhang和Guo,2018年)。衰老的抑制或增殖的激活也已通过本文鉴定的几种miRNA受到注意,这些miRNA包括miR-17-5p、miR-93-3p、miR-1260b、miR-106a-5p、miR-767-5p、miR-130a-3p、miR-9-3p、miR-9-5p和miR-130b-3p (Borgdorff等人,2010年;Gao等人,2019年;Meng等人,2017年;O'Loughlen等人,2015年;Shen等人,2015年;Su等人,2018年;Tai等人,2020年;Wang等人,2020a;Xia等人,2019年;Zhang和Guo,2018年)。总之,这些数据提供了一种补充机制,通过该机制胎儿的hGPC可维持它们的特征性祖细胞转录状态和特征。

[0601] 实施例B7—成人miRNA信号传导可抑制增殖祖细胞状态并预示衰老

[0602] 我们接下来检查了成人hGPC内潜在的miRNA调节网络(图30E)。这涉及控制五种鉴定的活性胎儿转录调节因子的五种miRNA,这五种活性胎儿转录调节因子包括HDAC2、NFIB、BCLL1A、TEAD2和HMGA2,其通过miR-4651的沉默先前已显示会抑制增殖 (Han等人,2020年)。预测该组miRNA在抑制与维持GPC祖细胞状态相关的基因表达方面与成人转录阻遏物平行

发挥作用,这些基因包括PDGFRA、PTPRZ1、ZBTB18、SOX6、EGFR和NRXN1。此外,预测成人miRNA环境抑制已知诱导增殖状态或延迟衰老的许多基因,包括LMNB1 (Freund等人,2012年)、PATZ1 (Cho等人,2012年)、GADD45A (Hollander等人,1999年)、YAP1和TEAD1 (Xie等人,2013年)、CDK1 (Diril等人,2012年)、TPX2 (Rohrberg等人,2020年)、S1PR1 (Liu等人,2019年)、RRM2 (Aird等人,2013年)、CCND2 (Bunt等人,2010年)、SGO1 (Murakami-Tonami等人,2016年)、MCM4和MCM6 (Mason等人,2004年)、ZNF423 (Hernandez-Segura等人,2017年)、PHB (Piper等人,2002年)、WLS (Poudel等人,2020年)和ZMAT3 (Kim等人,2012年)。更直接地,衰老的诱导或增殖的抑制与miR-584-5p (Li等人,2017年)、miR-193a-5p (Chen等人,2016年)、miR-548ac (Song等人,2020年)、miR-23b-3p (Campos-Viguri等人,2020年)、miR-140-3p (Wang等人,2020b)和miR-330-3p (Wang等人,2020b)的上调有关。总之,这些数据表明这些miR是维持胎儿hGPC祖细胞状态的积极参与者,并且它们的调节是成人hGPC呈现它们的标志性基因表达谱的可能机制。

[0603] 实施例B8—miRNA的转录因子调节建立和巩固GPC同一性

[0604] 我们接下来试图通过查询TransmiR转录因子miRNA调节数据库来预测胎儿和成人GPC中差异表达的miRNA的上游调节 (Tong等人,2019年)。该方法预测了56种年龄特异性GPC miRNA中的54种通过66种转录因子的调节,这些转录因子同样被类似地确定为在胎儿和成人GPC之间显著差异表达 (图37A)。有趣的是,预测的前四种miRNA调节TF都是MYC相关因子,包括MAX、MYC本身、E2F6和胎儿富集的MYC相关锌指蛋白MAZ,分别靶向36、33、30和28种独特的差异表达miRNA。

[0605] 在12种TF候选物的背景下对所提出的关系的检查 (图28) 表明,大量的胎儿hGPC富集的miRNA被预测为受到胎儿激活物和成人阻遏物两者靶向,而成人GPC中富集的那些miRNA被更独特地靶向 (图37B)。MYC被预测驱动多种miRNA在胎儿GPC中的表达,其中许多miRNA被预测在成年期通过E2F6、MAX或两者被抑制。特别是miR-130a-3p除了通过TEAD2激活外,还被预测为受到MYC、MAX和E2F6靶向。值得注意的是,在其他细胞类型中验证的TF-miRNA相互作用中,已经报道了MYC对再生miR-17-5p的上调,以及MAX对其的抑制 (Du等人,2014b;Hackl等人,2010年;Ji等人,2011年;O'Donnell等人,2005年)。类似地,已报道了MYC或TEAD2和YAP1对增殖性miR-130-3p的平行激活 (Shen等人,2015年;Wang等人,2020a;Yang等人,2013年),因为MYC已激活miR-9的两个臂 (Ma等人,2010a),这种激活随少突胶质细胞成熟而降低 (Lau等人,2008年)。

[0606] 在成人GPC中,预测由显著富集的TF群组调节的富集miRNA更可能仅被胎儿阻遏物的成人激活物靶向,其中仅miR-151a-5p和miR-4687-3p (预测的HMGA2抑制剂) 分别被STAT3对比BCL11A和EZH2靶向。除此之外,miR-1268b被预测为同时受到EZH2和HDAC2抑制。值得注意的是,预测关键的少突胶质细胞微RNA即miR-219a-2-3p在胎儿GPC中通过EZH2保持被抑制,而STAT3可能独立地驱动7种其他miR的表达。有趣的是,STAT3的活性增加与衰老有关 (Kojima等人,2013年),它还被预测为驱动与衰老诱导独立相关的一组miRNA的表达,这些miRNA包括miR-584-5p、miR-330-3p、miR-23b-3p和miR-140-3p。

[0607] 通过整合转录和miRNA谱、途径富集分析和靶预测,发明人提出了人GPC老化模型,其中胎儿hPGC维持祖细胞基因表达、激活增殖程序并防止衰老,同时通过微RNA转录地和转录后地抑制少突胶质细胞和衰老基因程序。随着成体成熟和时间的推移以及群体的倍增,

hGPC开始上调这些胎儿祖细胞连接网络的阻遏物,同时还激活程序以促进逐渐更分化并最终衰老的表型。

[0608] 实施例B9—Glial Explorer:用于查询人神经胶质转录表达的交互式

[0609] 数据库

[0610] 作为其他研究者的资源,发明人开发了一款Shiny应用程序(Chang等人)(可从GlialExplorer.org访问),该应用程序包括描述人神经胶质基因表达的数据库,包括大量和scRNA测序数据集,如本文和发明人的先前研究中所涵盖的。这包括健康人胚胎干细胞(hESC)衍生的GPC和星形胶质细胞以及来自亨廷顿病细胞(Osipovitch等人,2019年)的GPC和星形胶质细胞、健康诱导的多能干细胞(iPSC)衍生的GPC和星形胶质细胞以及来自精神分裂症患者(Windrem等人,2017年)的GPC和星形胶质细胞,以及从免疫缺陷嵌合小鼠中筛选出的髓鞘再生或静息胎儿衍生的GPC的谱(Windrem等人,2020年)。简言之,Glial Explorer允许简单地查询基因丰度(在所有上述数据集中)。此外,还可以探索剪接变体的丰度。最后,scRNA-Seq数据可通过生成特征图和小提琴图来详细描述。目的是该应用程序及其包含的数据库应使感兴趣的研究者能够快速调查他们感兴趣的基因,并交互地评估它们在人神经胶质个体发育和衰老中的调节和作用。更详细的表达谱信息托管在可从ctngoldmanlab.genialis.com访问的基因组数据库中。

[0611] 讨论

[0612] 人神经胶质祖细胞首次出现在人发育的妊娠中期,此后池一直存在于整个生命过程中。在早期发育和年轻时,这些祖细胞高度增殖并自我更新。然而,随着年龄的增长,以及在先前的脱髓鞘和白质疾病的情况下,它们分裂和补充损失的髓磷脂的能力显著下降。鉴于鼠和人神经胶质之间的进化差异,在评估这种扩增潜力丧失的基础时,询问人神经胶质非常重要,以便确定与最具治疗相关性的靶标。因此,发明人采用FACS和MACS分离的胎儿和成人GPC的大量RNA测序策略,以及直接从人脑分离的胎儿GPC的scRNA测序,以更准确地跟踪感兴趣的群体中的不同转录变化,同时抵抗潜在的脱靶细胞类型污染物。这提供了一组基因,其表达将人胎儿GPC与它们的老年继代区分开,并且其提示了对早期和终末少突胶质细胞分化的进行性偏倚。这种观察结果与先前的啮齿动物GPC基因表达和蛋白质组数据一致,该数据指出祖细胞标记物诸如CSPG4、PDGFRA和PTPRZ1的下调与早期少突胶质细胞标记物诸如MBP、CNP和MOG的上调相同。重要的是,发现这些相同的成人GPC获取了指示增殖能力丧失的表达特征,同时衰老相关基因整体上调

[0613] 我们的分析预测,在胎儿GPC中富集其表达的MYC通过其对一组下游基因和miRNA的转录调节,协同地和正向地调节有丝分裂能力和细胞周期性,成为人GPC增殖能力的中心调节因子。MYC先前已被鉴定为通过激活CDK1而成为对鼠GPC的表观遗传景观和增殖的重要调节因子。此外,MYC最近被广泛研究为成年鼠GPC的促有丝分裂剂和它们衰老的抑制剂,其功能与发明人在人GPC中鉴定的抑制性网络的MYC调节靶标一致。事实上,本文所述的模型表明,在成人GPC中不仅直接抑制MYC,还直接抑制其许多靶标。有趣的是,已报道IKZF3直接抑制前B细胞中的MYC,从而限制其增殖能力。对于其部分,MAX可与MYC复合以抑制其功能并改变其转录靶标。此外,MAX和E2F6均可竞争性靶向MYC结合位点,E2F6通常抑制的E2F位点除外。据报道,MYC的下调也跟随AHR和BIN1的上游激活,这两种基因中的每一者在成人GPC数据集中均上调。预测MYC也激活胎儿GPC中的miRNA整体,预测其中许多miRNA在成人GPC中

受到E2F6和MAX反向调节。其中有miR-9以及miR-130a-3p,它们中的每一者先前已与延缓衰老有关。

[0614] 有趣的是,还预测miR-130a-3p抑制另一种高活性成人GPC转录激活物STAT3,其表达是神经胶质发育、髓鞘再生所必需的,并且被认为是衰老的驱动因素。事实上,STAT3的miRNA-130a-3p抑制延缓了肾小管上皮细胞的衰老,这是由二甲双胍驱动的,二甲双胍是同样表现出增强老年大鼠GPC髓鞘再形成的药物。此外,暴露于条件培养基后,STAT3表达可在GPC中增加,该条件培养基取自iPSC衍生的神经祖细胞的培养物,该培养物由患有原发性进行性多发性硬化症的患者产生。除此之外,发明人预测了一组miRNA的STAT3激活,该组miRNA包括miR-23b-3p,即衰老间充质干细胞上调程度最高的miR。

[0615] 对miR差异表达数据的进一步评估揭示了许多准备调节胎儿和成人GPC转录的转录后调节机制。这包括在成人hPGC中少突胶质细胞成熟的充分研究的调节因子miR-219和miR-338的上调,这与成人GPC的更成熟的少突胶质细胞转录特征一致。在这方面,与健康对照相比,成人GPC富集的miRNA即miR-338-5p、miR-219a-2-3p和miR-584-5p,先前都被报道为是多发性硬化症(MS)患者白质中的最高度上调的miR之一。因此,发现在MS白质中下调的那些miRNA即miR-130a-3p、miR-9-3p、miR-9-5p在成人hGPC miRNA小组中也下调。本文的分析还预测了包括miR-17-5p和miR-93-3p的几种另外的miRNA参与维持胎儿GPC的祖细胞状态,而预测miR-584-5p、miR-330-3p、miR-23b-3p和miR-140-3p促进成人GPC的衰老。

[0616] 据推测,成人hGPC的异质性在成人脑中以区域特异性的方式增加,因此,未来的研究将需要结合多个区域的scRNA测序,并与空间转录组学配合使用,以更好地了解正常神经胶质老化的区域地理学及其与神经元活动和血管健康的关系。然后,需要在疾病(神经退行性和髓鞘形成障碍)情况下与神经胶质老化相关的转录,以评估病理学与正常衰老的相互作用,以及老化细胞对它们可能暴露于的多种疾病过程的应答。在这方面,解释GPC老化的非细胞自主驱动因素(诸如局部血管灌注和星形胶质细胞支持减少)对神经胶质细胞老化和衰老的影响至关重要。总之,考虑到年轻和老化的hGPC之间的明确区别,以及发明人已经描述的它们的转录组可通过机制调节的程度,现在似乎可行的目标是将老化的人GPC安全地再生为更有扩增能力和表型延展性的表型,使它们能够更有效地补偿衰老和成人白质疾病的不良影响。

[0617] 应当理解,上述公开的变型和其他特征和功能或其替代方案可组合到许多其他不同的系统或应用中。本领域技术人员随后可做出各种目前未预见或未预期的替代、修改、变化或改进,这些也旨在由所附权利要求涵盖。

[0618] 上述实施例和优选实施方案的描述应当被认为是说明性的,而不是限制由权利要求书限定的本公开。如将容易理解的,在不背离根据权利要求书中所阐述的本公开的情况下,可利用上文所阐述的特征的许多变化和组合。此类变化不被认为是脱离本公开的范围,并且所有此类变化都旨在被包括在所附权利要求书的范围内。本文引用的所有参考文献都以引用方式整体并入本文。

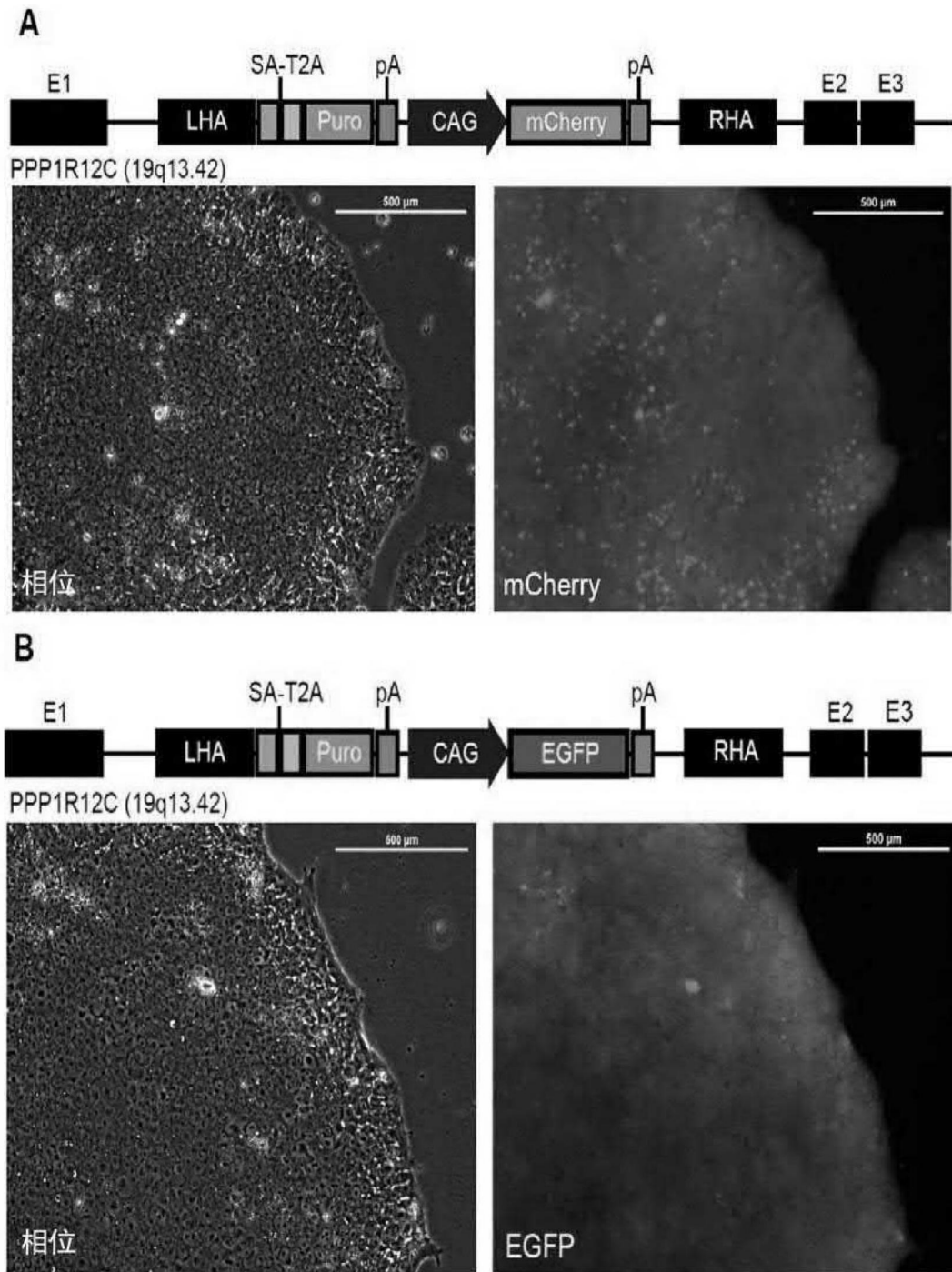


图1A至图1B

C

细胞系	HTT CAG长度	转基因插入物	同胞匹配
GENEA019 (WT-mCherry)	18; 15	Puro-CAG-mCherry	
GENEA020 (HD-EGFP)	48; 17	Puro-CAG-EGFP	

D

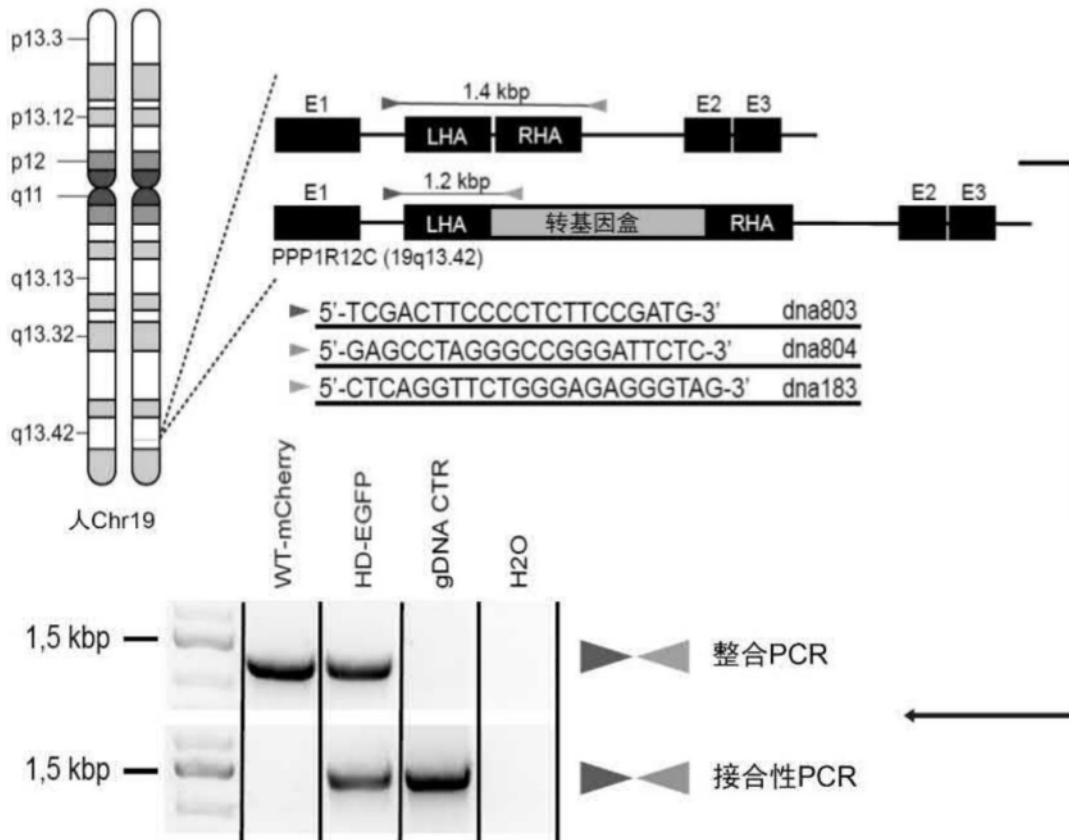


图1C至图1D

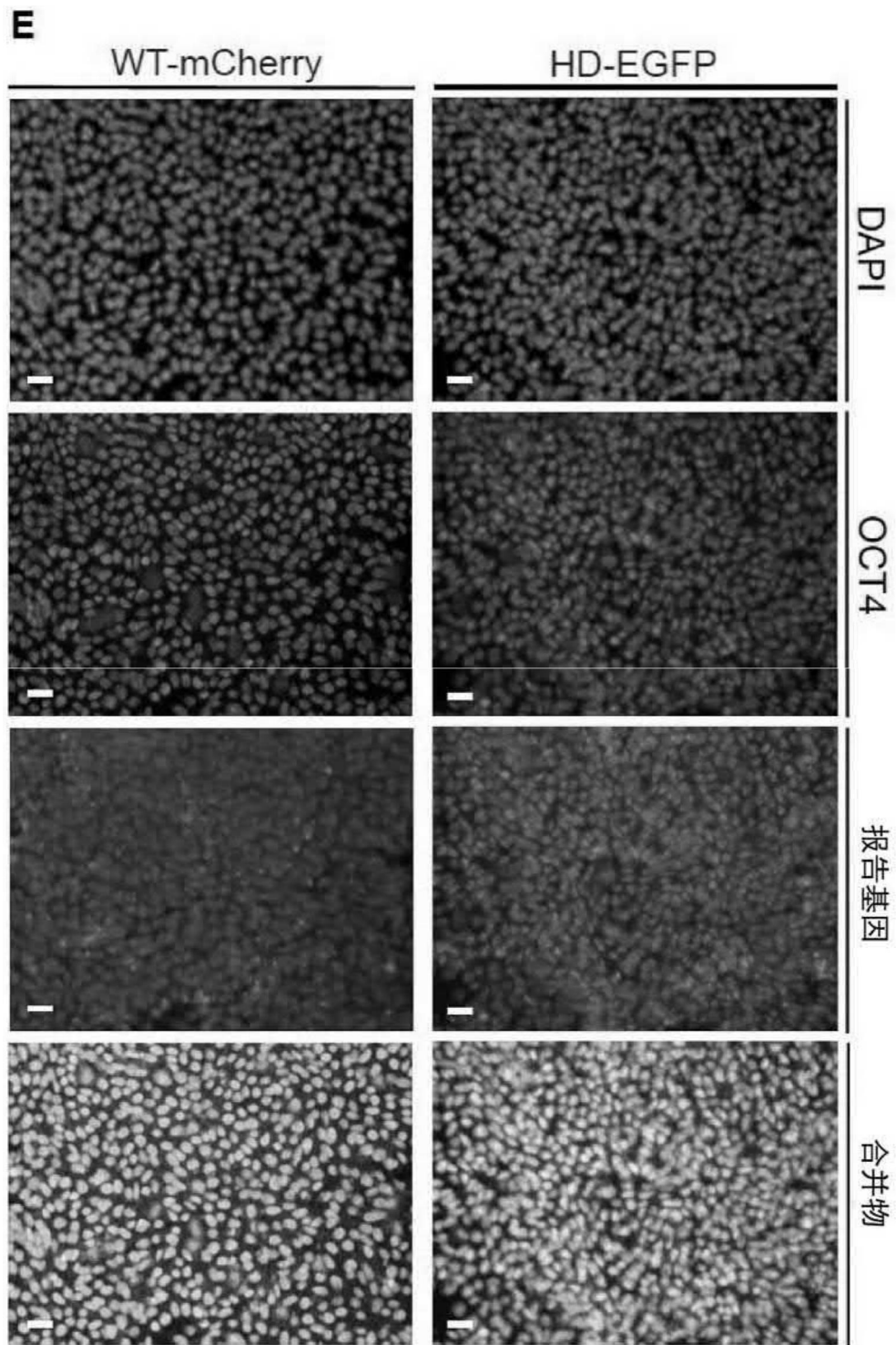


图1E

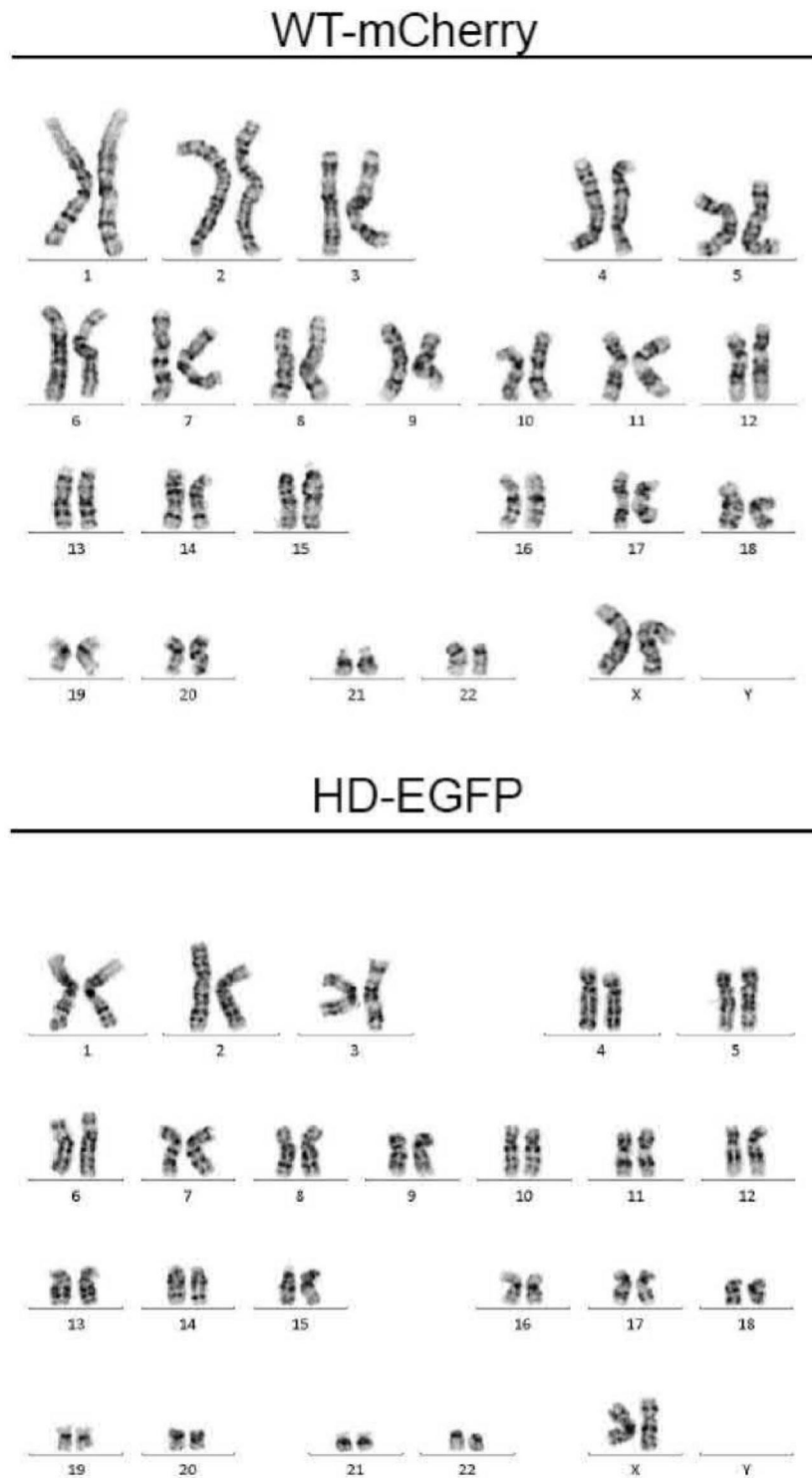


图2A

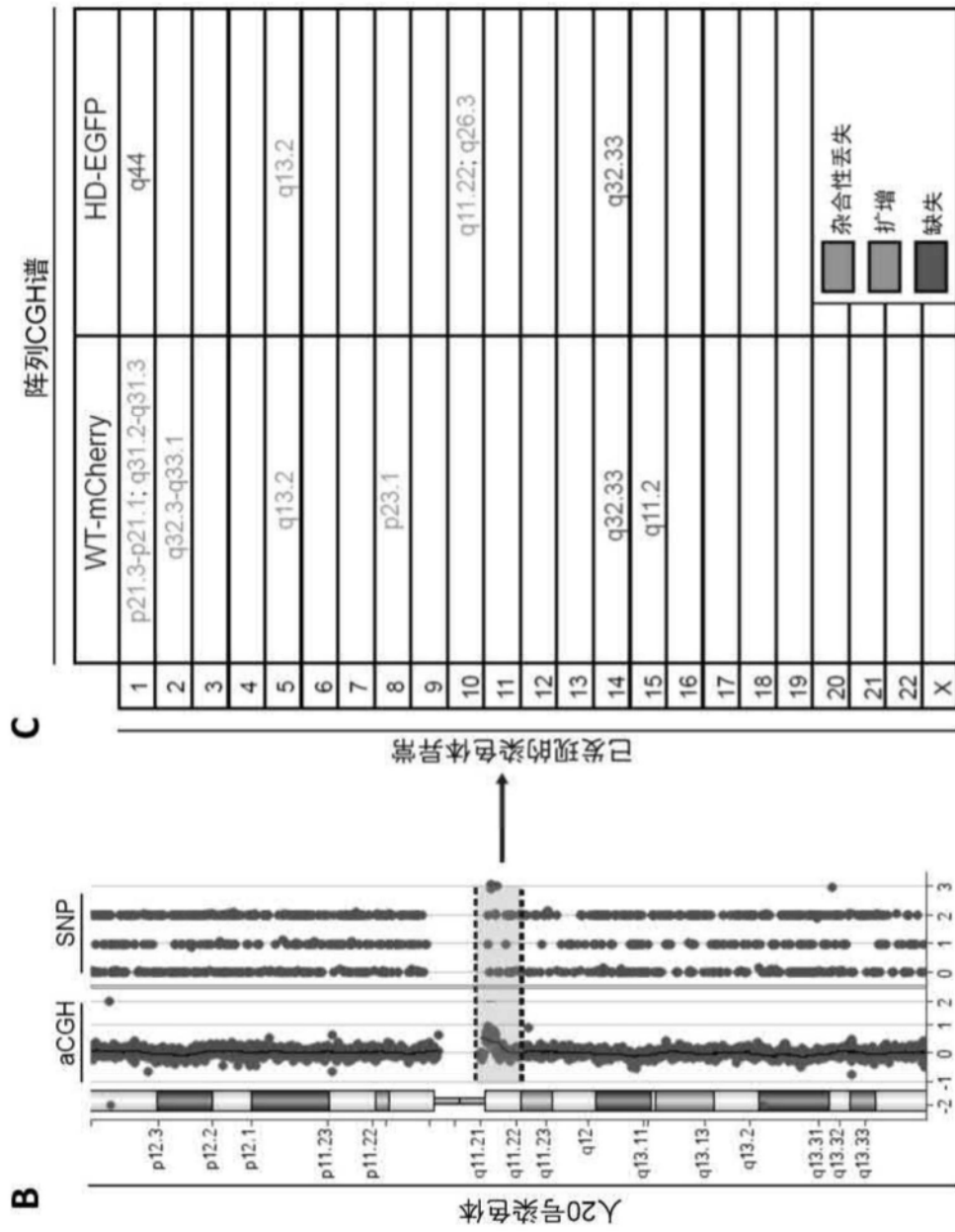


图2B至图2C

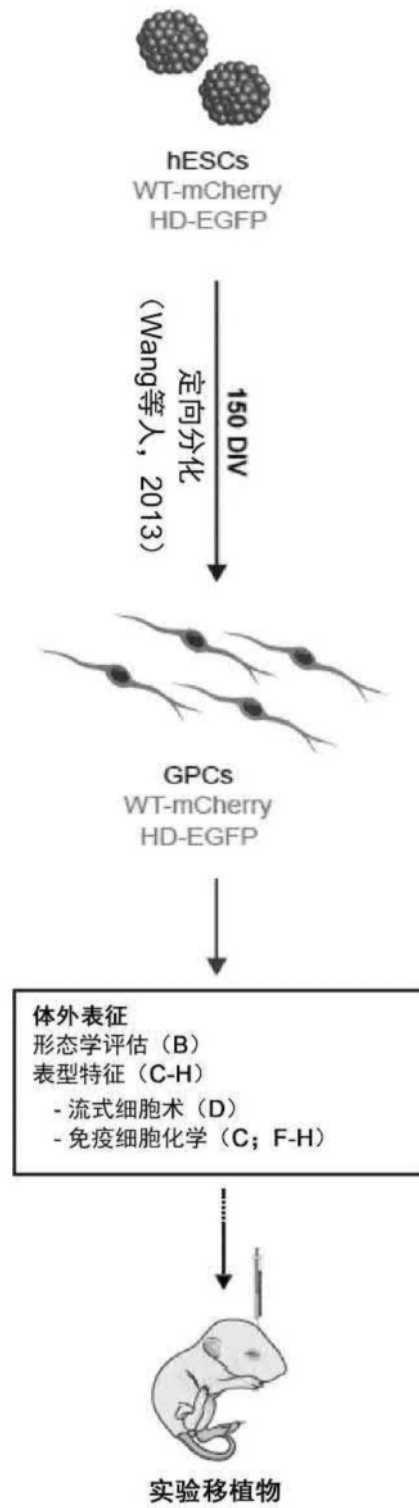


图3A

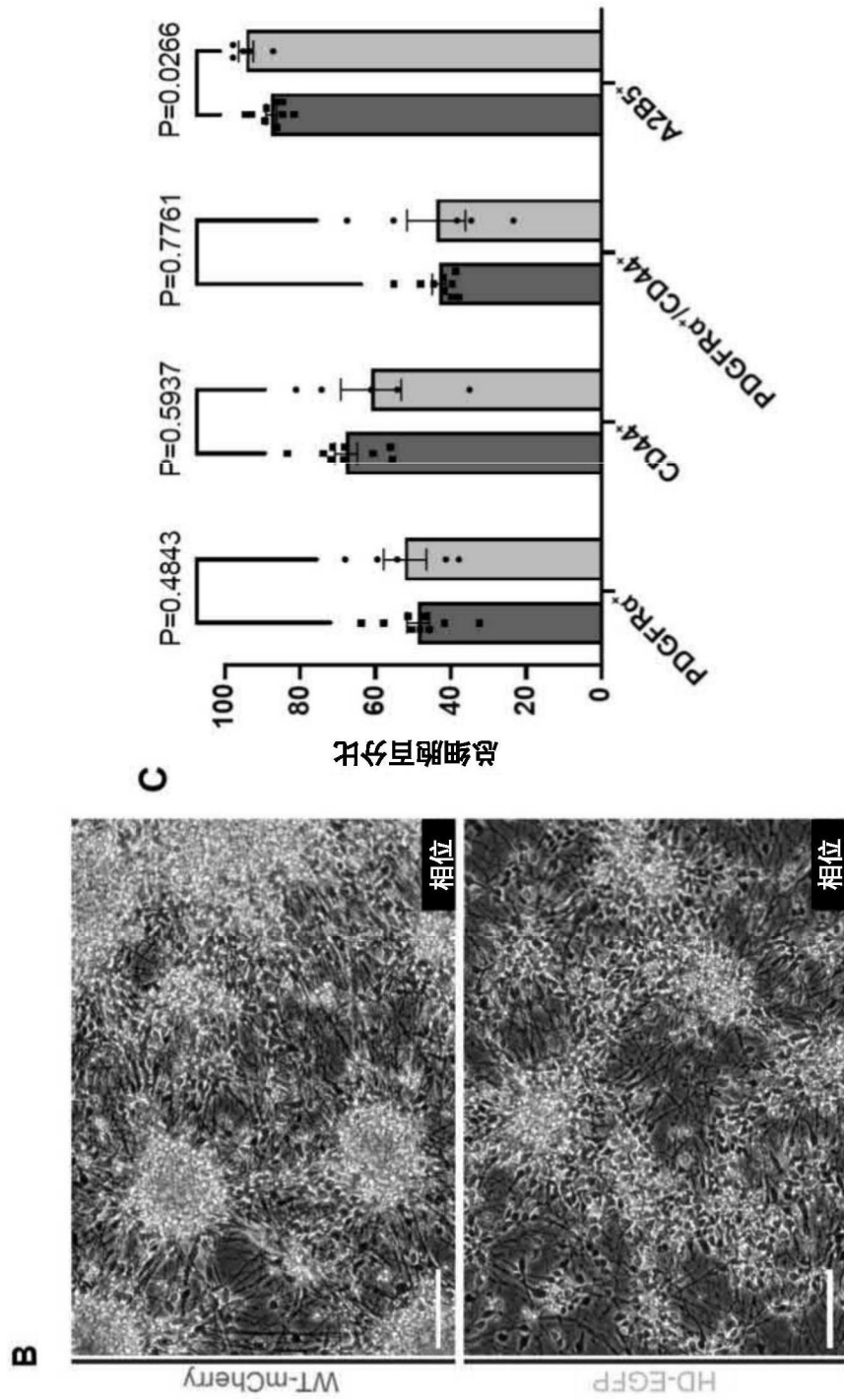


图3B至图3C

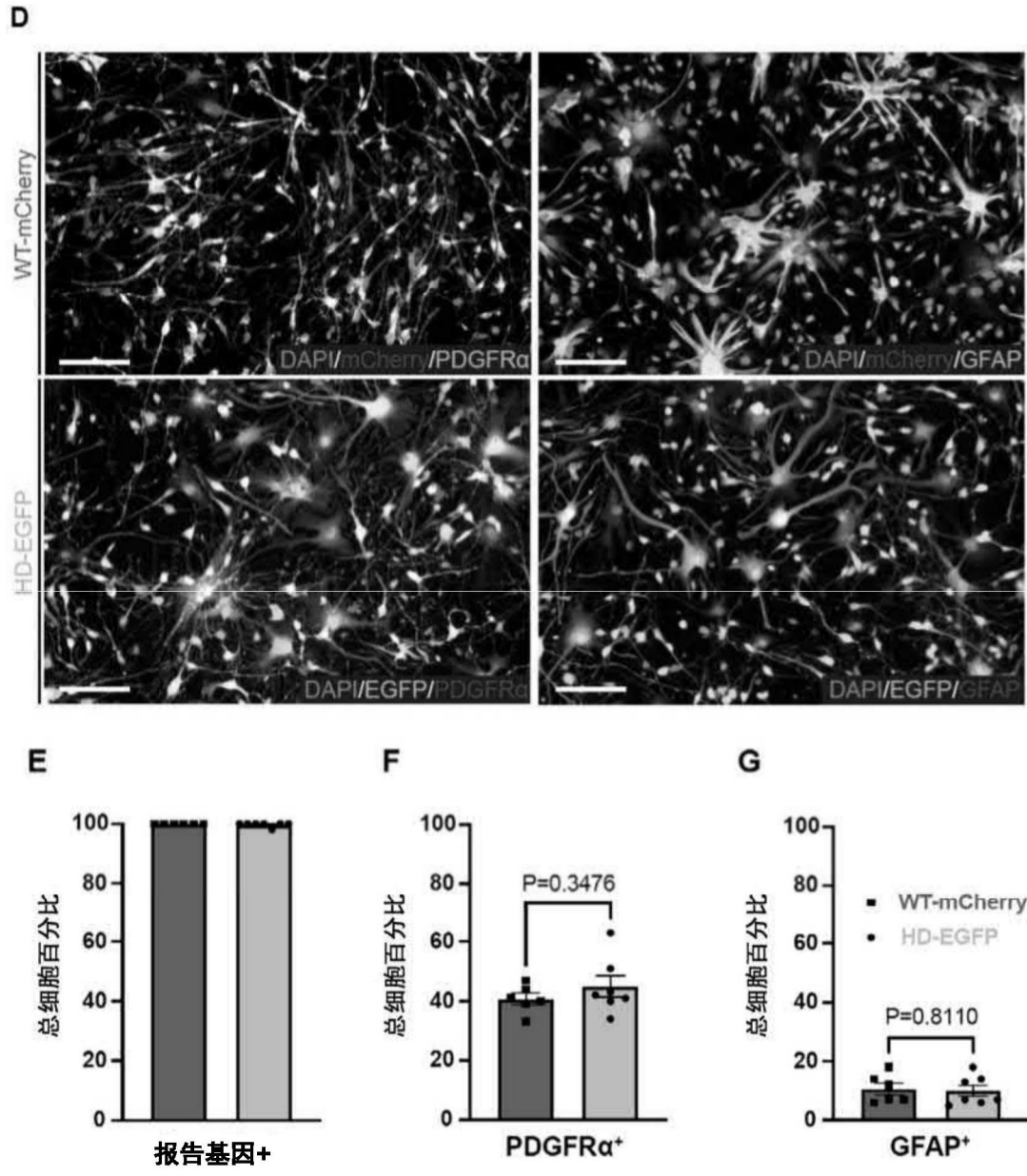


图3D、图3E、图3F、图3G

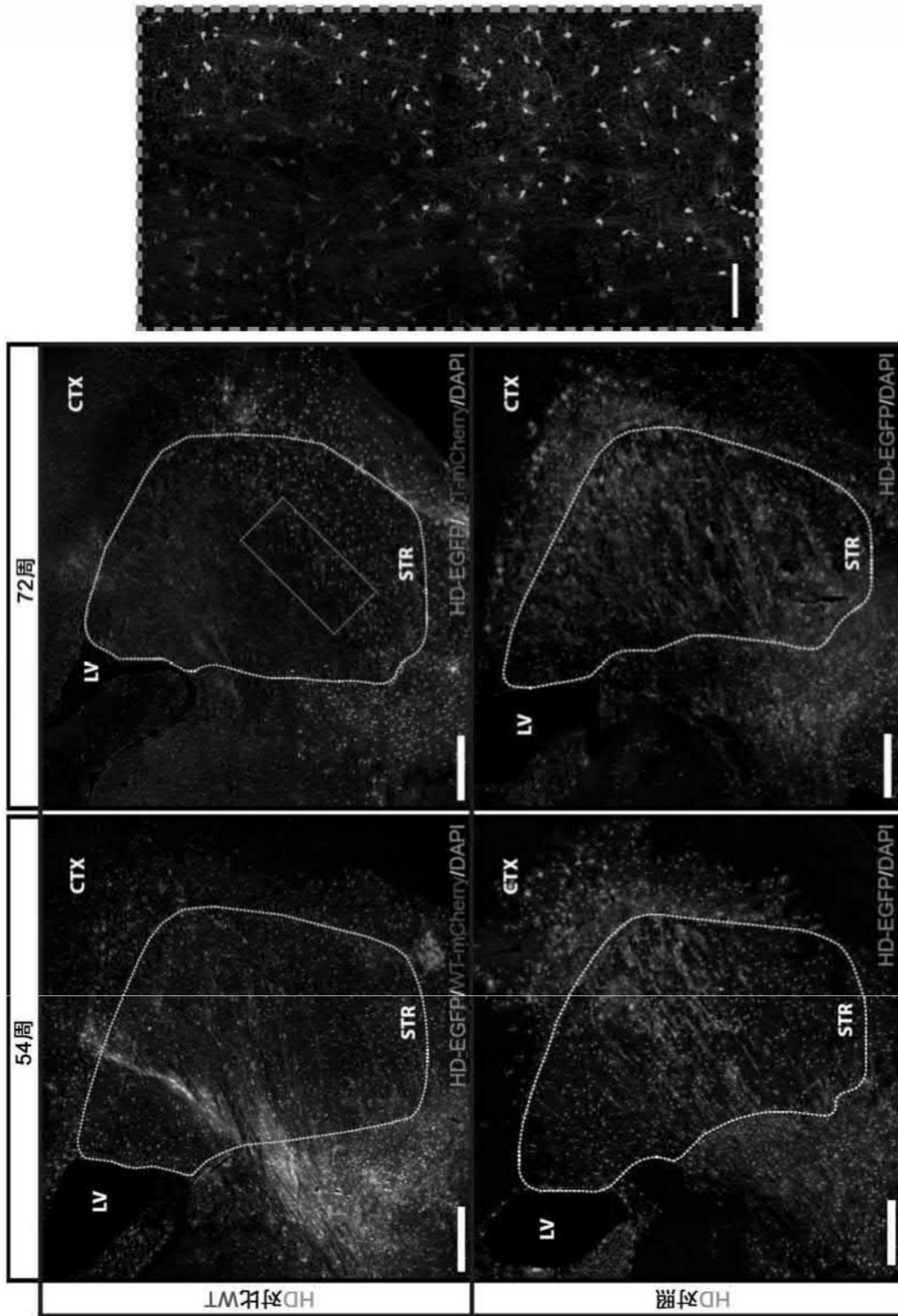


图4A

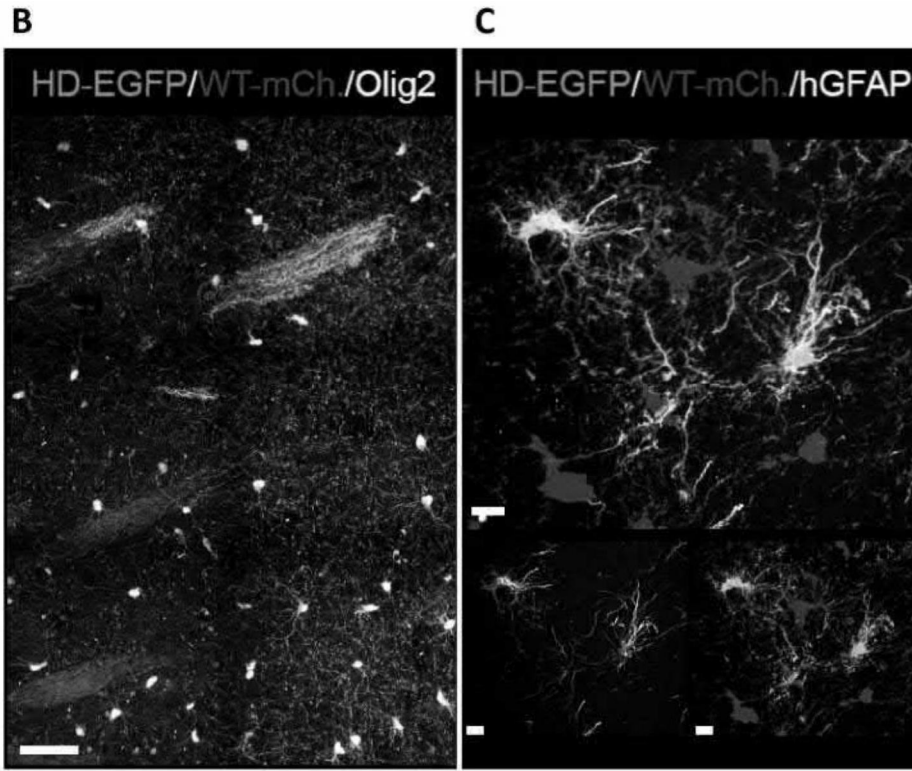


图4B至图4C

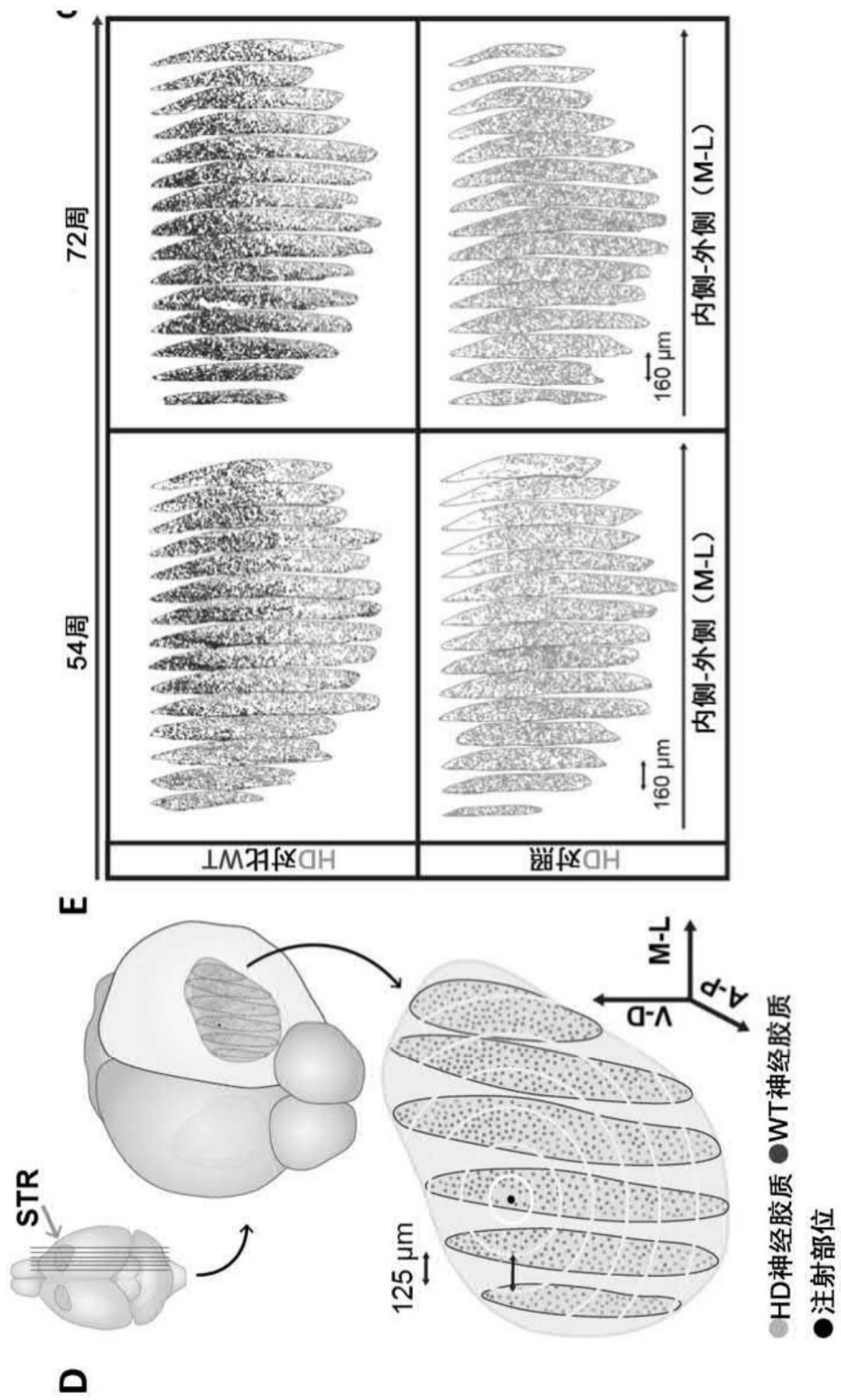


图4D至图4E

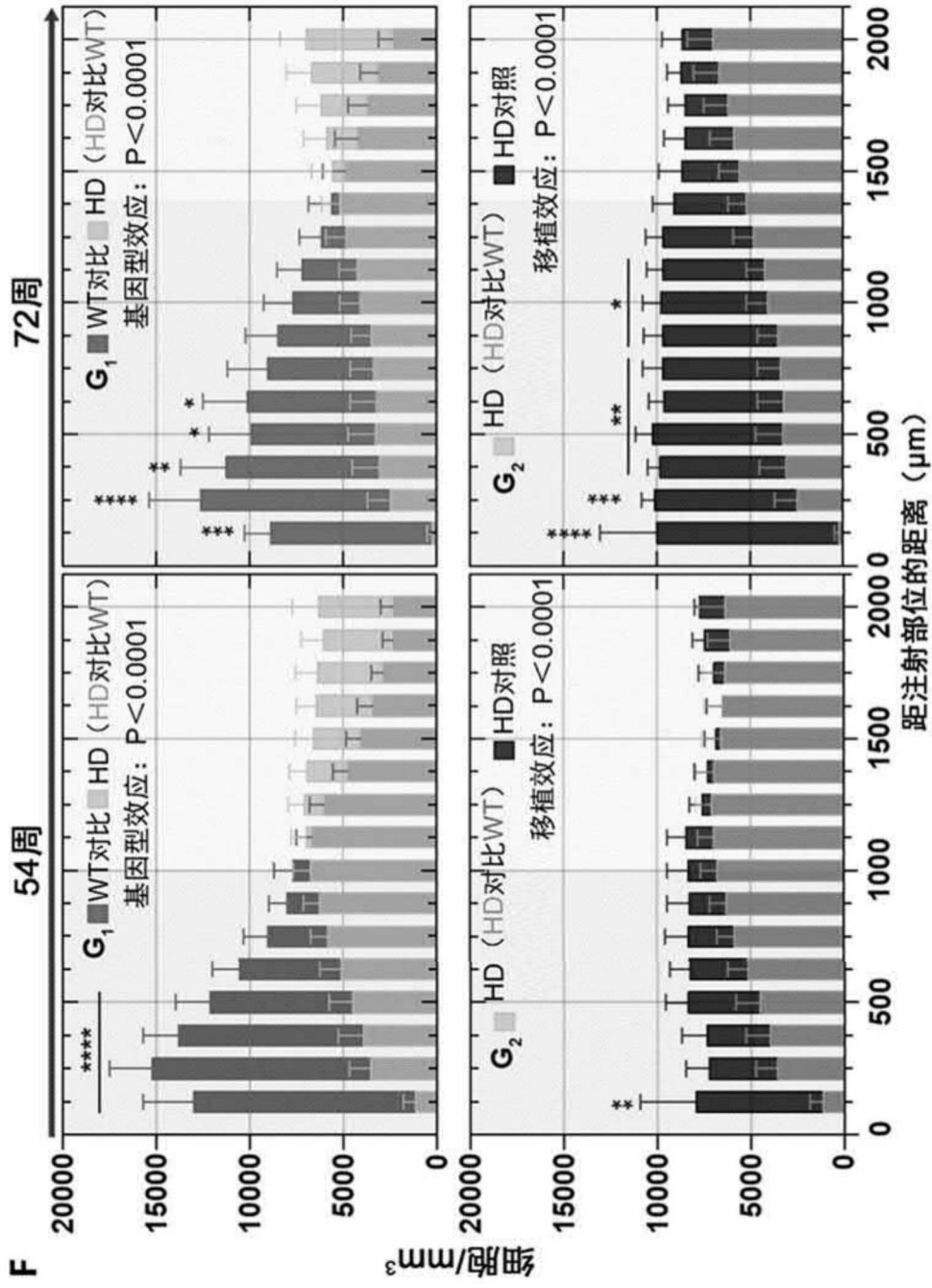


图4F

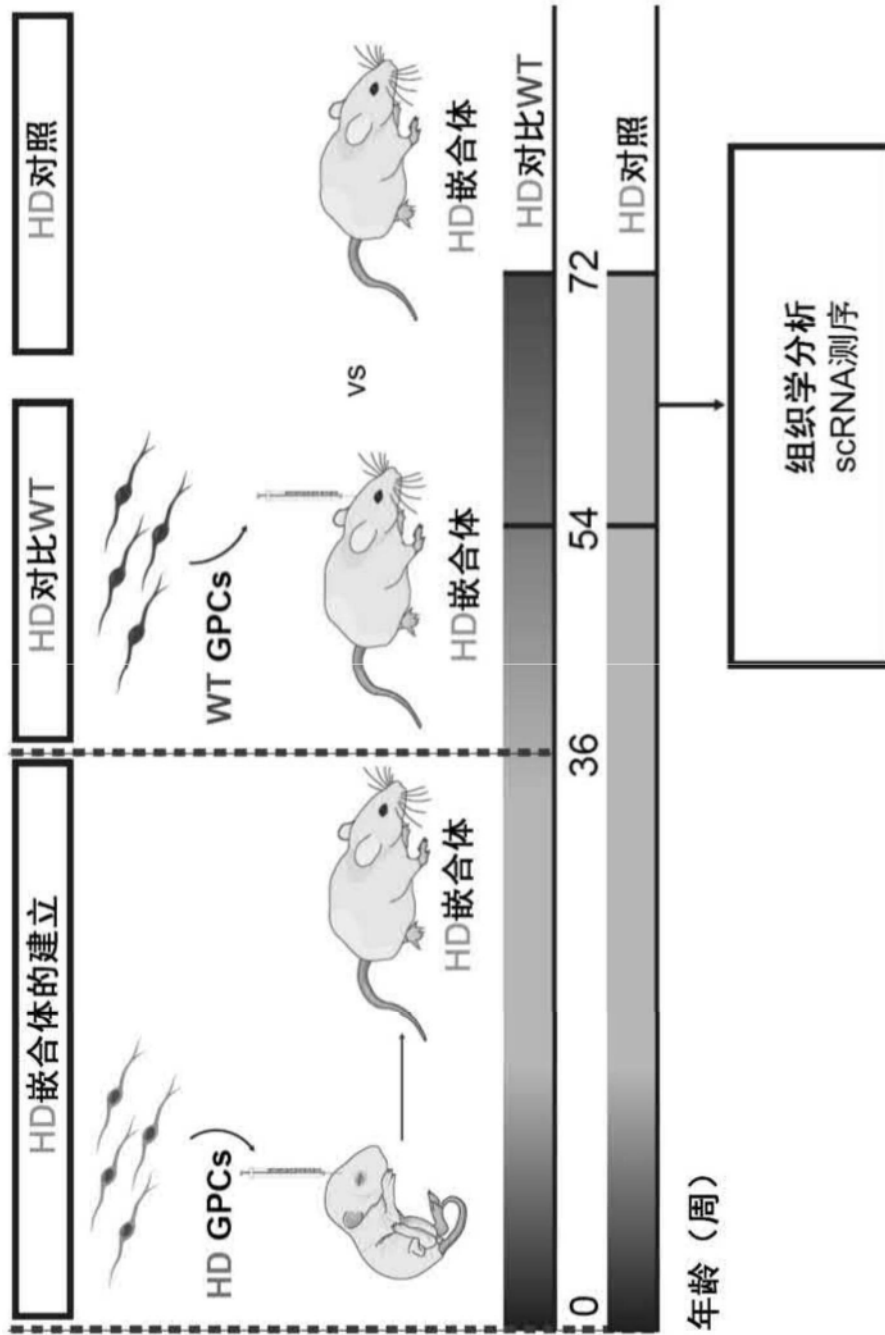


图5

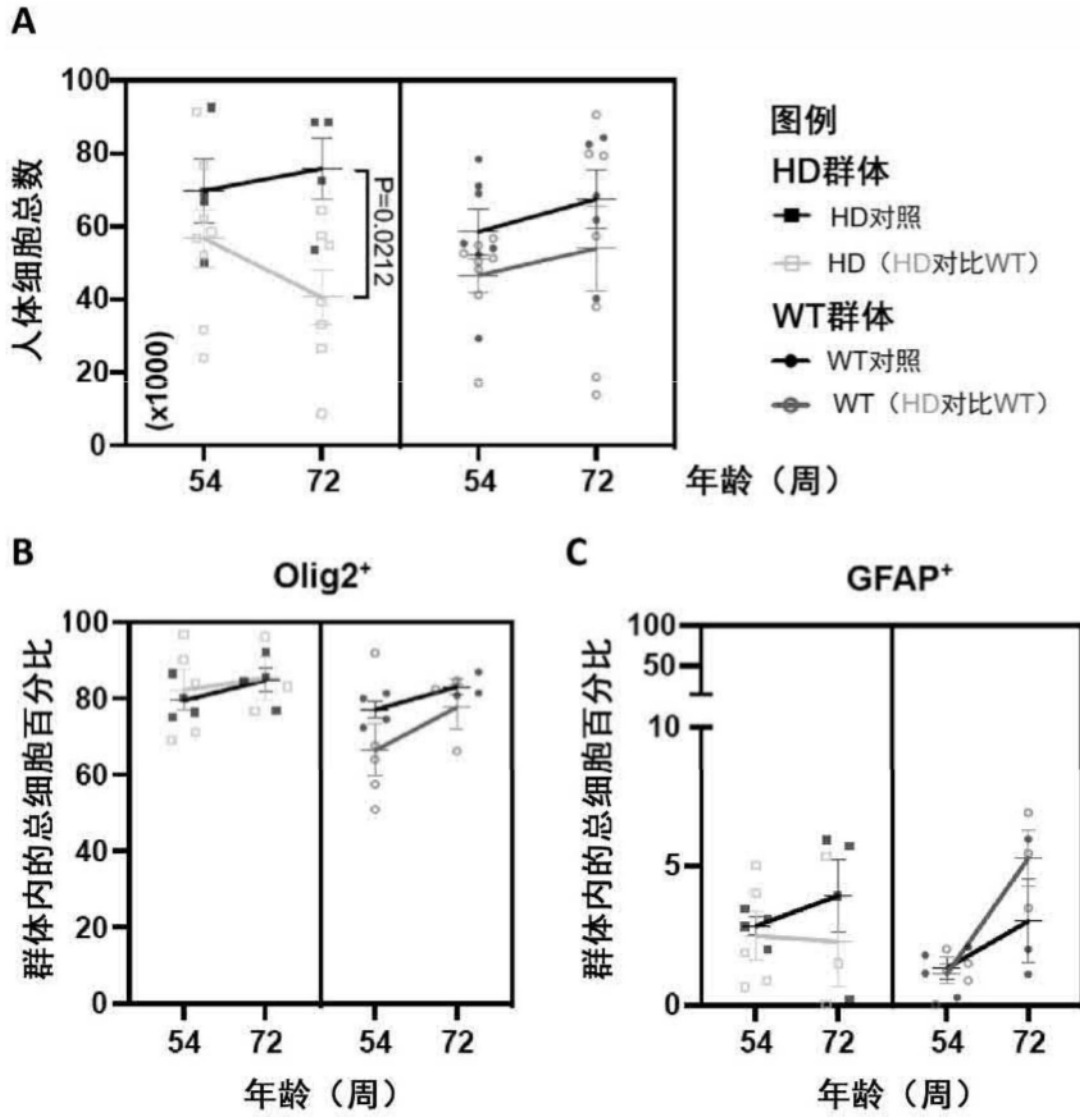


图6A、图6B、图6C

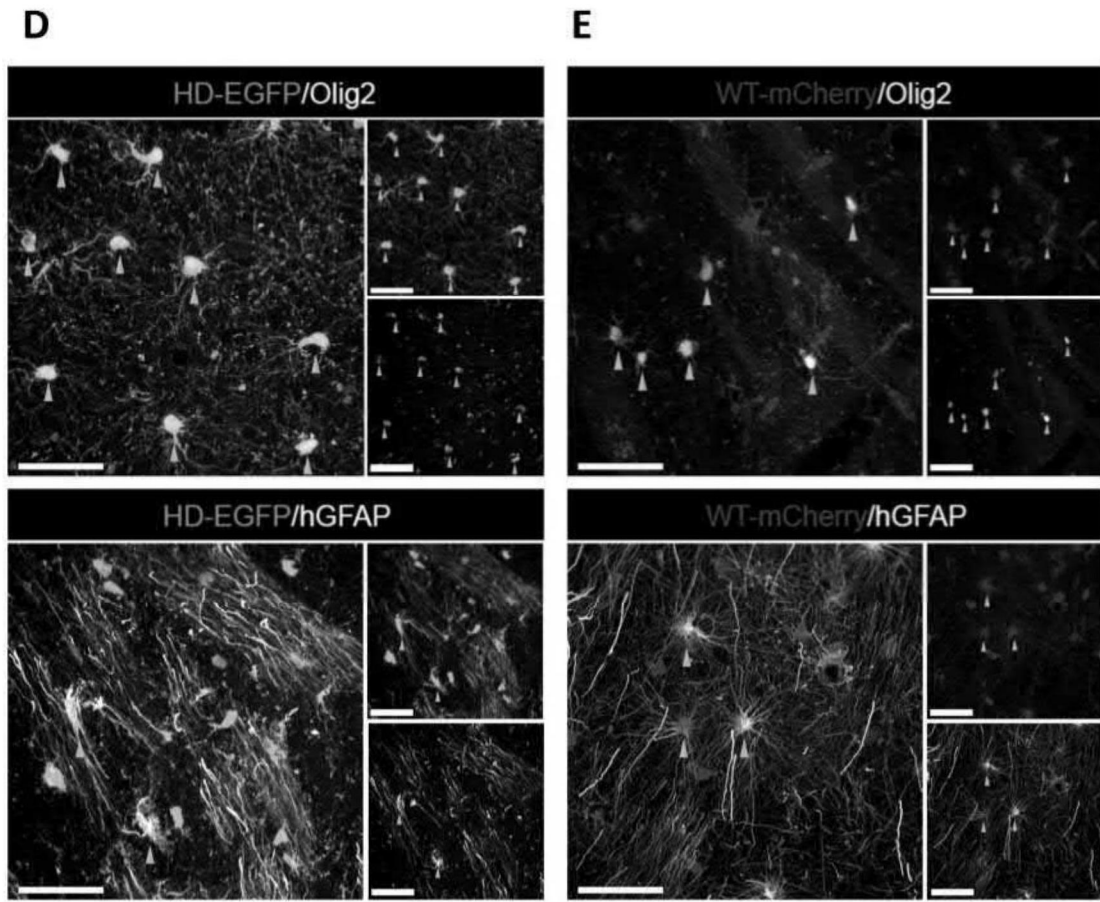


图6D至图6E

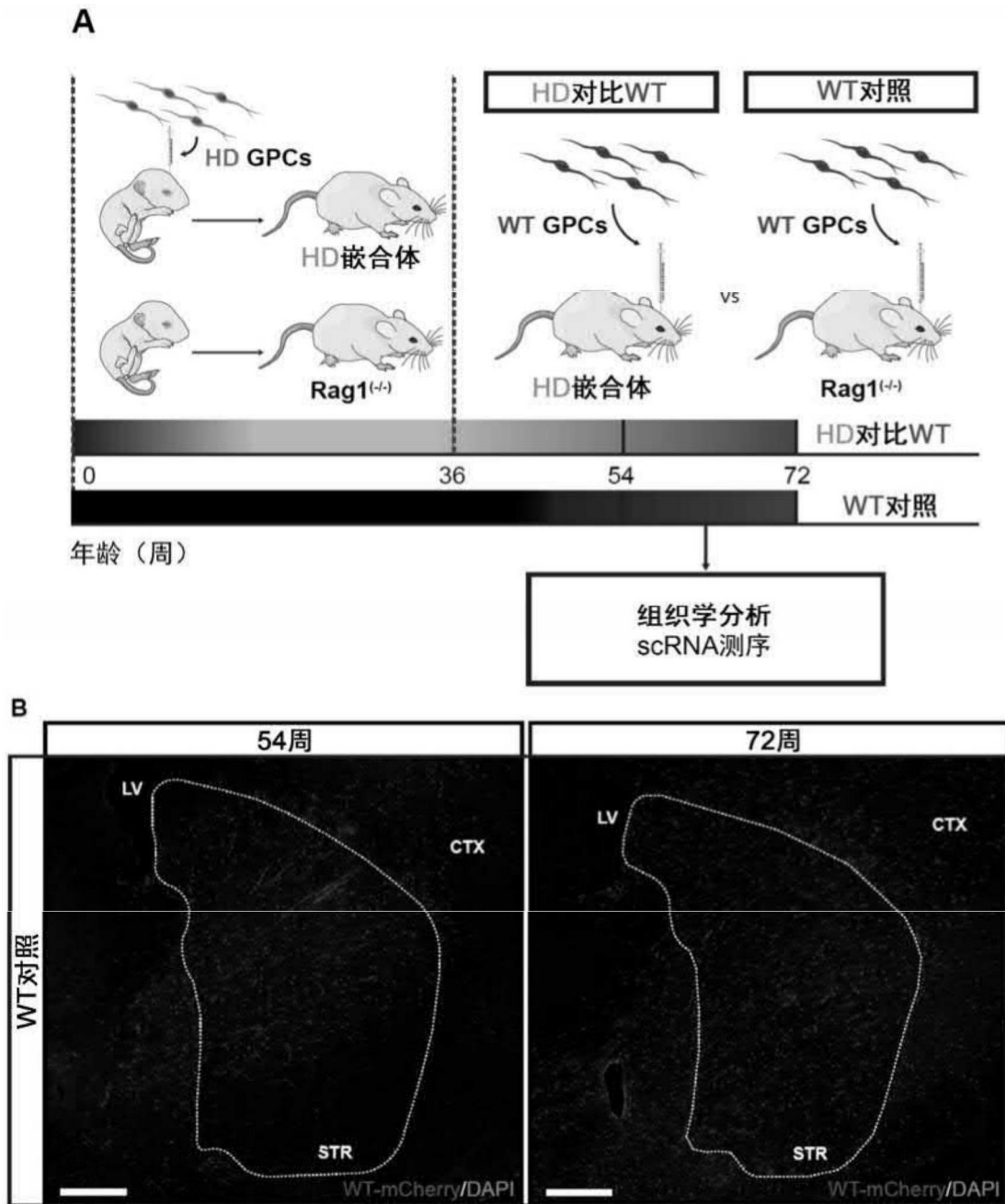


图7A至图7B

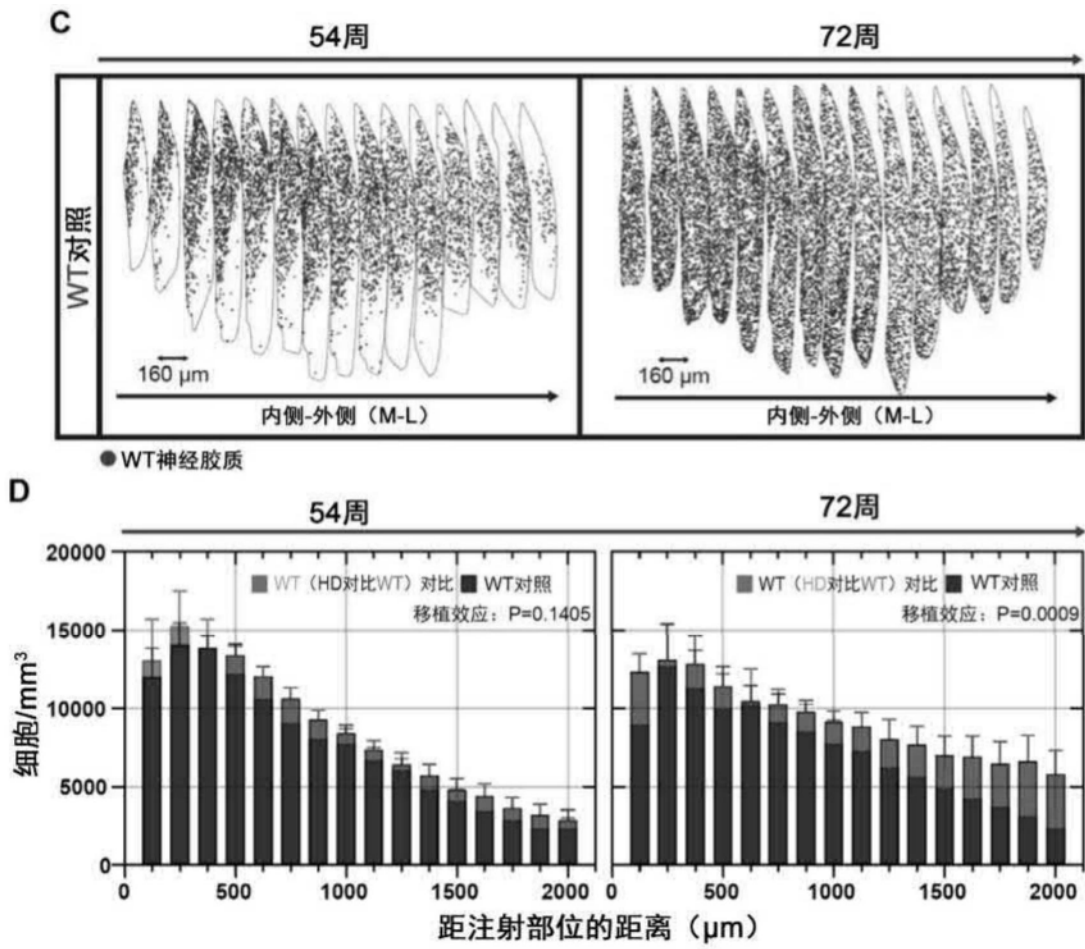


图7C至图7D

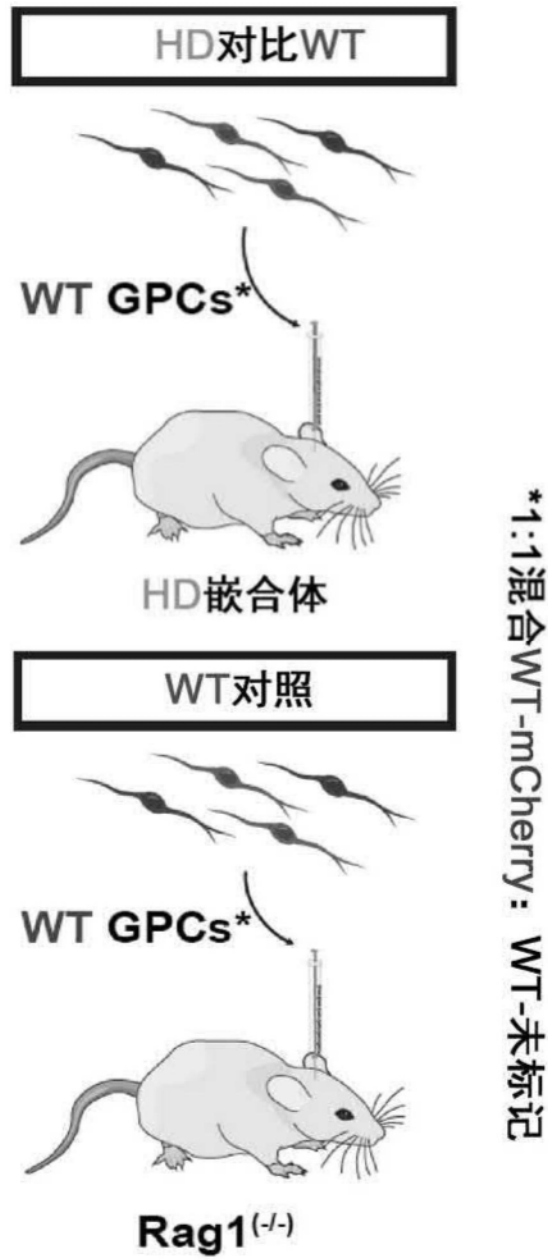


图8

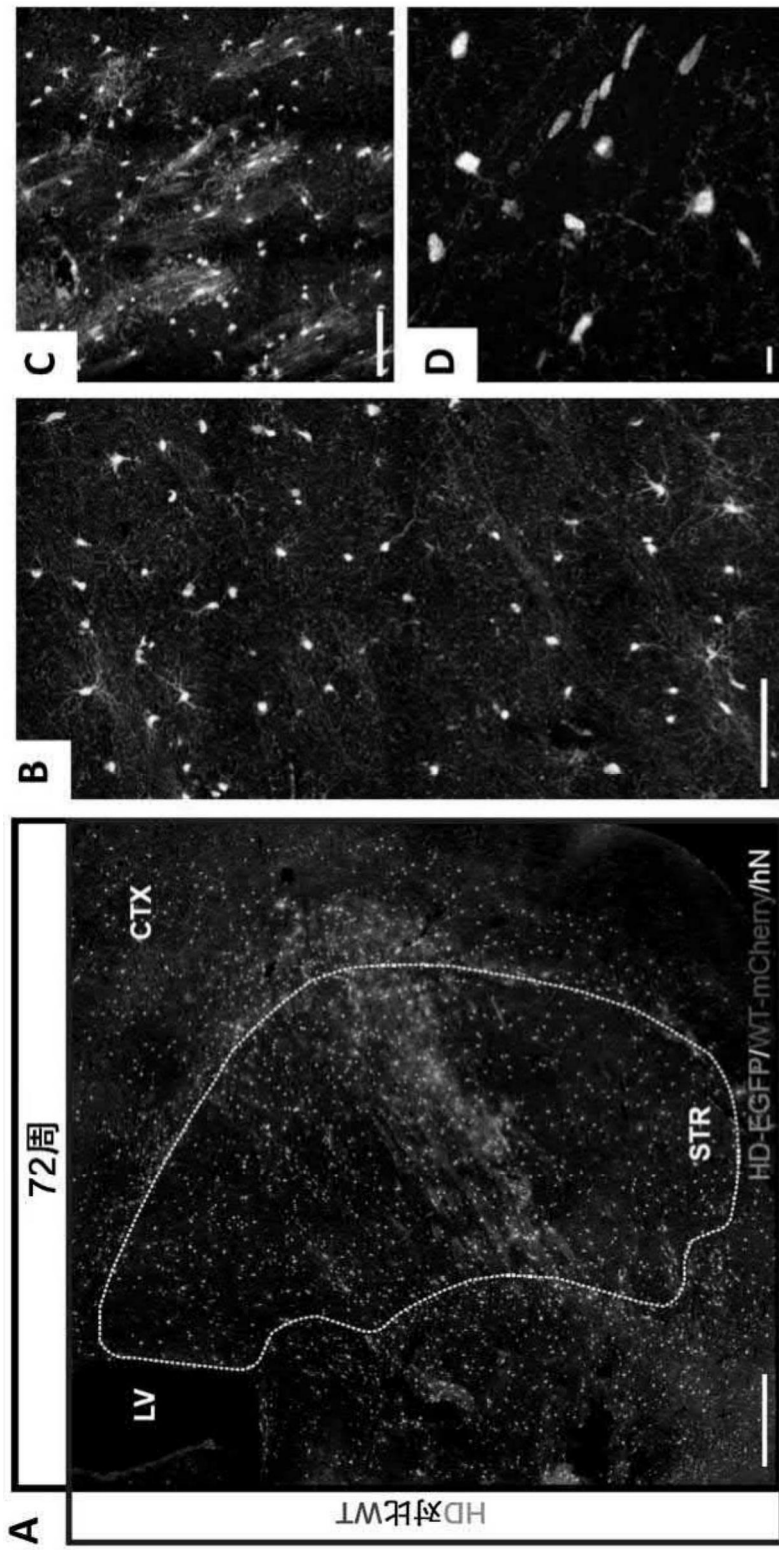


图9A、图9B、图9C、图9D

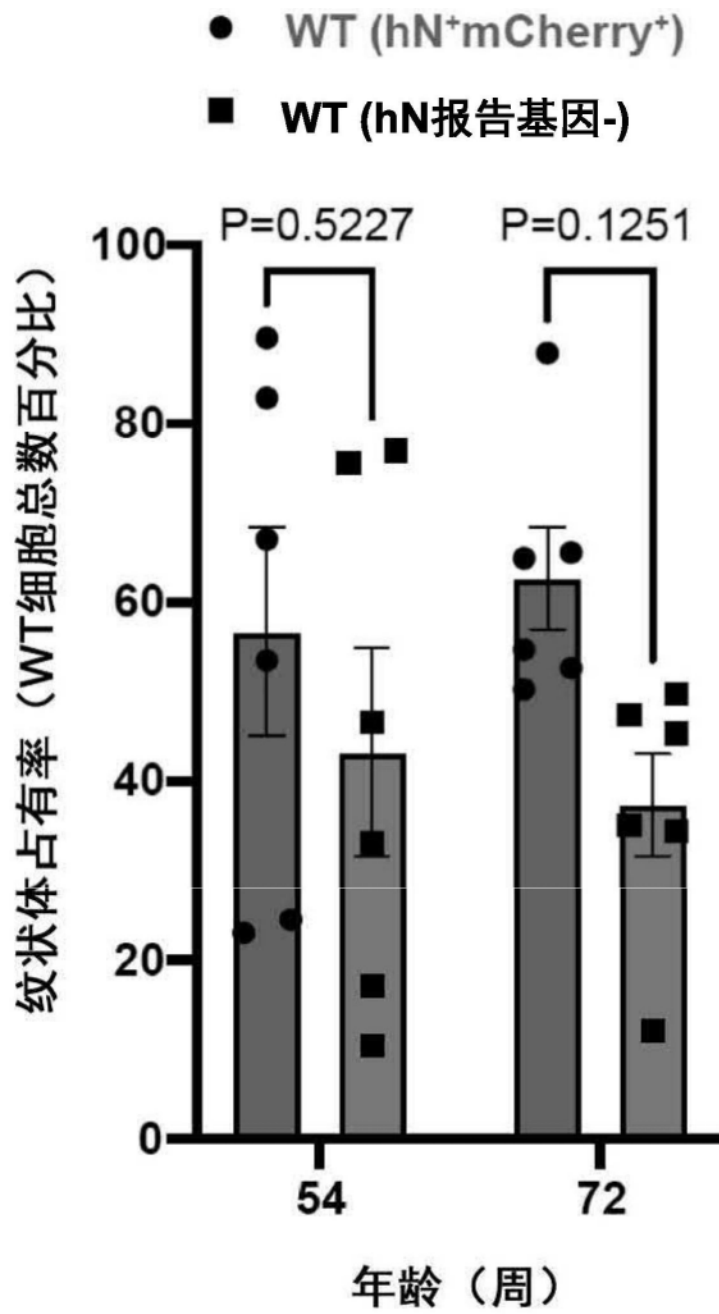


图10

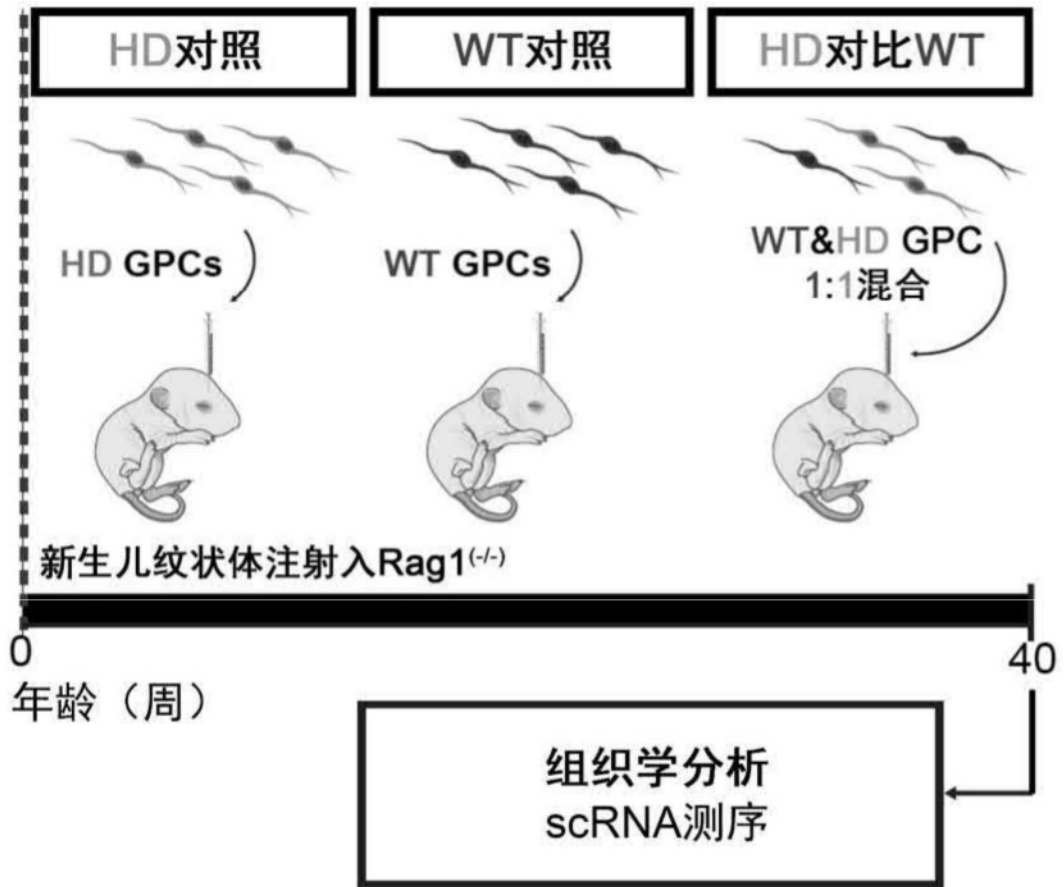


图11

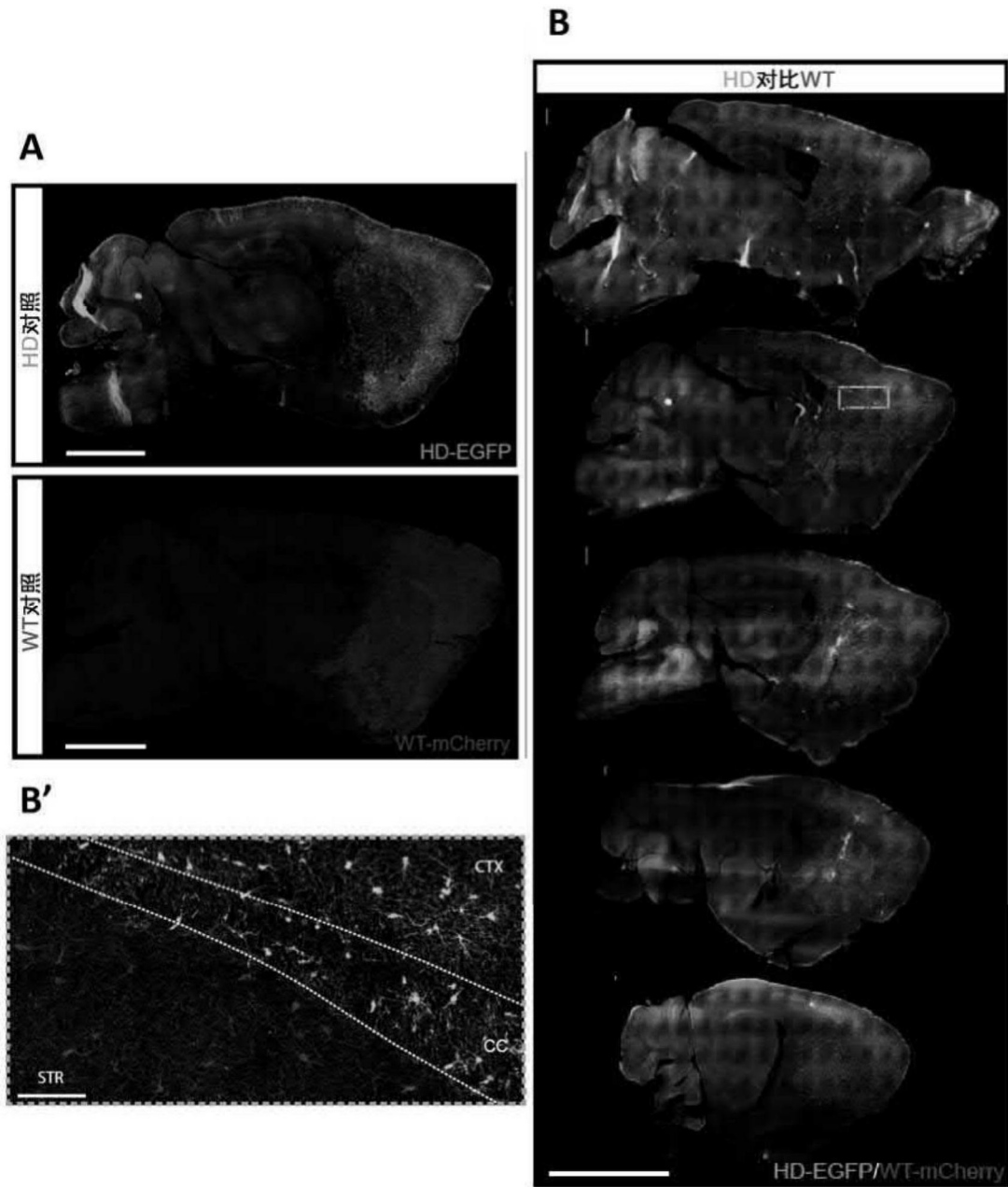


图12A、图12B、图12B'

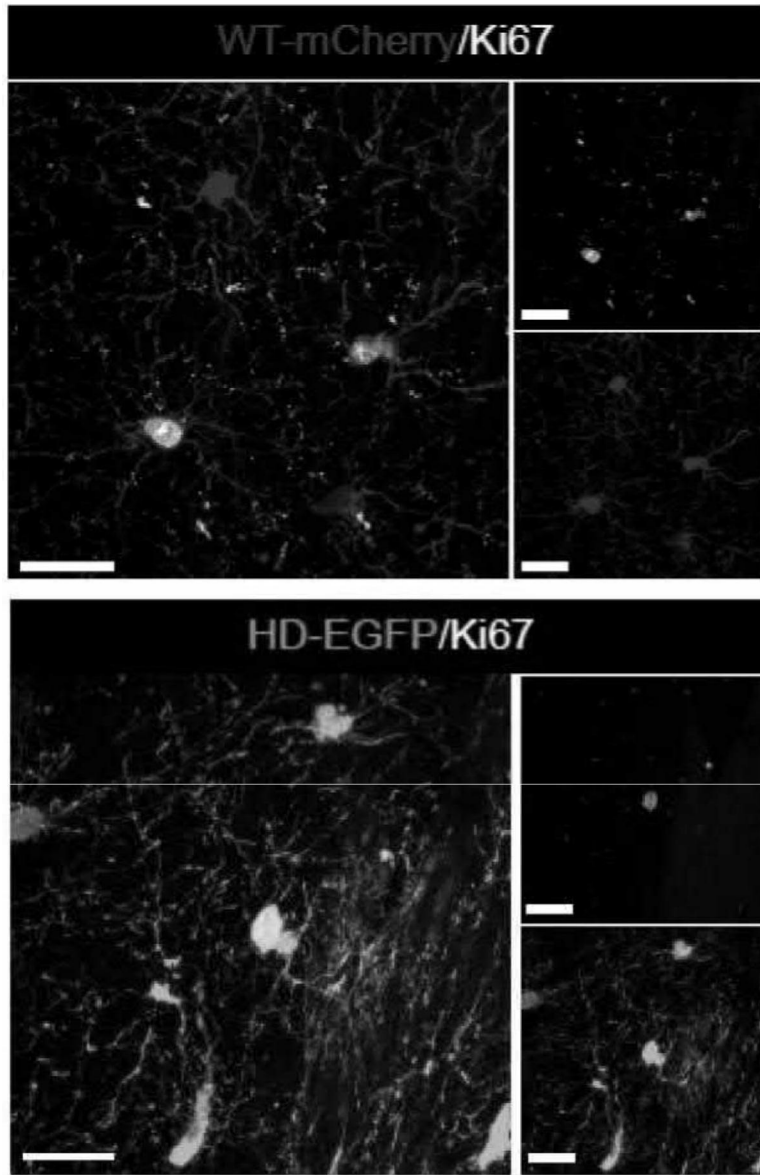


图12C

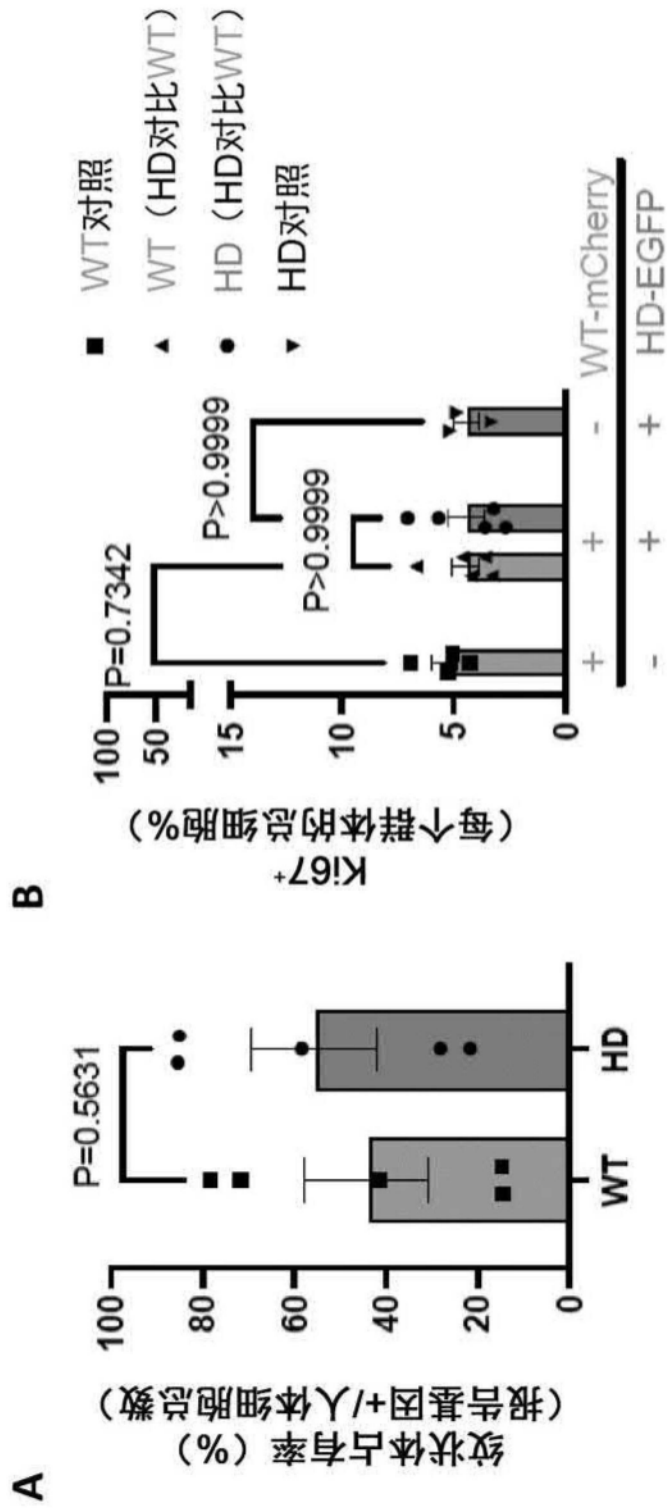


图13A至图13B

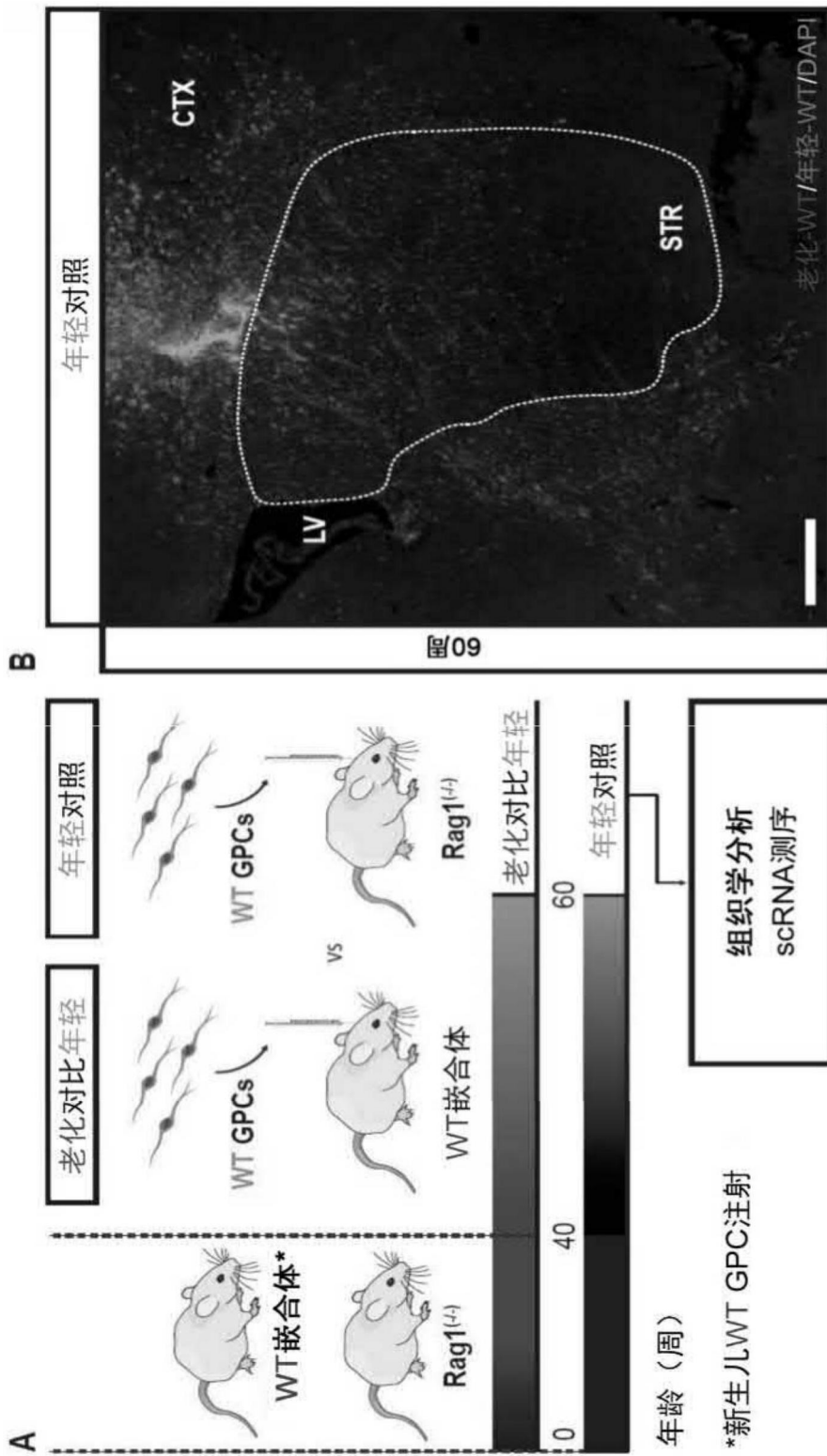


图14A至图14B

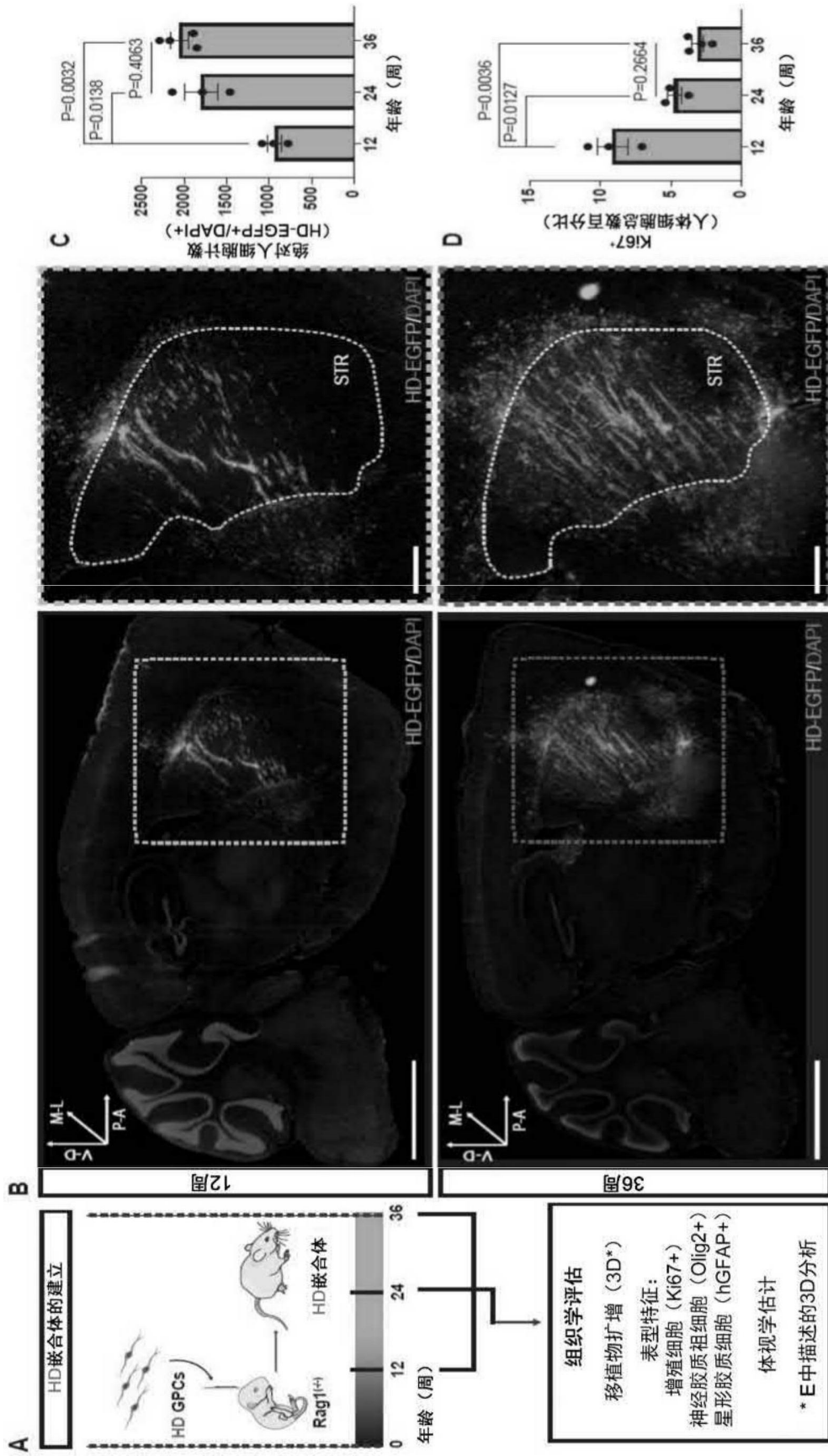


图15A、图15B、图15C、图15D

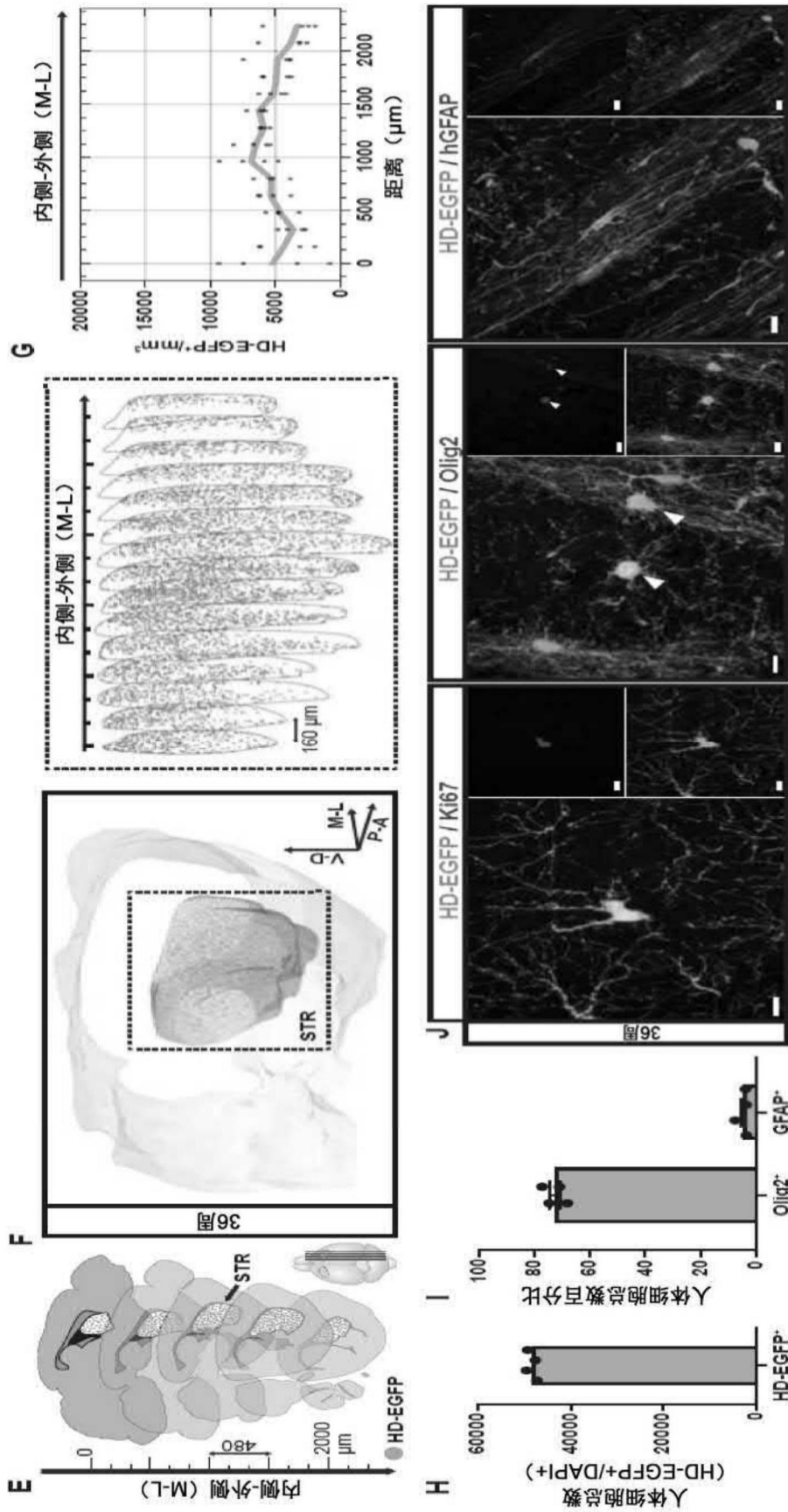


图15E、图15F、图15G、图15H、图15I、图15J

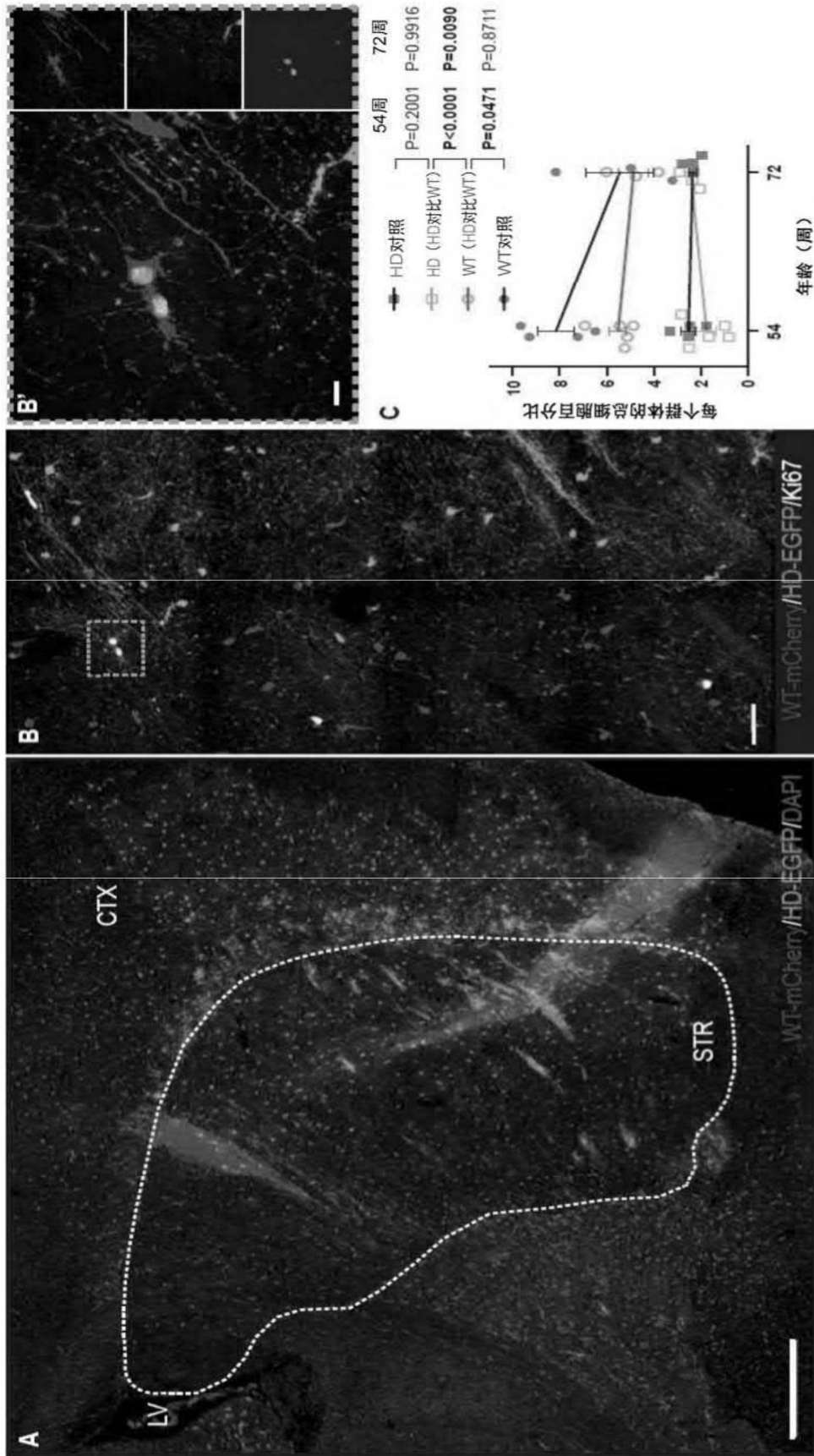


图16A、图16B、图16B'和图16C

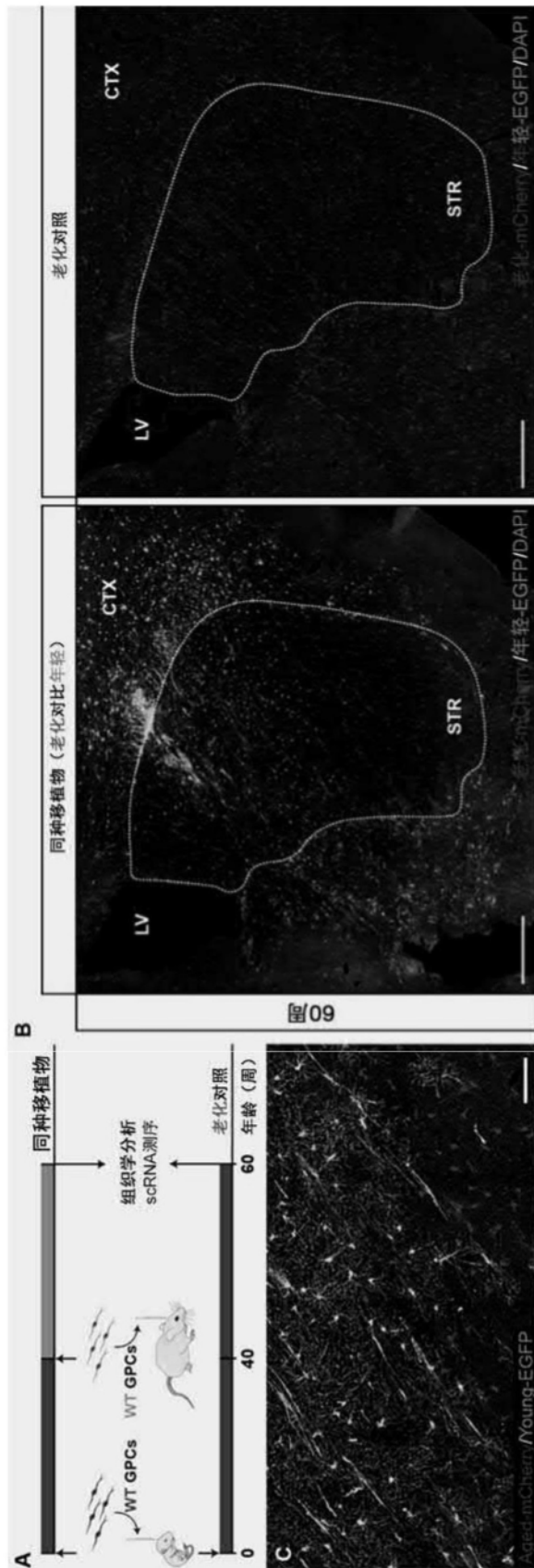


图17A、图17B和图17C

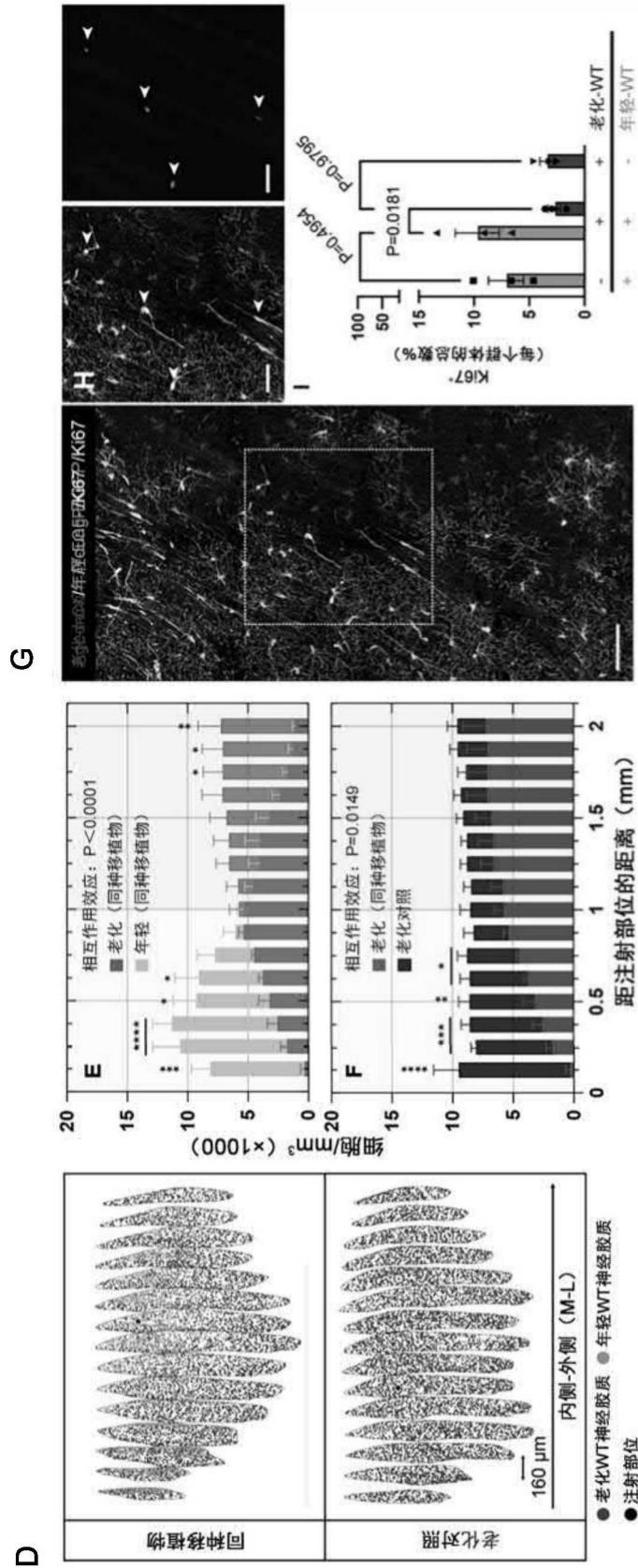


图17D、图17E、图17F、图17G、图17H和图17I

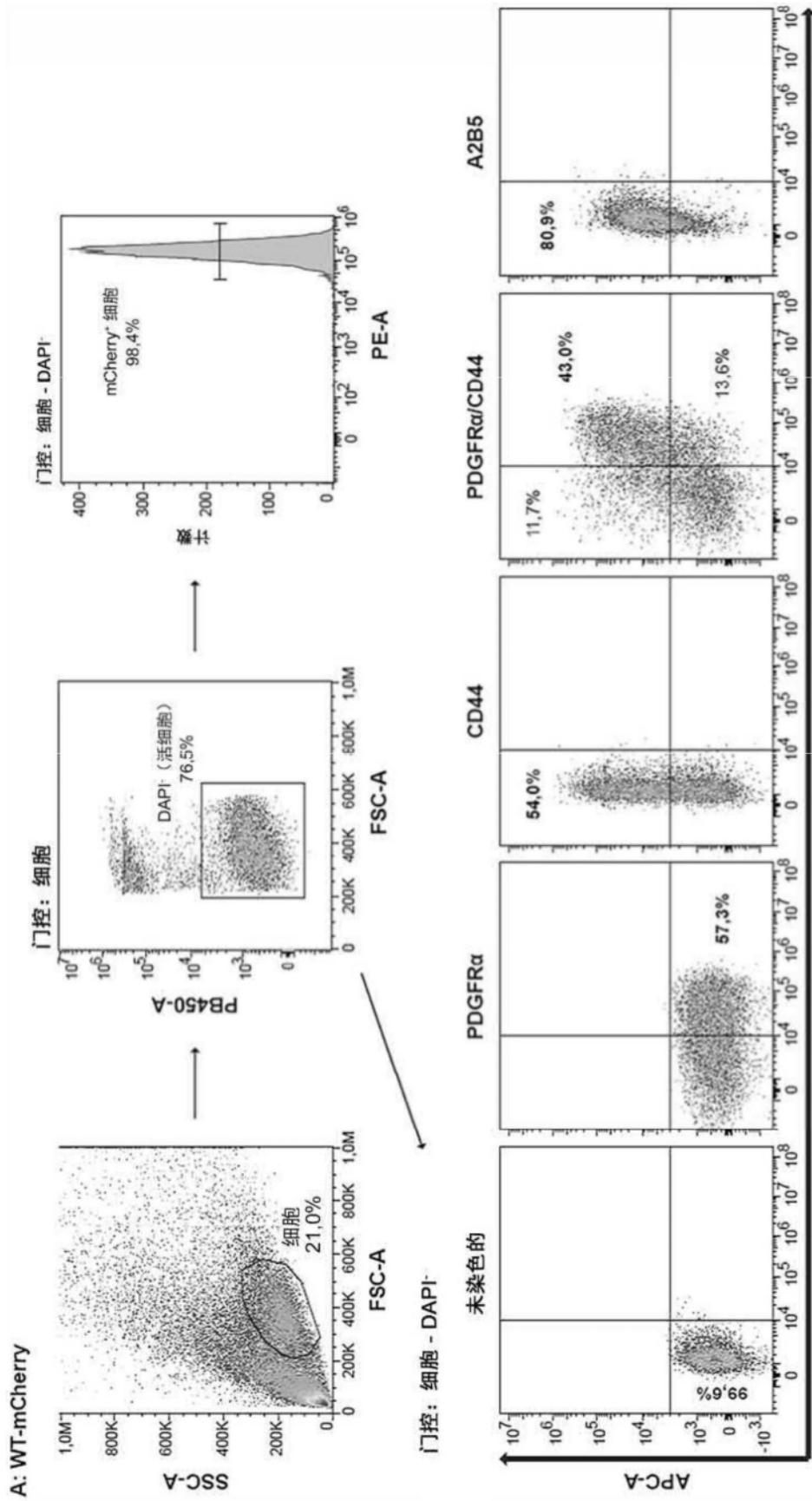


图18A

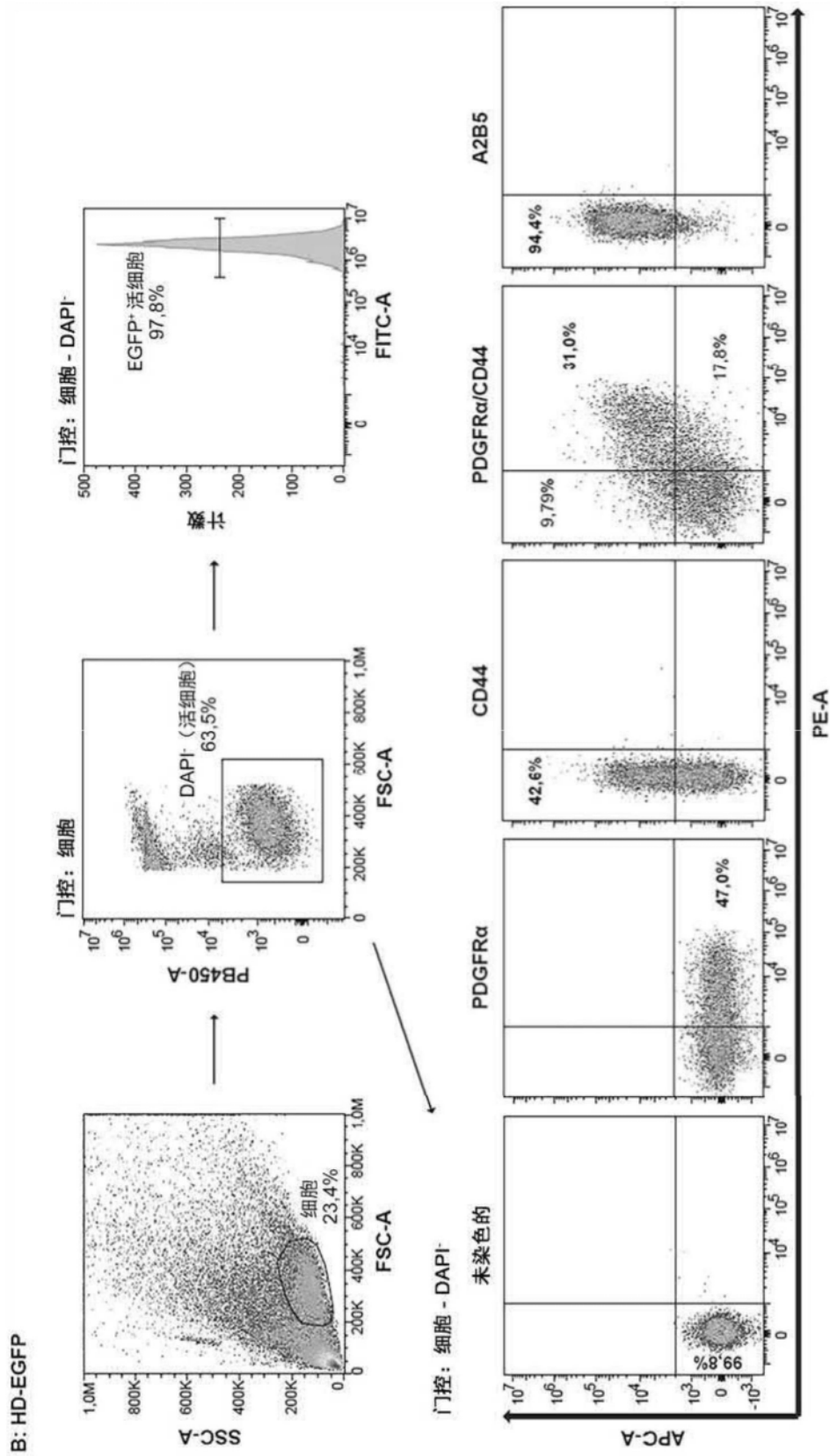


图18B

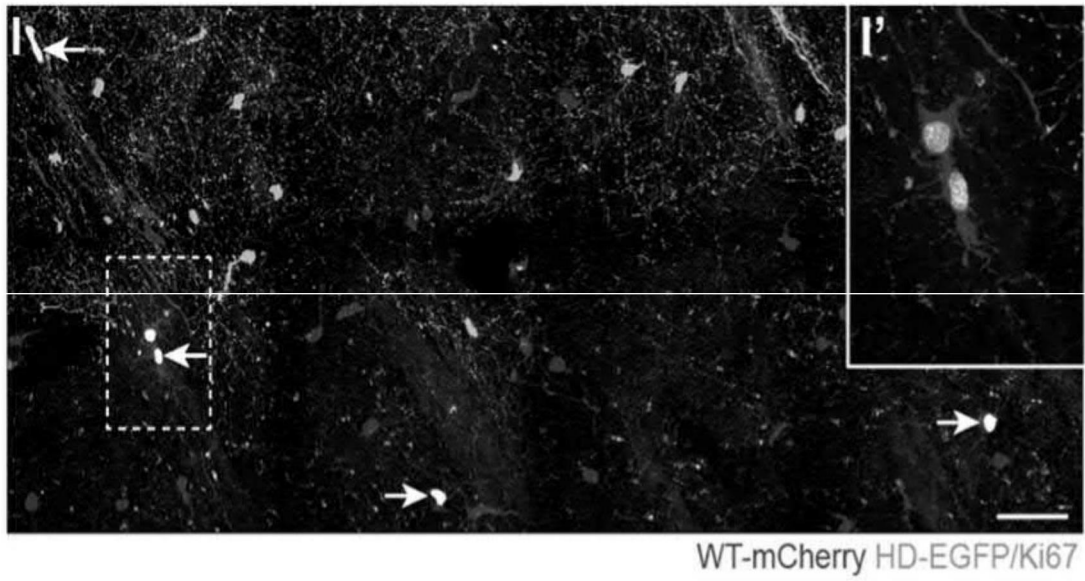


图19A

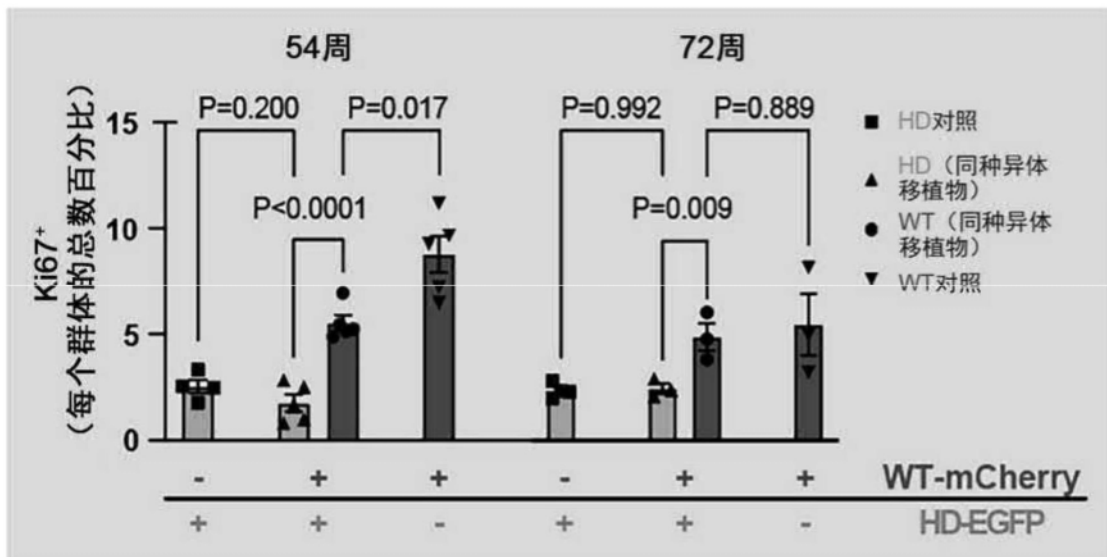


图19B

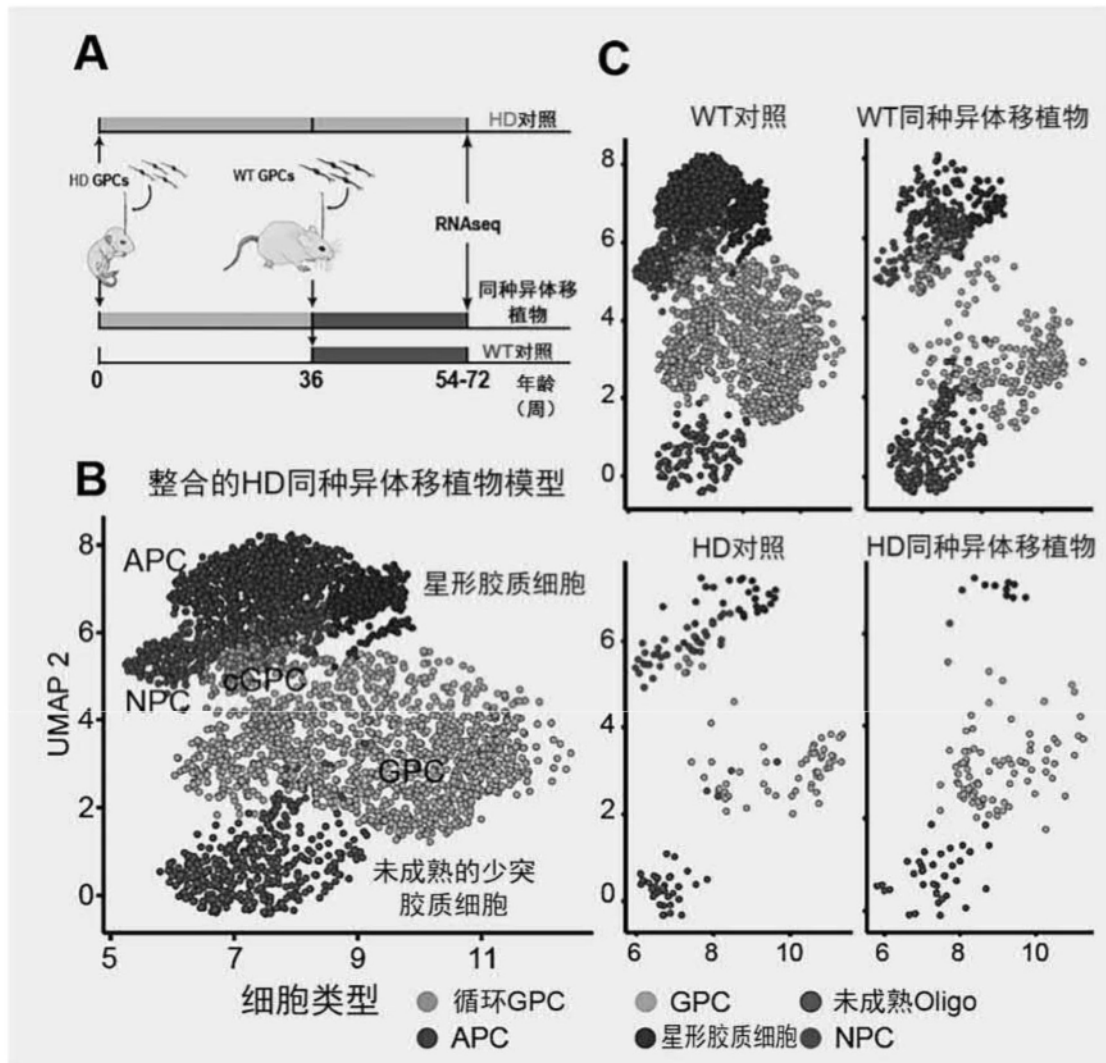


图20A、图20B和图20C

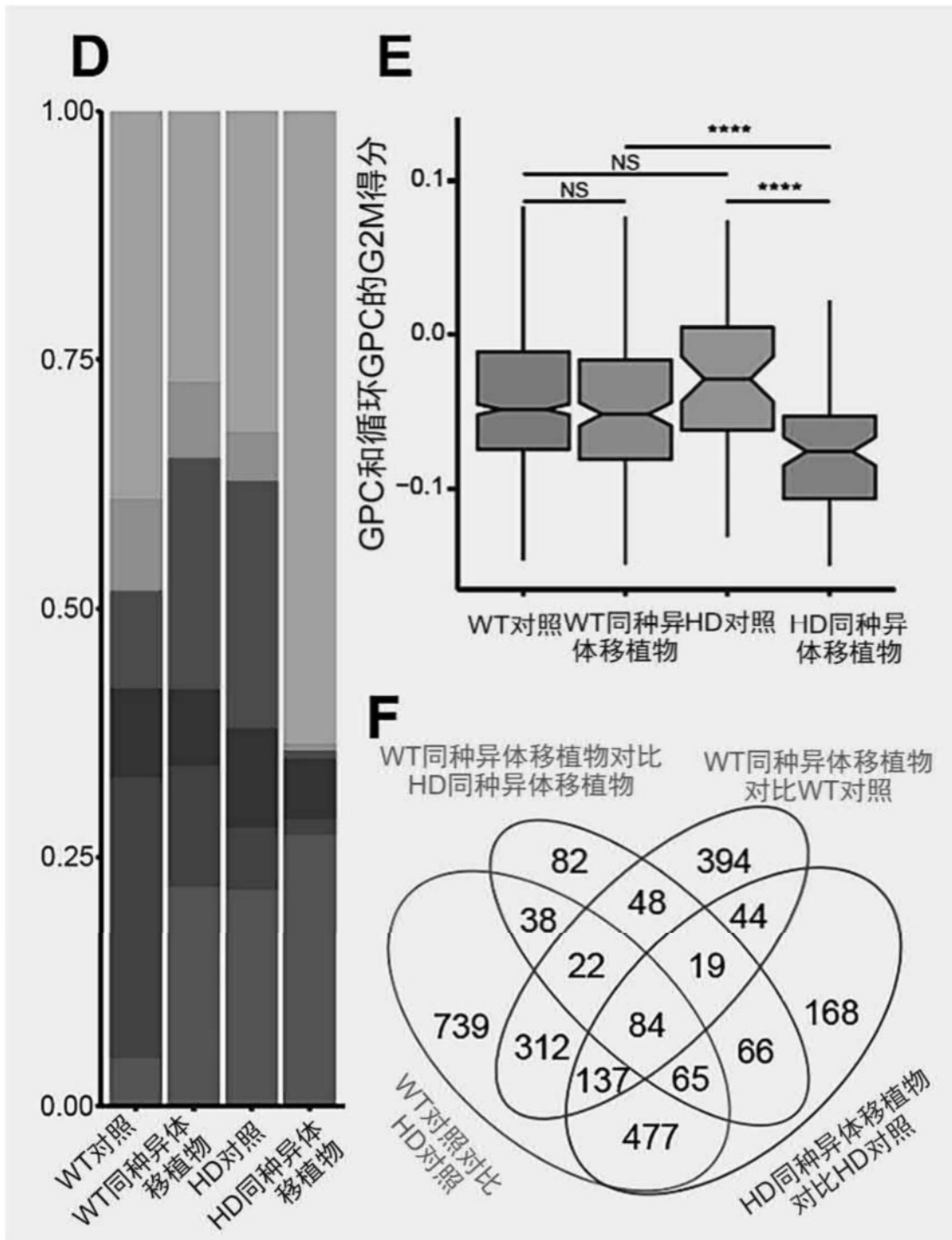


图20D、图20E和图20F

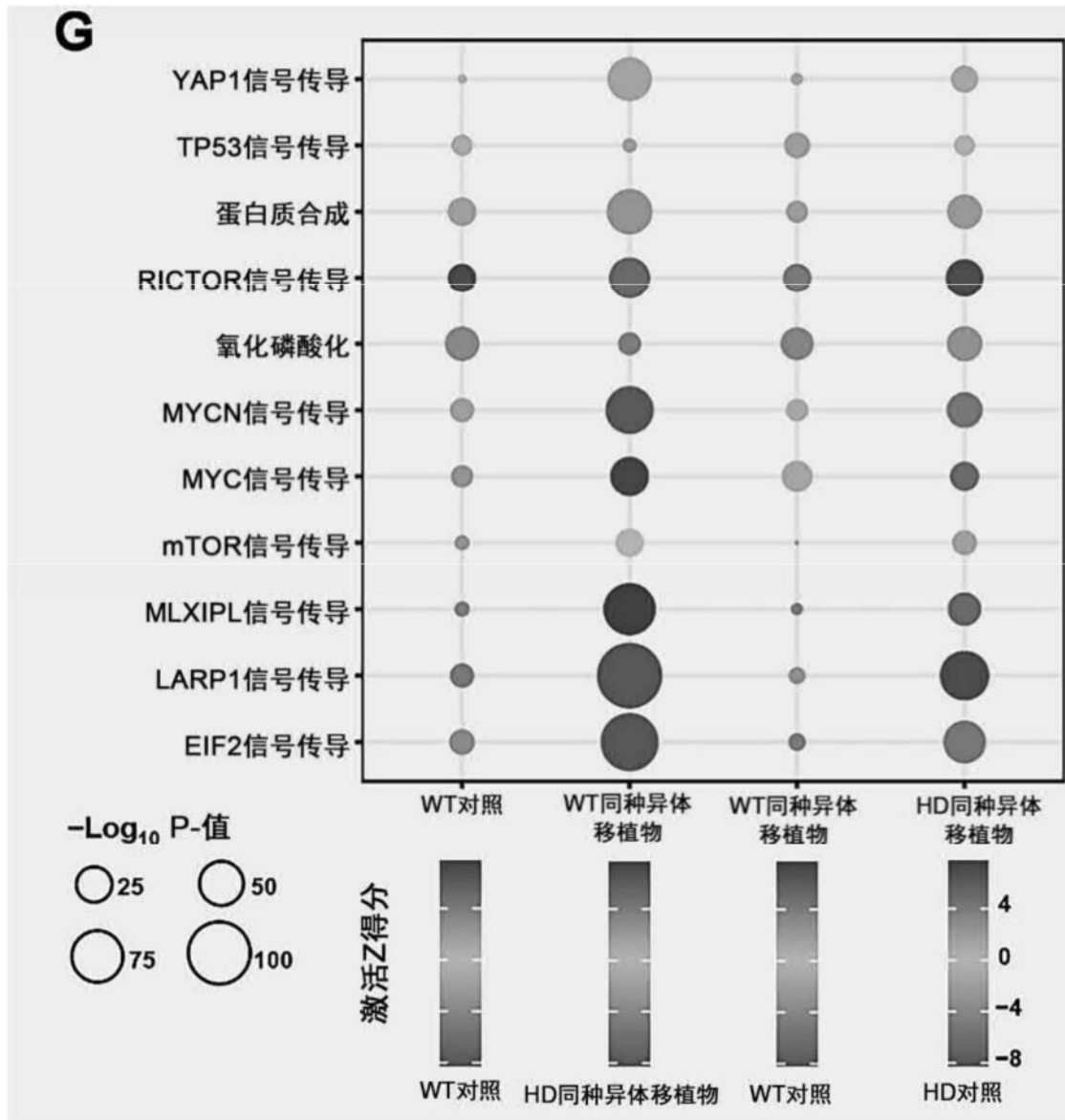


图20G

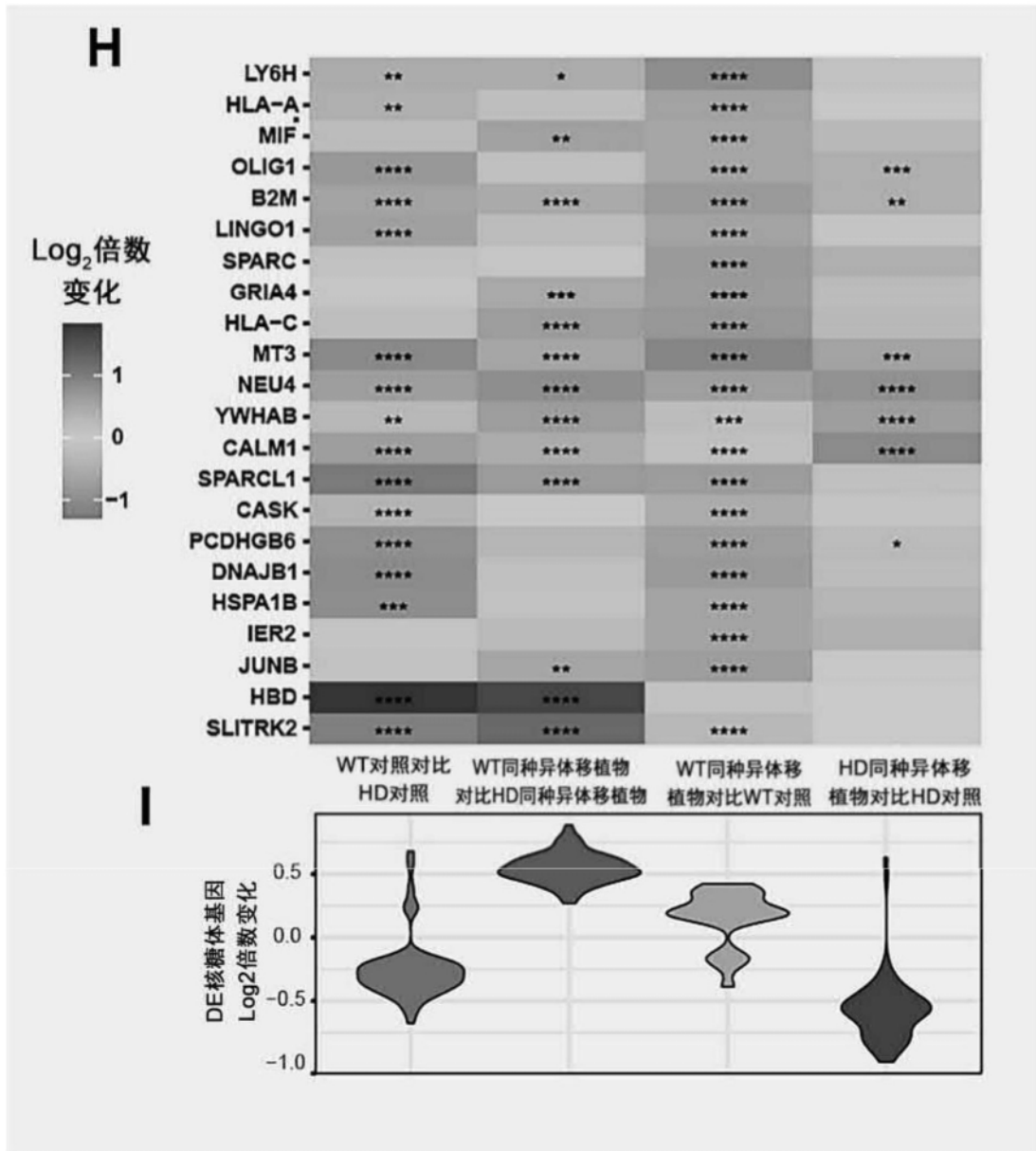


图20H和图20I

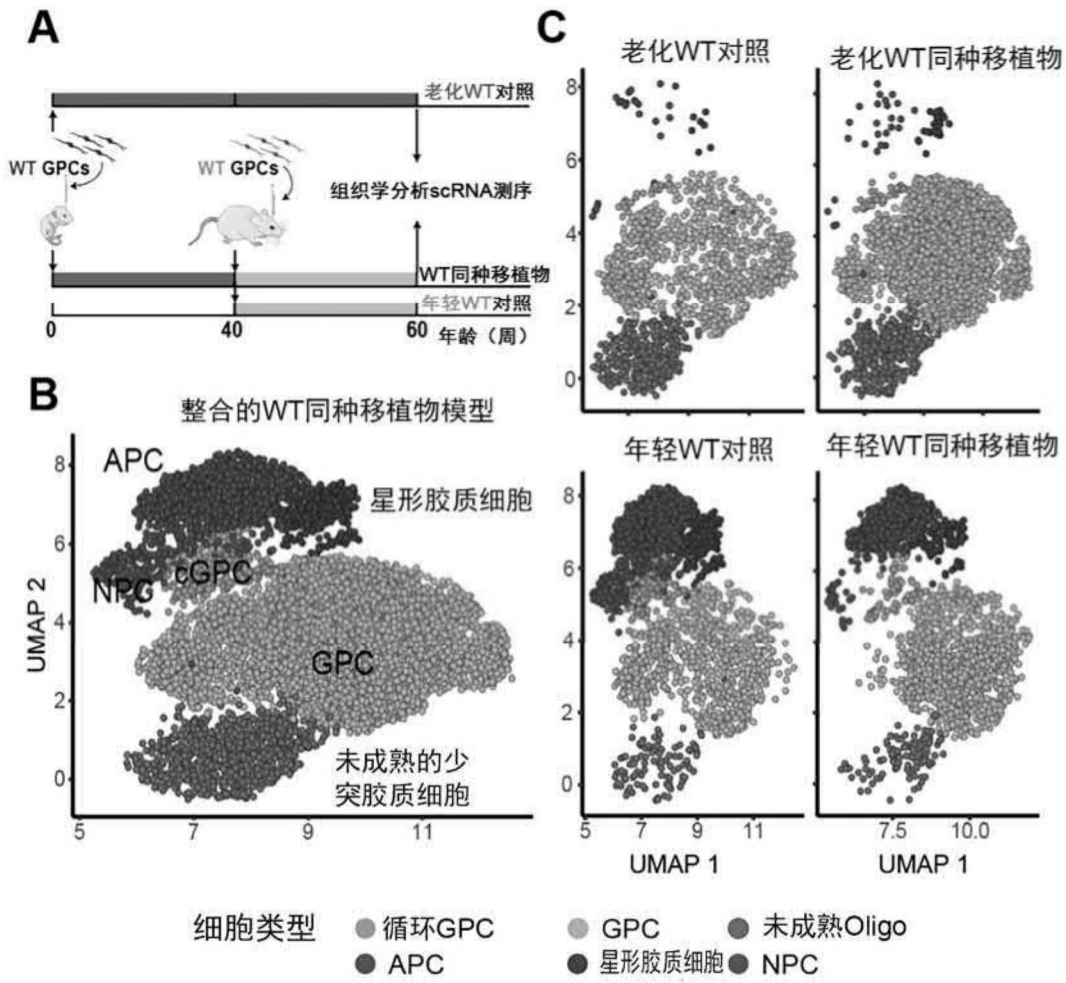


图21A、图21B和图21C

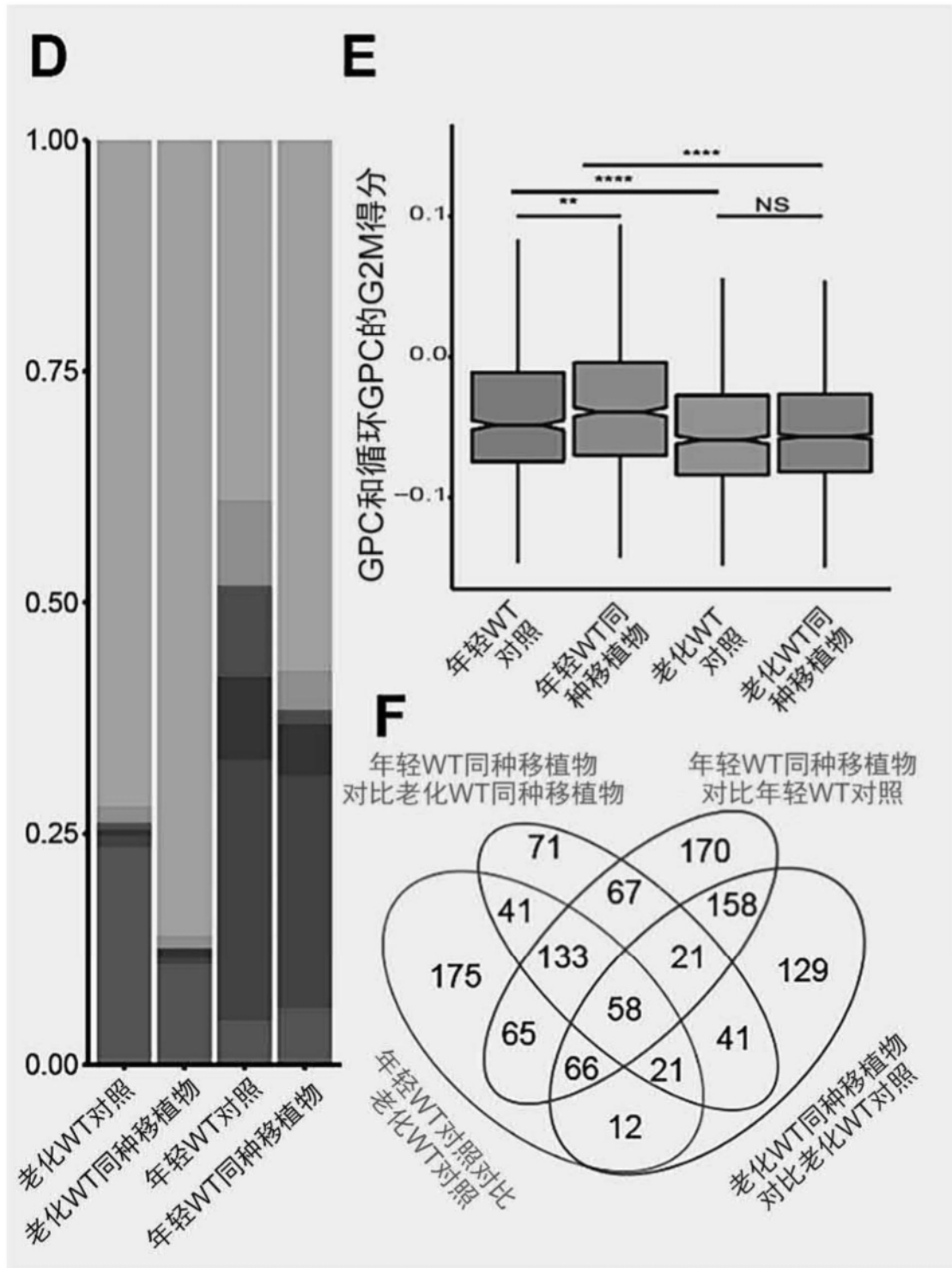


图21D、图21E和图21F

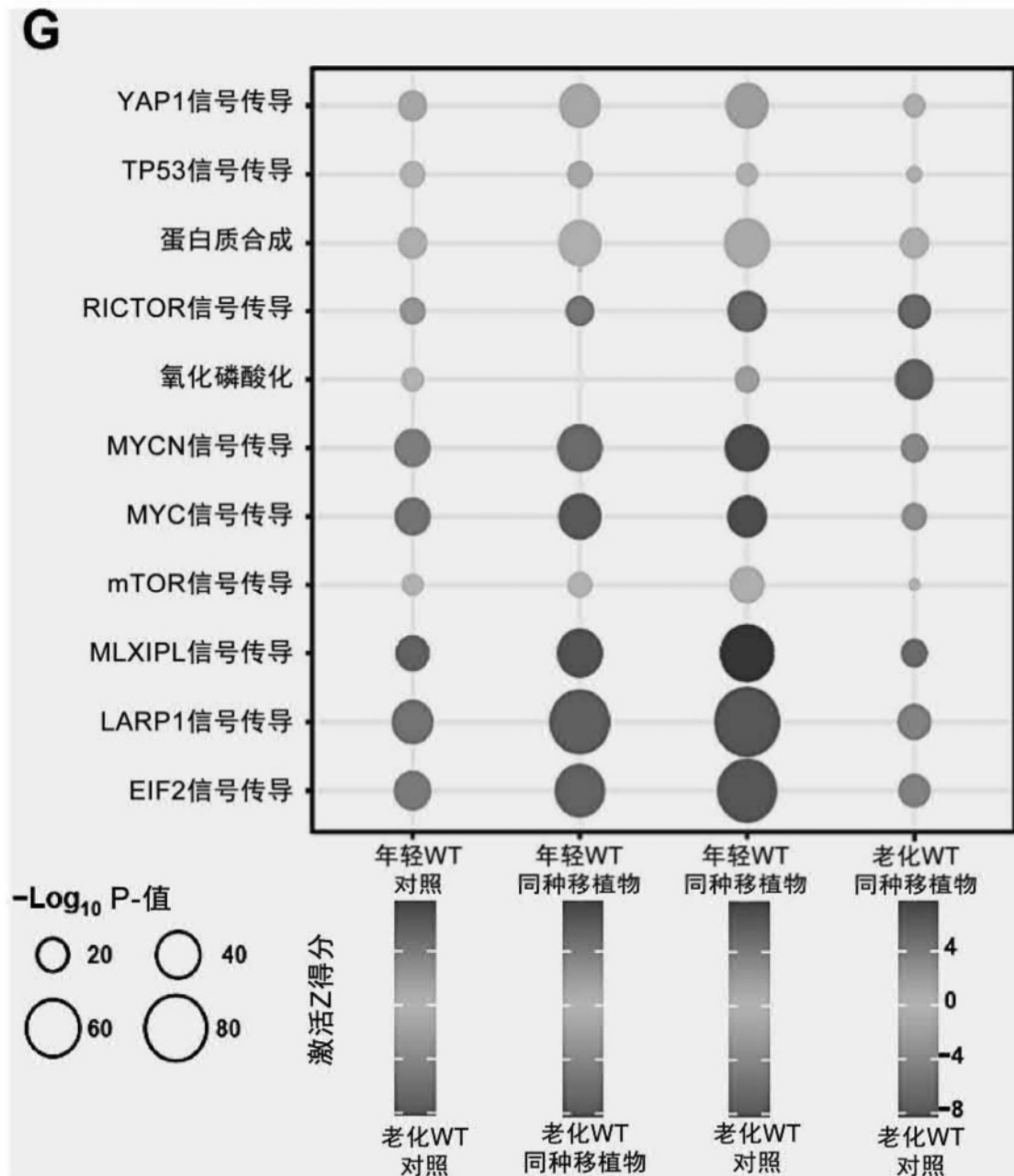


图21G

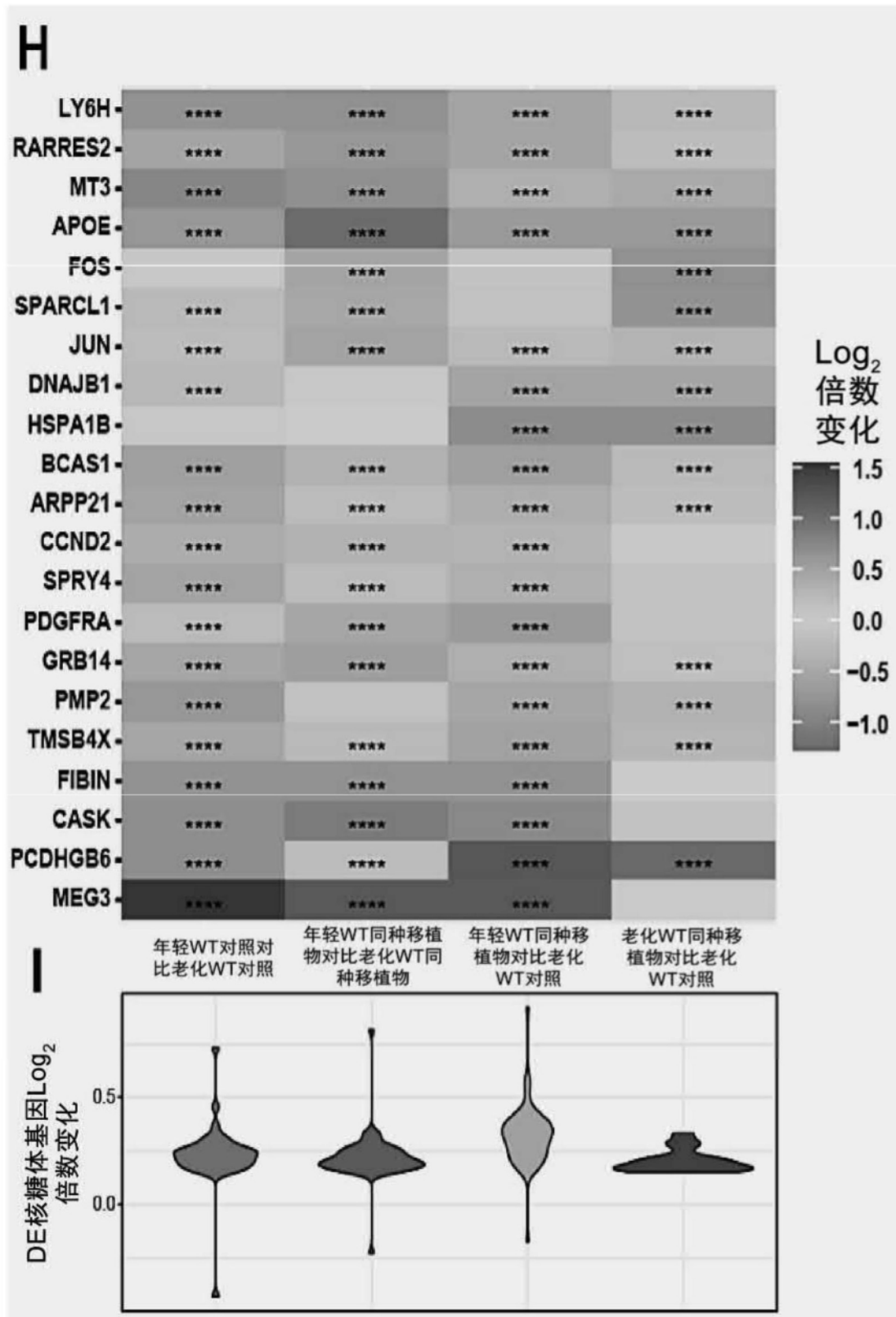


图21H和图21I

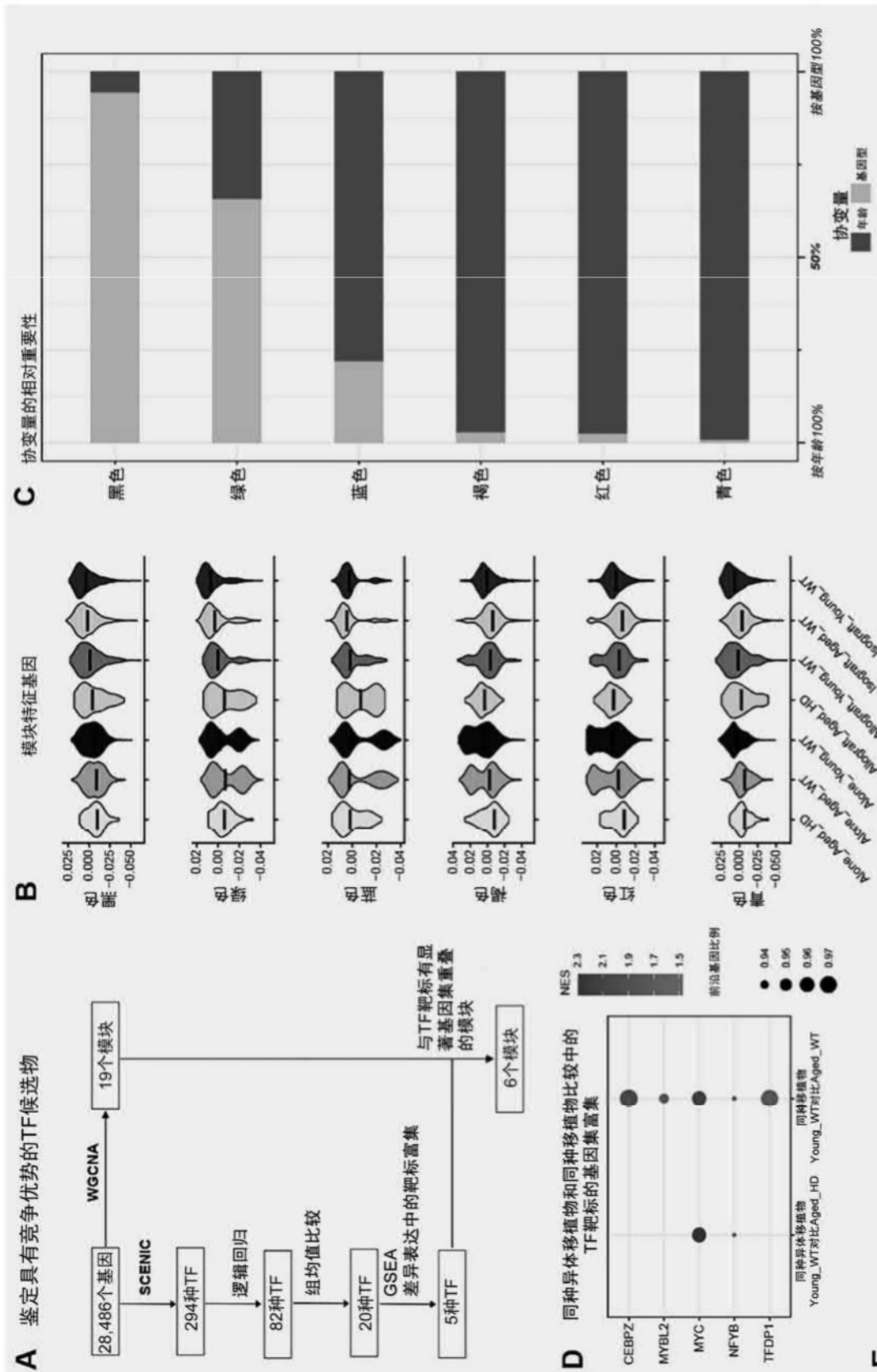


图22A、图22B、图22C和图22D

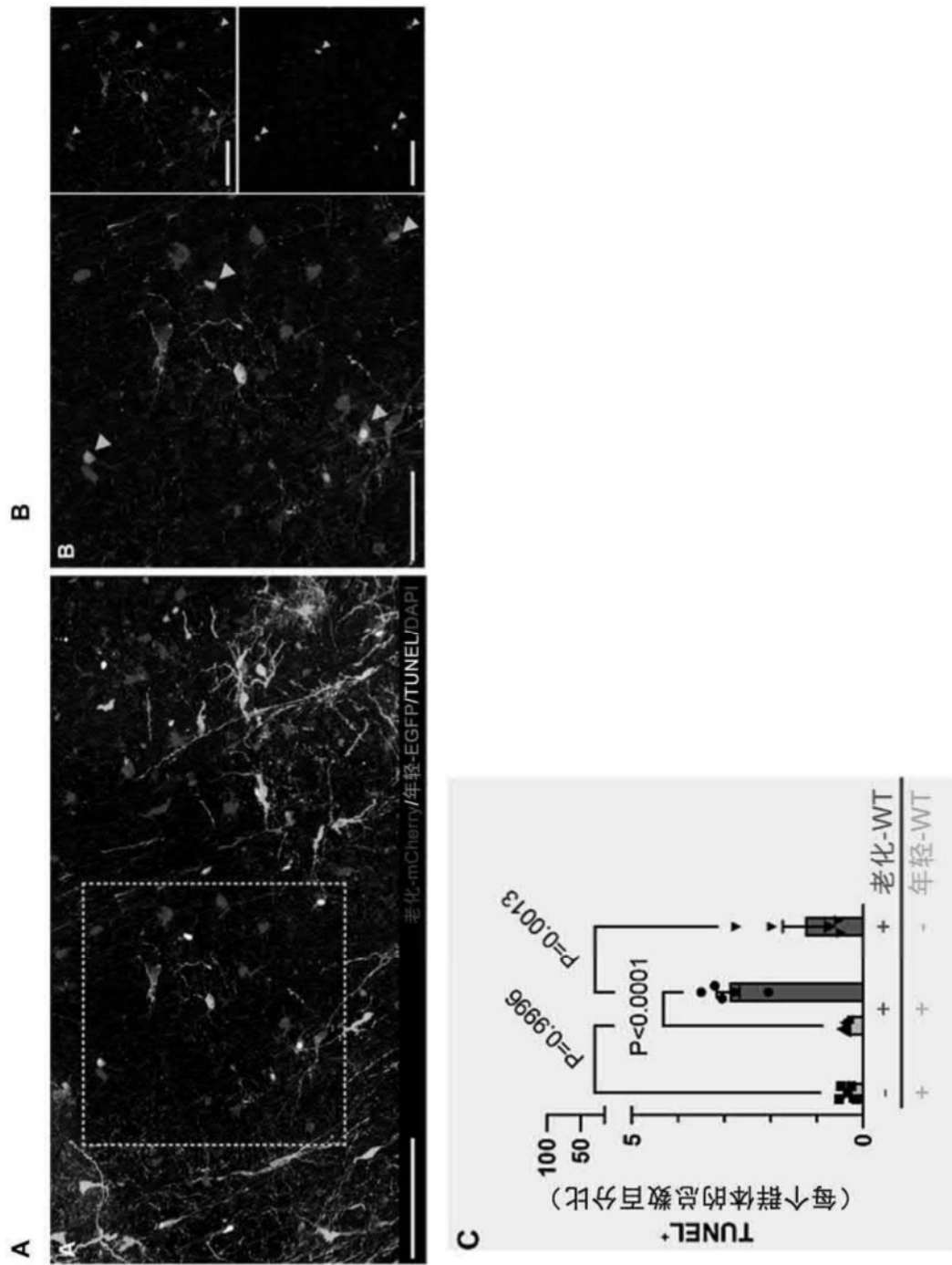


图23A、图23B和图23C

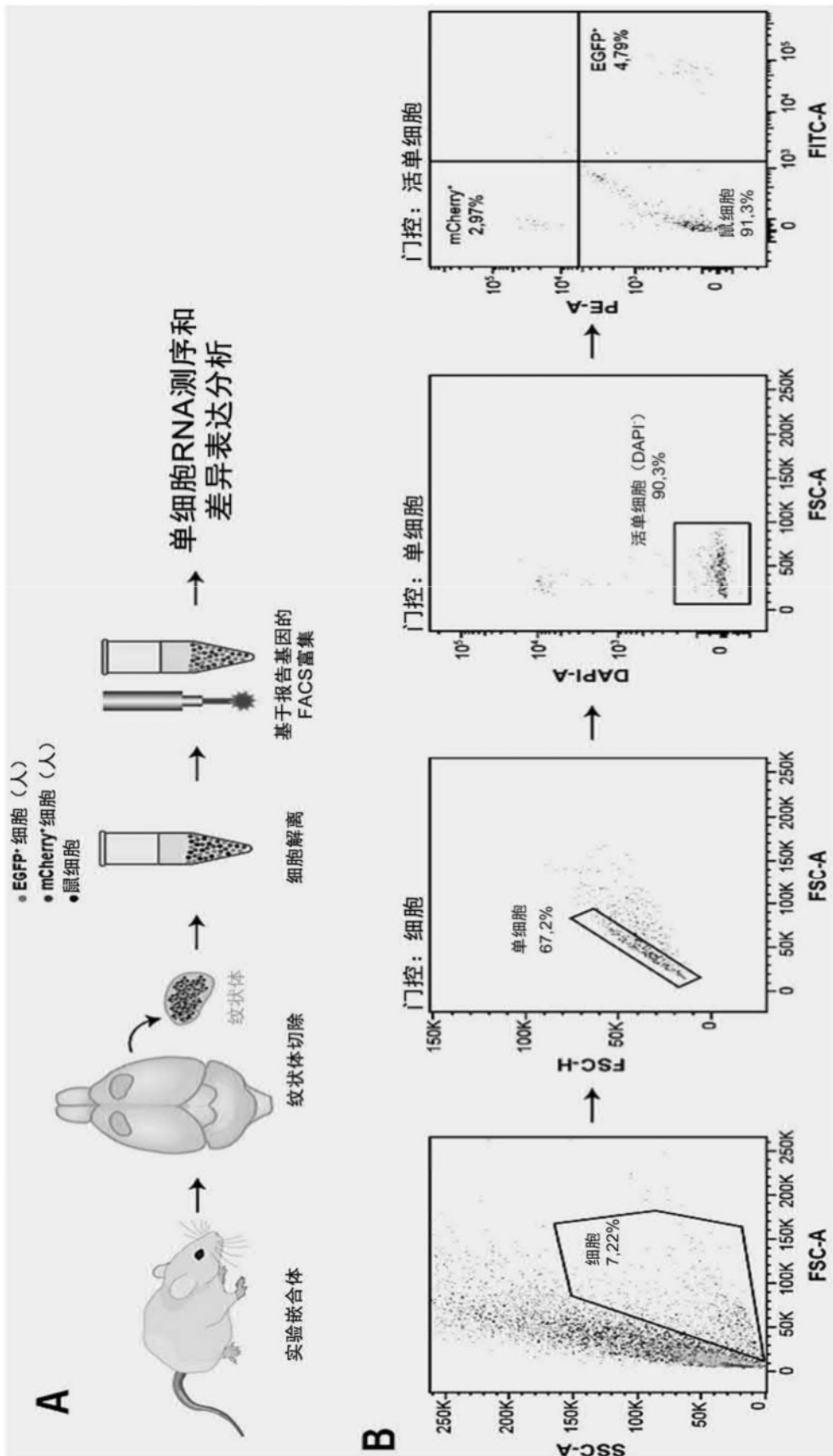


图24A和图24B

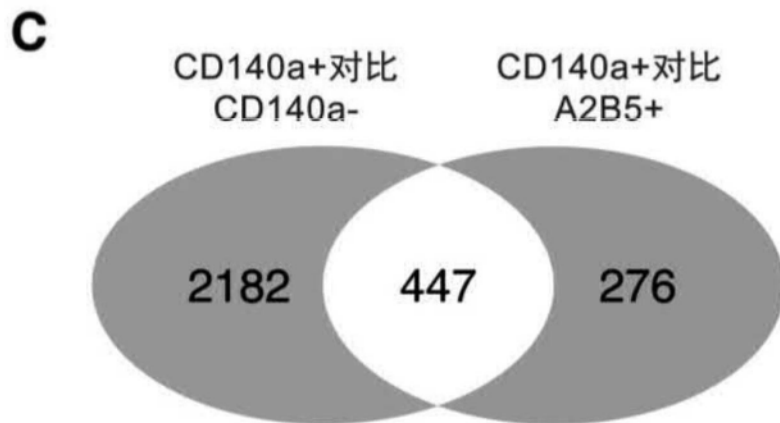
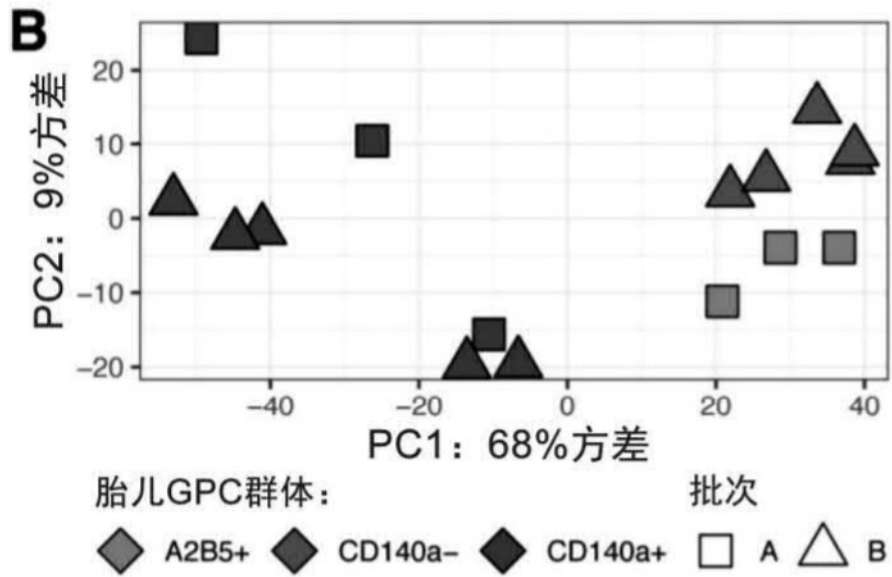
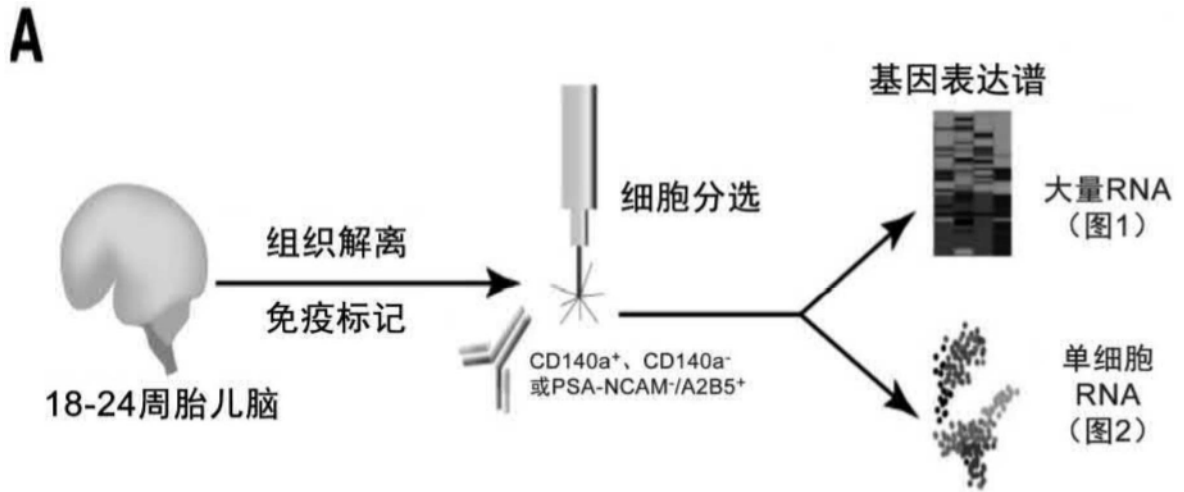


图25A、图25B和图25C

D

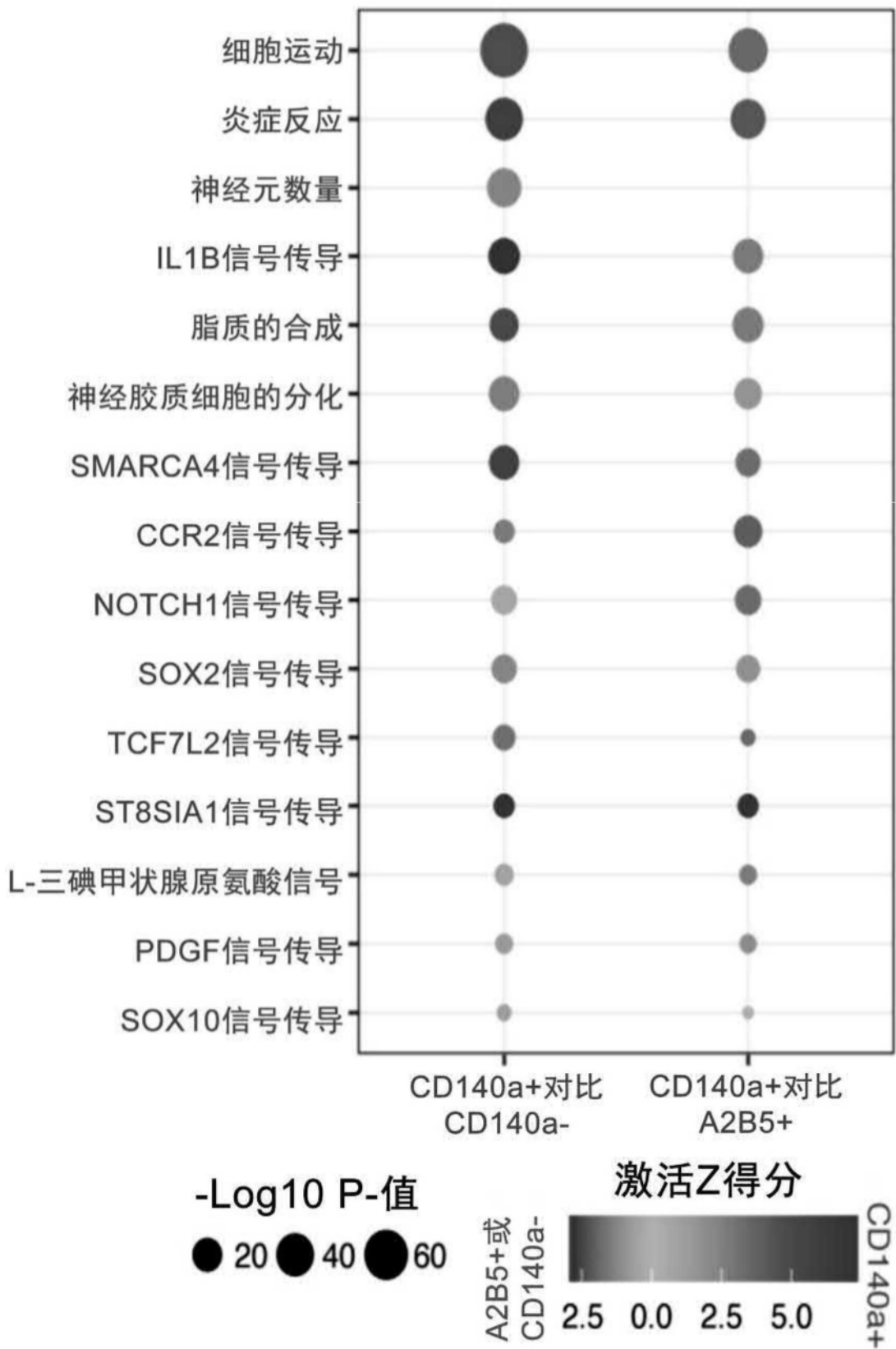


图25D

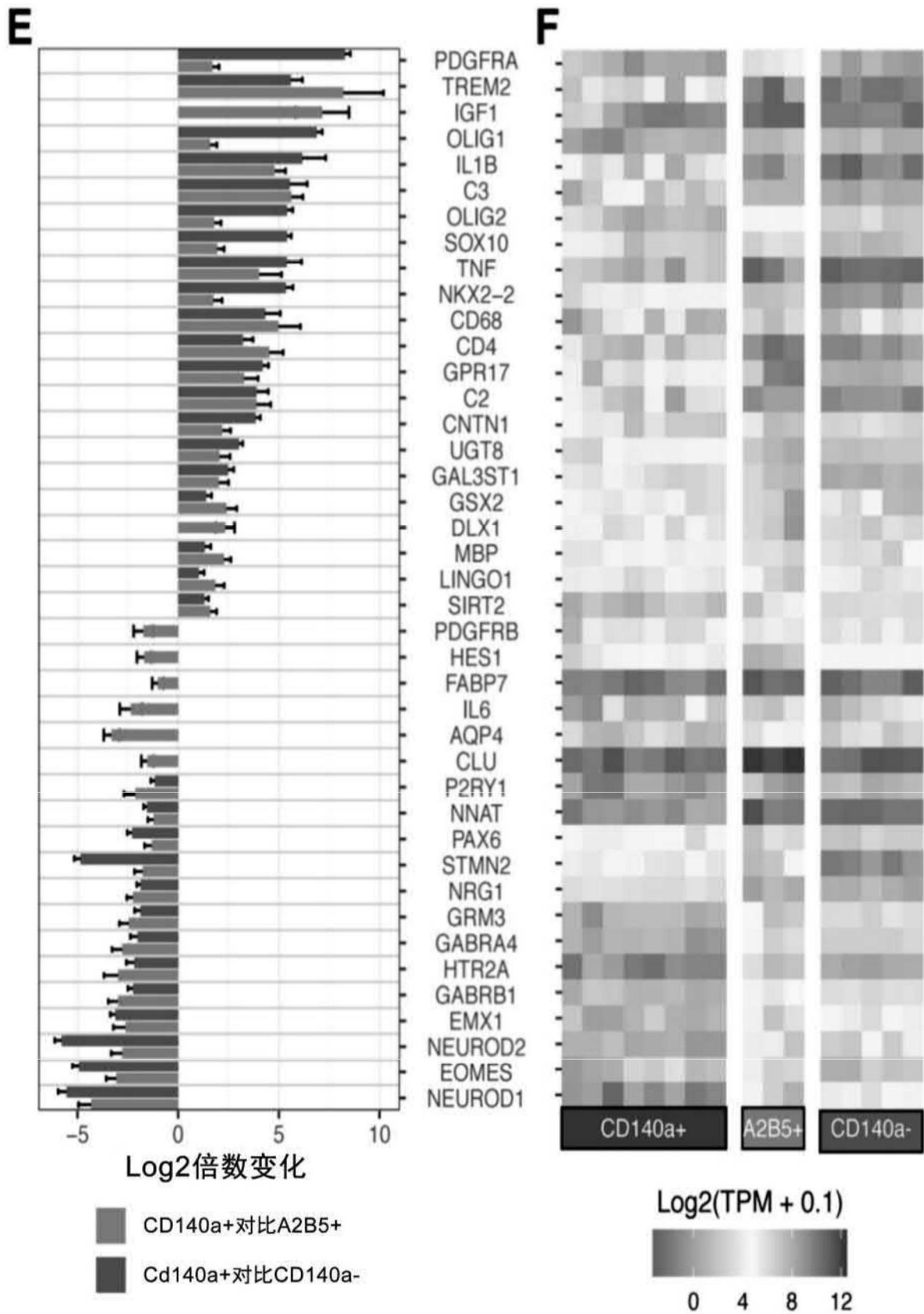


图25E和图25F

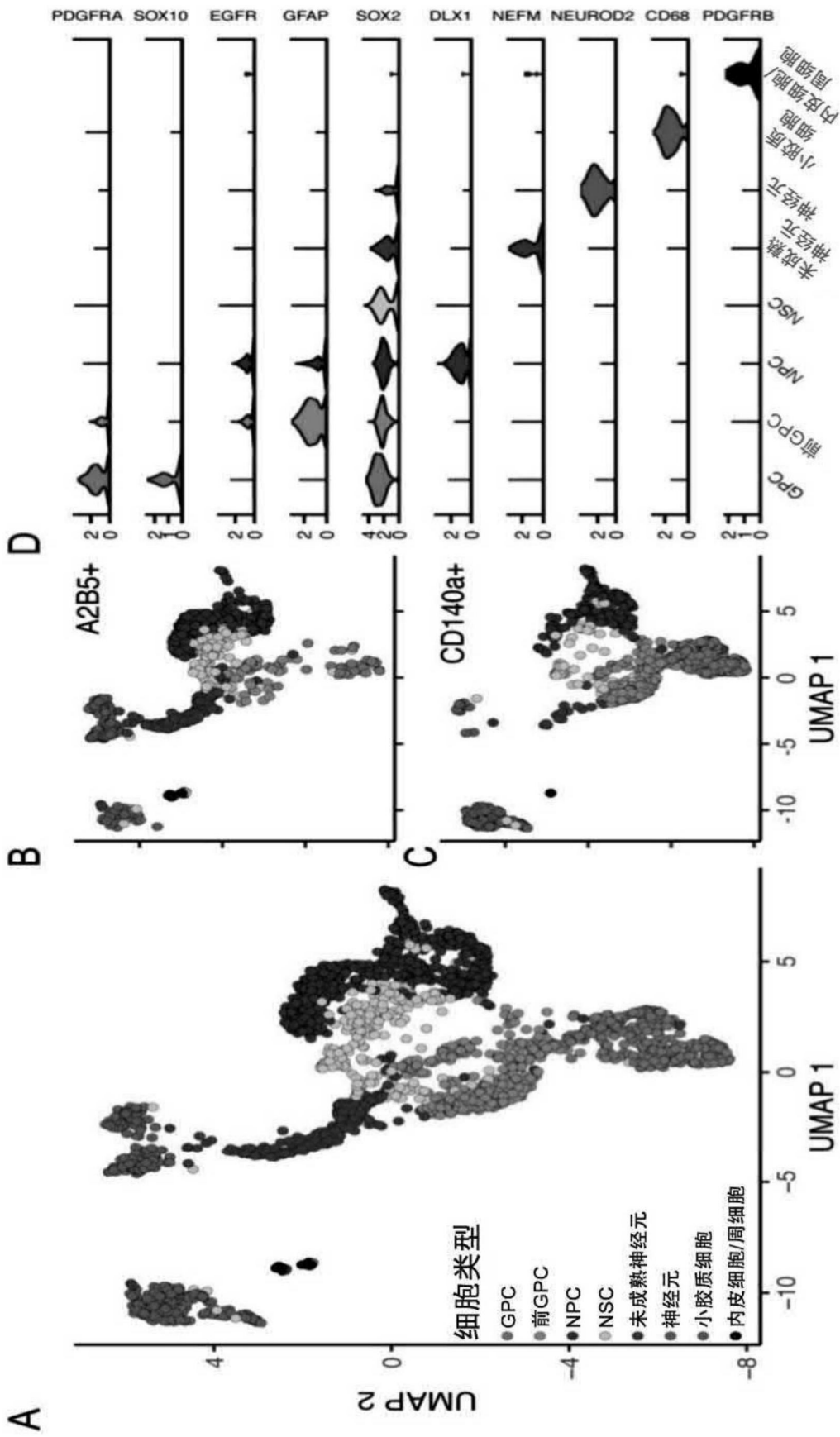


图26A、图26B、图26C和图26D

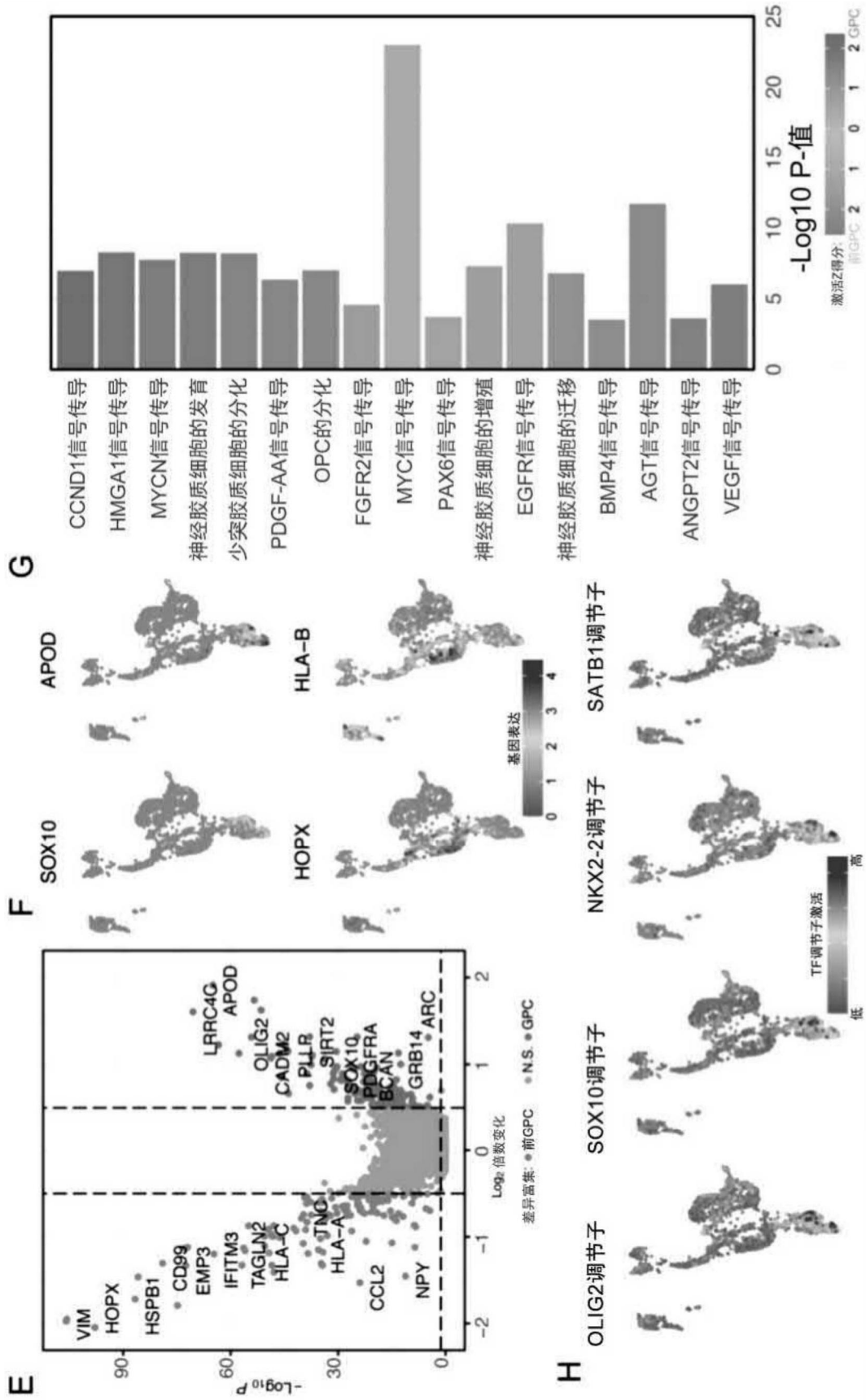


图26E、图26F、图26G和图26H

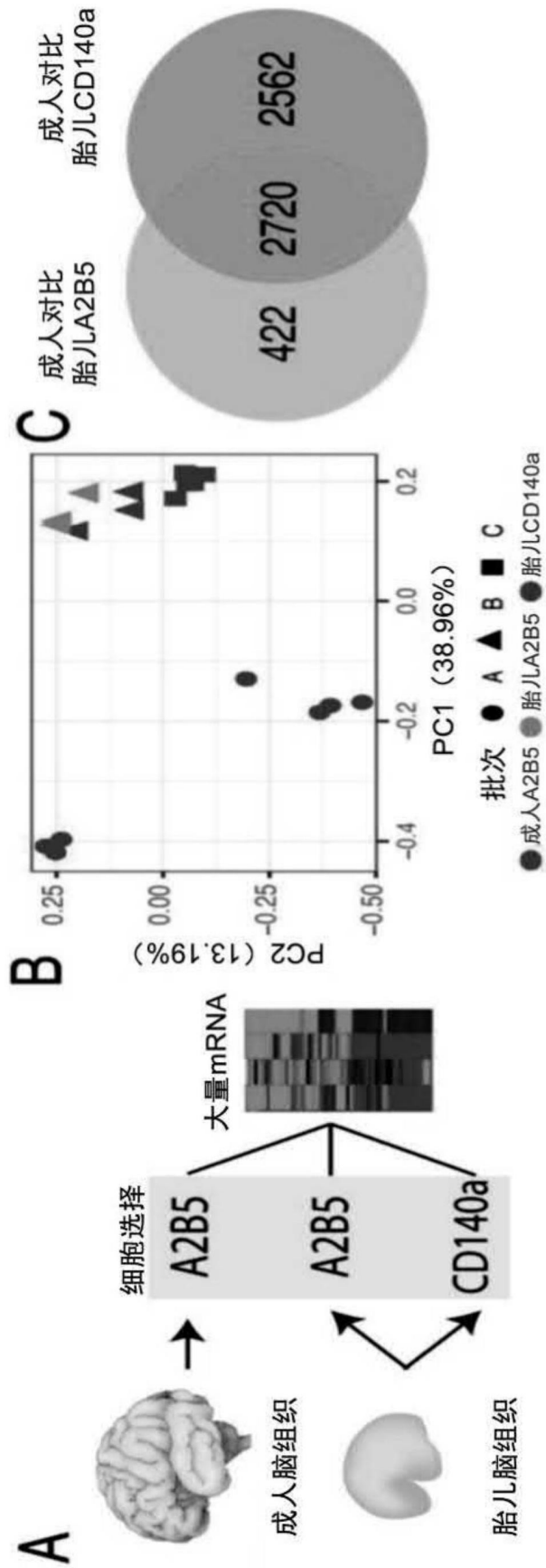


图27A、图27B和图27C

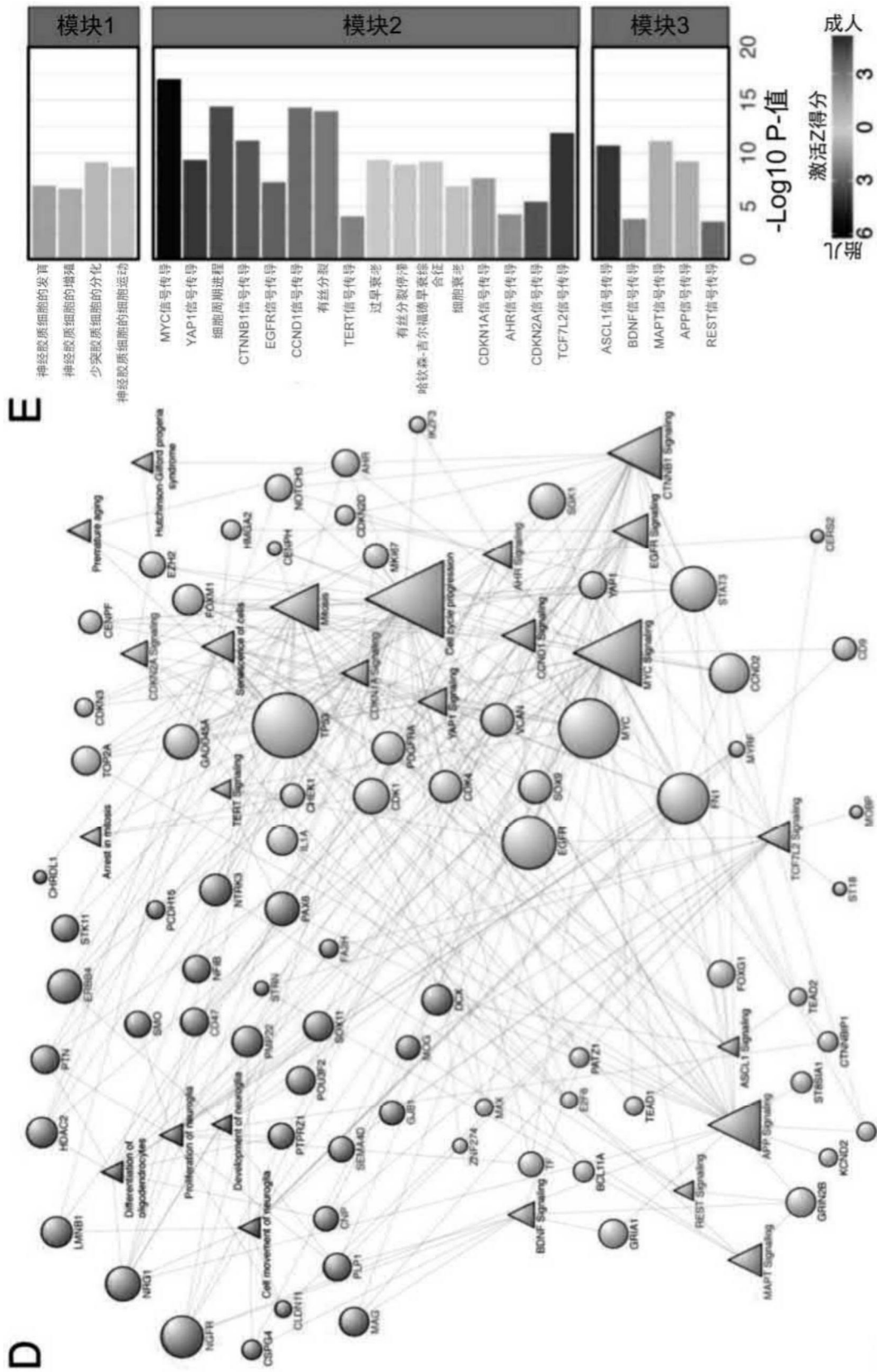


图27D和图27E

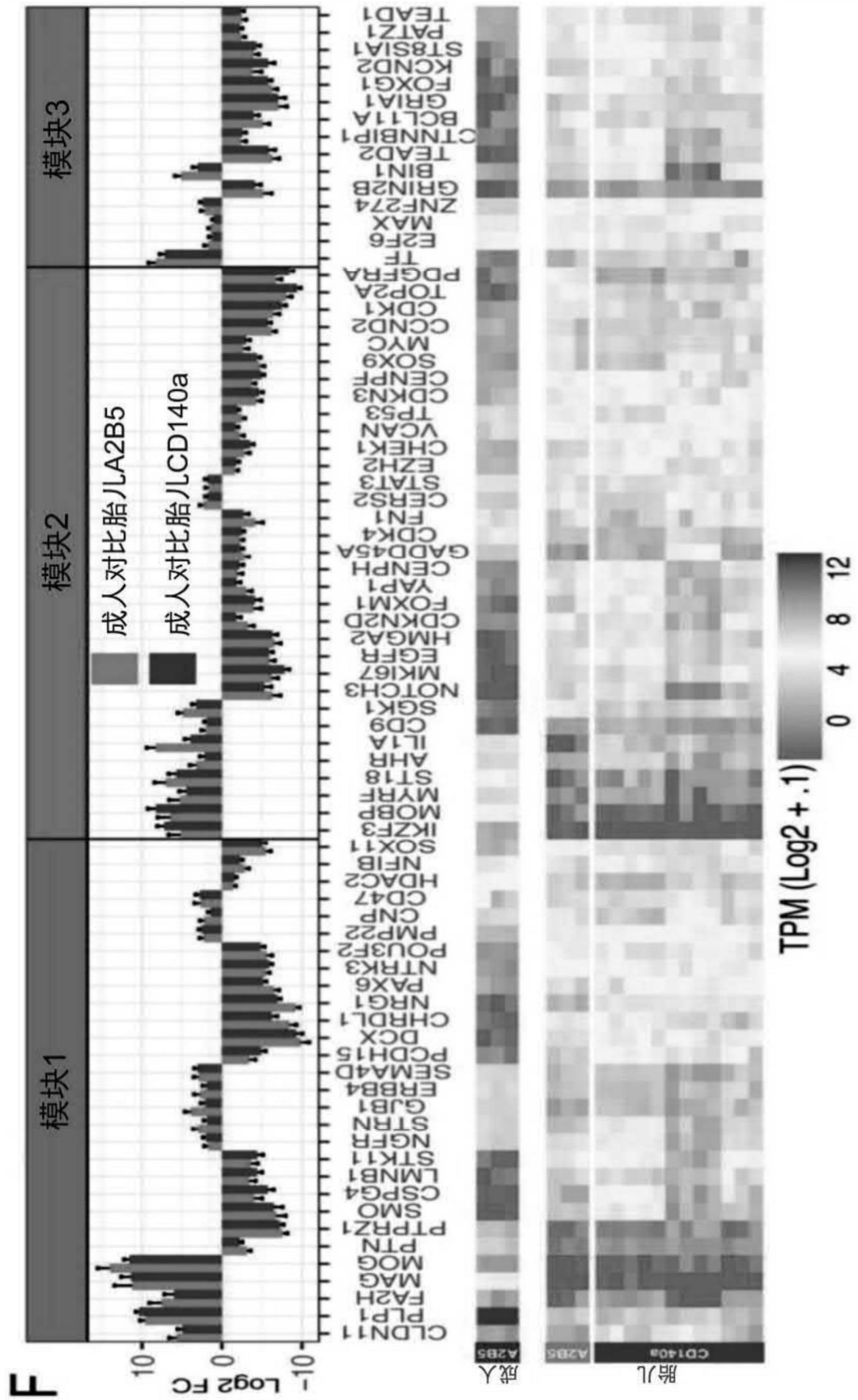


图27F

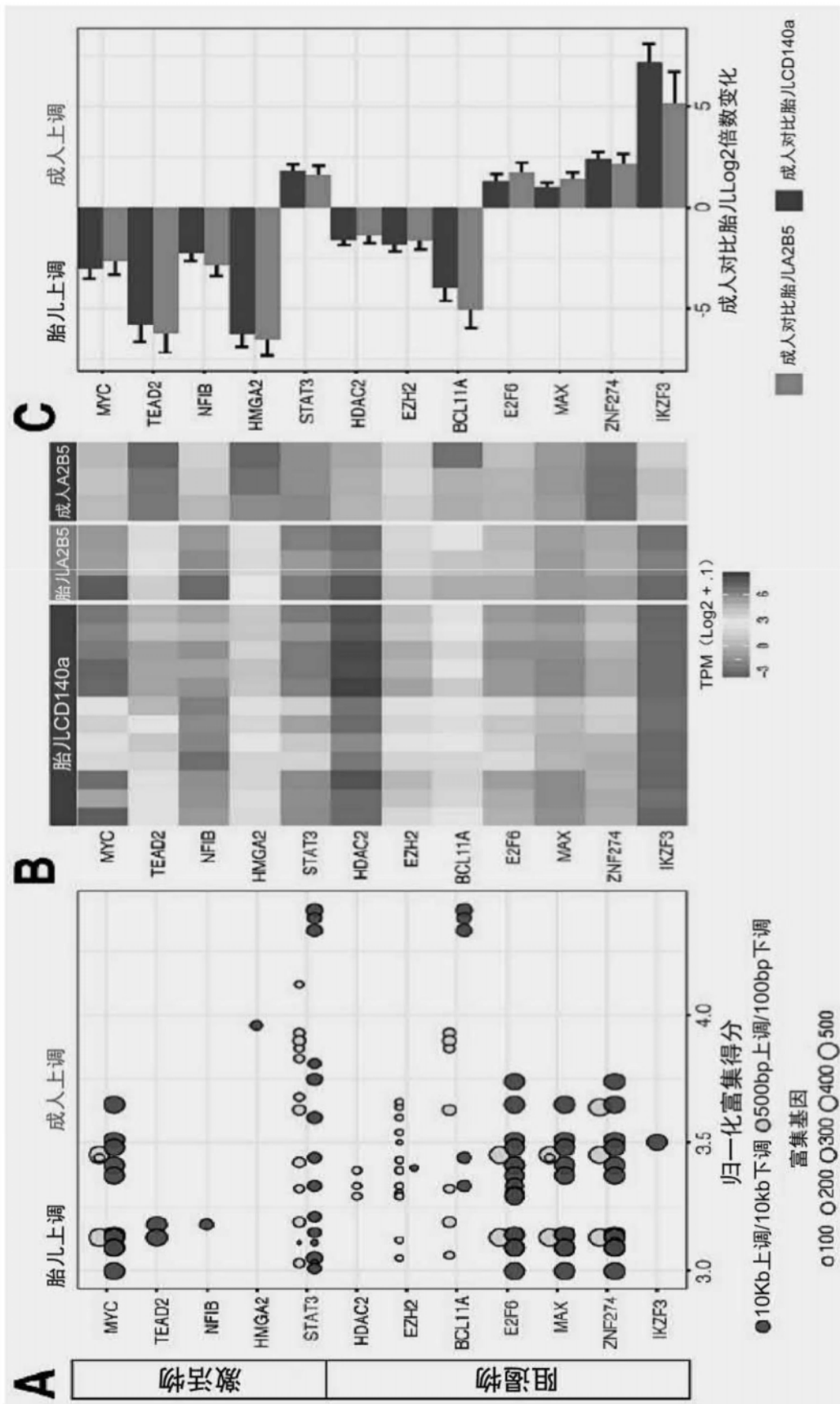


图28A、图28B和图28C

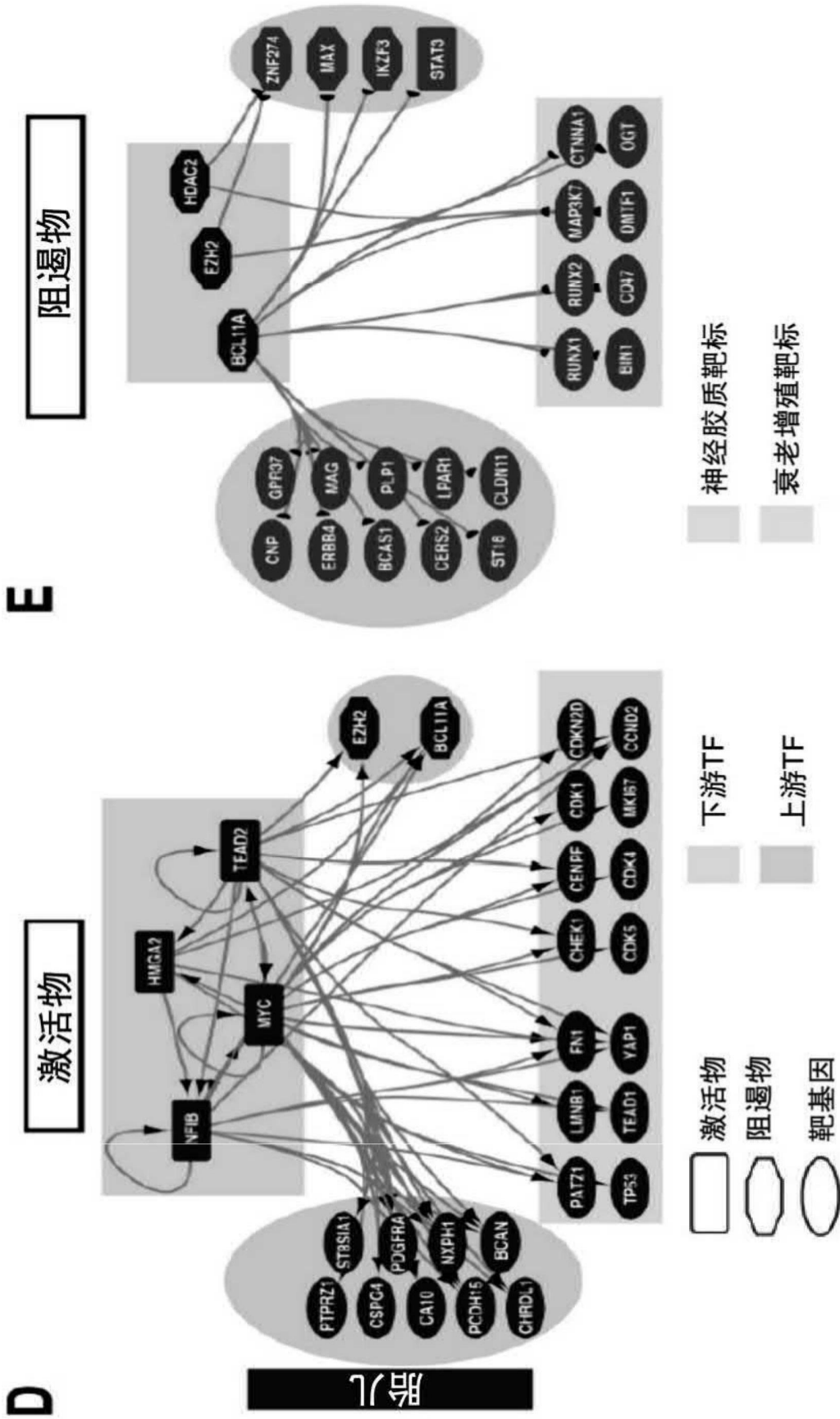


图28D和图28E

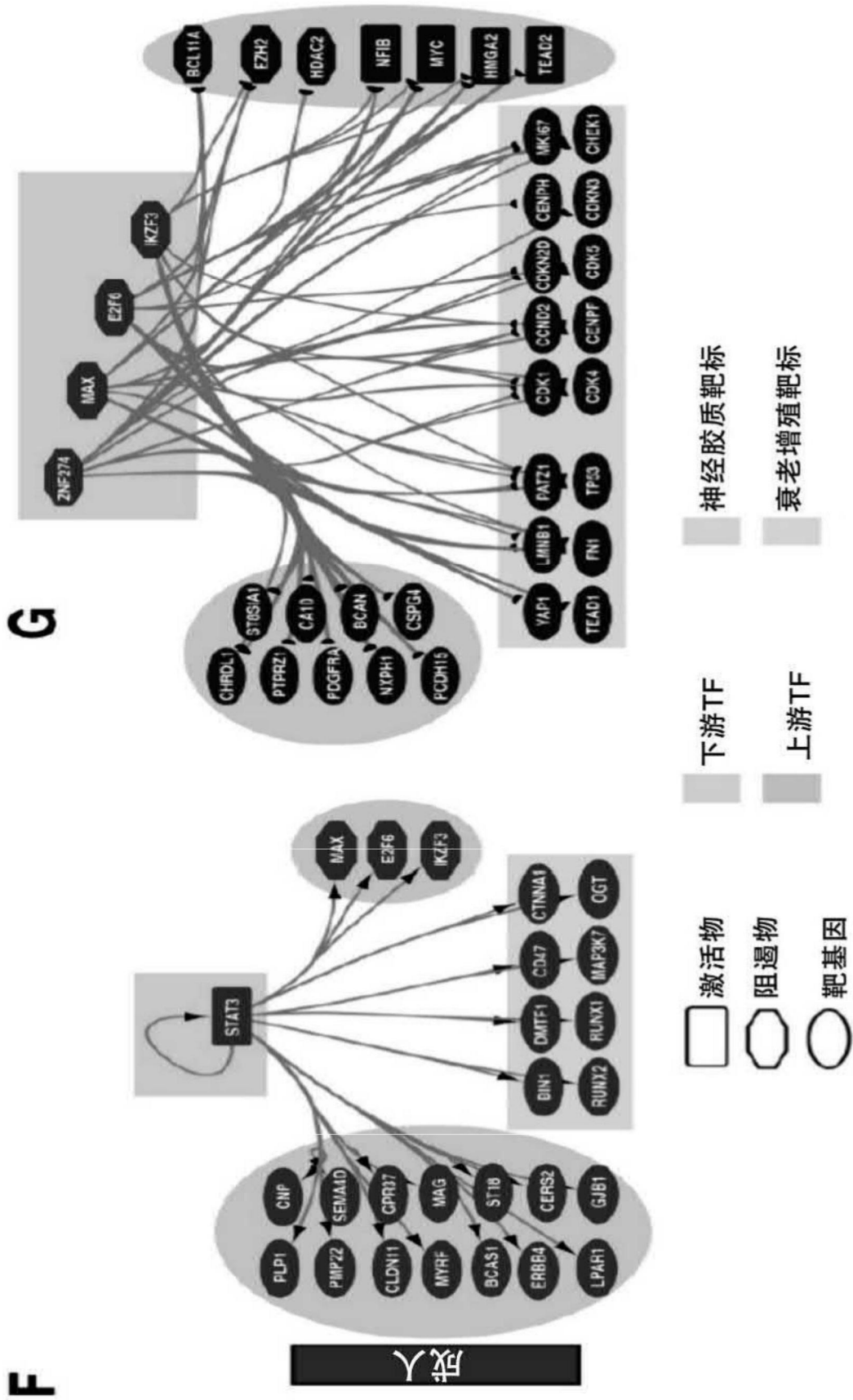


图28F和图28G

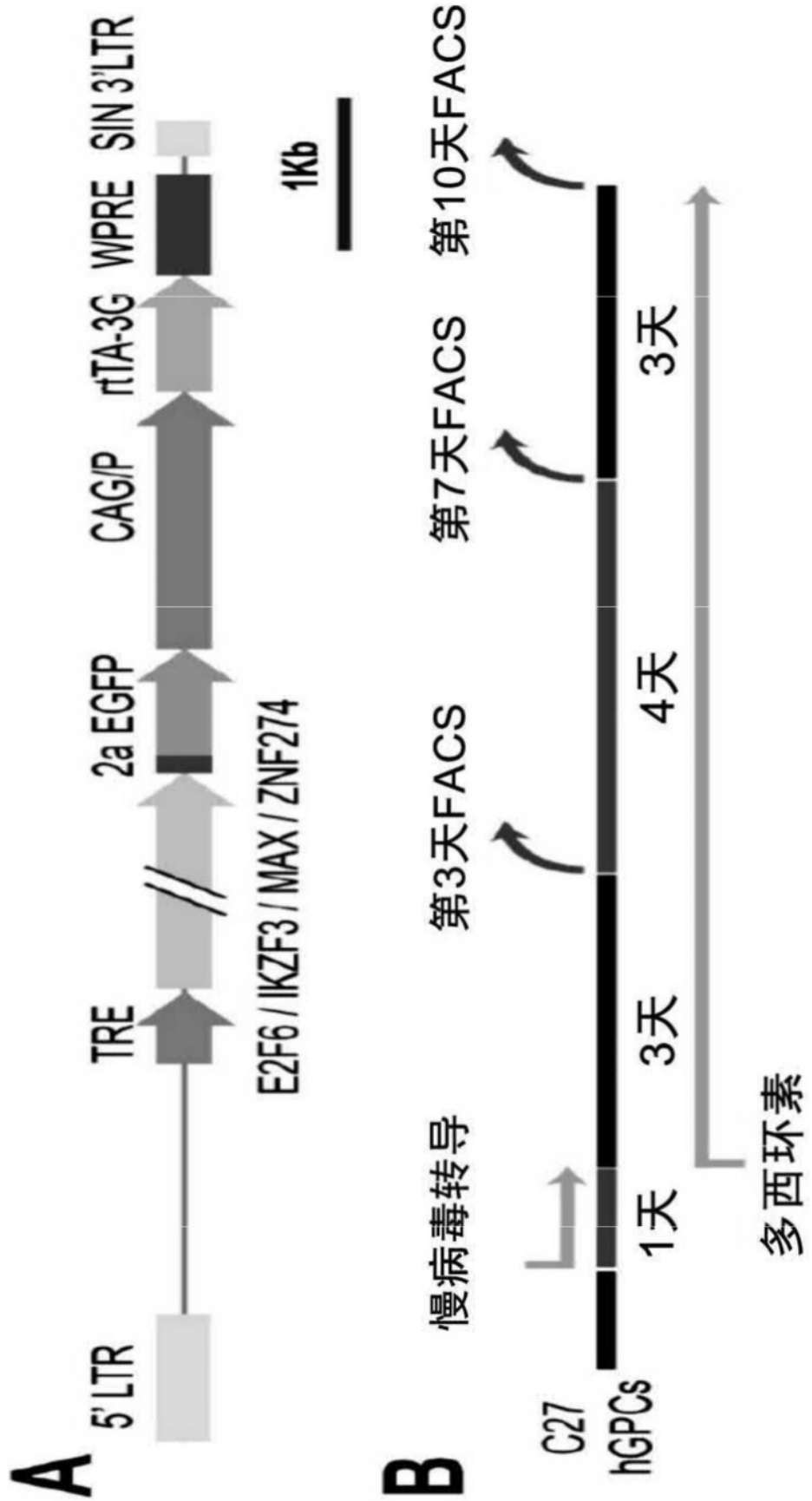


图29A和图29B

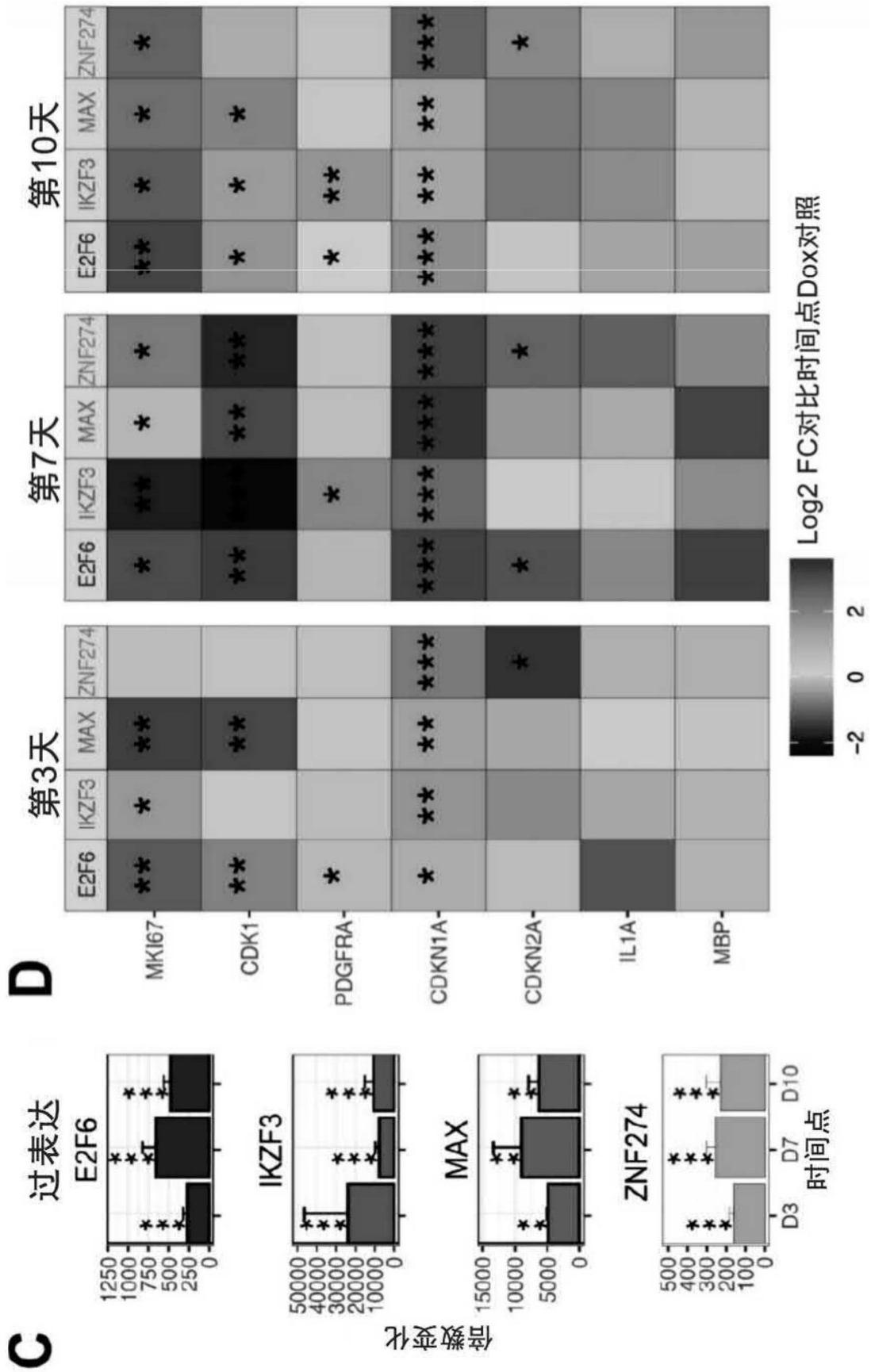


图29C和图29D

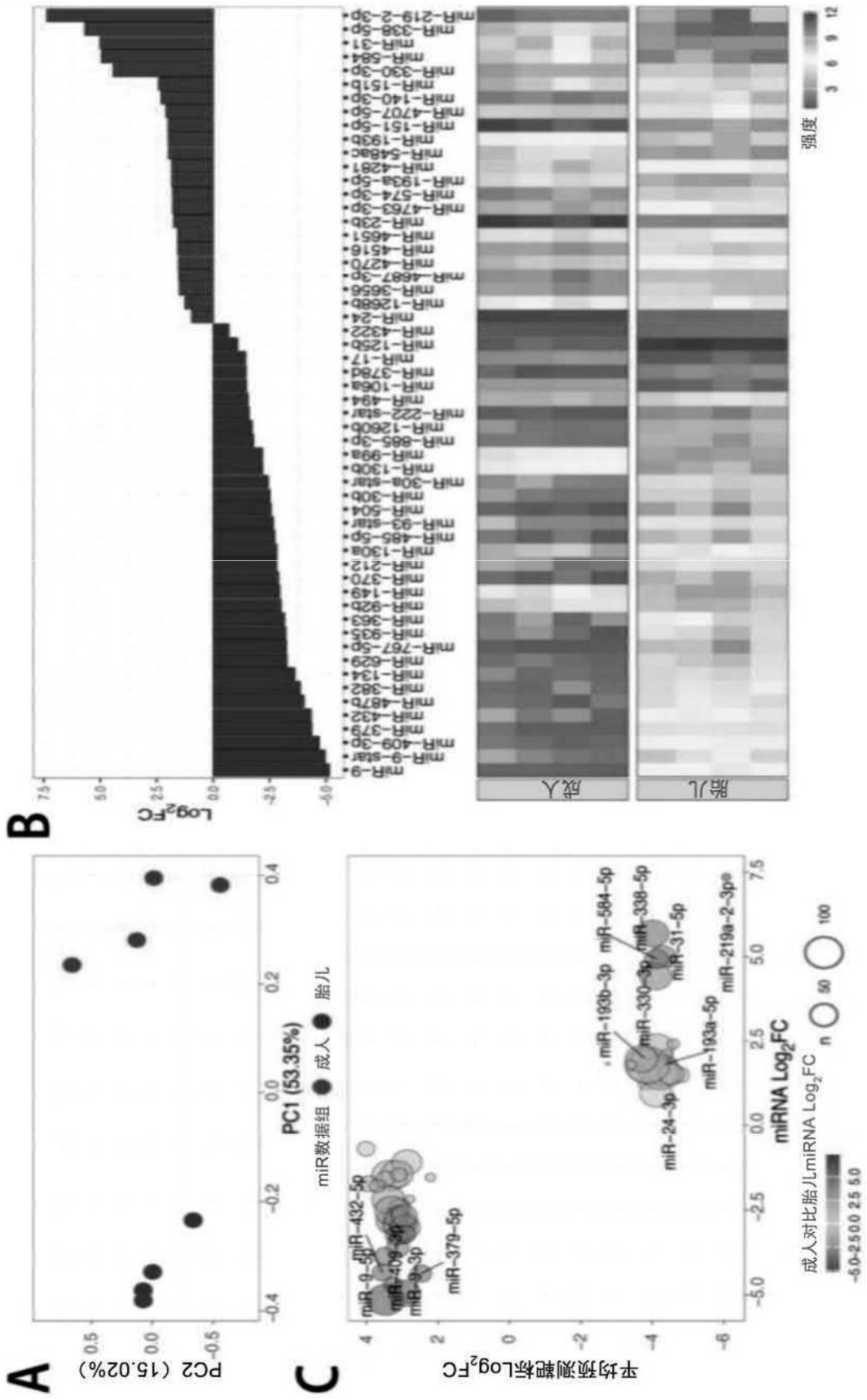


图30A、图30B和图30C

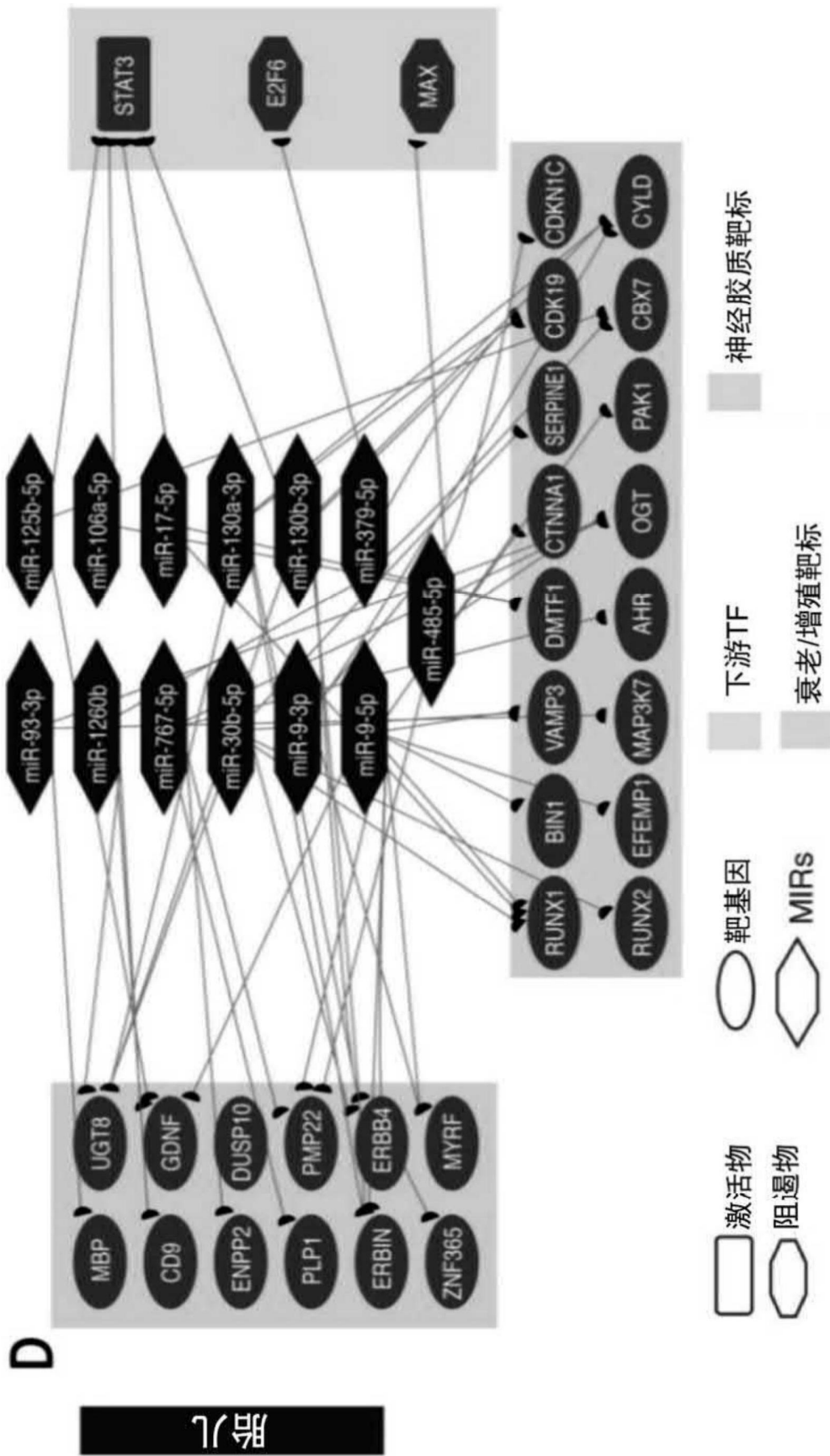


图30D

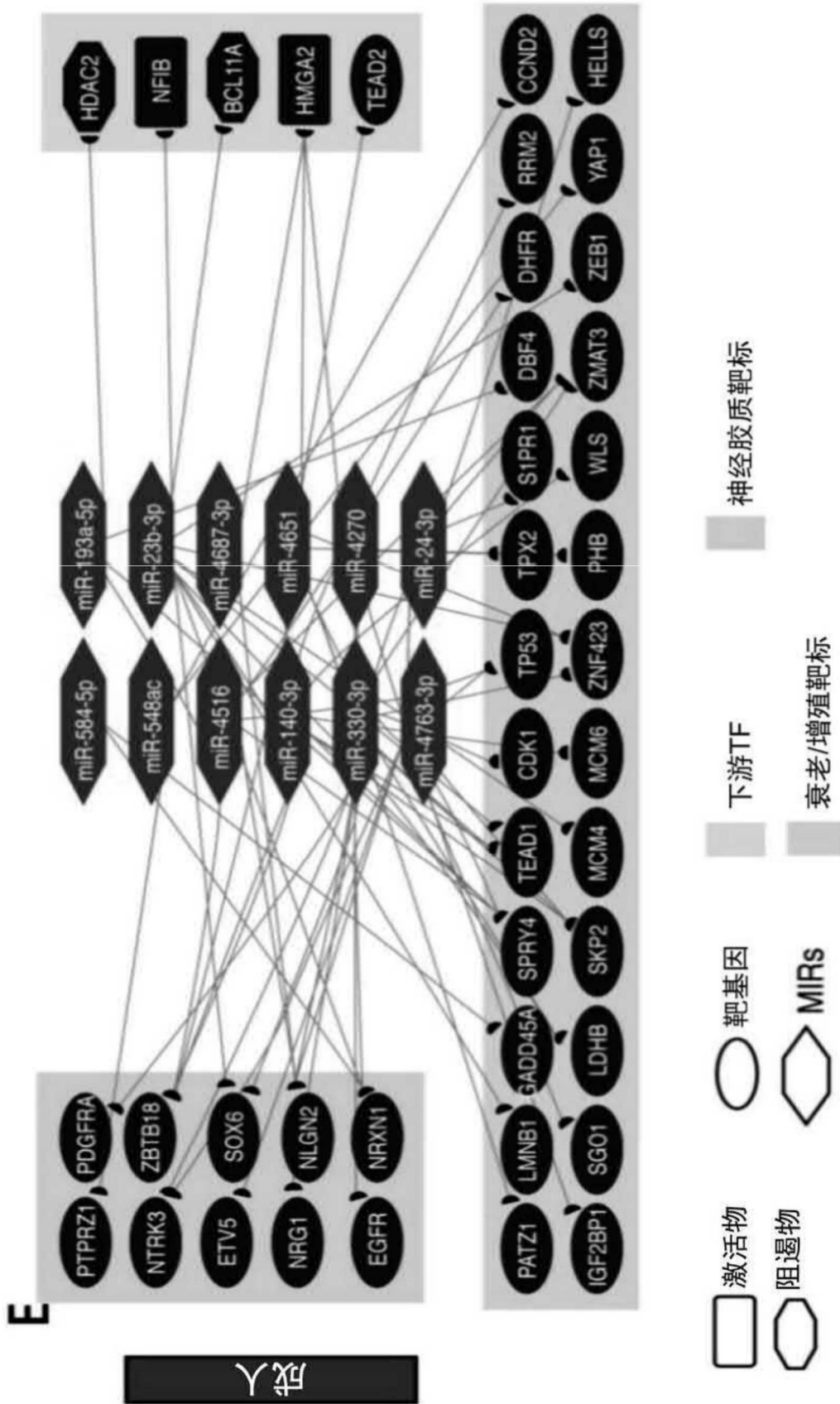


图30E

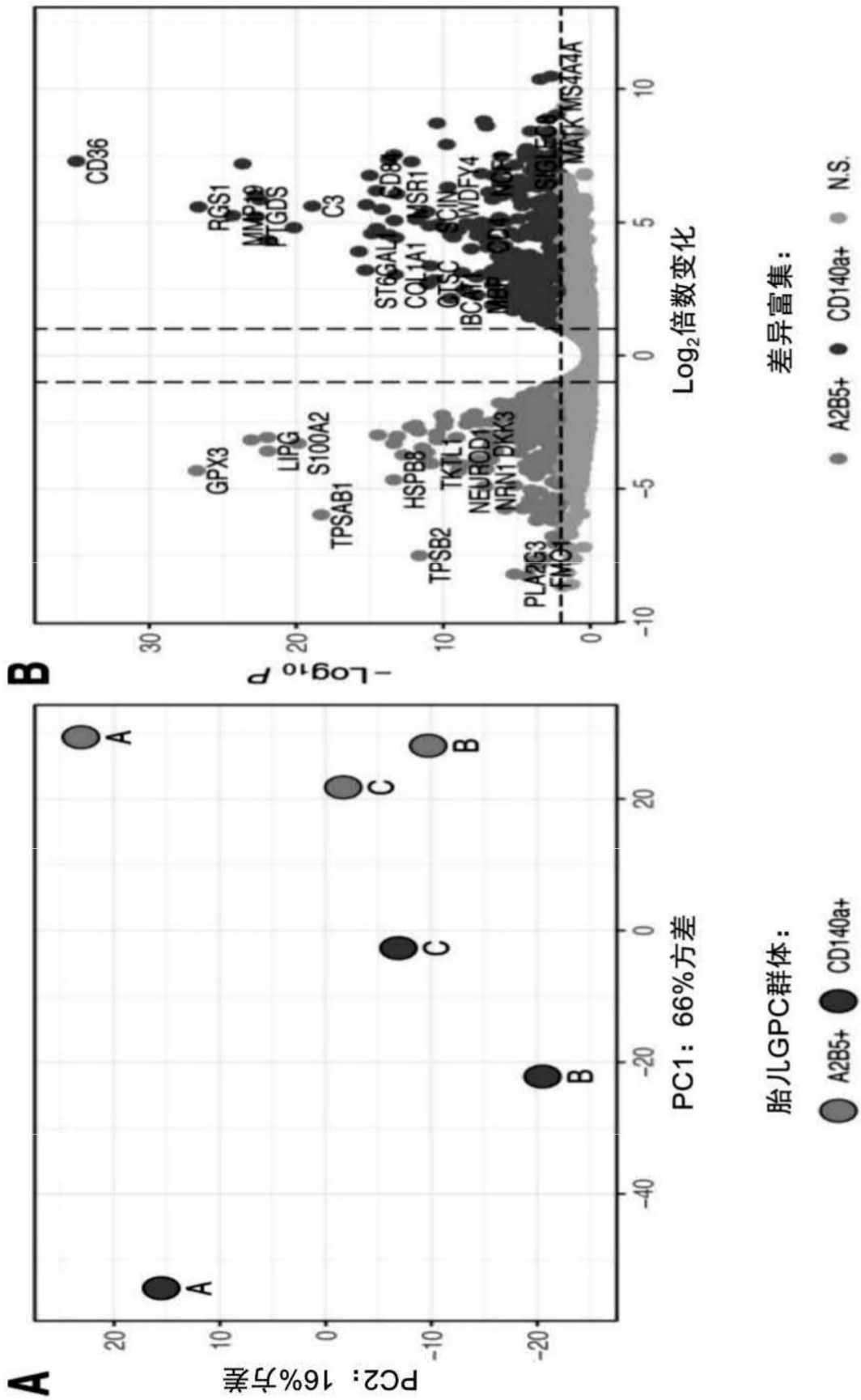


图31A和图31B

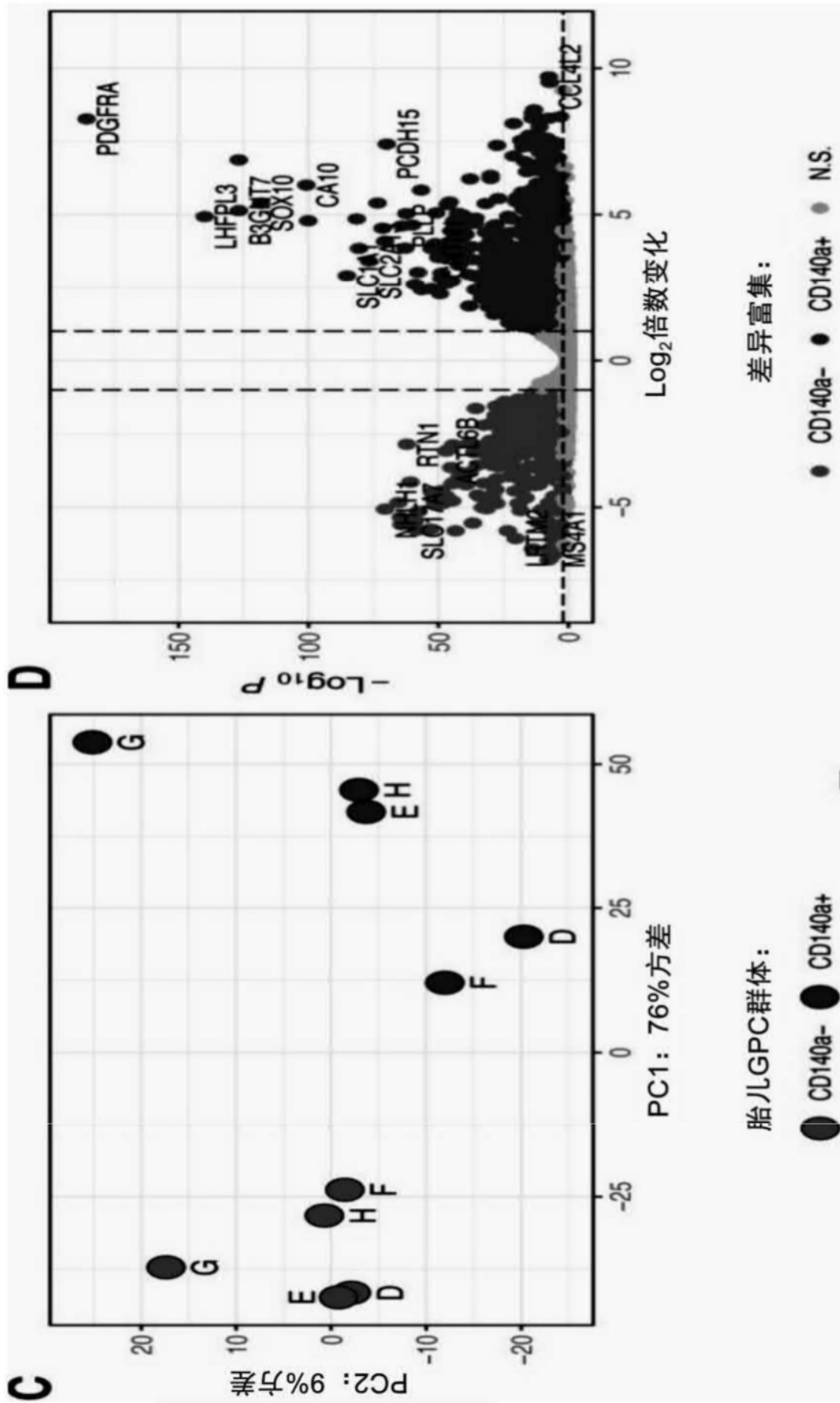


图31C和图31D

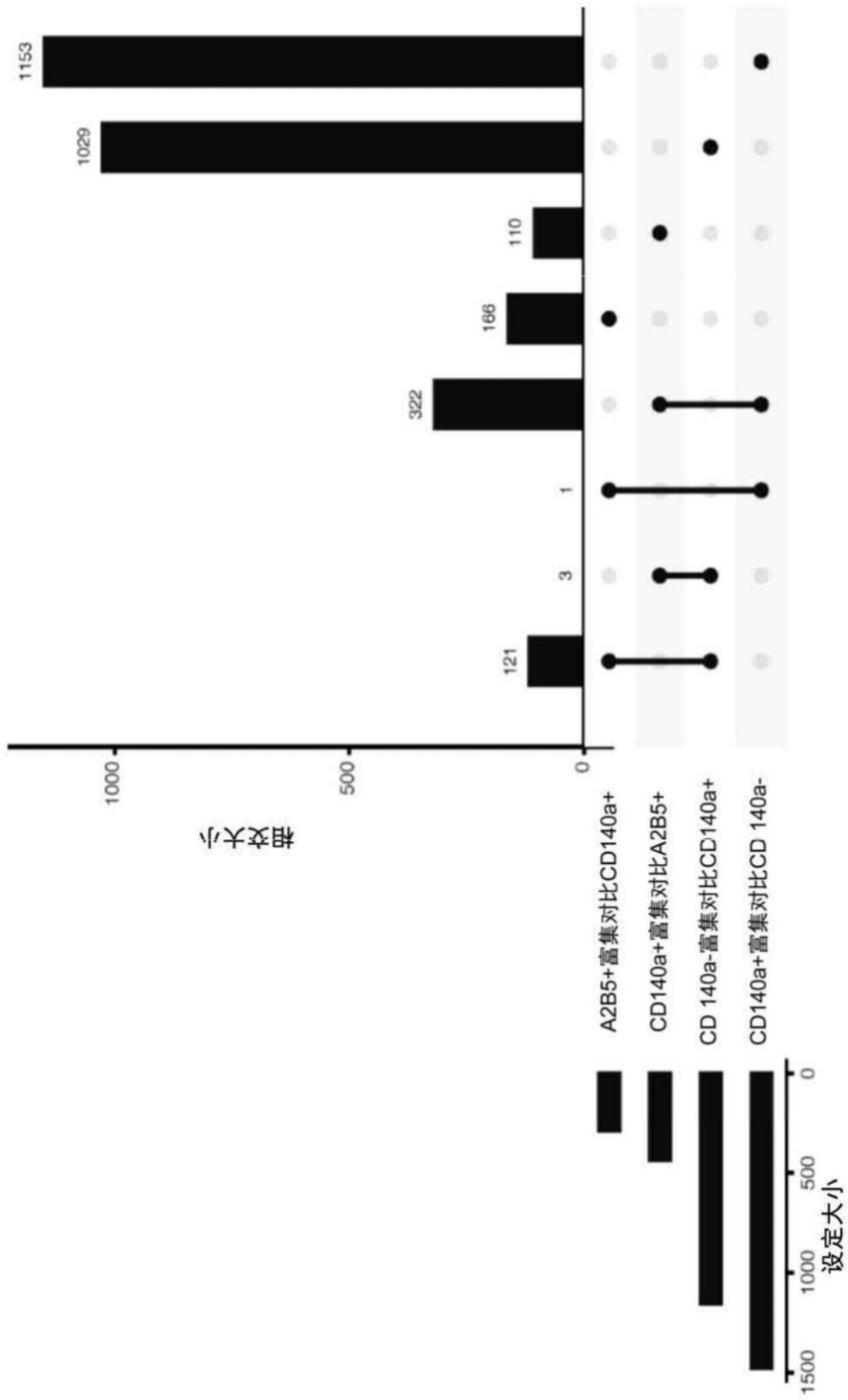


图31E

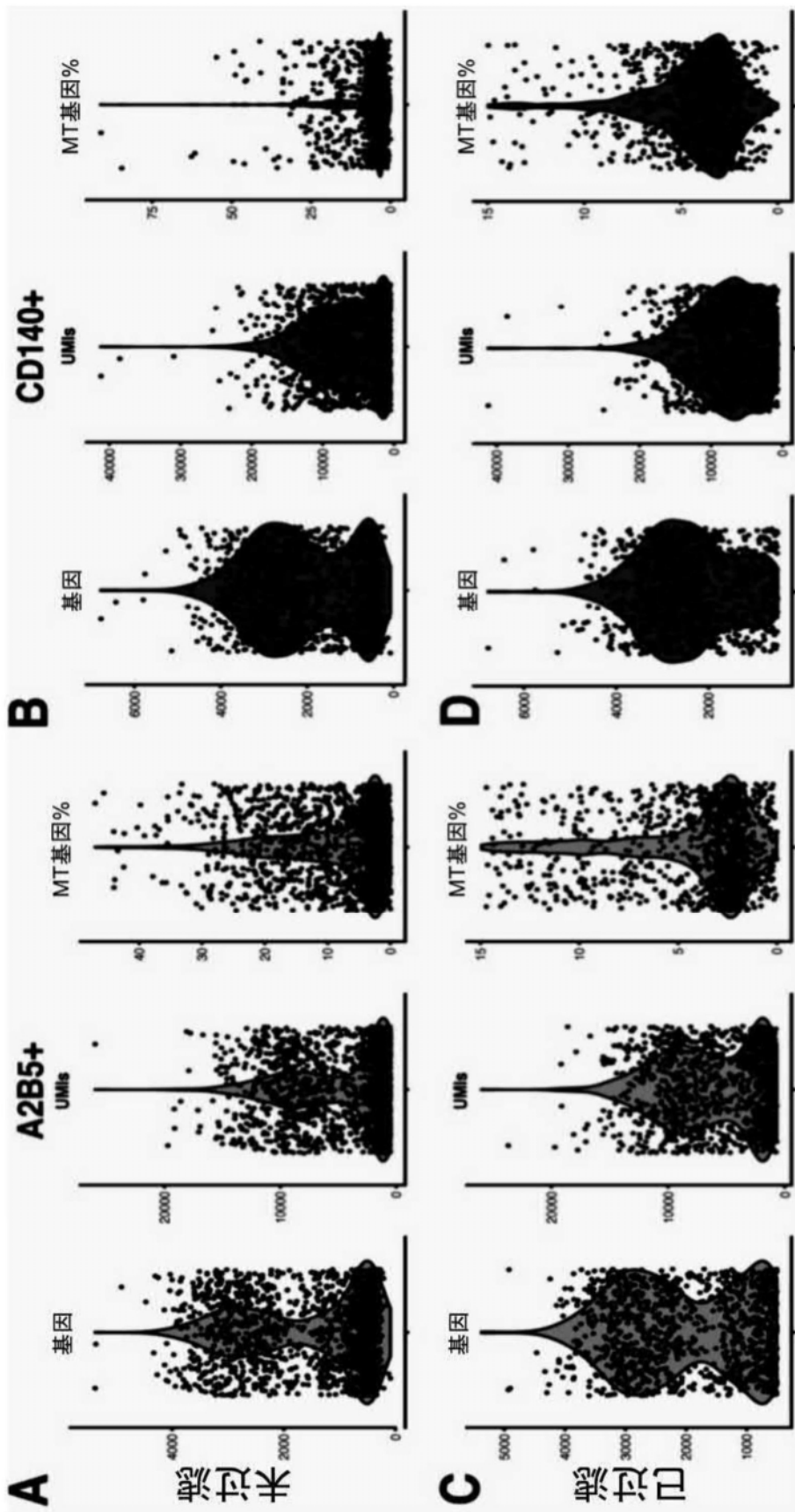


图32A、图32B、图32C和图32D

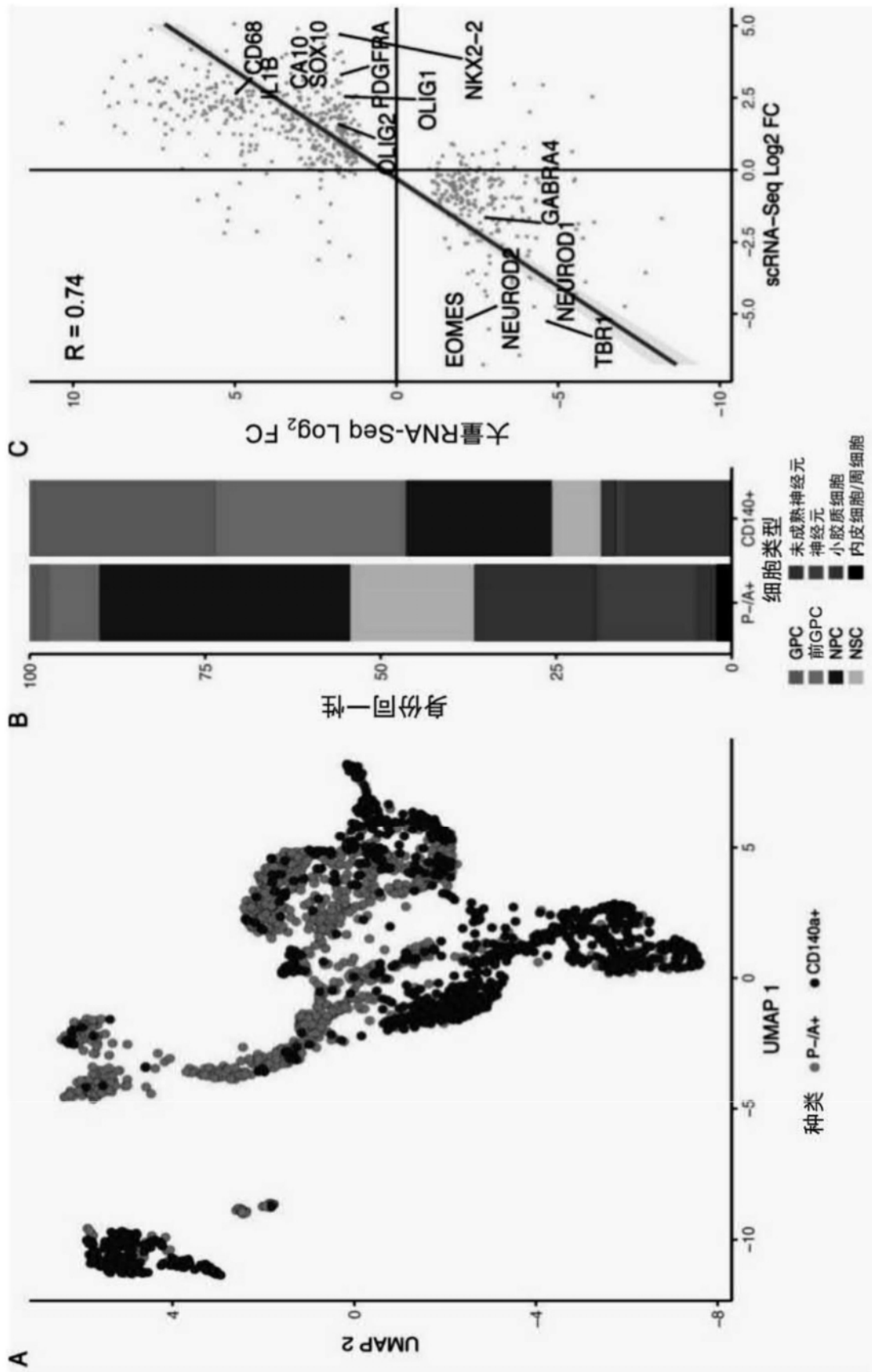


图33A、图33B和图33C

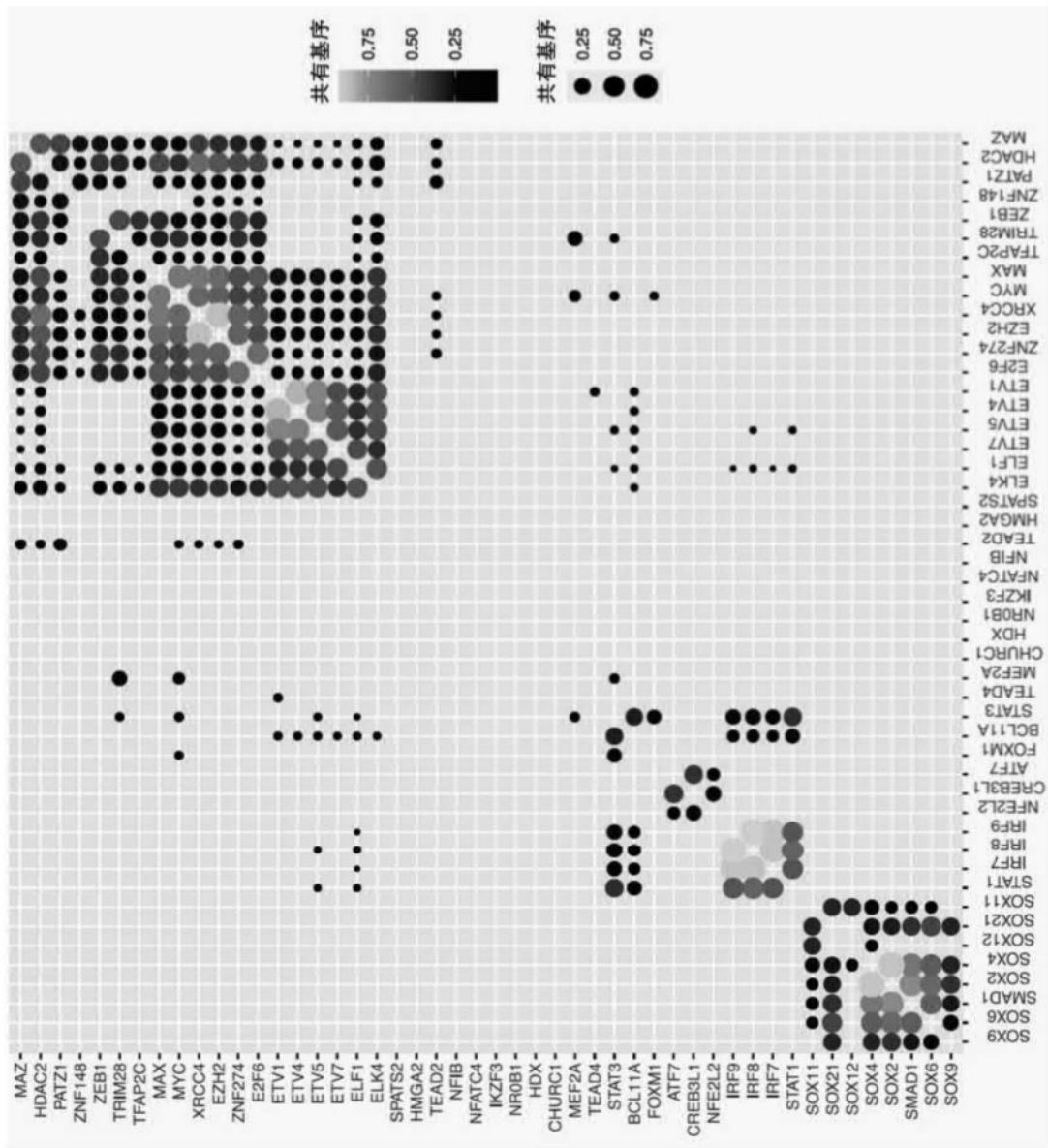


图34

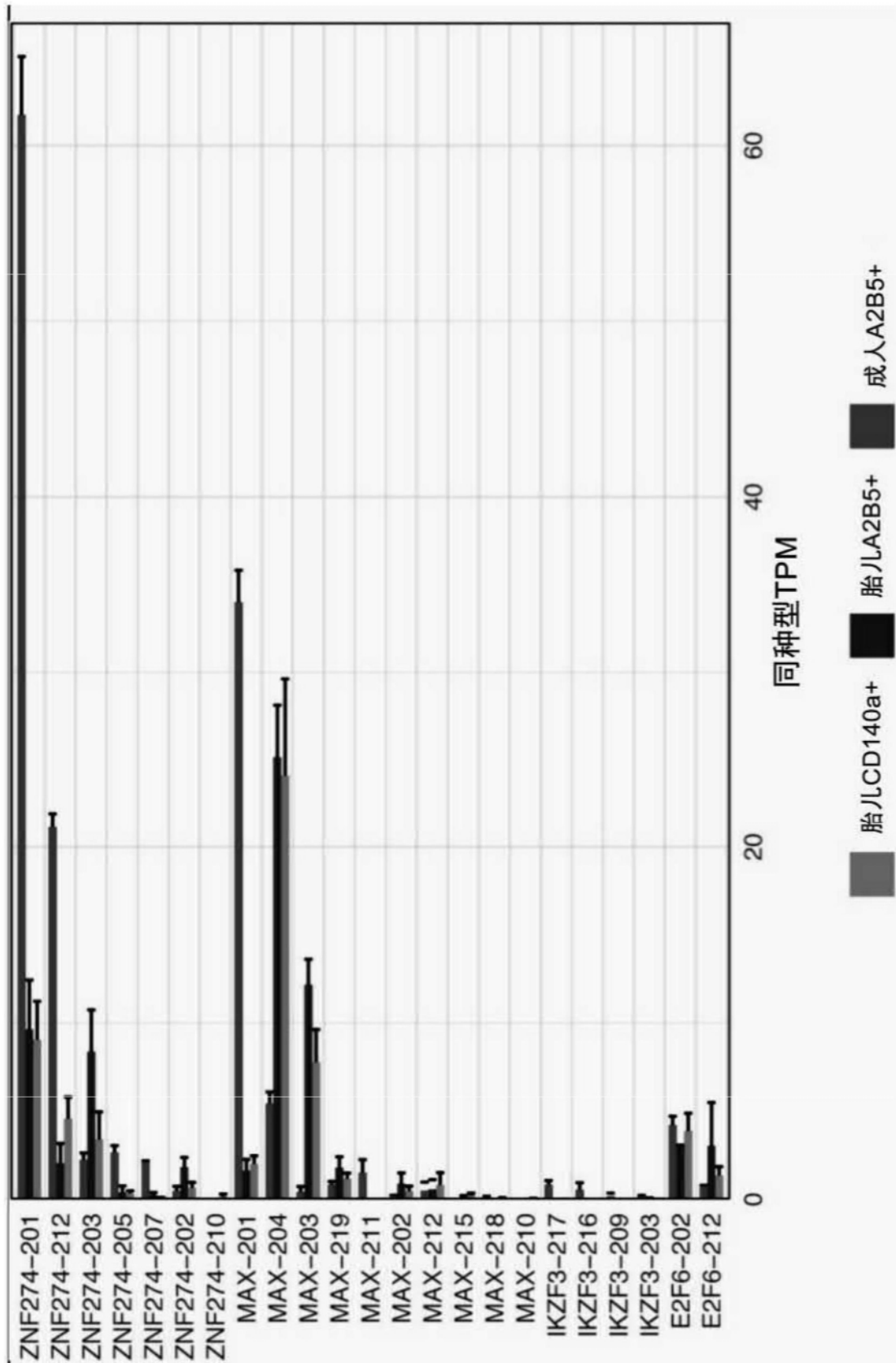


图35

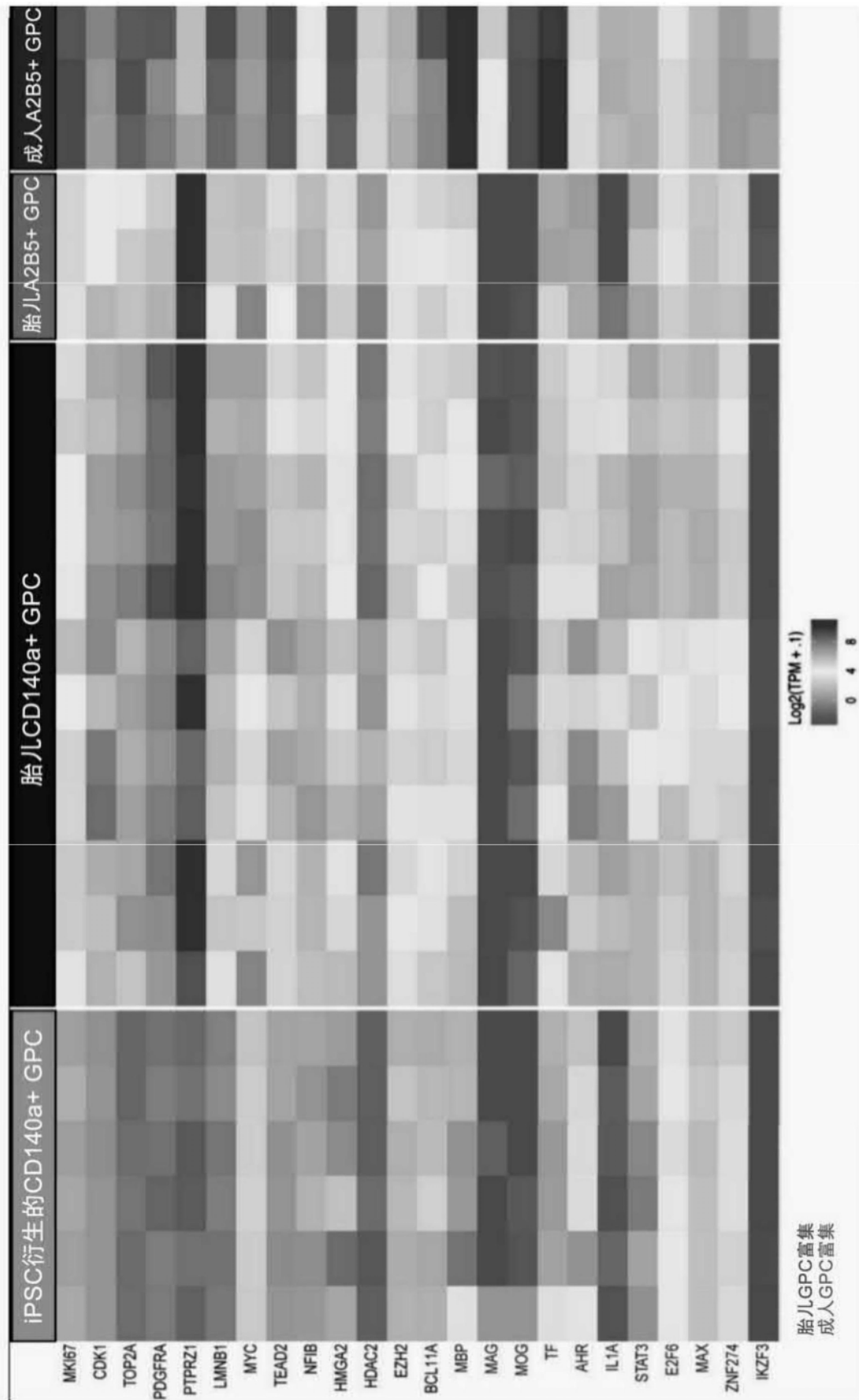


图36

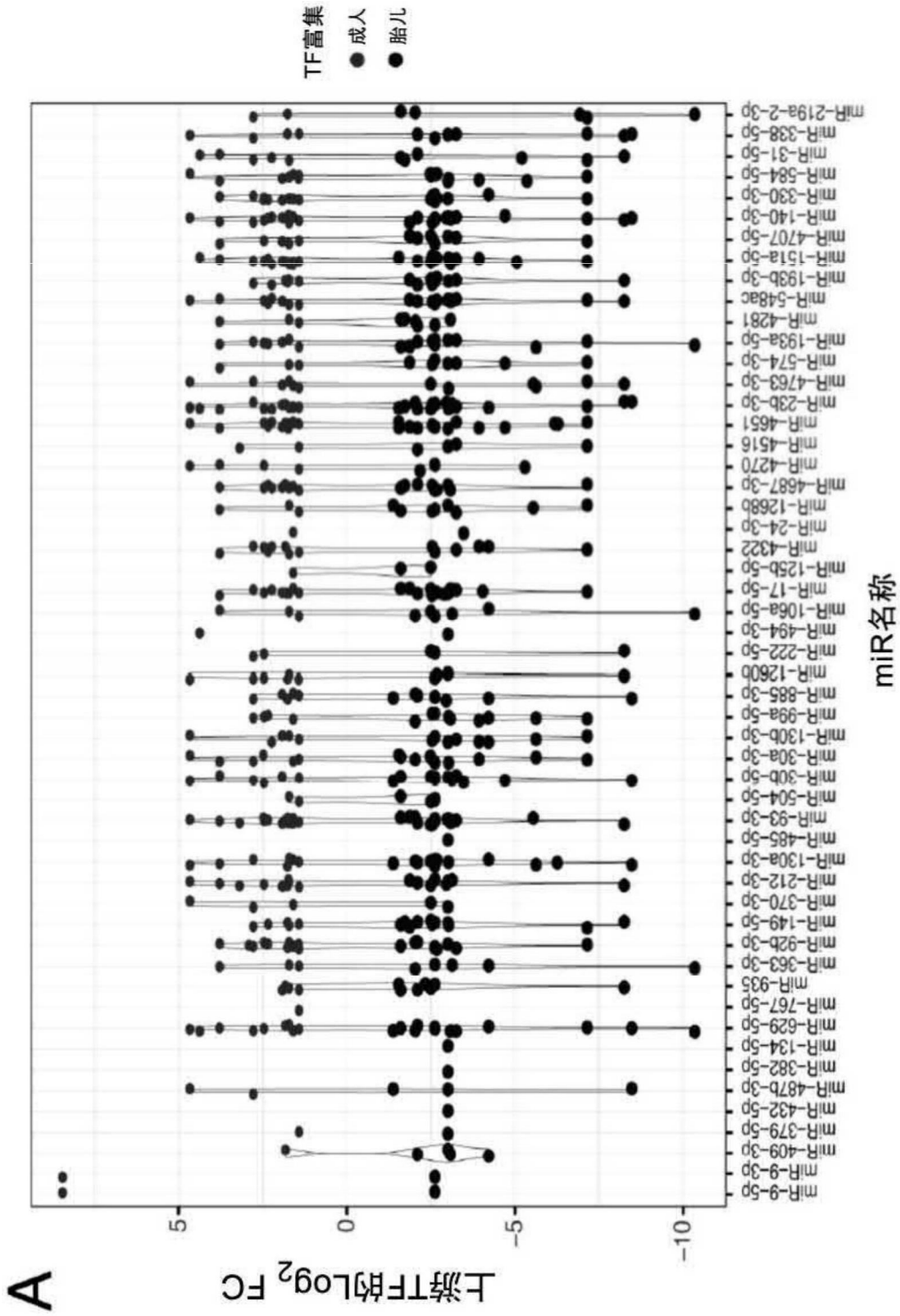


图37A

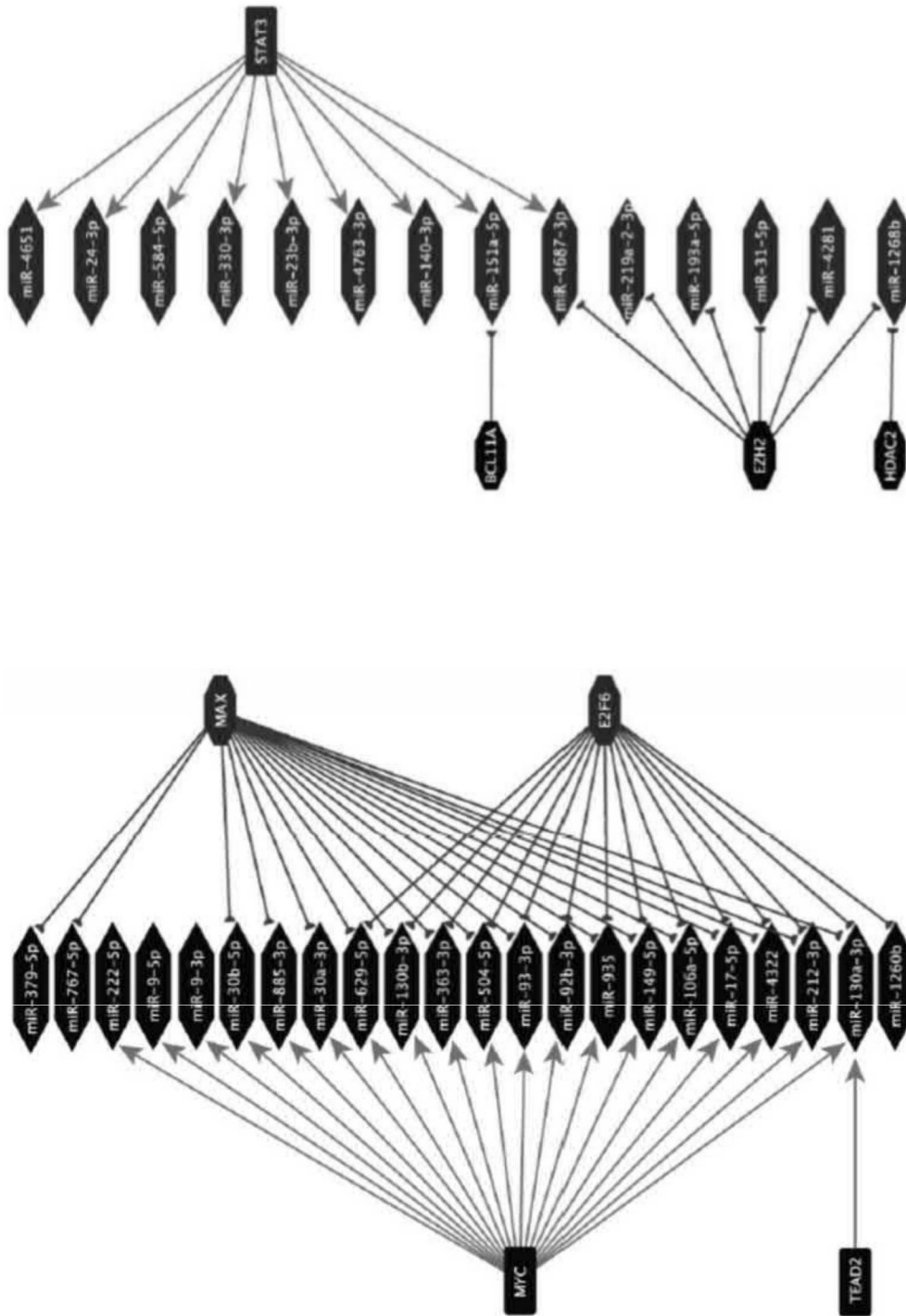


图37B