(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113728103 B
(45)授权公告日 2025.02.28

(21)申请号 201980091600.4

(22)申请日 2019.12.11

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113728103 A

(43)申请公布日 2021.11.30

(30)优先权数据
62/778,145 2018.12.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.08.09

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/065742 2019.12.11

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/123663 EN 2020.06.18

(73)专利权人 罗切斯特大学
地址 美国纽约州

(72)发明人 S·A·戈德曼 Z·刘

(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所 11517
专利代理师 黄遵玲 顾云峰

(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2006.01)
A61K 31/713(2006.01)
A61P 25/18(2006.01)

(56)对比文件

Takahiro Mukai等.Antiepileptic Drugs Elevate Astrocytic Kir4.1 Expression in the Rat Limbic Region.Frontiers in Pharmacology.2018,第9卷Article 845,第1-9页.

Takahiro Mukai等.Antiepileptic Drugs Elevate Astrocytic Kir4.1 Expression in the Rat Limbic Region.Frontiers in Pharmacology.2018,第9卷Article 845,第1-9页.

Zhengshan Liu.The Contribution of Glial Molecular Pathology to Schizophrenia.UR RESEARCH.2017,第1-137页.

Mario de la Fuente Revenga等.HDAC2-dependent antipsychotic-like effects of chronic treatment with the HDAC inhibitor SAHA in mice.Neuroscience.2018,第388卷102-117.

Ping-Tao Tseng等.Significant Effect of Valproate Augmentation Therapy in Patients With Schizophrenia.Medicine.2016,第95卷(第4期),1-10.

Ping-Tao Tseng等.Significant Effect of Valproate Augmentation Therapy in Patients With Schizophrenia.Medicine.2016,第95卷(第4期),1-10.

(续)

审查员 周茂新

权利要求书1页 说明书41页
序列表13页 附图13页

(54)发明名称

治疗精神分裂症和其他神经精神病症的方法

(57)摘要

本公开涉及恢复受试者中神经胶质细胞的K^+摄取的方法。这些方法涉及在有效于恢复所述神经胶质细胞的K^+摄取的条件下向所述受试者施用SMAD4抑制剂。本公开还涉及治疗或抑制受试者的神经精神病症的发作的方法。这些方法涉及在有效于治疗或抑制有此需要的受试者的所述神经精神病症的发作的条件下,向所述受试者施用SMAD4抑制剂。

CN 113728103 B

[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

Po-Sheng Wang等.The use of psychiatric drugs and worsening body mass index among inpatients with schizophrenia.International Clinical Psychopharmacology.2014,第29卷(第4期),235-238.

Po-Sheng Wang等.The use of psychiatric drugs and worsening body mass index among inpatients with schizophrenia.International Clinical Psychopharmacology.2014,第29卷(第4期),235-238.

Zhengshan Liu等.Dysregulated Glial Differentiation in Schizophrenia May Be Relieved by Suppression of SMAD4- and REST-Dependent Signaling. Cell Reports.2019,第27卷 3832-3843.

1.组合物在制备用于治疗或抑制患有精神分裂症或处于患有精神分裂症的风险下的受试者的精神分裂症发作的药物中的用途,所述组合物包含SMAD4抑制剂,

其中所述SMAD4抑制剂是选自由SMAD4反义寡核苷酸、SMAD4 shRNA和SMAD4 siRNA组成的组的抑制性核酸分子,以及

其中所述组合物恢复所述受试者中神经胶质细胞的K^+摄取。

2.如权利要求1所述的用途,其中所述神经胶质细胞是神经胶质祖细胞。

3.如权利要求2所述的用途,其中所述组合物在有效于恢复神经胶质祖细胞星形胶质细胞分化的条件下施用。

4.如权利要求1所述的用途,其中所述神经胶质细胞是星形胶质细胞。

5.如权利要求1所述的用途,其中所述组合物配制用于神经胶质细胞递送。

6.如权利要求1所述的用途,其中所述SMAD4抑制剂被包装在纳米颗粒递送载体中。

7.如权利要求6所述的用途,其中所述递送载体包含神经胶质细胞靶向部分。

8.如权利要求1所述的用途,其中所述组合物在有效于降低所述受试者的神经元兴奋性的条件下施用。

9.如权利要求1所述的用途,其中所述组合物在有效于降低所述受试者的癫痫发生率的条件下施用。

10.如权利要求1所述的用途,其中所述组合物在有效于改善所述受试者的认知紊乱的条件下施用。

11.如权利要求1所述的用途,其中所述组合物通过脑内递送、鞘内递送、鼻内递送或通过直接输注到脑室中施用。

12.如权利要求1所述的用途,其中所述受试者是人。

治疗精神分裂症和其他神经精神病症的方法

[0001] 本申请要求2018年12月11日提交的美国临时专利申请序列号62/778,145的权益,所述申请以引用的方式整体并入本文。

[0002] 本发明是以美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的MH099578在政府支持下完成的。美国政府拥有本发明的某些权利。

技术领域

[0003] 本公开涉及用于在具有受损的K^+通道功能的神经胶质细胞中恢复神经胶质细胞钾(K^+)摄取的方法。这些方法适用于治疗患有神经精神病状的受试者。

背景技术

[0004] 精神分裂症是一种以妄想、幻听和认知损害为特征的精神病症,其影响全世界约1%的人口,但仍知之甚少(Allen等人,"Systematic Meta-Analyses and Field Synopsis of Genetic Association Studies in Schizophrenia:The SzGene Database,"Nature Genetics 40:827-834(2008);Sawa和Snyder,"Schizophrenia:Diverse Approaches to a Complex Disease,"Science 296:692-695(2002))。在过去的十年中,已经清楚的是,许多精神分裂症相关基因参与了神经胶质细胞的发育和生理学过程(Yin等人,"Synaptic Dysfunction in Schizophrenia,"Adv.Exp.Med.Biol.970:493-516(2012))。因此,星形胶质细胞和少突胶质细胞功能障碍都牵涉到精神分裂症的病因。星形胶质细胞尤其在神经网络的结构发育以及神经回路活动的协调中都起着至关重要的作用,后者通过释放神经胶质递质、维持突触密度以及调节突触钾和神经递质水平来发挥重要作用(Christopherson等人,"Thrombospondinsare Astrocyte-Secreted Proteins That Promote CNS Synaptogenesis,"Cell 120:421-433(2005);Chung等人,"Astrocytes Mediate Synapse Elimination Through MEGF10 and MERTK Pathways,"Nature 504:394-400(2013);以及Thrane等人,"Ammonia Triggers Neuronal Disinhibition and Seizures by Impairing Astrocyte Potassium Buffering,"Nat.Med.19:1643-1648(2013))。但是,星形胶质细胞功能障碍在神经精神病症诸如精神分裂症的发展中所起到的作用尚不清楚。本公开旨在克服本领域中的这个和其他缺陷。

发明内容

[0005] 本公开的第一方面涉及一种恢复神经胶质细胞的K^+摄取的方法,其中所述神经胶质细胞具有受损的K^+通道功能。此方法涉及在有效于恢复具有受损的K^+通道功能的神经胶质细胞的K^+摄取的条件下向所述神经胶质细胞施用SMAD4抑制剂。

[0006] 本公开的另一方面涉及一种恢复受试者中神经胶质细胞的K^+摄取的方法。此方法涉及选择具有受损的神经胶质细胞K^+摄取的受试者,并在有效于恢复所述神经胶质细胞的K^+摄取的条件下向所选择的受试者施用SMAD4抑制剂。

[0007] 本公开的另一方面涉及一种治疗或抑制受试者的神经精神病症的发作的方法。此

方法涉及选择患有神经精神病症或处于患有神经精神病症的风险下的受试者,并在有效于治疗或抑制所述受试者的神经精神病症的发作的条件下向所选择的受试者施用SMAD4抑制剂。

[0008] 为了研究神经胶质病理在神经和神经精神病症如精神分裂症中的作用,建立了用于从诱导性多能细胞(iPSC)产生神经胶质祖细胞(GPC)的方案(Wang等人,"Human iPSC-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells Can Myelinate and Rescue a Mouse Model of Congenital Hypomyelination,"Cell Stem Cell 12:252-264(2013),其以引用的方式整体并入本文)。此模型允许以保留其遗传完整性和功能库的方式从患有精神分裂症的患者中产生GPC及其衍生的星形胶质细胞和少突胶质细胞。此方案提供了一种方式,通过所述方式在植入免疫缺陷小鼠后在体外和体内评定来源于患有精神分裂症的患者的星形胶质细胞的分化、基因表达和生理功能(Windrem等人,"HumaniPSC Glial Mouse Chimeras Reveal Glial Contributions to Schizophrenia,"Cell Stem Cell 21:195-208.e6(2017),其以引用的方式整体并入本文)。注意到,用从精神分裂症患者产生的iPSC衍生的GPC定殖的此种人神经胶质嵌合小鼠在星形胶质细胞分化和成熟结构方面均表现出与明显的生理和行为异常有关的显著异常。重要的是,RNA序列分析揭示,这些精神分裂症GPC中的发育缺陷与一组核心分化相关基因的下调相关,所述基因的转录靶包括在精神分裂症胶质细胞中发现类似缺陷的许多转运蛋白、通道和突触调节剂。

[0009] 如本文所述,鉴定了可以减轻此种精神分裂症相关的神经胶质病理的可靶向信号传导节点。为此,从患有儿童期发作型精神分裂症的患者或其正常对照(CTR)产生iPSC GPC,并从这些细胞产生星形胶质细胞。比较了精神分裂症和对照来源的GPC的基因表达模式和星形胶质细胞功能分化。已发现过量TGFβ信号传导在精神分裂症来源的GPC的功能障碍性分化中起到关键性作用,TGFβ在此细胞背景下的作用通过SMAD4进行信号传导,并且表型正常的方面可以通过SMAD4抑制恢复至SCZ神经胶质细胞。

附图说明

[0010] 图1A-1F示出由SCZ iPSC有效产生hGPC。流式细胞术揭示,在SCZ(4个SCZ品系,n≥3/每个品系)和CTR(4个CTR品系,n≥3/每个品系)来源的hiPSC中>90%的未分化hiPSC均表达SSEA4(图1A)。在神经祖细胞(NPC)阶段,NPC标记物CD133的表达在SCZ和CTR来源的品系之间没有差异(图1B)。CD140a限定的hGPC同样类似地从SCZ和CTR来源的iPSC产生,并且$CD140a^{+}$细胞的相对比例在SCZ和CTR hGPC培养物中没有差异(图1C)。在星形胶质细胞祖细胞阶段,CD44的表达在SCZ和CTR来源的品系之间没有差异(图1D)。在与BMP4一起培养之后,$PDGF\alpha R^{+}$神经胶质细胞的百分比在SCZ品系(4个SCZ品系,n≥3/每个品系)中与在CTR品系(4个CTR品系,n≥3/每个品系)中相比显著更高(图1E)。除了GFAP以外,$S100\beta^{+}$星形胶质细胞在CTR品系中相对于在SCZ品系中显著更高(图1F)。FSC,前向散射。标尺:50μm。通过双尾t检验,***p<0.001;NS:不显著;平均值±SEM。

[0011] 图2A-2J显示在SCZ GPC中星形胶质细胞分化受损。如图2A-2D所示,在神经祖细胞(NPC)阶段,SCZ和CTR(4名不同的患者和各自得到的品系,n≥3/每个品系)hNPC均高度表达SOX1和PAX6。类似地,PDGFRα/CD140a限定的hGPC产生的效率在SCZ和CTR品系(4个各自不同的患者特异性品系,n≥3/每个品系)之间没有差异(图2E-2G)。相反,如图2H-2J所示,$GFAP^{+}$

星形胶质细胞的比例在CTR品系(4个CTR品系,n≥3/每个品系[70.1±2.4%])中对比在SCZ品系(4个SCZ品系,n≥3/每个品系,[39.9±2.0])中显著更高。标尺:50μm;通过双尾t检验,***p<0.001;NS:不显著;平均值±SEM。

[0012] 图3A-3E显示TGFβ信号依赖性转录物在SCZ GPC中上调。图3A为RNA-seq数据的Ingenuity Pathway Analysis的示意图,其揭示TGFβ-依赖性转录在SCZ hGPC中上调。上调基因包括LTBP1、LTBP2、IGFBP3、TGFB1、PDGFB、GDF3、GDF7、BMP1和BMP5。下调基因包括AMH和BMP3。qPCR确认TGFβ途径相关和上调基因(包括BMP1、BMPR2、RUNX2、SERPINE1、BAMBI等)在SCZ hGPC(4个SCZ品系,3个重复/每个品系)中相对于在CTR细胞(4个CTR品系,3个重复/每个品系)中显著上调(图3B)。相比之下,如图3C所示,这些基因的表达在NPC阶段在SCZ与CTR品系之间并不相同。主成分分析(PCA)显示在CTR和SCZ来源的iPSC之间的类似甲基化状态(图3D)。图3E是热图,其表示iPSC甲基化状态的变异性主要是由于性别和个别品系(p<0.05),而非是由于疾病状态或年龄。通过双尾t检验,*p<0.05,**p<0.01;NS:不显著;平均值±SEM。

[0013] 图4A-4B示出了BAMBI过表达和敲低的验证。在用慢病毒-BAMBI转导的CTR hGPC(4个CTR品系,3个重复/每个品系)中,qPCR确认BAMBI显著过表达(图4A)。SCZ hGPC(4个SCZ品系,3个重复/每个品系)相对于CTR hGPC表达高水平的BAMBI,而SCZ hGPC的慢病毒-BAMBI-shRNAi转导将BAMBI表达抑制至CTR hGPC的水平(图4B)。对于A和B,通过单向ANOVA,***P<0.001;平均值±SEM。

[0014] 图5A-5C显示正常hGPC中的BAMBI表达表型模拟SCZ的神经胶质细胞分化缺陷。图5A-5B显示膜结合的BMP拮抗剂BAMBI在CTR hGPC(4个CTR品系,3个重复/每个品系)中的过表达显著降低其星形胶质细胞转变的效率。然而,SCZ hGPC(4个SCZ品系,3个重复/每个品系)中的BAMBI敲低不足以恢复星形胶质细胞分化(图5B)。除了BAMBI以外,BMP拮抗剂卵泡抑素(FST)和gremlin1(GREM1)在SCZ hGPC中相对于对照也上调(图5C)。标尺:50μm;***p<0.001,对于B进行单向ANOVA;对于C,通过双尾t检验,**P<0.001;NS:不显著;平均值±SEM。

[0015] 图6A-6D显示SMAD4调节SCZ GPC的星形胶质细胞分化。图6A是通过以下方式调节TGFβ和BMP途径的表达的SMAD4的示意图:1)SMAD2/3和SMAD1/5/8二者的磷酸化;2)SMAD核转位和靶启动子活化,包括内源性BMP抑制剂BAMBI、卵泡抑素(FST)和gremlin1(GREM1)的早期诱导;以及3)BMP信号的后续反馈抑制。图6B的图显示,BAMBI、FST和GREM1在SCZ CD140a分选的hGPC中相对于对照来源的hGPC全部显著过表达。然后在SCZ hGPC(4个SCZ品系,3个重复/品系)中的SMAD4敲低将BAMBI、FST和GREM1的表达抑制至对照水平。图6C是显示SCZ hGPC中的SMAD4敲低使星形胶质细胞分化恢复至CTR hGPC(4个SCZ品系,3个重复/每个品系)的一组免疫化学图像。DOX(-)/(+)意指用DOX短期/长期培养。如通过连续强力霉素暴露所介导的,在星形胶质细胞诱导后的SMAD4敲低引起SCZ和CTR组中GFAP限定的星形胶质细胞损失,如图6D的图所示。DOX(-)/(+)意指用DOX短期/长期培养。标尺:50μm;*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001;单向ANOVA;NS:不显著;平均值±SEM。

[0016] 图7A-7C示出了SMAD4敲低的验证。图7A是显示在SCZ与对照hGPC和星形胶质细胞之间SMAD4 mRNA水平不同的图,如在CD140a分选的hGPC(左图)和CD44分选的星形胶质细胞(右图)中反映的。图7B是用于评定瞬时的强力霉素调节的SMAD4敲低对SCZ和CTR患者来源的hGPC的星形胶质细胞分化的作用的实验计划的示意图。图7C是示出SMAD4表达的图。用强

力霉素(DOX)可诱导的慢病毒-SMAD4-shRNAi转导SCZ CD140a分选的hGPC(4个SCZ品系,3个重复/每个品系),然后通过DOX诱导以驱动SMAD4-shRNAi表达。然后将培养物转换至星形胶质细胞分化条件,并且DOX撤出,从而允许SMAD4表达和星形胶质细胞成熟(DOX仅在GPC阶段中),或者持续,从而继续抑制在星形胶质细胞成熟期间的SMAD4表达(在AST阶段中保持DOX)。慢病毒SMAD4-shRNAi在DOX下强烈抑制SMAD4表达,而SMAD4表达在不存在DOX诱导的情况下未受影响。DOX(-)/(+)意指用DOX短期/长期培养。通过单向ANOVA,**P<0.01;NS:不显著;平均值±SEM。

[0017] 图8A-8B示出SCZ hGPC中钾通道(KCN)相关基因的表达。图8A是示出SCZ来源的hGPC品系中差异表达的钾通道基因的热图。将每个SCZ来源的hGPC品系分别与三个合并的CTR来源的hGPC品系进行比较(FDR 5%,FC>2.00[如果适用的话])。发现所示基因在四个评定的SCZ来源的hGPC品系中的至少三个中差异地表达。qPCR确认,钾通道相关基因(包括ATP1A2、SLC12A6和KCNJ9)全部在SCZ hGPC(4个SCZ品系,3个重复/每个品系)中相对于在CTR细胞(4个CTR品系,3个重复/每个(图8B)品系)中显著下调。通过双尾t检验,**p<0.01;平均值±SEM。

[0018] 图9A-9E显示SCZ星形胶质细胞的钾摄取降低。图9A是Na+/K+-ATP酶泵、NKCC1 $Na^+/K^+/2Cl^-$协同转运蛋白和内向整流K+通道参与调节星形胶质细胞的钾摄取的示意图。qPCR证实,在SCZ CD44+星形胶质细胞偏向的GPC中相对于CTR细胞,几种K+通道相关基因被下调,如图9B所示。将SCZ和CTR CD44+GPC在具有BMP4的FBS中培养,以产生成熟GFAP+星形胶质细胞,然后评定其K^+摄取;将结果归一化至总蛋白和细胞数。图9C显示与CTR星形胶质细胞的K^+摄取(4个CTR品系,5个重复/每个品系)相比,SCZ星形胶质细胞的K^+摄取显著降低(4个SCZ品系,5个重复/每个品系)。用哇巴因、布美他尼和托肽品处理星形胶质细胞,以评定SCZ星形胶质细胞中相对于对照(每个对照4个品系,4个重复/品系)哪些钾转运蛋白类别功能受损。哇巴因和布美他尼二者均有效降低CTR星形胶质细胞的K^+摄取(图9D,灰色条),而二者均未影响SCZ星形胶质细胞的K+摄取(图9E,紫色条)。对于B和C,通过双尾t-检验,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001;对于D,通过单向ANOVA,***P<0.001;NS:不显著;平均值±SEM。

[0019] 图10A-10C示出从SCZ CD44+星形胶质细胞偏向的祖细胞产生星形胶质细胞。诱导SCZ来源的和CTR来源的CD44+星形胶质细胞前体分化为星形胶质细胞。GFAP的免疫染色表明,星形胶质细胞产生效率在SCZ来源品系(图10A,右图;4个SCZ品系,5个重复/每个品系)和CTR来源品系(图10A,左图;4个CTR品系,5个重复/每个品系)之间没有显著差异(也参见图10B的图)。qPCR揭示,GFAPmRNA表达在SCZ和CTR来源的CD44+星形胶质细胞前体之间没有差异,如图10C所示。标尺:50μm。对于B和C,双尾t检验;NS:不显著;平均值±SEM。

具体实施方式

[0020] 本公开的第一方面涉及一种恢复神经胶质细胞的K+摄取的方法,其中所述神经胶质细胞具有受损的K^+通道功能。此方法涉及在有效于恢复具有受损的K^+通道功能的神经胶质细胞的K^+摄取的条件下向所述神经胶质细胞施用SMAD4抑制剂。

[0021] 本公开的另一方面涉及一种恢复受试者中神经胶质细胞的K^+摄取的方法。此方法涉及选择具有受损的神经胶质细胞K^+摄取的受试者,并在有效于恢复所述神经胶质细胞的

K^+摄取的条件下向所选择的受试者施用SMAD4抑制剂。

[0022] 如本文所述,“神经胶质细胞”包括神经胶质祖细胞、少突胶质细胞偏向的祖细胞、星形胶质细胞偏向的祖细胞、少突胶质细胞和星形胶质细胞。神经胶质祖细胞是脑中能够分化为少突胶质细胞和星形胶质细胞的双能祖细胞。神经胶质祖细胞可以通过它们表达某些阶段特异性表面抗原(例如A2B5抗体识别的神经节苷脂和PDGFRα(CD140a))以及阶段特异性转录因子(例如OLIG2、NKX2.2和SOX10)来鉴定。少突胶质细胞偏向的祖细胞和星形胶质细胞偏向的祖细胞通过它们获得性表达阶段选择性表面抗原来鉴定,所述抗原包括例如对于少突胶质细胞偏向的祖细胞由O4抗体识别的CD9和脂质硫苷脂和对于星形胶质细胞偏向的祖细胞的CD44。成熟的少突胶质细胞通过它们表达髓鞘碱性蛋白来鉴定,并且成熟的星形胶质细胞最通常通过它们表达神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)来鉴定。在本文所述的方法的一个实施方案中,在神经胶质祖细胞中恢复K+摄取。在另一个实施方案中,在星形胶质细胞偏向的祖细胞中恢复K^+摄取。在另一个实施方案中,在星形胶质细胞中恢复K^+摄取。

[0023] 根据本公开的这些方面,具有受损的K^+摄取的细胞是与正常健康的神经胶质细胞相比具有降低的K^+摄取的神经胶质细胞,特别是神经胶质祖细胞、星形胶质细胞偏向的祖细胞和/或星形胶质细胞。在一个实施方案中,具有降低的K^+摄取的神经胶质细胞是一个或多个钾通道编码基因被下调,从而导致相应钾通道蛋白表达降低的神经胶质细胞。特别地,一种或多种选自以下的钾通道编码基因的表达下调可导致神经胶质细胞K^+摄取降低:KCNJ9、KCNH8、KCNA3、KCNK9、KCNC1、KCNC3、KCNB1、KCNF1、KCNA6、SCN3A、SCN2A、SCNN1D、SCN8A、SCN3B、SLC12A6、SLC6A1、SLC8A3、ATP1A2、ATP1A3、ATP2B2。

[0024] 因此,在一个实施方案中,选择具有受损的神经胶质细胞K^+摄取的受试者涉及评定所述受试者的神经胶质细胞的钾摄取、将所述神经胶质细胞的钾摄取水平与对照健康神经胶质细胞群体的钾摄取水平进行比较以及选择神经胶质细胞K^+摄取减少的受试者。在另一个实施方案中,选择具有受损的神经胶质细胞K^+摄取的受试者涉及评定一个或多个选自由以下组成的组的钾通道编码基因的神经胶质细胞表达水平以及如果一个或多个钾通道编码基因的表达下调,则选择所述受试者:KCNJ9、KCNH8、KCNA3、KCNK9、KCNC1、KCNC3、KCNB1、KCNF1、KCNA6、SCN3A、SCN2A、SCNN1D、SCN8A、SCN3B、SLC12A6、SLC6A1、SLC8A3、ATP1A2、ATP1A3、ATP2B2。在另一个实施方案中,选择具有受损的神经胶质细胞K^+摄取的受试者涉及评定一种或多种钾通道的神经胶质细胞蛋白表达,所述钾通道包括GIRK-3(由KCNJ9编码)、钾电压门控通道亚家族H成员8(由KCNH8编码)、钾电压门控通道亚家族A成员3(由KCNA3编码)、钾通道亚家族K成员9(由KCNK9编码)、钾电压门控通道亚家族C成员1(由KCNC1编码)、钾电压门控通道亚家族C成员3(由KCNC3编码)、钾电压门控通道亚家族B成员1(由KCNB1编码)、钾电压门控通道亚家族F成员1(由KCNF1编码)、钾电压门控通道亚家族A成员6(由KCNA6编码)、3型钠通道蛋白亚基α(由SCN3A编码)、2型钠通道蛋白亚基α(由SCN2A编码)、阿米洛利敏感性钠通道亚基δ(由SCNN1D编码)、8型钠通道蛋白亚基α(由SCN8A编码)、钠通道亚基β-3(由SCN3B编码)、溶质载体家族12成员6(即K^+/Cl^-协同转运蛋白3)(由SLC12A6编码)、钠和氯依赖性GABA转运蛋白1(即GAT-1)(由SLC6A1编码)、Na^+/Ca^{+2}交换蛋白3(由SLC8A3编码)、Na^+/K^+转运ATP酶亚基α-2(由ATP1A2编码)、Na^+/K^+转运ATP酶亚基α-2(由ATP1A3编码)、质膜钙转运ATP酶2(即PMCA2)(由ATP2B2编码)。如果一种或多种钾通道蛋白的水平降低,则选择所述受试者来使用本文所述的方法进行治疗。

[0025] 钾摄取、钾通道基因表达、钾通道蛋白表达和SMAD4基因表达均可以使用本文所述的方法和本领域技术人员熟知的方法来评定。这些参数可以在取自受试者的神经胶质细胞样品中评定。或者,可以在来源于受试者的诱导性多能干细胞(iPSC)衍生的神经胶质细胞样品中评定这些参数中的一种或多种。iPSC可从受试者的几乎任何体细胞中获得,所述体细胞包括例如但不限于成纤维细胞,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、脸颊细胞、肺成纤维细胞、外周血细胞、骨髓细胞等。iPSC可以通过本领域已知的方法得到,所述方法包括使用整合病毒载体(例如慢病毒载体、可诱导的慢病毒载体和逆转录病毒载体)、可切除的载体(例如转座子和被loxP位点标记(floxed)的慢病毒载体)和非整合载体(例如腺病毒和质粒载体),以递送上述促进细胞重编程的基因(参见例如Takahashi和Yamanaka,Cell 126:663-676(2006);Okita.等人,Nature 448:313-317(2007);Nakagawa等人,Nat.Biotechnol.26:101-106(2007);Takahashi等人,Cell 131:1-12(2007);Meissner等人Nat.Biotech.25:1177-1181(2007);Yu等人Science 318:1917-1920(2007);Park等人Nature 451:141-146(2008);和美国专利申请公布号2008/0233610,其以引用的方式整体并入本文)。用于产生IPS细胞的其他方法包括以下文献中公开的那些方法:WO2007/069666、WO2009/006930、WO2009/006997、WO2009/007852、WO2008/118820、Ikeda等人的美国专利申请公布号2011/0200568、Egusa等人的美国专利申请公布号2010/0156778、Musick的美国专利申请公布号2012/0276070和Nakagawa的美国专利申请公布号2012/0276636;Shi等人,Cell Stem Cell 3(5):568-574(2008);Kim等人,Nature 454:646-650(2008);Kim等人,Cell 136(3):411-419(2009);Huangfu等人,Nature Biotechnology 26:1269-1275(2008);Zhao等人,Cell Stem Cell 3:475-479(2008);Feng等人,Nature Cell Biology 11:197-203(2009);和Hanna等人,Cell 133(2):250-264(2008),其以引用的方式整体并入本文。将iPSC向神经胶质祖细胞(GPC)命运和星形胶质细胞命运驱动的方法是本文中描述的,并且是本领域中已知的,参见例如Wang等人,“Human iPSC-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells can Myelinate and Rescue a Mouse Model of Congenital Hypomyelination,”Cell Stem Cell 12:252-264(2013),其以引用的方式整体并入本文。

[0026] 在一个实施方案中,具有受损的K^+摄取的神经胶质细胞是患有神经精神病症的受试者的神经胶质细胞。如本文所提及的“神经精神病症”包括具有精神病症状的任何脑疾病,所述精神病症状包括但不限于痴呆、易忘综合症和人格行为改变。已知涉及神经胶质细胞中受损的K^+通道功能且适用于使用本文所述的方法治疗的神经精神病症包括但不限于精神分裂症、孤独症谱系病症和双相障碍。

[0027] 因此,本公开的另一方面涉及一种治疗或抑制受试者的神经精神病症发作的方法。此方法涉及选择患有神经精神病症或处于患有神经精神病症的风险下的受试者,并在有效于治疗或抑制所述受试者的神经精神病症的发作的条件下向所选择的受试者施用SMAD4抑制剂。

[0028] 在一个实施方案中,根据本公开治疗的受试者是患有精神分裂症或处于患有精神分裂症的风险下的受试者。精神分裂症是一种慢性和严重的精神病症,其影响个体如何思考、感觉和行为。迄今为止,已经提出了几种病症的分期模型(Agius等人,“The Staging

Model in Schizophrenia,and its Clinical Implications,"Psychiatr.Danub.22(2):211-220(2010);McGorry等人,"Clinical Staging:a Heuristic Model and Practical Strategy for New Research and Better Health and Social Outcomes for Psychotic and Related Disorders,"Can.J.Psychiatry 55(8):486-497(2010);Fava和Kellner,"Staging:a Neglected Dimension in Psychiatric Classification,"Acta Psychiatr.Scand.87:225-230(1993),其以引用的方式整体并入本文)。但是,一般而言,精神分裂症发展为至少三个阶段:前驱期、首次发病和慢性期。在病症的所有阶段也存在个体的异质性,其中一些个体被认为是精神病发作的超高风险、临床高风险或处于风险中(Fusar-Poli等人,"The Psychosis High-Risk State:a Comprehensive State-of-the-Art Review,"JAMA Psychiatry 70:107-120(2013),其以引用的方式整体并入本文)。

[0029] 本文所述的方法适用于治疗任何阶段的精神分裂症和任何风险水平的精神病的受试者,因为所有阶段都将涉及受损的神经胶质细胞K^+摄取。例如,在一个实施方案中,根据本文所述的方法治疗的受试者是处于发展精神分裂症的风险下的受试者。此种受试者可能具有在一个或多个与精神分裂症的发展相关的选自以下的基因中的一个或多个遗传突变并且可能表现或不表现所述疾病的任何症状:ABCA13、ATK1、C4A、COMT、DGCR2、DGCR8、DRD2、MIR137、NOS1AP、NRXN1、OLIG2、RTN4R、SYN2、TOP3B YWHAE、ZDHHC8或染色体22(22q11)。在另一个实施方案中,受试者可以处于疾病的前驱期并且表现出精神分裂症的一种或多种早期症状,例如焦虑、抑郁、睡眠障碍和/或短暂间歇性精神病综合征。在另一个实施方案中,根据本文所述的方法治疗的受试者正在经历精神分裂症的精神病症状,例如幻觉、妄想。

[0030] 在另一个实施方案中,本文所述的方法用于治疗患有孤独症或相关病症的受试者。相关病症包括但不限于阿斯伯格疾病(Asperger's disorder)、未另外指明的广泛性发育障碍、儿童崩解病症和瑞特病症(Rett's Disorder),其症状的严重程度不同,包括社交互动、交流和异常行为的困难(McPartland等人,"Autism and Related Disorders,"Handb Clin Neurol 106:407-418(2012),其以引用的方式整体并入本文)。本文所述的方法适用于治疗这些病状中的每一种和所述病状的任何阶段。在一个实施方案中,根据本文所述的方法治疗的受试者没有表现出任何孤独症或相关病状的症状。在另一个实施方案中,所治疗的受试者表现出孤独症或相关病状的一种或多种早期症状。在又另一个实施方案中,根据本文所述的方法治疗的受试者表现出孤独症或相关病状的多种症状。

[0031] 在另一个实施方案中,本文所述的方法用于治疗患有双相障碍的受试者。双相障碍是一组以情绪长期不稳定、昼夜节律紊乱以及能量水平、情绪、睡眠和自我和他人观点的波动为特征的症状。双相障碍包括但不限于I型双相障碍、II型双相障碍、循环性情绪障碍和未另外指明的双相障碍。

[0032] 通常,双相障碍是发展为至少三个阶段的进行性病状:前驱期、症状期和残余期(Kapczinski等人,"Clinical Implications of a Staging Model for Bipolar Disorders,"Expert Rev Neurother 9:957-966(2009),和McNamara等人,"Preventative Strategies for Early-Onset Bipolar Disorder:Towards a Clinical Staging Model,"CNS Drugs 24:983-996(2010);其以引用的方式整体并入本文)。本文所述的方法适用于治疗患有任何上述双相障碍的受试者和处于特定双相障碍的任何阶段的受试者。例

如,在一个实施方案中,根据本文所述的方法治疗的受试者是处于早期前驱期的受试者,其表现出情绪不稳定/摆动、抑郁、快速思维、愤怒、易怒、身体激动和焦虑的症状。在另一个实施方案中,根据本文所述的方法治疗的受试者是处于症状期或残余期的受试者。

[0033] 如本文所用,术语“受试者”和“患者”明确包括人和非人哺乳动物受试者。如本文所用,术语“非人哺乳动物”延伸至但不限于家庭宠物和家养动物。此类动物的非限制性实例包括灵长类动物、牛、绵羊、雪貂、小鼠、大鼠、猪、骆驼、马、兔、山羊、狗和猫。

[0034] 根据本公开,向具有受损的K^+通道功能的神经胶质细胞施用SMAD4抑制剂。在另一个实施方案中,向具有受损的神经胶质细胞K^+摄取的受试者施用SMAD4抑制剂。在另一个实施方案中,向患有可能涉及或不涉及受损神经胶质细胞K^+摄取的神经精神病症或处于患有所述神经精神病症的风险下的受试者施用SMAD4抑制剂。Smad4(也称为母亲对抗十指瘫痪同源物4(Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4,MADH4)和DPC4)代表Smad家族中最独特的成员。此蛋白质在与途径限制性Smad的复合物中充当共享异寡聚化配偶体(Lagna等人,“Partnership between DPC4 and SMAD Proteins in TGF-beta Signalling Pathways,”Nature 383:832-836(1996);Zhang等人,“The Tumor Suppressor Smad4/DPC 4as a Central Mediator of Smad Function,”Curr.Biol.7:270-276(1997),其以引用的方式整体并入本文中)。已证实尽管Smad4不与TGF-β受体相互作用,但其在Smad信号传导级联内表现出两种不同的功能。通过其N-末端,Smad4促进Smad复合物与DNA结合,并且通过其C末端,其提供Smad复合物刺激转录所需的活化信号(Liu等人,“Dual Role of the Smad4/DPC4 Tumor Suppressor in TGFbeta-inducible Transcriptional Complexes,”Genes Dev.11:3157-3167(1997),其以引用的方式整体并入本文中)。

[0035] SMAD4氨基酸序列提供为以下SEQ ID NO:1。

[0036]
```
MDNMSITNTPTSNDACLSIVHSLMCHRQGGESETFAKRAIESLVKKL
KEKKDELDSLITAITTNGAHPSKCVTIQRTLDGRLQVAGRKGFPHVI
YARLWRWPDLHKNELKHVKYCQYAFDLKCDSVCVNPYHYERVVSPGI
DLSGLTLQSNAPSSMMVKDEYVHDFEGQPSLSTEGHSIQTIQHPPSN
RASTETYSTPALLAPSESNATSTANFPNIPVASTSQPASILGGSHSE
GLLQIASGPQPGQQQNGFTGQPATYHHNSTTTWTGSRTAPYTPNLPH
HQNGHLQHHPPMPPHPGHYWPVHNELAFQPPISNHPAPEYWCSIAYF
EMDVQVGETFKVPSSCPIVTVDGYVDPSGGDRFCLGQLSNVHRTEAI
ERARLHIGKGVQLECKGEGDVWVRCLSDHAVFVQSYYLDREAGRAPG
DAVHKIYPSAYIKVFDLRQCHRQMQQQAATAQAAAAAQAAAVAGNIP
GPGSVGGIAPAISLSAAAGIGVDDLRRLCILRMSFVKGWGPDYPRQS
IKETPCWIEIHLHRALQLLDEVLHTMPIADPQPLD
```

[0037] 编码SMAD4的核酸序列提供为SEQ ID NO:2

[0038]

```
1    atgctcagtg gcttctcgac aagttggcag caacaacacg gccctggtcg tcgtcgccgc
61   tgcggtaacg gagcggtttg ggtggcggag cctgcgttcg cgccttcccg ctctcctcgg
121  gaggcccttc ctgctctccc ctaggctccg cggccgccca gggggtggga gcgggtgagg
181  ggagccaggc gcccagcgag agaggccccc cgccgcaggg cggcccggga gctcgaggcg
241  gtccggcccg cgcgggcagc ggcgcggcgc tgaggagggg cggcctggcc gggacgcctc
301  ggggcggggg ccgaggagct ctccgggccg ccggggaaag ctacgggccc ggtgcgtccg
361  cggaccagca gcgcgggaga gcggactccc ctcgccaccg cccgagccca ggttatcctg
421  aatacatgtc taacaatttt ccttgcaacg ttagctgttg tttttcactg tttccaaagg
481  atcaaaattg cttcagaaat tggagacata tttgatttaa aaggaaaaac ttgaacaaat
541  ggacaatatg tctattacga atacaccaac aagtaatgat gcctgtctga gcattgtgca
601  tagtttgatg tgccatagac aaggtggaga gagtgaaaca tttgcaaaaa gagcaattga
661  aagtttggta aagaagctga aggagaaaaa agatgaattg gattctttaa taacagctat
721  aactacaaat ggagctcatc ctagtaaatg tgttaccata cagagaacat tggatgggag
781  gcttcaggtg gctggtcgga aaggatttcc tcatgtgatc tatgcccgtc tctggaggtg
841  gcctgatctt cacaaaaatg aactaaaaca tgttaaatat tgtcagtatg cgtttgactt
901  aaaatgtgat agtgtctgtg tgaatccata tcactacgaa cgagttgtat cacctggaat
961  tgatctctca ggattaacac tgcagagtaa tgctccatca agtatgatgg tgaaggatga
1021 atatgtgcat gactttgagg gacagccatc gttgtccact gaaggacatt caattcaaac
1081 catccagcat ccaccaagta atcgtgcatc gacagagaca tacagcaccc cagctctgtt
1141 agccccatct gagtctaatg ctaccagcac tgccaacttt cccaacattc ctgtggcttc
1201 cacaagtcag cctgccagta tactgggggg cagccatagt gaaggactgt tgcagatagc
1261 atcagggcct cagccaggac agcagcagaa tggatttact ggtcagccag ctacttacca
1321 tcataacagc actaccacct ggactggaag taggactgca ccatacacac ctaatttgcc
1381 tcaccaccaa aacggccatc ttcagcacca cccgcctatg ccgccccatc ccggacatta
1441 ctggcctgtt cacaatgagc ttgcattcca gcctcccatt tccaatcatc ctgctcctga
1501 gtattggtgt tccattgctt actttgaaat ggatgttcag gtaggagaga catttaaggt
1561 tccttcaagc tgccctattg ttactgttga tggatacgtg gacccttctg gaggagatcg
1621 cttttgtttg ggtcaactct ccaatgtcca caggacagaa gccattgaga gagcaaggtt
1681 gcacataggc aaaggtgtgc agttggaatg taaaggtgaa ggtgatgttt gggtcaggtg
1741 ccttagtgac cacgcggtct ttgtacagag ttactactta gacagagaag ctgggcgtgc
1801 acctggagat gctgttcata agatctaccc aagtgcatat ataaaggtct ttgatttgcg
1861 tcagtgtcat cgacagatgc agcagcaggc ggctactgca caagctgcag cagctgccca
1921 ggcagcagcc gtggcaggaa acatccctgg cccaggatca gtaggtggaa tagctccagc
1981 tatcagtctg tcagctgctg ctggaattgg tgttgatgac cttcgtcgct tatgcatact
2041 caggatgagt tttgtgaaag gctggggacc ggattaccca agacagagca tcaaagaaac
2101 accttgctgg attgaaattc acttacaccg ggccctccag ctcctagacg aagtacttca
```

2161 taccatgccg attgcagacc cacaaccttt agactgaggt cttttaccgt tggggccctt
2221 aaccttatca ggatggtgga ctacaaaata caatcctgtt tataatctga agatatattt
2281 cacttttgtt ctgctttatc ttttcataaa gggttgaaaa tgtgtttgct gccttgctcc
2341 tagcagacag aaactggatt aaaacaattt tttttttcct cttcagaact tgtcaggcat
2401 ggctcagagc ttgaagatta ggagaaacac attcttatta attcttcacc tgttatgtat
2461 gaaggaatca ttccagtgct agaaaattta gccctttaaa acgtcttaga gccttttatc
2521 tgcagaacat cgatatgtat atcattctac agaataatcc agtattgctg attttaaagg
2581 cagagaagtt ctcaaagtta attcacctat gttattttgt gtacaagttg ttattgttga
2641 acatacttca aaaataatgt gccatgtggg tgagttaatt ttaccaagag taactttact
2701 ctgtgtttaa aaagtaagtt aataatgtat tgtaatcttt catccaaaat atttttgca
2761 agttatatta gtgaagatgg tttcaattca gattgtcttg caacttcagt tttatttttg
2821 ccaaggcaaa aaactcttaa tctgtgtgta tattgagaat cccttaaaat taccagacaa
2881 aaaaatttaa aattacgttt gttattccta gtggatgact gttgatgaag tatacttttc
2941 ccctgttaaa cagtagttgt attcttctgt atttctaggc acaaggttgg ttgctaagaa
3001 gcctataaga ggaatttctt ttccttcatt catagggaaa ggttttgtat tttttaaaac
3061 actaaaagca gcgtcactct acctaatgtc tcactgttct gcaaaggtgg caatgcttaa
3121 actaaataat gaataaactg aatattttgg aaactgctaa attctatgtt aaatactgtg
3181 cagaataatg gaaacattac agttcataat aggtagtttg gatatttttg tacttgattt
3241 gatgtgactt tttttggtat aatgtttaaa tcatgtatgt tatgatattg tttaaaattc
3301 agtttttgta tcttggggca agactgcaaa ctttttttata tcttttggtt attctaagcc
3361 ctttgccatc aatgatcata tcaattggca gtgactttgt atagagaatt taagtagaaa
3421 agttgcagat gtattgactg taccacagac acaatatgta tgctttttac ctagctggta
3481 gcataaataa aactgaatct caacatacaa agttgaattc taggtttgat ttttaagatt
3541 tttttttttct tttgcacttt tgagtccaat ctcagtgatg aggtaccttc tactaaatga
3601 caggcaacag ccagttctat tgggcagctt tgtttttttc cctcacactc taccgggact
3661 tccccatgga cattgtgtat catgtgtaga gttggttttt ttttttttta atttttattt
3721 tactatagca gaaatagacc tgattatcta caagatgata aatagattgt ctacaggata
3781 aatagtatga aataaaatca aggattatct ttcagatgtg tttacttttg cctggagaac
3841 ttttagctat agaaacactt gtgtgatgat agtcctcctt atatcacctg gaatgaacac
3901 agcttctact gccttgctca gaaggtcttt taaatagacc atcctagaaa ccactgagtt
3961 tgcttatttc tgtgatttaa acatagatct tgatccaagc tacatgactt ttgtctttaa
[0039] 4021 ataacttatc taccacctca tttgtactct tgattactta caaattcttt cagtaaacac
4081 ctaatttttct tctgtaaaag tttggtgatt taagttttat tggcagtttt ataaaaagac
4141 atcttctcta gaaattgcta actttaggtc cattttactg tgaatgagga ataggagtga
4201 gttttagaat aacagatttt taaaaatcca gatgatttga ttaaaaccttt aatcatacat
4261 tgacataatt cattgcttct tttttttgag atatggagtc ttgctgtgtt gcccaggcag
4321 gagtgcagtg gtatgatctc agctcactgc aacctctgcc tcccgggttc aactgattct
4381 cctgcctcag cctccctggt agctaggatt acaggtgccc gccaccatgc ctggctaact
4441 tttgtagttt tagtagagac ggggttttgc ctgttggcca ggctggtctt gaactcctga
4501 cctcaagtga tccatccacc ttggcctccc aaagtgctgg gattacgggc gtgagccact
4561 gtccctggcc tcattgttcc cttttctact ttaaggaaag ttttcatgtt taatcatctg
4621 gggaaagtat gtgaaaaata tttgttaaga agtatctctt tggagccaag ccacctgtct
4681 tggtttcttt ctactaagag ccataaagta tagaaatact tctagttgtt aagtgcttat
4741 atttgtacct agatttagtc acacgctttt gagaaaacat ctagtatgtt atgatcagct
4801 attcctgaga gcttggttgt taatctatat ttctatttct tagtggtagt catctttgat
4861 gaataagact aaagattctc acaggtttaa aattttatgt ctactttaag ggtaaaatta
4921 tgaggttatg gttctgggtg ggttttctct agctaattca tatctcaaag agtctcaaaa
4981 tgttgaattt cagtgcaagc tgaatgagag atgagccatg tacacccacc gtaagacctc
5041 attccatgtt tgtccagtgc ctttcagtgc attatcaaag ggaatccttc atggtgttgc
5101 ctttattttc cggggagtag atcgtgggat atagtctatc tcatttttaa tagtttaccg
5161 cccctggtat acaaagataa tgacaataaa tcactgccat ataaccttgc tttttccaga
5221 aacatggctg ttttgtattg ctgtaaccac taaataggtt gcctatacca ttcctcctgt
5281 gaacagtgca gatttacagg ttgcatggtc tggcttaagg agagccatac ttgagacatg
5341 tgagtaaact gaactcatat tagctgtgct gcatttcaga cttaaaatcc atttttgtgg
5401 ggcagggtgt ggtgtgtaaa ggggggtgtt tgtaatacaa gttgaaggca aaataaaatg
5461 tcctgtctcc cagatgatat acatcttatt atttttaaag tttattgcta attgtaggaa
5521 ggtgagttgc aggtatcttt gactatggtc atctggggaa ggaaaatttt acattttact
5581 attaatgctc cttaagtgtc tatggaggtt aaagaataaa atggtaaatg tttctgtgcc
5641 tggtttgatg gtaactggtt aatagttact caccatttta tgcagagtca cattagttca
5701 cacccttttct gagagccttt tgggagaagc agttttattc tctgagtgga acagagttct
5761 ttttgttgat aatttctagt ttgctcccttt cgttattgcc aactttactg gcatttttatt
5821 taatgatagc agattgggaa aatggcaaat ttaggttacg gaggtaaatg agtatatgaa
5881 agcaattacc tctaaagcca gttaacaatt attttgtagg tggggtacac tcagcttaaa

[0040]

```
5941 gtaatgcatt ttttttccc gtaaaggcag aatccatctt gttgcagata gctatctaaa
6001 taatctcata tcctcttttg caaagactac agagaatagg ctatgacaat cttgttcaag
6061 cctttccatt ttttccctg ataactaagt aatttctttg aacataccaa gaagtatgta
6121 aaaagtccat ggccttattc atccacaaag tggcatccta ggcccagcct tatccctagc
6181 agttgtccca gtgctgctag gttgcttatc ttgtttatct ggaatcactg tggagtgaaa
6241 ttttccacat catccagaat tgccttattt aagaagtaaa acgttttaat ttttagcctt
6301 tttttggtgg agttatttaa tatgtatatc agaggatata ctagatggta acatttcttt
6361 ctgtgcttgg ctatctttgt ggacttcagg ggcttctaaa acagacagga ctgtgttgcc
6421 tttactaaat ggtctgagac agctatggtt ttgaattttt agtttttttt ttttaaccca
6481 cttcccctcc tggtctcttc cctctctgat aattaccatt catatgtgag tgttagtgtg
6541 cctccttta gcatttttctt cttctctttc tgattcttca tttctgactg cctaggcaag
6601 gaaaccagat aaccaaactt actagaacgt tctttaaaac acaagtacaa actctgggac
6661 aggacccaag acactttcct gtgaagtgct gaaaaagacc tcattgtatt ggcatttgat
6721 atcagtttga tgtagcttag agtgcttcct gattcttgct gagtttcagg tagttgagat
6781 agagagaagt gagtcatatt catattttcc cccttagaat aatattttga aaggtttcat
6841 tgcttccact tgaatgctgc tcttacaaaa actggggtta caagggttac taaattagca
6901 tcagtagcca gaggcaatac cgttgtctgg aggacaccag caaacaacac acaacaaagc
6961 aaaacaaacc ttgggaaact aaggccattt gttttgtttt ggtgtcccct ttgaagccct
7021 gccttctggc cttactcctg tacagatatt tttgacctat aggtgccttt atgagaattg
7081 agggtctgac atcctgcccc aaggagtagc taaagtaatt gctagtgttt tcagggattt
7141 taacatcaga ctggaatgaa tgaatgaaac tttttgtcct tttttttttct gttttttttt
7201 ttctaatgta gtaaggacta aggaaaacct ttggtgaaga caatcatttc tctctgttga
7261 tgtggatact tttcacaccg tttatttaaa tgctttctca ataggtccag agccagtgtt
7321 cttgttcaac ctgaaagtaa tggctctggg ttgggccaga cagttgcact ctctagtttg
7381 ccctctgcca caaatttgat gtgtgacctt tgggcaagtc atttatcttc tctgggcctt
7441 agttgcctca tctgtaaaat gagggagttg gagtagatta attattccag ctctgaaatt
7501 ctaagtgacc ttggctacct tgcagcagtt ttggatttct tccttatctt tgttctgctg
7561 tttgaggggg ctttttactt atttccatgt tattcaaagg agactaggct tgatatttta
7621 ttactgttct tttatggaca aaaggttaca tagtatgccc ttaagactta attttaacca
7681 aaggcctagc accaccttag gggctgcaat aaacacttaa cgcgcgtgcg cacgcgcgcg
7741 cgcacacaca cacacacaca cacacacaca cacaggtcag agtttaaggc tttcgagtca
7801 tgacattcta gcttttgaat tgcgtgcaca cacacacgca cgcacacact ctggtcagag
7861 tttattaagg ctttcgagtc atgacattat agcttttgag ttggtgtgtg tgacaccacc
7921 ctcctaagtg gtgtgtgctt gtaatttttt ttttcagtga aaatggattg aaaacctgtt
7981 gttaatgctt agtgatatta tgctcaaaac aaggaaattc ccttgaaccg tgtcaattaa
8041 actggtttat atgactcaag aaaacaatac cagtagatga ttattaactt tattcttggc
8101 tctttttagg tccattttga ttaagtgact tttggctgga tcattcagag ctctcttcta
8161 gcctaccctt ggatgagtac aattaatgaa attcatattt tcaaggacct gggagccttc
8221 cttggggctg ggttgagggt ggggggttgg ggagtcctgg tagaggccag ctttgtggta
8281 gctggagagg aagggatgaa accagctgct gttgcaaagg ctgcttgtca ttgatagaag
8341 gactcacggg cttggattga ttaagactaa acatggagtt ggcaaacttt cttcaagtat
8401 tgagttctgt tcaatgcatt ggacatgtga tttaagggaa aagtgtgaat gcttatagat
8461 gatgaaaacc tggtgggctg cagagcccag tttagaagaa gtgagttggg ggttggggac
8521 agatttggtg gtggtatttc ccaactgttt cctcccctaa attcagagga atgcagctat
8581 gccagaagcc agagaagagc cactcgtagc ttctgctttg gggacaactg gtcagttgaa
8641 agtcccagga gttcctttgt ggctttctgt atacttttgc ctggttaaag tctgtggcta
8701 aaaaatagtc gaacctttct tgagaactct gtaacaaagt atgtttttga ttaaaagaga
8761 aagccaacta aaaaaaaaaa aaaaaaaaa
```

[0041] 根据本公开,适合的SMAD4抑制剂是能够相对于不存在所述剂时发生的SMAD4表达水平和/或信号传导活性来降低受试者的神经胶质细胞中SMAD4表达水平和/或SMAD4信号传导活性的任何剂或化合物。适合的抑制剂可抑制SMAD mRNA表达或蛋白质表达,可阻断SMAD4翻译后加工,可抑制SMAD4与其他信号传导蛋白质的相互作用,或者可阻断SMAD4核转位。

[0042] 在一个实施方案中,SMAD4抑制剂为小分子抑制剂。适用于本文所公开的方法的一种示例性SMAD4抑制剂是减少SMAD4表达水平的去泛素化酶抑制剂PR-619(即,2,6-二氨基-3,5-二硫代氰基吡啶;CAS号2645-32-1),如Soji等人,“Deubiquitinase Inhibitor PR-619 Reduces Smad4 Expression and Suppresses Renal Fibrosis in Mice with

Unilateral Ureteral Obstruction,"PLoS 13(8):e0202409(2008)所述,所述文献以引用的方式整体并入本文中。SMAD4的另一种示例性小分子抑制剂也通过降低SMAD4表达来起作用并且适用于本文所述的方法中,所述抑制剂为丙戊酸(参见例如Mao等人,"Valproic acid inhibits epithelial mesenchymal transition in renal cell carcinoma by decreasing SMAD4 expression,"Mol.Med.Rep.16(5):6190-6199(2017)以及Lan等人,"Valproic acid(VPA)inhibits the epithelial-mesenchymal transition in prostate carcinoma via the dual suppression of SMAD4,"J Cancer Res Clin Oncol.142(1):177-85(2016),其以引用的方式整体并入本文中)。SMAD4的适用于本文所述的方法中的另一种示例性小分子抑制剂是减少SMAD4蛋白质水平的5-氟尿嘧啶(5-FU),如Okada等人,"Regulation of transforming growth factor is involved in the efficacy of combined 5-fluorouracil and interferon alpha-2b therapy of advanced hepatocellular carcinoma,"Cell Death Discov.4:42(2018)所教导的,所述文献以引用的方式整体并入本文中。适用于本文所述的方法中的另一种示例性SMAD4抑制剂是抑制SMAD4核转位的HDAC抑制剂伏立诺他,如Sakamoto等人,"A Histone Deacetylase Inhibitor Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition and Attenuates Chemoresistance in Biliary Tract Cancer,"PLoS One 11(1):e0145985(2016)所描述,所述文献以引用的方式整体并入本文中。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)特异性抑制剂也阻断SMAD4核转位,如Jiang等人,"MAPK inhibitors modulate Smad2/3/4complex cyto-nuclear translocation in myofibroblasts via Imp7/8mediation,"Mol Cell Biochem.406(1-2):255-62(2015)所公开的,所述文献以引用的方式整体并入本文中)。因此,MAPK特异性抑制剂(特别是ERK、JNK和p38特异性抑制剂)充当可用于本文所公开的方法中的另一类小分子抑制剂。在此类别中适合的抑制剂为本领域已知的并且包括例如但不限于优立替尼(Ulixertinib)(ERK抑制剂)(BVD523)(Sullivan等人,"First-in-Class ERK1/2Inhibitor Ulixertinib(BVD-523)in Patient with MAPK Mutant Advanced Solid Tumors:Results of a Phase I Dose-Escalation and Expansion Study,"Cancer Discov.8(2):1-12(2017),其以引用的方式整体并入本文中);CC-401、SP600125、AS601245、AS602801、D-JNKI-1和BI-78D(JNK抑制剂)(Cicenas等人,"JNK,p38,ERK,and SGK1 Inhibitors in Cancer,"Cancers 10:1(2018),其以引用的方式整体并入本文中);SCIO-469(他匹莫德(Talmapimod))、BIRB-796(多玛莫德(Doramapimod))、LY2228820(雷米替尼(Ralimetinib))、VX-745和PH-797804(选择性p38抑制剂)(Cicenas等人,"JNK,p38,ERK,and SGK1 Inhibitors in Cancer,"Cancers 10:1(2018),其以引用的方式整体并入本文中)。

[0043] 适用于本文所公开的方法中的另一类SMAD4抑制剂包括抑制性肽。SMAD4的一种适合肽抑制剂为能够阻断SMAD4蛋白质相互作用的SBD肽(Urata等人,"A peptide that blocks the interaction of NF-κB p65 subunit with Smad4 enhances BMP2-induced osteogenesis,"J Cell Physiol.233(9):7356-7366(2018),其以引用的方式整体并入本文中)。SBD肽对应于p65的反式活化内的氨基末端区域,其与SMAD4的MH1结构域(称为Smad4结合结构域(SBD))相互作用(参见Urata等人,"A peptide that blocks the interaction of NF-κB p65 subunit with Smad4 enhances BMP2-induced osteogenesis,"J Cell

Physiol.233(9):7356-7366(2018)以及Hirata-Tsuchiya等人,Inhibition of BMP2-Induced Bone Formation by the p65 Subunit of NK-kB via an Interaction with SMAD 4,"Mol.Endocrinology 28(9):1460-1470(2014),其以引用的方式整体并入本文中)。SBD肽与SMAD4的结合阻断了SMAD4与其他蛋白质诸如p65相互作用。示例性SBD肽具有氨基酸序列APGLPNGLLSGDEDFSSIADMDFSALLSQISS(SEQ ID NO:35)。

[0044] SMAD4的另一种适合的肽抑制剂为毛状蛋白样蛋白(CLP或Cotl1;UniProtKB登录号Q14019),其为F-肌动蛋白结合蛋白。此蛋白质通过引起SMAD4的翻译后下调来抑制SMAD4(Xia等人,"Coactosin-like protein CLP/Cotl1 suppresses breast cancer growth through activation of IL-24/PERP and inhibition of non-canonical TGFβ signaling,"Oncogene 37(3):323-331(2018),其以引用的方式整体并入本文中)。因此,CLP/Cotl1的具有氨基酸序列SEQ ID NO:8(下文所示)的重组形式或其活性片段适用于本文所公开的方法中。

[0045] MATKIDKEACRAAYNLVRDDGSAVIWVTFKYDGSTIVPGEQGAEYQHFIQQCTDDVR LFAFVRFTTGDAMSKRSKFALITWIGENVSGLQRAKTGTDKTLVKEVVQNFAKEFVI SDRKEL EEDFIKSELKKAGGANYDAQTE (SEQ ID NO: 8)

[0046] 在另一个实施方案中,所述SMAD4抑制剂是选自由SMAD4反义寡核苷酸、SMAD4 shRNA、SMAD4 siRNA和SMAD4 RNA适体组成的组的抑制性核酸分子。

[0047] 使用反义方法抑制基因的体内翻译和随后的蛋白表达是本领域熟知的(例如,Dobie等人的美国专利号7,425,544;Karras等人的美国专利号7,307,069;Bennett等人的美国专利号7,288,530;Cowsert等人的美国专利号7,179,796,其以引用的方式整体并入本文)。根据本公开,适合的反义核酸是与编码SMAD4的特定核酸分子的至少一部分互补或杂交的核酸分子(例如,含有DNA核苷酸、RNA核苷酸或修饰(例如增加分子稳定性的修饰,例如2'-O-烷基(例如,甲基)取代的核苷酸)或其组合的分子)(参见例如Weintraub,H.M.,"Antisense DNA and RNA,"Scientific Am.262:40-46(1990),其以引用的方式整体并入本文)。以上SEQ ID NO:2是编码SMAD4的示例性核酸分子。用于本文所述方法的适合的反义寡核苷酸的长度为或高达12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核碱基,并且相对于靶SMAD4核酸或其特定部分包含不超过6个、不超过5个、不超过4个、不超过3个、不超过2个或不超过1个非互补核碱基。反义核酸分子与其相应靶SMAD4核酸分子杂交,以形成双链分子,所述双链分子干扰mRNA的翻译,因为细胞将不会翻译双链mRNA。

[0048] SMAD4反义核酸可以作为反义寡核苷酸引入到细胞中,或者可以例如使用基因治疗方法在已经引入了编码反义核酸的核酸的细胞中产生。适用于根据本文所述的方法使用的抗SMAD4反义寡核苷酸公开于Monia等人的美国专利号6,013,787和Kretschmer等人,"Differential Regulation of TGF-βSignaling Through Smad2,Smad3,and Smad4,"Oncogene 22:6748-6763(2003),其以引用的方式整体并入本文中。

[0049] SMAD4 siRNA是长度为约20-25个核苷酸的双链合成RNA分子,其两端具有短的2-3个核苷酸的3'突出端。双链siRNA分子表示靶mRNA分子的一部分的有义链和反义链,在此情况下为SMAD4核苷酸序列的一部分,即编码SMAD4的SEQ ID NO:2。siRNA分子通常被设计成靶向SMAD4 mRNA靶标的从起始密码子开始的大约50-100个核苷酸的区域。在引入到细胞中

后,siRNA复合物引发内源性RNA干扰(RNAi)途径,从而导致靶SMAD4 mRNA分子裂解和降解。靶向可用于本文所公开的方法中的SMAD4和SMAD4转录复合物的其他成员的siRNA分子公开于Dhillon等人的美国专利号9,035,039和Puplampu-Dove等人,"Potentiating Tumor Immunity Using Aptamer-Targeted RNAi to Render CD8+T Cells Resistant to TGFβ Inhibition,"J.OncoImmunology 7(4)(2018),其以引用的方式整体并入本文中。已经描述了siRNA组合物的各种改进,例如将修饰的核苷或基序掺入siRNA分子的一条或两条链中以增强稳定性、特异性和功效,并且所述改进适用于根据本公开的这一方面使用(参见例如Giese等人的WO2004/015107;McSwiggen等人的WO2003/070918;Imanishi等人的WO1998/39352;Jesper等人的美国专利申请公布号2002/0068708;Kaneko等人的美国专利申请公布号2002/0147332;Bhat等人的美国专利申请公布号2008/0119427,其以引用的方式整体并入本文)。

[0050] 短或小发夹RNA分子在功能上与siRNA分子相似,但是包含产生紧密发夹转角的更长RNA序列。shRNA通过细胞机制裂解为siRNA,并且基因表达通过细胞RNA干扰途径来沉默。本文描述了有效干扰SMAD4表达的shRNA分子,并且其包含以下核酸序列:靶向SMAD4核苷酸序列5'-TGGTCAGCCAGCTACTTAC-3'(SEQ ID NO:4)的5'GUAAGUAGCUGGCUGACCA-3'(SEQ ID NO:3)和靶向SMAD4核苷酸序列5'-ATGAATATGACTCACTTCT-3'(SEQ ID NO:7)的5'-AGAAGUGAGUCAUAUUCAU-3'(SEQ ID NO:6)。抑制SMAD4表达并适用于根据本文所述的方法使用的其他shRNA分子为本领域抑制的,参见例如Doiron的WO2016115558,其以引用的方式整体并入本文中。

[0051] 特异性结合至SMAD4的核酸适体也适用于如本文所述的方法。核酸适体是单链的、部分单链的、部分双链的或双链的核苷酸序列,其能够通过Watson-Crick碱基配对或三链体形成以外的机制特异性识别选择的靶分子,即具有氨基酸序列SEQ ID NO:1的SMAD4蛋白质或具有核苷酸序列SEQ ID NO:2的SMAD4核酸分子。适体包括但不限于确定的序列区段和包含核苷酸、核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、核苷酸类似物、修饰的核苷酸和包含主链修饰、分支点和非核苷酸残基、基团或桥的核苷酸的序列。

[0052] 对本文所述的抑制性核酸分子(即,SMAD4反义寡核苷酸、siRNA、shRNA、PNA、适体)的修饰包括对核苷间键、糖部分或核碱基的取代或改变。修饰的抑制性核酸分子通常优于天然形式,因为其具有所需的特性,例如增强的细胞摄取、增强的对核酸靶的亲和力、在核酸酶存在下增加的稳定性或增加的抑制活性。例如,可以使用化学修饰的核苷来增加缩短或截短的反义寡核苷酸对其靶核酸的结合亲和力。因此,常可以具有此类化学上修饰的核苷的较短反义化合物获得相当的结果。

[0053] 靶向SMAD4的抑制性核酸分子可以任选地含有一个或多个其中糖基已被修饰的核苷。此类糖修饰的核苷可以赋予核酸分子增强的核酸酶稳定性、增加的结合亲和力或一些其他有益的生物学特性。在某些实施方案中,核苷包含化学修饰的呋喃核糖环部分。化学修饰的呋喃核糖环的实例包括但不限于添加包括5'和2'取代基的取代基,桥接非孪位环原子以形成双环核酸(BNA),用S、N(R)或C(R1)(R)2(其中R=H、C1-C12烷基或保护基)置换核糖基环氧原子,及其组合。化学修饰的糖的实例包括2'-F-5'-甲基取代的核苷、用S置换核糖基环氧原子且在2'-位置进一步取代。

[0054] 在某些实施方案中,核苷通过用糖替代物(有时称为DNA类似物)例如吗啉代环、环

己烯基环、环己基环或四氢吡喃基环置换核糖基环来修饰。

[0055] 核碱基(或碱基)修饰或取代在结构上可与天然存在或合成的未修饰核碱基区分，但在功能上可与天然存在或合成的未修饰核碱基互换。天然核碱基与经修饰核碱基两者均能够参与氢键结。此类核碱基修饰可以赋予SMAD4抑制剂核酸分子核酸酶稳定性、结合亲和力或一些其他有益的生物学特性。修饰的核碱基包括合成的和天然的核碱基，诸如，例如，5-甲基胞嘧啶(5-me-C)。某些核碱基取代(包括5-甲基胞嘧啶取代)特别可用于增加核酸分子与其靶核酸的结合亲和力。其他修饰的核碱基包括5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其他烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其他烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基(-C≡C-CH3)尿嘧啶和胞嘧啶以及嘧啶碱基的其他炔基衍生物、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基和其他8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代(具体地为5-溴)、5-三氟甲基、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、2-F-腺嘌呤、2-氨基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。

[0056] RNA和DNA的天然存在的核苷间键是3’至5’磷酸二酯键。具有修饰的核苷间键的抑制性核酸分子包含保留磷原子的核苷间键以及不具有磷原子的核苷间键。代表性含磷核苷间键联包括但不限于磷酸二酯、磷酸三酯、甲基磷酸酯、氨基磷酸酯以及硫代磷酸酯。制备含磷键和不含磷键的方法是已熟知的。在某些实施方案中，靶向SMAD4核酸的抑制性核酸分子包含一个或多个修饰的核苷间键。

[0057] 在此所述的抑制性核酸分子可以共价连接至一个或多个部分或缀合物，所述部分或缀合物增强所得抑制性核酸分子的活性、细胞分布或细胞摄取。典型缀合物基团包括胆固醇部分和脂质部分。另外的缀合物基团包括碳水化合物、聚合物、肽、无机纳米结构材料、磷脂、生物素、吩嗪、叶酸、菲啶、蒽醌、吖啶、荧光素、罗丹明、香豆素和染料。

[0058] 本文所述的抑制性核酸分子也可以被修饰为具有一个或多个通常连接至抑制性核酸分子的一个或两个末端以增强特性(例如，核酸酶稳定性)的稳定基团，例如帽结构。这些末端修饰保护抑制性核酸分子使其免于核酸外切酶降解，并有助于细胞内递送和/或定位。帽结构可以存在于5’末端(5’-帽)或3’末端(3’-帽)，或者可以存在于两个末端。帽结构在本领域中为熟知的且包括例如反向脱氧无碱基帽。可用于封端抑制性核酸分子的一个或两个末端以赋予核酸酶稳定性的其他3’和5’-稳定基团包括Manoharan的WO 03/004602中公开的那些，所述专利以引用的方式整体并入本文。

[0059] 在另一个实施方案中，适合的SMAD4抑制剂为能够相对于在不存在所述剂时发生的SMAD4与SMAD 2和3的相互作用和/或SMAD4与SMAD 1、5和8的相互作用来降低、阻断或预防神经胶质细胞中的所述相互作用水平的任何剂或小分子。

[0060] 在另一个实施方案中，适合的SMAD4抑制剂是能够相对于不存在所述剂下发生的SMAD4活性水平来拮抗或降低神经胶质细胞中的SMAD4活性的任何剂或小分子。

[0061] 在一个实施方案中，将根据本文所述的方法使用的SMAD4抑制剂包装到纳米颗粒递送载体(delivery vehicle)中以实现抑制剂向受试者的神经胶质细胞的递送。用于穿过血脑屏障和/或向神经胶质细胞递送SMAD4抑制剂的适合纳米颗粒递送载体包括但不限于脂质体、蛋白质纳米颗粒、聚合物纳米颗粒、金属纳米颗粒和树枝状聚合物。

[0062] 脂质体是尺寸约80-300nm的由磷脂和类固醇(例如,胆固醇)双层构成的球形囊泡。脂质体是生物可降解的,具有低免疫原性。可以使用包封方法将如本文所述的SMAD4抑制剂掺入脂质体中。脂质体通过吸附、融合、内吞或脂质转移被靶细胞吸收。SMAD4抑制剂从脂质体中的释放取决于脂质体组成、pH、渗透梯度和周围环境。脂质体可以被设计成以细胞器特异性方式释放SMAD4抑制剂,以实现例如SMAD4抑制剂的核递送。

[0063] 可用于将本文所述的SMAD4抑制剂递送至神经胶质细胞的方法和脂质体的类型是本领域已知的,参见例如,Liu等人,"Paclitaxel loaded liposomes decorated with a multifunctional tandem peptide for glioma targeting,"Biomaterials 35:4835-4847(2014);Gao等人"Glioma targeting and blood-brain barrier penetration by dual-targeting doxorubicin liposomes,"Biomaterials 34:5628-5639(2013);Zong等人,"Synergistic dual-ligand doxorubicin liposomes improve targeting and therapeutic efficacy of brain glioma in animals,"Mol Pharm.11:2346-2357(2014);Yemisci等人,"Systemically administered brain-targeted nanoparticles transport peptides across the blood-brain barrier and provide neuroprotection,"J Cerebr Blood F Met.35:469-475(2015),其以引用的方式整体并入本文。

[0064] 在另一个实施方案中,将本文所述的SMAD4抑制剂包装在聚合物递送载体中。聚合物递送载体是直径通常为约10至100nm的结构。用于包封如本文所述的SMAD4抑制剂的适合聚合物纳米颗粒可以由合成聚合物(例如聚-ε-己内酯、聚丙烯酰胺和聚丙烯酸酯)或天然聚合物(例如白蛋白、明胶或壳聚糖)制成。本文所用的聚合物纳米颗粒可以是生物可降解的,例如聚(L-丙交酯)(PLA)、聚乙交酯(PGA)、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA),或者是生物不可降解的,例如聚氨酯。本文所用的聚合物纳米颗粒还可以含有一种或多种增强递送的表面修饰。例如,在一个实施方案中,将聚合物纳米颗粒用非离子表面活性剂包衣以减少免疫学相互作用以及分子间相互作用。聚合物纳米颗粒的表面还可以被官能化以连接或固定如下文所述的一个或多个靶向部分,例如指导纳米颗粒穿过血脑屏障和/或到达神经胶质细胞以进行神经胶质细胞摄取(即神经胶质祖细胞或星形胶质细胞摄取)的抗体或其他结合多肽或配体。

[0065] 可用于将如本文所述的SMAD4抑制剂递送至神经胶质细胞的方法和聚合物纳米颗粒的类型是本领域已知的,参见例如Koffie等人"Nanoparticles enhance brain delivery of blood-brain barrier-impermeable probes for in vivo optical and magnetic resonance imaging,"Proc Natl Acad Sci U S A.108:18837-18842(2011);Zhao等人,"The permeability of puerarin loaded poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80on the blood-brain barrier and its protective effect against cerebral ischemia/reperfusion injury,"Biol Pharm Bull.36:1263-1270(2013);Yemisci等人,"Systemically administered brain-targeted nanoparticles transport peptides across the blood-brain barrier and provide neuroprotection,"J Cerebr Blood F Met.35:469-475(2015),其以引用的方式整体并入本文。

[0066] 在另一个实施方案中,将本公开的组合物包装在树枝状聚合物纳米载体递送载体

中。树枝状聚合物是具有明确限定的尺寸和结构的独特聚合物。适合用作如本文所述的SMAD4抑制剂的递送载体的具有树枝状结构的示例性纳米分子包括但不限于糖原、支链淀粉和蛋白聚糖。在树枝状聚合物的内部结构中包封治疗性组合物(例如本文所述的组合物)的方法是本领域中已知的,参见例如D'Emanuele等人,"Dendrimer-drug interactions," Adv Drug Deliv Rev 57:2147-2162(2005),其以引用的方式整体并入本文。树枝状聚合物的表面适用于连接一个或多个靶向部分,例如如本文所述的能够将树枝状聚合物靶向穿过血脑屏障和/或到达神经胶质细胞的抗体或其他结合蛋白和/或配体。

[0067] 用于包封SMAD4抑制剂以向有此需要的受试者施用和递送的示例性树枝状聚合物是聚(酰氨基酰胺)(PAMAM)。PAMAM已被用于将蛋白质和核酸治疗剂递送至目标靶细胞。将治疗剂包封在PAMAM中的方法和利用PAMAM将治疗剂递送至中枢神经系统的方法也是本领域中已知的,并且可以在本文中使用,参见例如Cerqueira等人,"Multifunctionalized CMCht/PAMAM dendrimer nanoparticles modulate the cellular uptake by astrocytes and oligodendrocytes in primary cultures of glial cells,"Macromol Biosci.12:591-597(2012);Nance等人,"Systemic dendrimer-drug treatment of ischemia-induced neonatal white matter injury,"J Control Release 214:112-120(2015);Natali等人,"Dendrimers as drug carriers:dynamics of PEGylated and methotrexate-loaded dendrimers in aqueous solution,"Macromolecules 43:3011-3017(2010);Han等人,"Peptide conjugated PAMAM for targeted doxorubicin delivery to transferrin receptor overexpressed tumors,"Mol Pharm 7:2156-2165(2010);Kannan等人,"Dendrimer-based Postnatal Therapy for Neuroinflammation and Cerebral Palsy in a Rabbit Model,"Sci.Transl.Med.4:130(2012);以及Singh等人,"Folate and Folate-PEG-PAMAM dendrimers:synthesis,characterization,and targeted anticancer drug delivery potential in tumor bearing mice," Bioconjugate Chem 19:2239-2252(2008),其以引用的方式整体并入本文。

[0068] 在另一个实施方案中,将如本文所公开的SMAD4抑制剂包装在银纳米颗粒或氧化铁纳米颗粒中。可用于将本文所述的SMAD4抑制剂递送至神经胶质细胞的方法和银和氧化铁纳米颗粒的制备是本领域已知的,参见例如Hohnholt等人,"Handling of iron oxide and silver nanoparticles by astrocytes,"Neurochem Res.38:227-239(2013),其以引用的方式整体并入本文。

[0069] 在另一个实施方案中,将本文所述的SMAD4抑制剂包装在金纳米颗粒中。金纳米颗粒是通过内吞途径进入细胞的小颗粒(<50nm)。在一个实施方案中,将金纳米颗粒用葡萄糖包衣,以促进纳米颗粒穿过血脑屏障转移和星形胶质细胞通过GLUT-1受体对纳米颗粒进行摄取,如Gromnicova等人,"Glucose-coated Gold Nanoparticles Transferacross Human Brain Endothelium and Enter Astrocytes In vitro,"PLoSONE 8(12):e81043(2013)所述,所述文献以引用的方式整体并入本文。

[0070] 在另一个实施方案中,将本公开的组合物包装在二氧化硅纳米颗粒中。二氧化硅纳米颗粒具有生物相容性、高多孔性且易于官能化。二氧化硅纳米颗粒为无定形形状,尺寸范围为10-300nm。适合于将治疗性组合物例如SMAD4抑制剂递送至CNS以进行神经胶质细胞摄取的二氧化硅纳米颗粒是本领域中已知的,参见例如Song等人,"In vitro Study of

Receptor-mediated Silica Nanoparticles Delivery Across Blood Brain Barrier," ACS Appl.Mater.Interfaces 9(24):20410-20416(2017);Tamba等人,"Tailored Surface Silica Nanoparticles for Blood-Brain Barrier Penetration:Preparation and In vivo Investigation,"Arabian J.Chem.doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.03.019 (2018),其以引用的方式整体并入本文。

[0071] 在另一个实施方案中,将SMAD4抑制剂包装到蛋白质纳米颗粒递送载体中。蛋白质纳米颗粒是可生物降解的、可代谢的且易于修饰以允许根据需要捕获治疗性分子或组合物并连接靶向分子。本领域已知并已用于将治疗组合物递送至中枢神经系统的适合蛋白质纳米颗粒递送载体包括但不限于白蛋白颗粒(参见例如,Lin等人,"Blood-brain Barrier Penetrating Albumin Nanoparticles for Biomimetic Drug Delivery via Albumin-Binding Protein Pathway for Antiglioma Therapy,"ACS Nano 10(11):9999-10012 (2016),以及Ruan等人,"Substance P-modified Human Serum Albumin Nanoparticles Loaded with Paclitaxel for Targeted Therapy of Glioma,"Acta Pharmaceutica Sinica B 8(1):85-96(2018),其以引用的方式整体并入本文)、明胶纳米颗粒(参见例如Zhao等人,"Using Gelatin Nanoparticle Mediated Intranasal Delivery of Neuropeptide Substance P to Enhance Neuro-Recovery in Hemiparkinsoninan Rats,"PLoS One 11(2):e0148848(2016),其以引用的方式整体并入本文)和乳铁蛋白纳米颗粒(参见例如Kumari等人,"Overcoming Blood Brain Barrier with Dual Purpose Temozolomide Loaded Lactoferrin Nanoparticles for Combating Glioma(SERP-17-12433)," Scientific Reports 7:6602(2017),其以引用的方式整体并入本文)。

[0072] 纳米颗粒介导的治疗组合物的递送可以被动地实现(即,基于脂质体或纳米颗粒在体内的正常分布模式)或通过主动靶向递送来实现。主动靶向递送涉及通过将靶向部分连接到脂质体的外表面来改变递送载体的自然分布模式。在一个实施方案中,修饰如本文所述的递送载体以包含一个或多个靶向部分,即促进脂质体或纳米颗粒穿过血脑屏障递送的靶向部分和/或促进神经胶质细胞摄取(即神经胶质祖细胞摄取和/或星形胶质细胞摄取)的靶向部分。在一个实施方案中,对如本文所述的递送载体进行表面修饰以表达适用于实现血脑屏障渗透的靶向部分。在另一个实施方案中,对如本文所述的递送载体进行表面修饰以表达适用于神经胶质细胞摄取的靶向部分。在另一个实施方案中,对本文所述的递送载体进行表面修饰以表达双重靶向部分。

[0073] 促进脂质体或纳米颗粒递送穿过血脑屏障的靶向部分利用受体介导的、转运蛋白介导的或吸附介导的穿过屏障的转运。用于实现血脑屏障通过的适合靶向部分包括与内皮细胞表面蛋白和受体结合的抗体和配体。示例性靶向部分包括但不限于环状RGD肽(Liu等人,"Paclitaxel loaded liposomes decorated with a multifunctional tandempeptide for glioma targeting,"Biomaterials 35:4835-4847(2014),其以引用的方式整体并入本文);结合VEGFR2和神经纤毛蛋白-1的环状A7R肽(Ying等人,"A Stabilized Peptide Ligand for Multifunctional Glioma Targeted Drug Delivery," J.Contr.Rel.243:86-98(2016),其以引用的方式整体并入本文);能够结合转铁蛋白受体的转铁蛋白、肽或抗体(Zong等人,"Synergistic dual-ligand doxorubicin liposomes improve targeting and therapeutic efficacy of brain glioma in a nimals,"Mol

Pharm.11:2346-235773(2014);Yemisci等人,“Systemically administered brain-targeted nanoparticles transport peptides a cross the blood-brain barrier and provide neuroprotection,”J Cerebr Blood F Met.35:469-475(2015);以及Wei等人,“Brain Tumor-targeted Therapy by Systemic Delivery of siRNA with Transferrin Receptor-Mediated Core-Shell Nanoparticles,”Inter.J.Pharm 510(1):394-405),Niewoehner等人,“Increased Brain Penetration and Potency of a Therapeutic Antibody Using a Monovalent Molecular Shuttle,”Neuron 81:49-60(2014),其以引用的方式整体并入本文);结合叶酸受体的叶酸蛋白或肽(Gao等人“Glioma targeting and blood-brain barrier penetration by dual-targeting doxorubincin liposomes,”Biomaterials 34:5628-5639(2013),其以引用的方式整体并入本文);结合乳铁蛋白受体的乳铁蛋白蛋白或肽(Song等人,“In vitro Study of Receptor-mediated Silica Nanoparticles Delivery Across Blood Brain Barrier,”ACS Appl.Mater.Interfaces 9(24):20410-20416(2017),其以引用的方式整体并入本文);低密度脂蛋白受体配体,例如ApoB和ApoE(Wagner等人,“Uptake Mechanisms of ApoE-modified Nanoparticles on Brain Capillary Endothelial Cells as a Blood-brain Barrier Model,”PLoS One 7:e32568(2012),其以引用的方式整体并入本文);物质P肽(Ruan等人,“Substance P-modified Human Serum Albumin Nanoparticles Loaded with Paclitaxel for Targeted Therapy of Glioma,”Acta Pharmaceutica Sinica B 8(1):85-96(2018),其以引用的方式整体并入本文);以及angiopep-2(An2)肽(Demeule等人,“Conjugation of a brain-penetrant peptide with neurotensin provides antinociceptive properties,”J.Clin.Invest.124:1199-1213(2014),其以引用的方式整体并入本文)。其他适合的靶向部分包括氨基酸转运蛋白的配体,例如用于通过谷胱甘肽转运蛋白转运的谷胱甘肽(Rip等人,“Glutathione PEGylated Liposomes:Pharmacokinetics and Delivery of Cargo Across the Blood-Brain Barrier in Rats,”J.Drug Target 22:460-67(2014),其以引用的方式整体并入本文),以及用于通过胆碱转运蛋白递送的胆碱衍生物(Li等人,“Choline-derivative-modified Nanoparticles for Brain-targeting Gene Delivery,”Adv.Mater.23:4516-20(2011),其以引用的方式整体并入本文)。

[0074] 第二靶向部分是促进神经胶质细胞递送和摄取的部分。用于实现星形胶质细胞摄取的适合靶向部分包括但不限于能够结合星形胶质细胞上的LDL受体和氧化LDL受体的低密度脂蛋白(LDL)受体配体或其肽(Lucarelli等人,“The Expression of Native and Oxidized LDL Receptors in Brain Microvessels is Specifically Enhanced by Astrocyte-derived Soluble Factor(s),”FEBS Letters 522(1-3):19-23(2002),其以引用的方式整体并入本文)、能够结合星形胶质细胞上的GLUT-1受体的葡萄糖或其他聚糖(Gromnicova等人,“Glucose-coated Gold Nanoparticles Transfer across Human Brain Endothelium and Enter Astrocytes In vitro,”PLoS ONE 8(12):e81043(2013),其以引用的方式整体并入本文)以及能够结合神经胶质祖细胞的PDGFRα的血小板衍生生长因子或其肽。

[0075] 本文所述的抑制性核酸分子(例如SMAD4反义寡核苷酸、SMAD4 siRNA、SMAD4 shRNA)的神经胶质细胞递送也可以通过将此类核酸分子包装在病毒载体中来实现。已知几

种病毒载体在体内固有地靶向星形胶质细胞,所述病毒载体例如慢病毒载体(Colin等人,“Engineered Lentiviral Vector Targeting Astrocytes In vivo,”Glia57:667-679(2009),以及Cannon等人,“Pseudotype-dependent Lentiviral Transduction of Astrocytes or Neurons in the Rat Substantia Nigra,”Exp.Neurol.228:41-52(2011),其以引用的方式整体并入本文)以及腺相关病毒载体(Furman等人,“Targeting Astrocytes Ameliorates Neurologic Changes in a Mouse Model of Alzheimer's Disease,”J.Neurosci.32:16129-40(2012),其以引用的方式整体并入本文),并且因此所述病毒载体适用于根据本文所述的方法来实现核酸SMAD4抑制分子的递送。

[0076] 在一个实施方案中,载体是腺病毒相关病毒(AAV)载体。适用于将核酸SMAD4抑制剂或编码本文所述的SMAD4蛋白质抑制剂的多核苷酸递送至中枢神经系统的许多治疗性AAV载体是本领域已知的。参见例如Deverman等人,“Gene Therapy for Neurological Disorders:Progress and Prospects,”Nature Rev.17:641-659(2018),其以引用的方式整体并入本文中。适合的AAV载体包括呈天然形式或针对增强的嗜性进行工程化的血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10或AAV11。已知对CNS具有嗜性且特别适合于治疗性表达本文所述的SMAD4核酸分子的AAV载体包括呈天然形式或对增强的嗜性进行工程化的AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV8和AAV9。在一个实施方案中,AAV载体是AAV2载体。在另一个实施方案中,AAV载体是如Vitale等人,“Anti-tau Conformational scFv MC1 Antibody Efficiently Reduces Pathological Tau Species in Adult JNPL3 Mice,”Acta Neuropathol.Commun.6:82(2018)中所述的AAV5载体,任选地含有GFAP或CAG启动子和土拨鼠肝炎病毒(WPRE)翻译后调节元件。在另一个实施方案中,AAV载体是如Haiyan等人,“Targeting Root Cause by SystemicscAAV9-hIDS Gene Delivery: Functional Correction and Reversal of Severe MPSII in Mice,”Mol.Ther.Methods Clin.Dev.10:327-340(2018)所述的AAV9载体,所述文献以引用的方式整体并入本文中。在另一个实施方案中,AAV载体是如Liu等人,“Vectored Intracerebral Immunizations with the Anti-Tau Monoclonal Antibody PHF1 Markedly Reduces Tau Pathology in Mutant Transgenic Mice,”J.Neurosci.36(49):12425-35(2016)所述的AAVrh10载体,所述文献以引用的方式整体并入本文中。

[0077] 在另一个实施方案中,AAV载体是包含一种血清型(例如AAV2)的基因组和控制嗜性的另一种血清型(例如AAV1或AAV3-9)的衣壳蛋白的杂合载体。参见例如Broekman等人,“Adeno-associated Virus Vectors Serotyped with AAV8 Capsid are More Efficient than AAV-1 or-2 Serotypes for Widespread Gene Delivery to the Neonatal Mouse Brain,”Neuroscience 138:501-510(2006),其以引用的方式整体并入本文中。在一个实施方案中,AAV载体是如Ising等人,“AAV-mediated Expression of Anti-Tau ScFv Decreases Tau Accumulation in a Mouse Model of Tauopathy,”J.Exp.Med.214(5):1227(2017)所述的AAV2/8杂合载体,所述文献以引用的方式整体并入本文中。在另一个实施方案中,AAV载体是如Simon等人,“A Rapid Gene Delivery-Based Mouse Model for Early-Stage Alzheimer Disease-Type Tauopathy,”J.Neuropath.Exp.Neurol.72(11):1062-71(2013)所述的AAV2/9杂合载体,所述文献以引用的方式整体并入本文中。

[0078] 在另一个实施方案中,AAV载体是以下载体:已被工程化或选择使得在器官实质内

施用之后CNS转导增强,例如AAV-DJ(Grimm等人,J.Viol.82:5887-5911(2008),其以引用的方式整体并入本文);干细胞或祖细胞的转导增加,例如SCH9和AAV4.18(Murlidharan等人,J.Virol.89:3976-3987(2015)and Ojala等人,Mol.Ther.26:304-319(2018),其以引用的方式整体并入本文);逆行转导增强,例如rAAV2-retro(Muller等人,Nat.Biotechnol.21:1040-1046(2003),其以引用的方式整体并入本文);或在IV施用之后成人CNS的转导增强,例如AAV-PHP.B和AAVPHP.eB(Deverman等人,Nat.Biotechnol.34:204-209(2016)和Chan等人,Nat.Neurosci.20:1172-1179(2017),其以引用的方式整体并入本文。

[0079] 如本文所用,"治疗(treating)"或"治疗(treatment)"包括施用SMAD4抑制剂以部分或完全恢复或去阻遏神经胶质细胞中的钾通道基因表达、部分或完全恢复神经胶质细胞中的钾通道摄取活性并部分或完全恢复神经胶质细胞和周围组织中的钾稳态。关于治疗患有神经精神病状的受试者,"治疗"包括成功改善所述病状的任何指征,包括任何客观或主观参数,例如症状的减轻、缓解、减少(例如,降低神经元兴奋性)或使患者更耐受所述病状(例如,降低癫痫事件);减慢病状的进展;使病状不恶化;或改善受试者身心健康。症状的治疗或改善可以基于客观或主观参数;包括身体检查、神经学检查和/或精神病学评估的结果。

[0080] 如本文所指,"在有效的条件下"是指在实现受试者的所需治疗益处中起作用的有效剂量、施用途径、施用频率、SMAD4抑制剂的制剂等。根据本文所述的方法治疗受试者的SMAD4抑制剂的有效量是部分或完全地去阻遏钾通道基因表达,从而恢复钾通道摄取功能(部分或完全)以允许恢复大脑钾稳态的SMAD4抑制剂的剂量。在向患有神经精神病症诸如精神分裂症的受试者施用SMAD4抑制剂的情况下,有效剂量是诱导神经胶质祖细胞分化成星形胶质细胞的剂量。在另一个实施方案中,有效剂量是使大脑钾稳态恢复至足以降低钾的细胞外水平、降低神经元兴奋性并降低癫痫事件的水平所需要的剂量。在另一个实施方案中,治疗患有神经精神病症的受试者的有效剂量是有效于改善受试者的认知紊乱的剂量。用于特定受试者的有效剂量和给药条件例如根据待治疗的个体的健康和身体状况、个体的精神和情绪能力、病症的阶段、SMAD4抑制剂的类型、施用途径、制剂、主治医师对医疗状况的评定以及其他相关因素而变化。

[0081] 在一个实施方案中,具有受损的K^+通道功能的神经胶质细胞是神经胶质祖细胞。如本文实施例中所示,神经胶质祖细胞中的SMAD4上调抑制了K^+通道基因表达,并随后抑制了神经胶质祖细胞的K^+摄取。K^+摄取的减少抑制了终末神经胶质祖细胞分化。因此,在一个实施方案中,SMAD4抑制剂的有效剂量是增强神经胶质祖细胞的星形胶质细胞成熟,从而减少、消除或抑制神经精神疾病的发作、神经精神疾病的症状或疾病的副作用的发作的剂量。

[0082] 在另一个实施方案中,具有受损的K^+通道功能的神经胶质细胞是星形胶质细胞。星形胶质细胞中的SMAD4抑制恢复了受影响的星形胶质细胞中的K^+摄取和随后的K^+稳态。患有神经精神疾病的受试者的星形胶质细胞(其中钾通道表达和功能发生改变)中的SMAD4抑制降低神经元兴奋性、减少癫痫发生率(seizure incidence)并改善认知紊乱。因此,用有效剂量的SMAD4抑制剂进行的治疗减少、减轻、阻止或抑制与精神分裂症、孤独症谱系病症、双相障碍或任何其他神经精神病症相关的症状或病状的发展。治疗可以是预防性的,以预防或延迟疾病、病状或病症的发作或恶化,或预防其临床或亚临床症状的表现。或者,治疗可以是治疗性的,以在疾病、病状或病症表现之后抑制和/或减轻症状。

[0083] 可用于恢复受试者(例如患有神经精神病状的受试者)中的神经胶质细胞K^+摄取的SMAD4抑制剂可以通过胃肠外、局部、经口或鼻内方式来施用以进行治疗性治疗。肌肉内注射(例如,注射到手臂或腿肌肉)和静脉内输注是施用本文所公开的SMAD4抑制剂的适合方法。在一些方法中,将此类分子作为持续释放组合物或装置诸如Medipad™装置(Elan Pharm.Technologies,Dublin,Ireland)施用。或者,本文所公开的SMAD4抑制剂通过脑内递送、鞘内递送、鼻内递送或通过直接输注到脑室中来胃肠外施用。

[0084] 在一个实施方案中,肠胃外施用通过输注进行。输注的SMAD4抑制剂可以用泵递送。在某些实施方案中,输注的SMAD4抑制剂的广泛分布通过颅内施用、鞘内施用或脑室内施用递送至脑脊液来实现。

[0085] 在某些实施方案中,将输注的SMAD4抑制剂直接递送至组织。此类组织的实例包括纹状体组织、脑室内组织和尾状核组织。SMAD4抑制剂的特异性定位可以通过直接输注到靶组织来实现。

[0086] 在某些实施方案中,肠胃外施用通过注射进行。注射可以用注射器或泵递送。在某些实施方案中,注射是直接施用于组织的推注。此类组织的实例包括纹状体组织、脑室内组织和尾状核组织。包括反义寡核苷酸的药剂的特异性定位可以通过注射到靶组织来实现。

[0087] 在某些实施方案中,与SMAD4抑制剂的广泛扩散相比,SMAD4抑制剂诸如SMAD4反义寡核苷酸对靶组织的特异性定位改善了所述抑制剂的药代动力学特性。与抑制剂的广泛扩散相比,SMAD4抑制剂的特异性定位提高了效力,因此实现相似药理学需要施用的抑制剂更少。“相似药理学”是指靶SMAD4 mRNA和/或靶SMAD4蛋白受到下调/抑制的时间量(例如作用的持续时间)。在某些实施方案中,特异性定位SMAD4抑制剂的方法(例如通过推注)使抑制剂的中值有效浓度(EC50)降低约20倍。

[0088] 在另一个实施方案中,如本文所述的SMAD4抑制剂与一种或多种其他药剂共同施用。根据本公开的此实施方案,此类一种或多种其他药剂被设计为治疗与本文所述的SMAD4抑制剂相同的疾病、病症或病状或与其相关的一种或多种症状。在一个实施方案中,一种或多种其他药剂被设计为治疗本公开的一种或多种药物组合物的不期望的副作用。在一个实施方案中,将如本文所述的SMAD4抑制剂与另一种药剂共同施用以治疗不期望的作用。在另一个实施方案中,将如本文所述的SMAD4抑制剂与另一种药剂共同施用以产生组合效应。在另一个实施方案中,将如本文所述的SMAD4抑制剂与另一种药剂共同施用以产生协同效应。

[0089] 在一个实施方案中,同时施用如本文所述的SMAD4抑制剂和另一种药剂。在另一个实施方案中,将如本文所述的SMAD4抑制剂和另一种药剂在不同时间施用。在另一个实施方案中,将如本文所述的SMAD4抑制剂和另一种药剂一起制备成单一制剂。在另一个实施方案中,单独制备如本文所述的SMAD4抑制剂和另一种药剂。

[0090] 在某些实施方案中,可以与如本文所述的SMAD4抑制剂共同施用的药剂包括抗精神病药,例如氟哌啶醇、氯丙嗪、氯氮平、喹硫平(quetapine)和奥氮平;抗抑郁药,例如氟西汀、盐酸舍曲林、文拉法辛和去甲替林;镇定剂,例如苯并二氮䓬、氯硝西泮、帕罗西汀、文拉法辛和β-阻断剂;以及情绪稳定剂,例如锂、丙戊酸盐、拉莫三嗪和卡马西平。

[0091] 实施例

[0092] 材料和方法

[0093] 患者鉴定、保护和采样。从中得到这些品系的患者被诊断患有残疾程度的在青少

年早期发作的精神分裂症;所有患者及他们的监护人均已在我们之一(RLF)的监督下在获得儿童和青少年精神病医生的同意/赞同,并且根据大学医院病例医学中心机构审查委员会(University Hospitals Case Medical Center Institutional Review Board)的批准规程,对后续的线路指定不知情。没有研究调查人员访问患者标识符。

[0094] 细胞来源和品系。精神分裂症来源的iPSC品系从患有儿童期发作型精神分裂症的患者产生,并且对照品系从年龄和性别适当的对照受试者产生;所有iPSC品系均如先前所报告地得到(Windrem等人,"Human iPSC Glial Mouse Chimeras Reveal Glial Contributions to Schizophrenia,"Cell Stem Cell 21:195-208.e6(2017),其以引用的方式整体并入本文)。另一种对照品系(C27;Wang等人,"Human iPSC-derived Oligodendrocyte Progenitor Cells Can Myelinate and Rescue a Mouse Model of Congenital Hypomyelination,"Cell Stem Cell 12:252-264(2013),其以引用的方式整体并入本文)由Lorenz Studer博士(Memorial Sloan-Kettering)热情地提供。对照来源的品系包括:CWRU-22(26岁男性)、CWRU-37(32岁女性)、CWRU-208(25岁男性)和C27;SCZ来源的品系包括CWRU-8(10岁女性)、CWRU-51(16岁男性)、CWRU-52(16岁男性)、CWRU-193(15岁女性)、CWRU-164(14岁女性)、CWRU-29(12岁男性)、CWRU-30(12岁男性)和CWRU-31(12岁男性)(Windrem等人,"Human iPSC Glial Mouse Chimeras Reveal Glial Contributions to Schizophrenia,"Cell Stem Cell 21:195-208.e6(2017),其以引用的方式整体并入本文;参见表1)。CWRU-51/52和CWRU-29/30/31包括来自同一患者的不同品系,并经过评定以估计来自单个患者的品系间变异性。通过逆转录病毒表达Cre-可切割的山中因子(Yamanaka factor)(Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc)由成纤维细胞产生所有iPSC(Takahashi等人,"Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors,"Cell 131:861-872(2007),其以引用的方式整体并入本文),并如所述验证多能性和核型稳定性(Windrem等人,"Human iPSC Glial Mouse Chimeras Reveal Glial Contributions to Schizophrenia,"Cell Stem Cell 21:195-208.e6(2017),其以引用的方式整体并入本文)。

[0095] 表1.用于本研究的患者来源的iPSC品系

[0096]

受试者编号	hiPSC品系	年龄	性别	GPC的RNA-Seq	星形胶质细胞分化	钾摄取	核型	aCGH
	对照受试者							
CTR 1	22	26	M	√	√	√	√	√
CTR 2	37	32	F	√	√	√	√	√
CTR 3	208/205	25	M	√	√	√	√	√
CTR 4	C27	NA	NA	√	√	√	√	√
	精神分裂症受试者							
SCZ 1	51/52	16	M	√	√	√	√	√
SCZ 2	29, 30, 31	12	M	√	√	√	√	√
SCZ 3	193	15	F		√	√	√	√
SCZ 4	164	14	F	√	√	√	√	√
SCZ 5	8	10	F	√			√	√

[0097] 本研究中使用的品系先前已描述并公布在Windrem等人,"Human iPSC Glial

Mouse Chimeras Reveal Glial Contributions to Schizophrenia,"Cell Stem Cell 21:195-208.e6(2017)中,所述文献以引用的方式整体并入本文。在本研究中添加的其他操作(星形胶质细胞分化和所得的分化的星形胶质细胞对K^+的摄取的评定)在中间列中标出,而核型正常和可用CGH阵列数据在两个最右侧列中标出。所有这些品系均具有正常的核型。CGH阵列显示若干品系具有零星的indel,但是没有品系先前已与精神分裂症或孤独症谱系病症相关。

[0098] hiPSC培养和传代。将hiPSC在补充有10ng/ml bFGF(Invitrogen,13256-029)的hESC培养基(参见下文)中在具有100-120万个细胞/孔的0.1%明胶(Sigma G1890-100G)涂覆的6-孔板中在辐照过的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)上培养。每天进行培养基更换,并且在培养4-7天后,细胞以80%汇合传代。对于hiPSC传代,首先将细胞与1ml胶原酶(Invitrogen,17104-019)在37℃下孵育3-5分钟,并且然后将细胞转移到15ml试管中离心3分钟。将沉淀用含bFGF的ES培养基重新悬浮,并以1:3-1:4铺板到新的辐射过的MEF上。

[0099] 从hiPSC产生GPC和星形胶质细胞。当hiPSC达到80%汇合时,将它们与1ml分散酶(Invitrogen,17105-041)一起孵育,以产生胚状体(Eb);将它们在不含bFGF的ES培养基中培养5天。在DIV6时,将Eb铺板到聚鸟氨酸(Sigma,P4957)和层粘连蛋白(VWR,47743)涂覆的培养皿上,并在补充有20ng/ml bFGF、2μg/ml肝素和10μg/ml层粘连蛋白的神经诱导培养基(NIM;参见下文)中培养10天(Wang等人,"Human iPSC-derived Oligodendrocyte Progenitor Cells Can Myleinate and Rescue a Mouse Model of Congenital Hypomyelination,"Cell Stem Cell 12:252-264(2013),其以引用的方式整体并入本文)。

[0100] 在DIV 25时,用2ml玻璃移液管轻轻刮擦Eb,然后在NIM加1μM紫吗啡胺(Calbiochem,80603-730)和0.1μM RA(Sigma,R2625)中培养。在DIV33时,出现NPC,并连续转换到具有1μM紫吗啡胺和10ng/ml bFGF的NIM持续7天,然后再转换到具有1μM紫吗啡胺的神经胶质诱导培养基(GIM)(Wang等人,"Human iPSC-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells Can Myelinate and Rescue a Mouse Model of Congenital Hypomyelination,"Cell Stem Cell 12:252-264(2013),其以引用的方式整体并入本文)持续15天。在DIV 56时,在解剖显微镜下用显微外科刀片机械切割所得的神经胶质球,并转换到具有10ng/ml PDGF、10ng/ml IGF和10ng/ml NT3的GIM,每2天更换培养基。在DIV 80-100时,将CTR GPC与10ng/ml BMP4(PeproTech,AF-120-05ET)和0.5μM DMH1(Sigma,D8946-5MG)一起培养2周,并且将SCZ GPC用慢病毒-SMAD4-shRNAi转导2周,二者均用于验证K^+转运基因表达。在DIV 150-180时,将GPC与小鼠抗CD44微珠(1:50)一起孵育,并且然后与兔抗小鼠IgG2a+b微珠(1:100)一起孵育,并通过磁性细胞分选(MACS)用磁性立柱进一步分选。然后使$CD44^+$细胞在补充有10%FBS(VWR,16777-014)和20ng/mL BMP4的M41中持续4周成熟为星形胶质细胞。

[0101] 培养基配方列出于表2(hESC培养基和神经培养基)和表3(神经胶质细胞培养基和星形胶质细胞诱导培养基)中。

[0102] 表2.培养基配方基础培养基、hESC培养基和神经培养基

[0103]

hES 培养基			
组分	**浓缩**	**供应商**	**目录**
Dulbecco's Modified Eagle 培养基/营养混合物 F-12	1X	Invitrogen	11330-032
KnockOut 血清替代物	20%	Invitrogen	10828-028
L-谷氨酰胺	1 mM	Invitrogen	25030-081
2-巯基乙醇	0.1 mM	Sigma	M7522
非必需氨基酸	1X	Invitrogen	11140-050
神经诱导培养基			
组分	**浓缩**	**供应商**	**目录**
Dulbecco's Modified Eagle 培养基/营养混合物 F-12	1X	Invitrogen	11330-032
非必需氨基酸	1X	Invitrogen	11140-050
N2 补充物	1X	Invitrogen	17502-048
重组人 FGF-2 蛋白	20 ng/ml	Sigma	F0291
肝素溶液	2 μg/ml	Fisher Scientific	NC0668440
层粘连蛋白	10 μg/ml	Fisher Scientific	CB-40232

[0104] 表3.培养基配方神经胶质细胞培养基和星形胶质细胞诱导培养基

[0105]

神经胶质细胞诱导培养基			
组分	浓缩	供应商	目录
Dulbecco's Modified Eagle 培养基/营养混合物 F-12	1X	Invitrogen	11330-032
B27 补充物	1X	Invitrogen	12587-010
N1 补充物	1X	Sigma	N6530
非必需氨基酸	1X	Invitrogen	11140-050
三碘-L-甲状腺原氨酸(T3)	60 ng/ml	Sigma	T5516-1mg
N6,2-O-二丁酰基环状 3',5'-环状单磷酸钠盐	1 μM	Sigma	D0260
生物素（Biotin）	100 ng/ml	Sigma	B4639
重组人 PDGF-AA 蛋白	10 ng/ml	R&D	221-AA-50
重组人 IGF-1 蛋白	10 ng/ml	R&D	291-G1-050
重组人 NT3 蛋白	10 ng/ml	R&D	267-N3-025
抗生素-抗真菌药	0.5X	Invitrogen	15240-096
星形胶质细胞诱导培养基			
组分	浓缩	供应商	目录
Dulbecco's Modified Eagle 培养基/营养混合物 F-12	1X	Invitrogen	11330-032
N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙烷磺酸	1X	Invitrogen	15630-080
N1 补充物	1X	Sigma	N6530
非必需氨基酸	1X	Invitrogen	11140-050
D-葡萄糖	46.4 mM	Sigma	G8769
丙酮酸钠	1.5 mM	Invitrogen	11360-070
L-谷氨酰胺	6.35 mM	Invitrogen	25030-081
青霉素-链霉素	40 U/ml	Invitrogen	15140-122
亚硒酸盐	0.065 μg/ml	Sigma	S9133
黄体酮	0.057 μg/ml	Sigma	P6149

[0106] FACS/MACS分选。将细胞与Accutase(Fisher Scientific,SCR005)在37℃下孵育5分钟,以获得单细胞悬液,并且然后在200RCF下离心10分钟。将这些GPC重悬浮在具有一级抗体(对于FACS为藻红蛋白(PE)缀合的小鼠抗CD140a,1:50;对于MACS为小鼠抗CD140a,1:100)的冷的Miltenyi洗涤缓冲液中,并在冰上孵育30分钟,每10分钟轻轻旋转。在一级抗体孵育后,然后将这些细胞洗涤,并与二级抗体(兔抗小鼠IgG2a+b微珠,1:100)一起孵育,然后在磁性立柱上进行MACS来分选,或在FACSAria IIIu(Becton-Dickinson)上直接通过FACS分选。对分选的细胞进行计数,并铺板在聚鸟氨酸和层粘连蛋白涂覆的24孔板上,以进行进一步实验。抗体和稀释液列出于表4中。

[0107] 表4.用于FACS/MACS分选的抗体

[0108]

试剂或资源	来源	标识符
抗体		
兔多克隆抗 Nanog，1:200	Millipore	目录号 AB9220; RRID: AB_570613
小鼠单克隆抗人 TRA1-60，1:200	Millipore	目录号 MAB4360; RRID: AB_2119183
兔多克隆抗 PAX6，1:400	Covance Research Products Inc	目录号 PRB-278p; RRID: AB_291612
兔单克隆抗 PDGF 受体 α，克隆 D13C6，1:300	Cell Signaling Technology	目录号 5241S; RRID: AB_10692773
小鼠单克隆抗人 GFAP，克隆 SMI 21R，1:500	Covance Research Products	目录号 SMI-21R-500; RRID: AB_509979
小鼠单克隆抗 S100β，克隆 SH-B1，1:500	Abcam	目录号 ab11178; RRID: AB_297817
山羊多克隆抗人 SOX1，1:200	R&D Systems	目录号 AF3369; RRID: AB_2239897
驴抗小鼠 IgG (H+L) Alexa Fluor 594，1:400	ThermoFisher Scientific	目录号 A-21203; RRID: AB_2535789
驴抗小鼠 IgG (H+L) Alexa Fluor 488，1:400	ThermoFisher Scientific	目录号 A-21202; RRID: AB_141607
驴抗兔 IgG (H+L) Alexa Fluor 594，1:400	ThermoFisher Scientific	目录号 A-21207; RRID: AB_141637
驴抗兔 IgG (H+L) Alexa Fluor 488，1:400	ThermoFisher Scientific	目录号 A-21206; RRID: AB_2535792
驴抗山羊 IgG (H+L) Alexa Fluor 594，1:400	ThermoFisher Scientific	目录号 A-11058; RRID: AB_2534105
小鼠单克隆抗 SSEA4 FITC 缀合物，1:100	Life Technologies	目录号 MC-813-70;
APC 缀合的小鼠 IgG1，同种型对照，1:10	Miltenyi Biotec	目录号 130-092-214
APC-小鼠 IgM，同种型对照，1:40	Miltenyi Biotec	目录号 130-093-176
大鼠抗小鼠 IgG2a+b，微珠，1:100	Miltenyi Biotec	目录号 130-095-194
小鼠抗 CD44 微珠，1:100	Miltenyi Biotec	目录号 130-095-194
APC 缀合的抗 CD133/1，1:10	Miltenyi Biotec	目录号 130-090-826
小鼠单克隆抗 CD140a 未缀合，1:100	BD Biosciences	目录号 556001; RRID: AB_396285

[0109]

PE 缀合的抗 CD140a，1:10	BD Biosciences	目录号 556002
APC 缀合的抗 CD44，1:10	Miltenyi Biotec	目录号 130-095-177; RRID: AB_10839563
PE-缀合的抗小鼠 IgG2a，同种型对照，1:10	BD Pharmingen	目录号 555574
化学品、肽和重组蛋白		
Dulbecco's Modified Eagle 培养基	Invitrogen	目录号 11965-092
胎牛血清	Invitrogen	目录号 16000-044
非必需氨基酸	Invitrogen	目录号 11140-050
Dulbecco's Modified Eagle 培养基/营养混合物 F-12	Invitrogen	目录号 11330-032
KnockOut 血清替代物	Invitrogen	目录号 10828-028
FBS	VWR	目录号 16777-014
驴血清	Millipore	目录号 5058837
山羊血清	Invitrogen	目录号 16210-072
DPBS	Invitrogen	目录号 14190-250
硫柳汞	Sigma	T5125
L-谷氨酰胺	Invitrogen	目录号 25030-081
明胶	Sigma	目录号 G1890-100G
2-巯基乙醇	Sigma	目录号 M7522
皂苷	Fluka Analytical	目录号 47036
B27 补充物	Invitrogen	目录号 12587-010
N1 补充物	Sigma	目录号 N6530
亚硒酸盐	Sigma	目录号 S9133
黄体酮	Sigma	目录号 P6149
锕-86	PerkinElmer	目录号 NEZ072001MC
哇巴因	Sigma	目录号 O3125
布美他尼	R&D Systems	目录号 3108
托肽品	R&D Systems	目录号 1316
NaOH	Fisher Scientific	目录号 MSX0607H6
NaCl	Invitrogen	目录号 AM9760G
KCl	Invitrogen	目录号 AM9640G
$CaCl_2$	Sigma	目录号 21108-500g
维生素 C	Sigma	目录号 A4034-100G
$NaHCO_3$	Sigma	目录号 S-8875
$MgCl_2$	Sigma	目录号 M8266-IKG
NaH_2PO_4	Sigma	目录号 S3264-500G
葡萄糖	Sigma	目录号 G8769-100ML
混合液	Fisher Scientific	目录号 509050575

[0110]

N2 补充物	Invitrogen	目录号 17502-048
bFGF	Sigma	目录号 F0291
bFGF	Invitrogen	目录号 13256-029
胶原酶（Collagenase）	Invitrogen	目录号 17104-019
分散酶	Invitrogen	目录号 17105-041
聚鸟氨酸	Sigma	目录号 P4957
层粘连蛋白	VWR	目录号 47743
生物素（Biotin）	Sigma	目录号 B4639
二丁酰基 cAMP	Sigma	目录号 D0260
肝素	Fisher	目录号 NC9484621
IGF-1	R&D Systems	目录号 291-G1-050
层粘连蛋白	Corning	目录号 354232
NT3	R&D Systems	目录号 267-N3-025
PDGFaa	R&D Systems	目录号 221-AA-50
BMP4	PeproTech	目录号 AF-120-05ET
Accutase	Fisher Scientific	目录号 SCR005
2,6,9-三元取代嘌呤	Calbiochem	目录号 80603-730
视黄酸	Sigma	目录号 R2625
DMH1	Sigma	目录号 D8946-5MG
T3	Sigma	目录号 T5516-1MG
4%多聚甲醛	Fisher Scientific	目录号 NC9245948
X-tremeGENE	Roche	目录号 06366236001
强力霉素（Doxycycline）	Fisher Scientific	目录号 ICN19895510
关键性商业测定		
RNeasy 微型试剂盒	QIAGEN	目录号 74104
QIAamp DNA 微型试剂盒	QIAGEN	目录号 56304
Taqman 逆转录试剂盒	Fisher Scientific	目录号 N8080234
BCA 蛋白质测定试剂盒	Fisher Scientific	目录号 23227
Perkin Elmer LLC ULTIMA-GOLD LITERS	Fisher Scientific	目录号 509050575
存储数据		
所有原始数据	Mendeley 数据	doi:10.17632/wvnxgw7xzf.1
RNA 表达数据	GEO	登录号 GSE86906
数据处理和分析路径	Github	https://github.com/cbtncph/GoldmanetalSCZ2016
实验模型：细胞系		
C27	L. Studer, SKI	N/A
CWRU8，女性，年龄 10	P. Tesar, Case Western	N/A
CWRU208，男性，年龄 25	P. Tesar, Case Western	N/A

[0111]

CWRU22，男性，年龄 26	P. Tesar, Case Western	N/A
CWRU29，男性，年龄 12 (与品系 30 和 31 相同的人)	P. Tesar, Case Western	N/A
CWRU30，男性，年龄 12 (与品系 29 和 31 相同的人)	P. Tesar, Case Western	N/A
CWRU31，男性，年龄 12 (与品系 29 和 30 相同的人)	P. Tesar, Case Western	N/A
CWRU37，女性，年龄 32	P. Tesar, Case Western	N/A
CWRU51，男性，年龄 16 (与品系 52 相同的人)	P. Tesar, Case Western	N/A
CWRU52，男性，年龄 16 (与品系 51 相同的人)	P. Tesar, Case Western	N/A
CWRU164，女性，年龄 14	P. Tesar, Case Western	N/A
CWRU193，女性，年龄 15	P. Tesar, Case Western	N/A
293T	Fisher Scientific	目录号 R70007
寡核苷酸		
ShRNA 靶向序列: SMAD4 #1: TGGTCAGCCAGCTACTTAC (SEQ ID NO:4); #2: ATGAATATGACTCACTTCT (SEQ ID NO:7)	GE Healthcare	目录号 V3SH11252
shScramble: AAGTTGCAAATCGCGTCTCTA (SEQ ID NO: 5)	此论文	N/A
重组 DNA		
SMAD4 的人 cDNA	GE Healthcare	目录号 MHS6278
质粒: pTANK-EF1a-coGFP-P2a-Puro- WPRE	此论文	N/A
质粒: pTANK-EF1a-IRES-mCherry-WPRE	Benraiss 等人, 2016	N/A
细菌和病毒株		
TOP10 化学感受态大肠杆菌	Invitrogen	目录号 K4600-01
软件和算法		
Photoshop CS6	Adobe	N/A
Illustrator CS6	Adobe	N/A
FlowJo	TreeStar	N/A
Ingenuity Pathway Analysis	QIAGEN	https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuity-pathway-analysis/
TRANSFAC	Genexplain	https:/www.genexplain.com/transfac/

minfi (版本 1.28.2)	(Aryee 等人, "Minfi: a Flexible and Comprehensive Bioconductor Package for the Analysis of Infinium DNA Methylation Microarrays," *Bioinformatics* 30:1363-1369 (2014), 其以引用的方式整体并入本文	https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/minfi.html

[0112]

其他		
Agilent Bioanalyzer	Agilent	N/A
BD FACS Aria IIIU	BD Biosciences	N/A
Ultracentrifuge	Beckman	目录号 L8-70
Becksman Coulter	Beckman	目录号 LS6500
Hemocytometer	Fisher Scientific	目录号 02-671-54
HiSeq 2500	Illumina	N/A
Nanodrop 1000 分光光度计	Nanodrop	N/A
Olympus IX71 倒置显微镜	Olympus	N/A
QuantStudio 12K Flex 实时 PCR 系统	Applied Biosystems	N/A
Orca-R2 数字 CCD 照相机	Hamamatsu	目录号 C10600-10B

[0113] RT-PCR。用miRNeasy微型试剂盒(Qiagen,217004)从细胞系中提取总RNA,并且然后用Taqman逆转录试剂盒(Fisher Scientific,N8080234)逆转录成cDNA。通过Bio-RAD S6048测量mRNA的相对表达,将其进一步归一化为18S mRNA的表达。

[0114] 引物序列列出于表5中。

[0115] 表5.RT-PCR引物

[0116]

靶标	正向引物	反向引物	登录号
18S	CTGGATACCGCAGCTAGGAA (SEQ ID NO:9)	CCCTCTTAATCATGGCCTCA (SEQ ID NO:10)	NT_167214
GFAP	TGCGGCCGATTGTGAAC (SEQ ID NO:11)	CCTCTTTTCTCTGCGGAACGT (SEQ ID NO:12)	NM_001193376.1
BMPR2	CTACCATGGACCATCCTGCT (SEQ ID NO:13)	CCTATCCCAAGGTCTTGCTG (SEQ ID NO:14)	NM_001204.6
RUNX2	GTGGACGAGGCAAGAGTTTC (SEQ ID NO:15)	TTCCCGAGGTCCATCTACTG (SEQ ID NO:16)	NM_001015051.3

[0117]

BMP1	TCAGGAACCTCACCTTGGAC (SEQ ID NO:17)	GCACAGTGGGGAGAAGAGAG (SEQ ID NO:18)	NM_001199.3
SERPINE1	GATTGATGACAAGGGCATGG (SEQ ID NO:19)	CCCATAGGGTGAGAAAACCA (SEQ ID NO:20)	NM_000602.4
BAMBI	ATCGCCACTCCAGCTACATC (SEQ ID NO:21)	GGCAGCATCACAGTAGCATC (SEQ ID NO:22)	NM_012342.2
SMAD4	CCATTTCCAATCATCCTGCT (SEQ ID NO:23)	ACCTTTGCCTATGTGCAACC (SEQ ID NO:24)	NM_005359
FST	GGAGGACGTGAATGACAACA (SEQ ID NO:25)	CACGTTCTCACACGTTTCTTTAC (SEQ ID NO:26)	BC004107.2
GREM1	GGCCAGTGCAACTCTTTCTA (SEQ ID NO:27)	CTGTAGTTCAGGGCAGTTGAG (SEQ ID NO:28)	AF110137.2
KCNJ9	GTTATCCTCGAGGGCATGGT (SEQ ID NO:29)	CGTCCTCCAGAGTCAGCACT (SEQ ID NO:30)	NM_004983.2
SLC12A6	AACTGTTAGACGACGGACATAG (SEQ ID NO:31)	CTTCGGTCTGGTGTCCATTT (SEQ ID NO:32)	NM_001042497.1
ATP1A2	TGAACCATCCAACGACAATCTA (SEQ ID NO:33)	CTTGCTGAGGTACCATGTTCT (SEQ ID NO:34)	NM_000702.3

[0118] 体外免疫细胞化学。首先在室温下将细胞用4％多聚甲醛固定5分钟。用含有硫柳汞(Sigma,T5125)的D-PBS(Invitrogen,14190-250)洗涤3次后,在室温下用0.1％皂苷(Fluka Analytical,47036)加1％山羊或驴血清渗透细胞15分钟。在室温下将细胞用5％山羊或驴血清加0.05％皂苷进一步封闭15分钟。在4℃下与一级抗体一起孵育过夜后,在室温下将细胞与二级抗体一起孵育30分钟。免疫荧光细胞的计数从每个重复10个随机场获得,并且每个样品具有三个重复。所用抗体和稀释液参见表4。

[0119] 甲基化。使用QIAamp DNA微型试剂盒(Qiagen,56304)从iPSC品系提取DNA,并且然后使用Illumina Methylation Epic阵列进行全基因组甲基化分析;在UCLA Neuroscience Genomics Core处进行此分析。来自强度数据的原始数据(IDAT)文件输入到R中并使用来自minfi包的preprocessQuantile函数归一化(Aryee等人,“Minfi:aFlexible and Comprehensive Bioconductor Package for the Analysis of Infinium DNA Methylation Microarrays,”Bioinformatics 30:136301369(2014),其以引用的方式整体并入本文)。基于设定的检测p值阈值(>0.01)来排除质量信号较差的探针。如果探针映射到性染色体的多个基因组位置或者如果探针含有在CpG位点处的单个核苷酸多态性,则也排除所述探针。在预处理后,通过主成分分析基于甲基化强度的特征(M值)来评定样品。为了确定协变量(性别、年龄、细胞系等)是否可以解释样品的甲基化情形的变化,将线性回归模型对于协变量和每个主成分进行拟合。突出显示了具有显著p值(<0.05)的协变量,这表明

在协变量的改变(预测变量)与主成分值的改变(反应变量)之间有意义的关系。

[0120] 分子克隆和病毒构建。在pTANK-EF1a-IRES-mCherry-WPRE中的EF1α启动子下游克隆编码SMAD4的人cDNA(GE Healthcare,MHS6278)(Benraiss等人,"Human Glia Can Both Induce and Rescue Aspects of Disease Phenotype in Huntington Disease,"Nature Communications 7:11758(2016),其以引用的方式整体并入本文)。慢病毒载体允许SMAD4与报告基因mCherry串联表达。SMAD4 pSMART-TRE3G-EGFP-Puro-WPRE中人SMAD4的强力霉素可诱导的shRNA(基因靶序列:TGGTCAGCCAGCTACTTAC(SEQ ID NO:4)或ATGAATATGACTCACTTCT(SEQ ID NO:7))订购自GE Healthcare(V3SH11252)。BAMBI先前产生BAMBI的人shRNA和cDNA(Sim等人,"Complementary Patterns of Gene Expression by Human Oligodendrocyte Progenitors and Their Environment Predict Determinants of Progenitor Maintenance and Differentiation,"Ann.Neurol.59:763-779(2006),其以引用的方式整体并入本文)。通过测序来验证最终构建体中的正确插入。然后通过X-tremeGENE(Roche,06366236001)将质粒与pLP-VSV(Invitrogen,K497500)和psPAX2(Didier Trono赠品,Addgene 12260)共转染到293FT细胞(Fisher Scientific,R70007)中以进行慢病毒生成。然后收集293T细胞的上清液并以76000RCF离心3小时以浓缩病毒(Beckman,L8-70,Ultracentrifuge)。然后制备病毒的10倍连续稀释液,并将其转导到293T细胞中,并计数荧光菌落以估算病毒滴定度。

[0121] 细胞转导。通过MACS分离CD140a^{+}hGPC并且然后用慢病毒-TRE3G-SMAD4-shRNAi或慢病毒-EF1α-BAMBI-shRNAi或其相应乱序对照病毒转导。慢病毒-EF1a-BAMBI-shRNAi有效抑制靶基因的表达(图4B)。在病毒感染后开始4天用0.5μg/ml doxycycline(Fisher,CN19895510)强力霉素处理用慢病毒-TRE3G-SMAD4-shRNAi感染的细胞;将此处理保持1周,之后开始实验;在此时间段期间,将细胞保持在神经胶质细胞诱导培养基中。在强力霉素下,SMAD4 mRNA表达下降至对照的<30%;在强力霉素不存在下未标出抑制(图7A-7C)。

[0122] 钾摄取。将星形胶质细胞以30,000个细胞/孔铺板在聚鸟氨酸和层粘连蛋白涂覆的24孔板上。对于钾摄取测定,将星形胶质细胞与^{86}Rb(1.0-3.3μCi/孔)一起孵育15分钟,并且然后将其用冰冷的人工脑脊液(aCSF,500μL/孔)洗涤三次。将0.5N NaOH(200μL/孔)装入每个孔中以进行细胞裂解,将所述孔装入5ml混合液(Ultima Gold,Fisher Scientific,509050575)中,并通过闪烁计数器(Beckman Coulter,LS6500)进行测量,并将结果归一化至总蛋白(BCA蛋白测定试剂盒,Fisher Scientific,23227)和细胞数(血细胞计数器,Fisher Scientific,02-671-54)。aCSF溶液含有(以mM计):124NaCl、2.5KCl、1.75NaH_2PO_4、2$MgCl_2$、2$CaCl_2$、0.04维生素C、10葡萄糖和26$NaHCO_3$,pH 7.4。

[0123] 定量和统计学分析。在附图和图例中报告了统计学参数,包括精确n、中心、分散性、精确量度(平均值±SEM)和统计学显著性。所有分析都使用GraphPad PRISM 6使用单向ANOVA和双尾t检验来进行。统计学显著性被认为是小于0.05的P-值。显著性表示为*p<0.05、**p<0.01和***p<0.001。曲线图和附图使用Prism 6绘制和组装。

[0124] 实施例1-SCZ GPC中星形胶质细胞分化受损

[0125] iPSC由从患有儿童期发作型精神分裂症的患者以及没有已知精神疾病的健康年轻成人对照获得的皮肤样品产生,如先前所述(Windrem等人,"Human iPSC Glial Mouse Chimeras Reveal Glial Contributions to Schizophrenia,"Cell Stem Cell 21:195-

208.e6(2017),其以引用的方式整体并入本文)。尽管年龄、性别、种族、诊断和用药史伴随着细胞系标识符,但除主治精神病医生外,研究人员无法获得患者标识符。简言之,从每个样品中分离出成纤维细胞;由这些细胞,从患者样品和正常对照(5位青少年发作型精神分裂症患者和3位健康的性别匹配和年龄相似的对照)(表1)得到8个hiPSC品系。使用编码Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc(Takahashi等人,"Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors,"Cell 131:861-872(2007);Welstead等人,"Generating iPS Cells from MEFS Through Forced Expression of Sox-2,Oct-4,c-Myc,and Klf4,"J.Vis.Exp.14:734(2008),其以引用的方式整体并入本文)的可切除的被loxP位点标记的多顺反子hSTEMCCA慢病毒(Somers等人,"Generation of Transgene-free Lung Disease-specific Human Induced Pluripotent Stem Cells Using a Single Excisable Lentiviral Stem Cell Cassette,"Stem Cells 28:1728-1740(2010);Zou等人,"Establishment of Transgene-free Induced Pluripotent Stem Cells Reprogrammed from Human Stem Cells of Apical Papilla for Neural Differentiation,"Stem Cell Res Ther 3:43(2012),其以引用的方式整体并入本文)产生iPSC。还使用第四hiPSC对照品系C27(Chambers等人,"Highly Efficient Neural Conversion of Human ES and iPS Cells by Dual Inhibition of SMAD Signaling,"Nature Biotechnol.27:275-280(2009),其以引用的方式整体并入本文),以确保所有基因组和表型数据与先前的工作(Wang等人,"Human iPSC-derived Oligodendrocyte Progenitor Cells Can Myleinate and Rescue a Mouse Model of Congenital Hypomyelination,"Cell Stem Cell 12:252-264(2013),其以引用的方式整体并入本文)一致。使用RNA测序和免疫标记评定多能基因表达来证实所有品系是多能的。使用基于短串联重复序列(STR)的DNA指纹图谱,确认每个iPSC品系的身份与亲本供体成纤维细胞相匹配,并对每个品系进行核型分析并对比较性基因组杂交进行测定以确认基因组完整性。另外,对这些iPSC品系的全基因组甲基化进行排列以比较其甲基化状态。

[0126] 首先通过如前所述指导这些iPSC细胞朝向GPC命运(Wang等人,"Human iPSC-derived Oligodendrocyte Progenitor Cells Can Myleinate and Rescue a Mouse Model of Congenital Hypomyelination,"Cell Stem Cell 12:252-264(2013),其以引用的方式整体并入本文)并评定成熟的阶段特异性标记物随着时间的表达来比较从SCZ患者和对照受试者(n=4个品系,来自4个不同患者,每个具有≥3个重复/患者,每个品系对比配对的对照)得到的细胞的神经胶质分化效率。通过流式细胞术,发现所有测试的iPSC均表现出典型的集落并表达多能性标记物,包括SSEA4(图1A)。在神经祖细胞(NPC)阶段,ICC和流式细胞术都揭示阶段选择性标记物、成对盒蛋白pax-6(PAX6)、性别决定区Y-box1(SOX1)和细胞表面标记物prominin-1/CD133的表达水平在CTR和SCZ来源品系之间没有差异(图2A-2D;图1B)。在GPC阶段,然后评定了GPC选择性血小板衍生生长因子受体α(PDGFRα/CD140a)的表达(Sim等人,"CD140a Identifies a Population of Highly Myelinogenic,Migration-Competent and Efficiently Engrafting Human Oligodendrocyte Progenitor Cells,"Nature Biotechnol.29:934-941(2011),其以引用的方式整体并入本文),其揭示了GPC产生效率在SCZ和CTR来源的NPC之间没有显著差异(图2E-2G;图1C)。在星形胶质细胞祖细胞阶段,流式细胞术确认,细胞表面标记物CD44的表达水平在CTR和SCZ来

源的品系之间没有差异(图1D)。因此,贯穿GPC阶段和星形胶质细胞祖细胞阶段,未发现SCZ和CTR iPSC分化的差异。

[0127] 此时,SCZ和CTR来源的GPC通过在补充有20ng/ml BMP4的M41培养基中孵育4周来进一步分化为星形胶质细胞。免疫标记揭示,对照品系(4个CTR品系,n≥3/品系,4个CTR品系的平均值=70.1±2.4%)中$GFAP^+$星形胶质细胞的比例显著高于SCZ品系(4个SCZ品系,n≥3/品系,4个SCZ品系的平均值=39.9±2.0%;通过双尾t检验,P<0.001)(图2H-2J)。除了GFAP以外,$S100\beta^+$星形胶质细胞的百分比在CTR品系中相对于SCZ品系显著更高(图1F)。相比之下,$PDGF\alpha R^+$GPC的比例在BMP4处理的SCZ神经胶质细胞(4个SCZ品系,n≥3/品系)中相对于BMP4处理的CTR神经胶质细胞(4个CTR品系,n≥3/品系)显著更高(图1E)。相对于CTR细胞,在所有SCZ GPC中都始终观察到这种星形胶质细胞分化的缺陷,并且此缺陷与先前描述的体内星形胶质细胞分化缺陷具有体外相关性(Windrem等人,"Human iPSC Glial Mouse Chimeras Reveal Glial Contributions to Schizophrenia,"Cell Stem Cell 21:195-208.e6(2017),其以引用的方式整体并入本文)。

[0128] 实施例2-SCZ GPC上调BMP信号传导抑制剂BAMBI的表达

[0129] 为了鉴定SCZ GPC的缺陷性星形胶质细胞分化的分子伴随物,早期在体外154至242天的时间点对来自3个不同的CTR-来源品系和4个SCZ-来源品系的FACS分选的$CD140a^+$ GPC进行RNA-seq(Windrem等人,"Human iPSC Glial Mouse Chimeras Reveal Glial Contributions to Schizophrenia,"Cell Stem Cell 21:195-208.e6(2017),其以引用的方式整体并入本文)。使用polyA-选择从这些细胞中分离出mRNA,用于在Illumina HiSeq 2500平台上进行RNA测序,每个样品有约4500万个1x100 bp读数。分析原始计数以在5%FDR和log2倍数变化>1下确定疾病-失调基因。通过这种方法,已鉴定出CD140a分选的SCZ hGPC相对于其对照iPSC hGPC一致且显著差异地表达的118个mRNA(Windrem等人,"Human iPSC Glial Mouse Chimeras Reveal Glial Contributions to Schizophrenia,"Cell Stem Cell 21:195-208.e6(2017),其以引用的方式整体并入本文)。在这些中,相对于它们的正常对照,SCZ hGPC中涉及神经胶质谱系进展的许多基因被下调,这表明由于SCZ来源的神经胶质祖细胞的固有缺陷,SCZ中星形胶质细胞分化以细胞自主方式受到损害。

[0130] 利用这些早期数据,在此研究中,首先使用Ingenuity Pathway Analysis(IPA)鉴定在SCZ hGPC中显著不同地调节的途径。已发现在这些中,BMP信号传导相关转录物在SCZ hGPC中与CTR hGPC相比上调(图3A)。然后,qPCR验证了,许多TGFβ途径调节剂(包括BAMBI)的表达确实在SCZ GPC中显著升高(图3B)。相比之下,这些BMP信号传导相关转录物在SCZ和CTR品系之间在NPC阶段中不同(图3C)。CTR来源和SCZ来源的iPSC的甲基化状态类似(图3D);在iPSC甲基化状态下在各品系之间标出的较少可变性似乎是由于性别和品系,而非疾病状态或受试者年龄(图3E)。因此,在SCZ hGPC中标出的BAMBI和其他TGFβ和BMP途径调节剂的上调不是由于在多能干细胞阶段在CTR和SCZ细胞之间的甲基化模式的任何全身性疾病依赖性差异。

[0131] BMP4是由人GPC进行星形胶质细胞分化的强烈刺激物,并且BAMBI是BMP4诱导的星形胶质细胞诱导的强烈拮抗剂,从而用作假受体并且因此用作BMP信号传导的显性抑制抑制剂(Sim等人,"Complementary Patterns of Gene Expression by Human Oligodendrocyte Progenitors and Their Environment Predict Determinants of

Progenitor Maintenance and Differentiation,"Ann Neurol 59:763-779(2006),其以引用的方式整体并入本文)。BAMBI表达也通过TGFβ和BMP受体依赖性信号传导作为补偿性负反馈反应来活化(Onichtchouk等人,"Silencing of TGF-beta Signaling by the Pseudoreceptor BAMBI,"Nature 40:480-485(1999),其以引用的方式整体并入本文)。因此,RNA-seq qPCR数据揭示,BMP信号传导依赖性转录物和BAMBI二者均在SCZ hGPC中上调,而在SCZ hNPC中未上调(图3B-3C)。这些数据表明,BMP信号传导的上调对SCZ神经胶质细胞具有特异性并且首先出现在神经胶质祖细胞阶段,并且此过程与BAMBI的表达上调相关,这进而抑制SCZ hGPC的星形胶质细胞分化。

[0132] 基于此,通过抑制这些hGPC的分化来确定正常对照受试者来源的hGPC中BAMBI过表达可模拟或再生SCZ GPC表型。为此,在hGPC即SCZ和CTR来源的GPC二者中遗传调节BAMBI的表达(图4A-4B)。已发现在CTR GPC中BAMBI的过表达显著降低星形胶质细胞转变的效率(4个CTR品系,其中3个重复/每个品系,4个CTR品系的平均值/36.4%±4.3%),从而产生在其对最终星形胶质细胞成熟的不应性方面类似于SCZ hGPC的细胞(4个SCZ品系,其中3个重复/每个品系,4个SCZ品系的平均值/45.5%±3.6%;通过双尾t检验,p=0.12)(图5A-5B)。然而,SCZ GPC中的BAMBI敲低不会拯救所述细胞中的星形胶质细胞分化,这表明BAMBI过表达造成SCZ hGPC对成熟的抗性,但就这一点而言并不足够(图5A-5B)。因此,当使用qPCR评定BMP信号传导的替代性抑制剂的表达时,发现编码BMP和BMP依赖性信号传导的两种强效拮抗剂卵泡抑素(FST)和gremlin1(GREM1)的mRNA均由SCZ GPC显著上调(SCZ对比CTR;4个SCZ和4个CTR品系,3个重复/每个品系;FST的ddCt=2.45±0.39,$p<0.05$;GREM1=3.38±0.53,$p<0.01$;双尾t检验)(图5C)。

[0133] 实施例3-由SCZ GPC进行的星形胶质细胞分化可通过SMAD4敲低来拯救。

[0134] SMAD4为典型BMP信号传导所必需的,因为其用作多个上游信号的共同效应子,响应于所述信号,它转位至细胞核,在其中活化BMP和TGFB调节基因(Herhaus和Sapkota,"The Emerging Roles of Deubiquitylating Enzymes(DUBs)in the TGFbeta and BMP Pathways,"Cell Signal 26:2186-2192(2014),其以引用的方式整体并入本文)。这些包括BAMBI以及FST和GREM1,其全部与促神经胶质细胞BMP信号的负反馈调节剂一致地起作用(Brazil等人,"BMP Signaling:Agony and Antagony in the Family,"Trends Cell Biol 25:249-264(2015);Onichtchouk等人,"Silencing of TGF-beta Signaling by the Pseudoreceptor BAMBI,"Nature 40:480-485(1999),其以引用的方式整体并入本文)(图6A)。基于此,假定在hGPC中通过抑制BAMBI、FST和GREM1的早期表达进行SMAD4敲低可以增强来自hGPC的星形胶质细胞分化。此外,在SCZ hGPC中的分化阻断是由于内源性BMP抑制剂的SMAD4介导的过表达的程度上,假定SMAD4敲低因此不同地增强由SCZ hGPC进行的星形胶质细胞分化。为了测试此可能性,使用SMAD4 shRNAi的强力霉素(DOX)诱导来条件性敲低SCZ和CTR hGPC中的SMAD4表达,并且然后通过qPCR评定其BMP调节基因的表达(图7A-7C)。已发现SMAD4敲低确实抑制BMP信号传导依赖性基因(包括BAMBI、FST和GREM1)的表达(SCZ-LV-乱序对比SCZ-LV-SMAD4-shRNA;4种不同患者iPSC品系/组,3个重复/品系;BAMBI的ddCt:2.56±0.35,$p<0.05$;FST:2.38±0.24,$p<0.01$;GREM1:3.04±0.45,$p<0.05$;所有比较均通过ANOVA和事后t检验进行)(图6B)。重要的是,瞬时DOX诱导的SMAD4敲低(其中shRNAi表达局限于祖细胞状态)强烈促进SCZ GPC的星形胶质细胞分化,从而克服其在星形胶质细

胞分化中的相对阻断以有效拯救星形胶质细胞表型(图6C-6D)。具体地,SCZ GPC中的SMAD4敲低(KD)将GFAP限定的星形胶质细胞分化的效率恢复至CTR GPC的水平(在GPC阶段的SCZ-SMAD4-shRNA:56.8%±3.8%;CTR品系:62.2%±4.0%;p>0.05,单向ANOVA;4个不同患者品系/组的平均值±SE,n≥3次重复/品系)(图6C-6D)。相比之下,如通过连续DOX暴露(如图7B中所概述)介导的,在星形胶质细胞诱导后的连续SMAD4敲低引起SCZ和CTR两组中GFAP限定的星形胶质细胞减少(图6C-6D)。因此,保持成熟星形胶质细胞表型似乎在SCZ和CTR星形胶质细胞中相同地需要正在进行的SMAD4信号传导。

[0135] 总之,这些数据表明,在SCZ GPC中通过驱动BMP信号传导抑制剂的过量表达产生的异常BMP信号传导抑制了星形胶质细胞分化,并且此分化缺陷可以通过SMAD4敲低来拯救。尽管如此,一旦SCZ GPC进行到星形胶质细胞分化,然后就需要SMAD4表达来在CTR和SCZ星形胶质细胞中相同地保持星形胶质细胞表型,这与其先前描述的作为BMP介导的星形胶质细胞成熟的效应子的功能一致(Kohyama等人,"BMP-induced REST Regulates the Establishment and Maintenance of Astrocytic Identity,"J.Cell Biol.189:159-170(2010),其以引用的方式整体并入本文)。这些数据表明,在SCZ GP中的病理性BMP依赖性信号传导可以界定其星形胶质细胞成熟,并且表明,此细胞病理学可以部分由GPC对促神经胶质细胞BMP信号传导的内源性抑制剂的SMAD4依赖性过表达产生。

[0136] 实施例4-SCZ星形胶质细胞表现出降低的钾摄取

[0137] 连同SCZ GPC的受损的星形胶质细胞分化,RNA-seq数据表明,那些成功分化的星形胶质细胞可能仍然功能受损。特别地,RNA-seq揭示了SCZ GPC中大量钾通道(KCN)编码基因的转录下调,这些基因包括Na^+-K^+ATP酶、Na^+-K^+/2Cl^-协同转运蛋白(NKCC)和Kir家族内向整流钾通道(图8A)(Windrem等人,"Human iPSC Glial Mouse Chimeras Reveal Glial Contributions to Schizophrenia,"Cell Stem Cell 21:195-208.e6(2017),其以引用的方式整体并入本文),所有这些基因都在星形胶质细胞对钾的摄取中起重要作用(Larsen等人,"Contributions of the Na(+)/K(+)-ATPase,NKCC1,and Kir4.1 to Hippocampal K(+)Clearance and Volume Responses,"Glia 62:608-622(2014);Macaulay和Zeuthen,"Glial K(+)Clearance and Cell Swelling:Key Roles for Cotransporters and Pumps,"Neurochem.Res.37:2299-2309(2012),其以引用的方式整体并入本文)(图9A)。在这些失调的KCN基因中,与4个对照品系相比,在所有评定的4个SCZ品系中分别编码Na^+/K^+-ATP酶泵、NKCC1 Na^+/K^+/2Cl^-协同转运蛋白和Kir3.3电压门控K^+通道的ATP1A2、SLC12A6和KCNJ9(Bottger等人,"Glutamate-System Defects Behind Psychiatric Manifestations in a Familial Hemiplegic Migraine Type 2Disease-Mutation Mouse Model,"Sci.Rep.6:22047(2016);Gamba和Friedman,"Thick Ascending Limb:The Na(+):K(+):2Cl(-)Cotransporter,NKCC2,and the Calcium-Sensing Receptor,CaSR,"Pflugers Arch.458:61-76(2009);Lesage等人,"Molecular Properties of Neuronal G-Protein-Activated Inwardly Rectifying K+Channels,"J.Biol.Chem.270:28660-28667(1995),其以引用的方式整体并入本文)被一致且实质地下调。这些发现表明SCZ神经胶质细胞对K+的摄取受到广泛损害。

[0138] 基于这些基因组数据,评定SCZ星形胶质细胞中K^+摄取是否确实受到损害。为了解决这个假设,使用qPCR证实这些K+通道相关基因在SCZ神经胶质细胞中是否失调。它们确实

被显著下调,因此验证了RNA-seq分析(图8B和图9B)。接下来,在培养的SCZ和CTR来源的星形胶质细胞中直接评定功能性K^+摄取。为了获得成熟的SCZ和CTR星形胶质细胞培养物,将CD44分选的神经胶质祖细胞在补充有10%胎牛血清(FBS)和20ng/ml BMP4的基础培养基中培养4周,以增强成熟的表达神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的含纤维的星形胶质细胞的分化(图10A-10C)。在这些高度星形胶质细胞发生的条件下并使用已经针对早期星形胶质细胞标记物CD44进行分选的细胞,通过SCZ来源的以及CTR来源的祖细胞来实现星形胶质细胞成熟(图10A-10C)。然后将来自4个不同SCZ和4个不同CTR品系的星形胶质细胞与用于K^+摄取的替代性单价阳离子86Rb一起孵育(Larsen等人,"Contributions of the Na(+)/K(+)-ATPase,NKCC1,and Kir4.1 to Hippocampal K(+)Clearance and Volume Responses,"Glia 62:608-622(2014),其以引用的方式整体并入本文),并作为细胞数和总蛋白的函数测量铷摄取。SCZ神经胶质细胞(4个SCZ细胞系,5个重复/每个细胞系)中的K+摄取相对于CTR神经胶质细胞(4个CTR细胞系,5个重复/每个细胞系)急剧降低,通过细胞数和总蛋白进行归一化(图9C;通过双尾t检验,$P<0.001$)。

[0139] 由于SCZ神经胶质细胞中编码不同钾Na^+/K^+-ATP酶泵和内向整流通道的基因失调,因此使用药物哇巴因、布美他尼和托肽品分别阻断这三种钾摄取机制。这些药物对星形胶质细胞的作用以前尚未评定,因此首先测试每种药物的不同浓度,以确定用于调节人星形胶质细胞K^+摄取的最佳剂量范围。分别靶向Na^+/K^+-ATP酶泵和NKCC1编码的$Na^+/K^+/2Cl^-$协同转运蛋白的哇巴因和布美他尼显著抑制了CTR神经胶质细胞中的K^+摄取,而靶向Kir通道的托肽品则没有(图9D-9E,左图)。形成鲜明对比的是,哇巴因和布美他尼均不影响SCZ星形胶质细胞对K^+的摄取(图9D-9E,右图)。这表明SCZ来源的星形胶质细胞的K^+摄取的功能下降可能主要归因于Na^+/K^+-ATP酶和$Na^+/K^+/2Cl^-$协同转运蛋白功能下调,使这些细胞对哇巴因和布美他尼治疗无效。

[0140] 实施例1-4的论述

[0141] 这些数据表明,来源于儿童期发作型精神分裂症的GPC中星形胶质细胞分化受到损害,并且这种成熟缺陷可以通过经由SMAD4敲低抑制BMP信号传导来拯救。重要的是,最近在患有精神分裂症的患者的皮层和皮层下区域中都注意到了星形胶质细胞消耗,并且这在白质中可能特别显著(Rajkowska等人,"Layer-specific Reductions in GFAP-reactive Astroglia in the Dorsolateral Prefrontal Cortex in Schizophrenia,"Schizophr Res 57:127-138(2002);Steffek等人,"Cortical Expression of Glial Fibrillary Acidic Protein and Glutamine Synthetase is Decreased in Schizophrenia,"Schizophr Res 103:71-82(2008);Williams等人,"Astrocyte Decrease in the Subgenual Cingulate and Callosal Genu in Schizophrenia,"Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 263:41-52(2013),其以引用的方式整体并入本文)。星形胶质细胞对神经回路形成和稳定性起关键作用(Christopherson等人,"Thrombospondins are Astrocyte-secreted Proteins that Promote CNS Synaptogenesis,"Cell 120:421-433(2005);Clarke和Barres,"Emerging Roles of Astrocytes in Neural Circuit Development,"Nature Reviews Neuroscience 14:311-321(2013),其以引用的方式整体并入本文)。因此,SCZ GPC中星形胶质细胞分化的任何此类发育缺陷都可能导致神经回路的初始形成或稳定性的严重缺陷,这种缺陷是精神分裂症的标志之一(Penzes等人,"Dendritic Spine

pathology in Neuropsychiatric Disorders,"Nat Neurosci 14:285-293(2011),其以引用的方式整体并入本文)。就这一点而言,RNA-seq数据表明TGFBR和BMP信号传导在SCZ GPC中上调,这与包括促神经胶质细胞BMP信号传导的竞争性抑制剂BAMBI的下游BMP调节基因的活化相关(Onichtchouk等人,"Silencing of TGF-beta Signaling by the Pseudoreceptor BAMBI,"Nature 40:480-485(1999),其以引用的方式整体并入本文)。先前已注意到,在成人GPC中BAMBI的高表达显著抑制其星形胶质细胞分化,如BMP4(Sim等人,"Complementary Patterns of Gene Expression by Human Oligodendrocyte Progenitors and Their Environment Predict Determinants of Progenitor Maintenance and Differentiation,"Ann Neurol 59:763-779(2006),其以引用的方式整体并入本文)所诱导的,这表明BMP信号传导诱导的BAMBI表达在SCZ hGPC中相对于正常对照hGPC的病理性升高可能足以抑制其分化为成熟星形胶质细胞。除了BAMBI以外,TGFβ/BMP信号传导的若干其他抑制剂(包括FST和GREM1)(Brazil等人,"BMP Signalling:Agony and Antagony in the Family,"Trends Cell Biol 25:249-264(2015),其以引用的方式整体并入本文)也通过SCZ GPC上调;这些可允许SCZ hGPC避免星形胶质细胞命运,甚至在BAMBI敲低后也如此。

[0142] 值得注意的是,典型TGFβ信号传导的活化依赖于通过TGFβ途径的SMAD2/3活化或通过BMP受体依赖性信号的SMAD1/5/8;这些效应子各自需要与SMAD4组合进行核转位,之后活化其下游基因靶标(Hata和Chen,"TGF-beta Signaling from Receptors to Smads," Cold Spring Harb Perspect Biol 8(2016);Herhaus and Sapkota,"The Emerging Roles of Deubiquitylating Enzymes(DUBs)in the TGFbeta and BMP Pathways,"Cell Signal 26:2186-2192(2014),其以引用的方式整体并入本文)。因此,发现SMAD4敲低有效抑制内源性BMP抑制剂的BMP信号传导诱导的表达,并且如此显著促进其他分化抗性SCZ GPC的星形胶质细胞分化。重要的是,hGPC对SMAD4抑制的此分化反应仅在hGPC阶段标出并且仅在SCZ hGPC中标出;对照患者来源的hGPC未显示响应于SMAD4抑制的此增强的分化。因此,SMAD4的调节可表示适于缓解精神分裂症中的神经胶质细胞分化缺陷的策略。

[0143] 神经胶质细胞成熟在人脑发育中得到精确调节(Goldman和Kuypers,"How to Make an Oligodendrocyte,"Development 142:3983-3995(2015);Molofsky等人,"Astrocytes and Disease:a Neurodevelopmental Perspective,"Genes and Development 26:891-907(2012),其以引用的方式整体并入本文)。星形胶质细胞在CNS中具有多种作用,包括对神经元和少突胶质细胞的能量支持、钾缓冲、神经递质循环以及突触形成和成熟;同样地,星形胶质细胞在神经回路形成和保持中起到关键性作用(Blanco-Suarez等人,"Role of Astrocyte-synapse Interactions in CNS Disorders," J.Physiol.595:1903-1916(2017);Clarke和Barres,"Emerging Roles of Astrocytes in Neural Circuit Development,"Nature Reviews Neuroscience 14:311-321(2013); Verkhratsky等人,"Why are Astrocytes Important?Neurochemical Research40:389-401(2015),其以引用的方式整体并入本文)。星形胶质细胞还通过调节经过脑间质的脑脊髓液流量而有助于淋巴系统(Xie等人,"Sleep Drives Metabolic Clearance from the Adult Brain,"Science 342:373-377(2013),其以引用的方式整体并入本文)。因此,SCZ星形胶质细胞的延迟分化可能对神经网络形成、组织和成熟功能等都具有重要影响。

[0144] 已发现在SCZ神经胶质细胞中许多钾转运蛋白被下调。有趣的是,先前的全基因组关联性研究(GWAS)已经鉴定了钾泵、转运和通道基因与精神分裂症的关联性。例如,含有KCNN3的染色体1q21-q22基因座与家族性精神分裂症具有显著联系(Brzustowicz等人,“Location of a Major Susceptibility Locus for Familial Schizophrenia on Chromosome 1q21-q22,”Science 288:678-682(2000),其以引用的方式整体并入本文)。KCNN3在人脑中广泛表达,并选择性地调节神经元兴奋性和单胺能神经元中的神经递质释放(O'Donovan和Owen,“Candidate-gene Association Studies of Schizophrenia,”Am.J.Hum.Genet.65:587-592(1999),其以引用的方式整体并入本文)。除KCNN3外,许多其他钾通道基因也与精神分裂症相关,包括KCNQ2和KCNAB1(Lee等人,“Pathway Analysis of Genome-wide Association Study in Schizophrenia,”Gene 525:107-115(2013),其以引用的方式整体并入本文)。最近,ATP1A3(钠钾泵的一个亚基)中的新的从头突变与儿童期发作型精神分裂症特别相关(Smedemark-Margulies等人,“ANovel De Novo Mutation in ATP1A3 and Childhood-Onset Schizophrenia,”Cold Spring Harb Mol Case Stud 2,a001008(2016),其以引用的方式整体并入本文)。

[0145] 在GPC及其衍生的星形胶质细胞中这些钾转运蛋白的下调或功能障碍可能显著促成精神分裂症的疾病表型。钾通道、泵和转运基因在GPC(Coppi等人,“UDP-glucose Enhances Outward K(+)Currents Necessary for Cell Differentiation and Stimulates Cell Migration by Activating the GPR17 Receptor in Oligodendrocyte Precursors,”Glia 61:1155-1171(2013);Maldonado等人,“Oligodendrocyte Precursor Cells are Accurate Sensors of Local K^+in Mature Gray Matter,”J.Neurosci.33:2432-2442(2013),其以引用的方式整体并入本文)和星形胶质细胞(Larsen等人,“Contributions of the Na(+)/K(+)-ATPase,NKCC1,and Kir4.1 to Hippocampal K(+)Clearance and Volume Responses,”Glia 62:608-622(2014);Zhang和Barres,“Astrocyte Heterogeneity:an Underappreciated Topic in Neurobiology,”Current Opinion in Neurobiology 20:588-594(2010),其以引用的方式整体并入本文)中广泛表达,其中它们不仅调节增殖、迁移和分化,而且调节神经胶质细胞与神经元的关系(Coppi等人,“UDP-glucose Enhances Outward K(+)Currents Necessary for Cell Differentiation and Stimulates Cell Migration by Activating the GPR17 Receptor in Oligodendrocyte Precursors,”Glia 61:1155-1171(2013);Maldonado等人,“Oligodendrocyte Precursor Cells are Accurate Sensors of Local K^+in Mature Gray Matter,”J.Neurosci.33:2432-2442(2013),其以引用的方式整体并入本文)。关于后者,星形胶质细胞还通过所有三种主要K^+转运机制(包括Na+/K+-ATP酶、NKCC1协同转运蛋白和向内整流的Kir通道)调节突触K^+摄取(Larsen等人,“Contributions of the Na(+)/K(+)-ATPase,NKCC1,and Kir4.1 to Hippocampal K(+)Clearance and Volume Responses,”Glia 62:608-622(2014);Zhang和Barres,“Astrocyte Heterogeneity:an Underappreciated Topic in Neurobiology,”Current Opinion in Neurobiology 20:588-594(2010),其以引用的方式整体并入本文),从而在广泛区域范围内建立神经元放电阈值。

[0146] 因此,失调的K+转运和钾通道基因表达已与多种神经和精神疾病相关。几个Kir基

因(包括Kir4.1)参与星形胶质细胞钾缓冲和谷氨酸摄取,并且在亨廷顿氏病和多发性硬化中都注意到这些基因的缺失(Seifert等人,“Astrocyte Dysfunction in Neurological Disorders:a Molecular Perspective,”Nat Rev Neurosci 7:194-206(2006);Tong等人,“Astrocyte Kir4.1 Ion Channel Deficits Contribute to Neuronal Dysfunction in Huntington's Disease Model Mice,”Nature Neuroscience 17:694-703(2014),其以引用的方式整体并入本文)。另外,星形胶质细胞ATP1A2(钠钾泵的α2同种型)的突变可能与家族性偏瘫性偏头痛有因果关系(Bottger等人,“Glutamate-system Defects Behind Psychiatric Manifestations in a Familial Hemiplegic Migraine Type 2 Disease-mutation Mouse Model,”Sci Rep 6:22047(2016);Swarts等人,“Familial Hemiplegic Migraine Mutations Affect Na,K-ATPase Domain Interactions,”Biochim Biophys Acta 1832:2173-2179(2013),其以引用的方式整体并入本文)。在所有这些实施例中,神经胶质细胞K^+摄取都受到损害,就像在SCZ神经胶质细胞中一样,并且所有这些损害都与表型过度兴奋相关。实际上,在精神分裂症的小鼠模型中,细胞外K^+升高已显示改变神经元兴奋性和神经回路稳定性(Crabtree等人,“Alteration of Neuronal Excitability and Short-term Synaptic Plasticity in the Prefrontal Cortex of a Mouse Model of Mental Illness,”J.Neurosci.(2017),其以引用的方式整体并入本文)。因此,SCZ神经胶质细胞对K^+摄取的减少可能是精神分裂症发病机理的重要贡献因素,特别是关于与过度兴奋和癫痫症相关的那些精神分裂症表型,其在破坏的钾稳态的环境中受到加强。

[0147] 因此,这些数据揭示了SCZ GPC对星形胶质细胞的缺陷性分化、SMAD4敲低对该缺陷的潜在可逆性以及SCZ神经胶质细胞对K^+的缺陷性摄取。所产生的突触钾稳态的缺陷可能预期显著降低神经元放电阈值,同时加强网络去同步化(Benraiss等人,"Human Glia Can Both Induce and Rescue Aspects of Disease Phenotype in Huntington Disease,"Nature Communications 7:11758(2016),其以引用的方式整体并入本文)。同样地,可以预期的是,神经胶质细胞K^+摄取的阳性调节剂可能具有治疗精神分裂症的的实际价值(Calcaterra等人,“Schizophrenia-associated hERG Channel Kv11.1-3.1Exhibits a Unique Trafficking Deficit that is Rescued Through Proteasome Inhibition for High Throughput Screening,”Sci Rep 6:19976(2016);He等人,“Current Pharmacogenomic Studies on hERG Potassium Channels,”Trends Mol Med 19:227-238(2013);Rahmanzadeh等人,“Lack of the Effect of Bumetanide,a Selective NKCC1 Inhibitor,in Patients with Schizophrenia:A Double-blind Randomized Trial,”Psychiatry Clin Neurosci 71:72-73(2017),其以引用的方式整体并入本文)。总之,这些发现鉴定了星形胶质细胞病理学对SCZ的神经元功能障碍的因果作用,并且这样做时表明了用于其治疗的一组易处理的分子靶标。

[0148] 尽管本文已经详细示出和描述了优选实施方案,相关领域技术人员显而易见的是可在不脱离本发明的精神的情况下进行各种修改、添加、替换等,因此,这些修改、添加、替换等被认为在如以下权利要求书中定义的本发明的范围内。

[0001] 序列表

[0002] <110> 罗切斯特大学

[0003] <120> 治疗精神分裂症和其他神经精神病症的方法

[0004] <130> 147400.03771 (6-18129)

[0005] <150> 62/778,145

[0006] <151> 2018-12-11

[0007] <160> 35

[0008] <170> PatentIn version 3.5

[0009] <210> 1

[0010] <211> 552

[0011] <212> PRT

[0012] <213> 智人(Homosapien)

[0013] <400> 1

[0014] Met Asp Asn Met Ser Ile Thr Asn Thr Pro Thr Ser Asn Asp Ala Cys

[0015] 1 5 10 15

[0016] Leu Ser Ile Val His Ser Leu Met Cys His Arg Gln Gly Gly Glu Ser

[0017] 20 25 30

[0018] Glu Thr Phe Ala Lys Arg Ala Ile Glu Ser Leu Val Lys Lys Leu Lys

[0019] 35 40 45

[0020] Glu Lys Lys Asp Glu Leu Asp Ser Leu Ile Thr Ala Ile Thr Thr Asn

[0021] 50 55 60

[0022] Gly Ala His Pro Ser Lys Cys Val Thr Ile Gln Arg Thr Leu Asp Gly

[0023] 65 70 75 80

[0024] Arg Leu Gln Val Ala Gly Arg Lys Gly Phe Pro His Val Ile Tyr Ala

[0025] 85 90 95

[0026] Arg Leu Trp Arg Trp Pro Asp Leu His Lys Asn Glu Leu Lys His Val

[0027] 100 105 110

[0028] Lys Tyr Cys Gln Tyr Ala Phe Asp Leu Lys Cys Asp Ser Val Cys Val

[0029] 115 120 125

[0030] Asn Pro Tyr His Tyr Glu Arg Val Val Ser Pro Gly Ile Asp Leu Ser

[0031] 130 135 140

[0032] Gly Leu Thr Leu Gln Ser Asn Ala Pro Ser Ser Met Met Val Lys Asp

[0033] 145 150 155 160

[0034] Glu Tyr Val His Asp Phe Glu Gly Gln Pro Ser Leu Ser Thr Glu Gly

[0035] 165 170 175

[0036] His Ser Ile Gln Thr Ile Gln His Pro Pro Ser Asn Arg Ala Ser Thr

[0037] 180 185 190

[0038] Glu Thr Tyr Ser Thr Pro Ala Leu Leu Ala Pro Ser Glu Ser Asn Ala

[0039] 195 200 205

[0040] Thr Ser Thr Ala Asn Phe Pro Asn Ile Pro Val Ala Ser Thr Ser Gln

[0041] 210 215 220

[0042] Pro Ala Ser Ile Leu Gly Gly Ser His Ser Glu Gly Leu Leu Gln Ile
[0043] 225 230 235 240
[0044] Ala Ser Gly Pro Gln Pro Gly Gln Gln Gln Asn Gly Phe Thr Gly Gln
[0045] 245 250 255
[0046] Pro Ala Thr Tyr His His Asn Ser Thr Thr Thr Trp Thr Gly Ser Arg
[0047] 260 265 270
[0048] Thr Ala Pro Tyr Thr Pro Asn Leu Pro His His Gln Asn Gly His Leu
[0049] 275 280 285
[0050] Gln His His Pro Pro Met Pro Pro His Pro Gly His Tyr Trp Pro Val
[0051] 290 295 300
[0052] His Asn Glu Leu Ala Phe Gln Pro Pro Ile Ser Asn His Pro Ala Pro
[0053] 305 310 315 320
[0054] Glu Tyr Trp Cys Ser Ile Ala Tyr Phe Glu Met Asp Val Gln Val Gly
[0055] 325 330 335
[0056] Glu Thr Phe Lys Val Pro Ser Ser Cys Pro Ile Val Thr Val Asp Gly
[0057] 340 345 350
[0058] Tyr Val Asp Pro Ser Gly Gly Asp Arg Phe Cys Leu Gly Gln Leu Ser
[0059] 355 360 365
[0060] Asn Val His Arg Thr Glu Ala Ile Glu Arg Ala Arg Leu His Ile Gly
[0061] 370 375 380
[0062] Lys Gly Val Gln Leu Glu Cys Lys Gly Glu Gly Asp Val Trp Val Arg
[0063] 385 390 395 400
[0064] Cys Leu Ser Asp His Ala Val Phe Val Gln Ser Tyr Tyr Leu Asp Arg
[0065] 405 410 415
[0066] Glu Ala Gly Arg Ala Pro Gly Asp Ala Val His Lys Ile Tyr Pro Ser
[0067] 420 425 430
[0068] Ala Tyr Ile Lys Val Phe Asp Leu Arg Gln Cys His Arg Gln Met Gln
[0069] 435 440 445
[0070] Gln Gln Ala Ala Thr Ala Gln Ala Ala Ala Ala Ala Gln Ala Ala Ala
[0071] 450 455 460
[0072] Val Ala Gly Asn Ile Pro Gly Pro Gly Ser Val Gly Gly Ile Ala Pro
[0073] 465 470 475 480
[0074] Ala Ile Ser Leu Ser Ala Ala Ala Gly Ile Gly Val Asp Asp Leu Arg
[0075] 485 490 495
[0076] Arg Leu Cys Ile Leu Arg Met Ser Phe Val Lys Gly Trp Gly Pro Asp
[0077] 500 505 510
[0078] Tyr Pro Arg Gln Ser Ile Lys Glu Thr Pro Cys Trp Ile Glu Ile His
[0079] 515 520 525
[0080] Leu His Arg Ala Leu Gln Leu Leu Asp Glu Val Leu His Thr Met Pro
[0081] 530 535 540
[0082] Ile Ala Asp Pro Gln Pro Leu Asp
[0083] 545 550

[0084] <210> 2

[0085] <211> 8789

[0086] <212> DNA

[0087] <213> 智人(Homosapien)

[0088] <400> 2

[0089] atgctcagtg gcttctcgac aagttggcag caacaacacg gccctggtcg tcgtcgccgc 60

[0090] tgcggtaacg gagcggtttg ggtggcggag cctgcgttcg cgccttcccg ctctcctcgg 120

[0091] gaggcccttc ctgctctccc ctaggctccg cggccgccca gggggtggga gcgggtgagg 180

[0092] ggagccaggc gcccagcgag agaggccccc cgccgcaggg cggcccggga gctcgaggcg 240

[0093] gtccggcccg cgcgggcagc ggcgcggcgc tgaggagggg cggcctggcc gggacgcctc 300

[0094] ggggcggggg ccgaggagct ctccgggccg ccggggaaag ctacgggccc ggtgcgtccg 360

[0095] cggaccagca gcgcgggaga gcggactccc ctcgccaccg cccgagccca ggttatcctg 420

[0096] aatacatgtc taacaatttt ccttgcaacg ttagctgttg tttttcactg tttccaaagg 480

[0097] atcaaaattg cttcagaaat tggagacata tttgatttaa aaggaaaaac ttgaacaaat 540

[0098] ggacaatatg tctattacga atacaccaac aagtaatgat gcctgtctga gcattgtgca 600

[0099] tagtttgatg tgccatagac aaggtggaga gagtgaaaca tttgcaaaaa gagcaattga 660

[0100] aagtttggta aagaagctga aggagaaaaa agatgaattg gattctttaa taacagctat 720

[0101] aactacaaat ggagctcatc ctagtaaatg tgttaccata cagagaacat tggatgggag 780

[0102] gcttcaggtg gctggtcgga aaggatttcc tcatgtgatc tatgcccgtc tctggaggtg 840

[0103] gcctgatctt cacaaaaatg aactaaaaca tgttaaatat tgtcagtatg cgtttgactt 900

[0104] aaaatgtgat agtgtctgtg tgaatccata tcactacgaa cgagttgtat cacctggaat 960

[0105] tgatctctca ggattaacac tgcagagtaa tgctccatca agtatgatgg tgaaggatga 1020

[0106] atatgtgcat gactttgagg gacagccatc gttgtccact gaaggacatt caattcaaac 1080

[0107] catccagcat ccaccaagta atcgtgcatc gacagagaca tacagcaccc cagctctgtt 1140

[0108] agccccatct gagtctaatg ctaccagcac tgccaacttt cccaacattc ctgtggcttc 1200

[0109] cacaagtcag cctgccagta tactgggggg cagccatagt gaaggactgt tgcagatagc 1260

[0110] atcagggcct cagccaggac agcagcagaa tggatttact ggtcagccag ctacttacca 1320

[0111] tcataacagc actaccacct ggactggaag taggactgca ccatacacac ctaatttgcc 1380

[0112] tcaccaccaa aacggccatc ttcagcacca cccgcctatg ccgccccatc ccggacatta 1440

[0113] ctggcctgtt cacaatgagc ttgcattcca gcctcccatt tccaatcatc ctgctcctga 1500

[0114] gtattggtgt tccattgctt actttgaaat ggatgttcag gtaggagaga catttaaggt 1560

[0115] tccttcaagc tgccctattg ttactgttga tggatacgtg gacccttctg gaggagatcg 1620

[0116] cttttgtttg ggtcaactct ccaatgtcca caggacagaa gccattgaga gagcaaggtt 1680

[0117] gcacataggc aaaggtgtgc agttggaatg taaaggtgaa ggtgatgttt gggtcaggtg 1740

[0118] ccttagtgac cacgcggtct ttgtacagag ttactactta gacagagaag ctgggcgtgc 1800

[0119] acctggagat gctgttcata agatctaccc aagtgcatat ataaaggtct ttgatttgcg 1860

[0120] tcagtgtcat cgacagatgc agcagcaggc ggctactgca caagctgcag cagctgccca 1920

[0121] ggcagcagcc gtggcaggaa acatccctgg cccaggatca gtaggtggaa tagctccagc 1980

[0122] tatcagtctg tcagctgctg ctggaattgg tgttgatgac cttcgtcgct tatgcatact 2040

[0123] caggatgagt tttgtgaaag gctggggacc ggattaccca agacagagca tcaaagaaac 2100

[0124] accttgctgg attgaaattc acttacaccg ggccctccag ctcctagacg aagtacttca 2160

[0125] taccatgccg attgcagacc cacaaccttt agactgaggt cttttaccgt tggggccctt 2220

[0126] aaccttatca ggatggtgga ctacaaaata caatcctgtt tataatctga agatatattt 2280
[0127] cacttttgtt ctgctttatc ttttcataaa gggttgaaaa tgtgtttgct gccttgctcc 2340
[0128] tagcagacag aaactggatt aaaacaattt tttttttcct cttcagaact tgtcaggcat 2400
[0129] ggctcagagc ttgaagatta ggagaaacac attcttatta attcttcacc tgttatgtat 2460
[0130] gaaggaatca ttccagtgct agaaaattta gcccctttaaa acgtcttaga gccttttatc 2520
[0131] tgcagaacat cgatatgtat atcattctac agaataatcc agtattgctg attttaaagg 2580
[0132] cagagaagtt ctcaaagtta attcacctat gttattttgt gtacaagttg ttattgttga 2640
[0133] acatacttca aaaataatgt gccatgtggg tgagttaatt ttaccaagag taactttact 2700
[0134] ctgtgtttaa aaagtaagtt aataatgtat tgtaatcttt catccaaaat atttttttgca 2760
[0135] agttatatta gtgaagatgg tttcaattca gattgtcttg caacttcagt tttatttttg 2820
[0136] ccaaggcaaa aaactcttaa tctgtgtgta tattgagaat cccttaaaat taccagacaa 2880
[0137] aaaaatttaa aattacgttt gttattccta gtggatgact gttgatgaag tatacttttc 2940
[0138] ccctgttaaa cagtagttgt attcttctgt atttctaggc acaaggttgg ttgctaagaa 3000
[0139] gcctataaga ggaatttctt ttccttcatt catagggaaa ggttttgtat tttttaaaac 3060
[0140] actaaaagca gcgtcactct acctaatgtc tcactgttct gcaaaggtgg caatgcttaa 3120
[0141] actaaataat gaataaactg aatattttgg aaactgctaa attctatgtt aaatactgtg 3180
[0142] cagaataatg gaaacattac agttcataat aggtagtttg gatatttttg tacttgattt 3240
[0143] gatgtgactt tttttggtat aatgtttaaa tcatgtatgt tatgatattg tttaaaattc 3300
[0144] agtttttgta tcttggggca agactgcaaa ctttttttata tcttttggtt attctaagcc 3360
[0145] ctttgccatc aatgatcata tcaattggca gtgactttgt atagagaatt taagtagaaa 3420
[0146] agttgcagat gtattgactg taccacagac acaatatgta tgctttttac ctagctggta 3480
[0147] gcataaataa aactgaatct caacatacaa agttgaattc taggtttgat ttttaagatt 3540
[0148] tttttttttct tttgcacttt tgagtccaat ctcagtgatg aggtaccttc tactaaatga 3600
[0149] caggcaacag ccagttctat tgggcagctt tgtttttttc cctcacactc taccgggact 3660
[0150] tccccatgga cattgtgtat catgtgtaga gttggttttt ttttttttta atttttattt 3720
[0151] tactatagca gaaatagacc tgattatcta caagatgata aatagattgt ctacaggata 3780
[0152] aatagtatga aataaaatca aggattatct ttcagatgtg tttacttttg cctggagaac 3840
[0153] ttttagctat agaaacactt gtgtgatgat agtcctcctt atatcacctg gaatgaacac 3900
[0154] agcttctact gccttgctca gaaggtcttt taaatagacc atcctagaaa ccactgagtt 3960
[0155] tgcttatttc tgtgatttaa acatagatct tgatccaagc tacatgactt ttgtctttaa 4020
[0156] ataacttatc taccacctca tttgtactct tgattactta caaattcttt cagtaaacac 4080
[0157] ctaattttct tctgtaaaag tttggtgatt taagttttat tggcagtttt ataaaaagac 4140
[0158] atcttctcta gaaattgcta actttaggtc cattttactg tgaatgagga ataggagtga 4200
[0159] gttttagaat aacagatttt taaaaatcca gatgatttga ttaaaacctt aatcatacat 4260
[0160] tgacataatt cattgcttct tttttttgag atatggagtc ttgctgtgtt gcccaggcag 4320
[0161] gagtgcagtg gtatgatctc agctcactgc aacctctgcc tcccgggttc aactgattct 4380
[0162] cctgcctcag cctccctggt agctaggatt acaggtgccc gccaccatgc ctggctaact 4440
[0163] tttgtagttt tagtagagac ggggttttgc ctgttggcca ggctggtctt gaactcctga 4500
[0164] cctcaagtga tccatccacc ttggcctccc aaagtgctgg gattacgggc gtgagccact 4560
[0165] gtccctggcc tcattgttcc cttttctact ttaaggaaag ttttcatgtt taatcatctg 4620
[0166] gggaaagtat gtgaaaaata tttgttaaga agtatctctt tggagccaag ccacctgtct 4680
[0167] tggtttcttt ctactaagag ccataaagta tagaaatact tctagttgtt aagtgcttat 4740

[0168] atttgtacct agatttagtc acacgctttt gagaaaacat ctagtatgtt atgatcagct 4800
[0169] attcctgaga gcttggttgt taatctatat ttctatttct tagtggtagt catctttgat 4860
[0170] gaataagact aaagattctc acaggtttaa aattttatgt ctactttaag ggtaaaatta 4920
[0171] tgaggttatg gttctgggtg ggttttctct agctaattca tatctcaaag agtctcaaaa 4980
[0172] tgttgaattt cagtgcaagc tgaatgagag atgagccatg tacacccacc gtaagacctc 5040
[0173] attccatgtt tgtccagtgc ctttcagtgc attatcaaag ggaatccttc atggtgttgc 5100
[0174] ctttattttc cggggagtag atcgtgggat atagtctatc tcatttttaa tagtttaccg 5160
[0175] cccctggtat acaaagataa tgacaataaa tcactgccat ataaccttgc tttttccaga 5220
[0176] aacatggctg ttttgtattg ctgtaaccac taaataggtt gcctatacca ttcctcctgt 5280
[0177] gaacagtgca gatttacagg ttgcatggtc tggcttaagg agagccatac ttgagacatg 5340
[0178] tgagtaaact gaactcatat tagctgtgct gcatttcaga cttaaaatcc atttttgtgg 5400
[0179] ggcagggtgt ggtgtgtaaa ggggggtgtt tgtaatacaa gttgaaggca aaataaaatg 5460
[0180] tcctgtctcc cagatgatat acatcttatt atttttaaag tttattgcta attgtaggaa 5520
[0181] ggtgagttgc aggtatcttt gactatggtc atctggggaa ggaaaatttt acattttact 5580
[0182] attaatgctc cttaagtgtc tatggaggtt aaagaataaa atggtaaatg tttctgtgcc 5640
[0183] tggtttgatg gtaactggtt aatagttact caccatttta tgcagagtca cattagttca 5700
[0184] cacccttttct gagagccttt tgggagaagc agttttattc tctgagtgga acagagttct 5760
[0185] ttttgttgat aatttctagt ttgctccctt cgttattgcc aactttactg gcattttatt 5820
[0186] taatgatagc agattgggaa aatggcaaat ttaggttacg gaggtaaatg agtatatgaa 5880
[0187] agcaattacc tctaaagcca gttaacaatt attttgtagg tggggtacac tcagcttaaa 5940
[0188] gtaatgcatt ttttttccc gtaaaggcag aatccatctt gttgcagata gctatctaaa 6000
[0189] taatctcata tcctcttttg caaagactac agagaatagg ctatgacaat cttgttcaag 6060
[0190] cctttccatt tttttccctg ataactaagt aatttctttg aacataccaa gaagtatgta 6120
[0191] aaaagtccat ggccttattc atccacaaag tggcatccta ggcccagcct tatccctagc 6180
[0192] agttgtccca gtgctgctag gttgcttatc ttgtttatct ggaatcactg tggagtgaaa 6240
[0193] ttttccacat catccagaat tgccttattt aagaagtaaa acgttttaat ttttagcctt 6300
[0194] tttttggtgg agttatttaa tatgtatatc agaggatata ctagatggta acatttcttt 6360
[0195] ctgtgcttgg ctatctttgt ggacttcagg ggcttctaaa acagacagga ctgtgttgcc 6420
[0196] tttactaaat ggtctgagac agctatggtt ttgaattttt agtttttttt ttttaaccca 6480
[0197] cttcccctcc tggtctcttc cctctctgat aattaccatt catatgtgag tgttagtgtg 6540
[0198] cctccttta gcattttctt cttctctttc tgattcttca tttctgactg cctaggcaag 6600
[0199] gaaaccagat aaccaaactt actagaacgt tctttaaaac acaagtacaa actctgggac 6660
[0200] aggacccaag acactttcct gtgaagtgct gaaaaagacc tcattgtatt ggcatttgat 6720
[0201] atcagtttga tgtagcttag agtgcttcct gattcttgct gagtttcagg tagttgagat 6780
[0202] agagagaagt gagtcatatt catattttcc cccttagaat aatattttga aaggtttcat 6840
[0203] tgcttccact tgaatgctgc tcttacaaaa actggggtta caagggttac taaattagca 6900
[0204] tcagtagcca gaggcaatac cgttgtctgg aggacaccag caaacaacac acaacaaagc 6960
[0205] aaaacaaacc ttgggaaact aaggccattt gttttgtttt ggtgtcccct ttgaagccct 7020
[0206] gccttctggc cttactcctg tacagatatt tttgacctat aggtgccttt atgagaattg 7080
[0207] agggtctgac atcctgcccc aaggagtagc taaagtaatt gctagtgttt tcagggattt 7140
[0208] taacatcaga ctggaatgaa tgaatgaaac tttttgtcct ttttttttct gttttttttt 7200
[0209] ttctaatgta gtaaggacta aggaaaacct ttggtgaaga caatcatttc tctctgttga 7260

[0210] tgtggatact tttcacaccg tttatttaaa tgctttctca ataggtccag agccagtgtt 7320

[0211] cttgttcaac ctgaaagtaa tggctctggg ttgggccaga cagttgcact ctctagtttg 7380

[0212] ccctctgcca caaatttgat gtgtgacctt tgggcaagtc atttatcttc tctgggcctt 7440

[0213] agttgcctca tctgtaaaat gagggagttg gagtagatta attattccag ctctgaaatt 7500

[0214] ctaagtgacc ttggctacct tgcagcagtt ttggatttct tccttatctt tgttctgctg 7560

[0215] tttgaggggg ctttttactt atttccatgt tattcaaagg agactaggct tgatatttta 7620

[0216] ttactgttct tttatggaca aaaggttaca tagtatgccc ttaagactta attttaacca 7680

[0217] aaggcctagc accaccttag gggctgcaat aaacacttaa cgcgcgtgcg cacgcgcgcg 7740

[0218] cgcacacaca cacacacaca cacacacaca cacaggtcag agtttaaggc tttcgagtca 7800

[0219] tgacattcta gcttttgaat tgcgtgcaca cacacacgca cgcacacact ctggtcagag 7860

[0220] tttattaagg ctttcgagtc atgacattat agcttttgag ttggtgtgtg tgacaccacc 7920

[0221] ctcctaagtg gtgtgtgctt gtaatttttt ttttcagtga aaatggattg aaaacctgtt 7980

[0222] gttaatgctt agtgatatta tgctcaaaac aaggaaattc ccttgaaccg tgtcaattaa 8040

[0223] actggtttat atgactcaag aaaacaatac cagtagatga ttattaactt tattcttggc 8100

[0224] tctttttagg tccattttga ttaagtgact tttggctgga tcattcagag ctctcttcta 8160

[0225] gcctaccctt ggatgagtac aattaatgaa attcatattt tcaaggacct gggagccttc 8220

[0226] cttggggctg ggttgagggt ggggggttgg ggagtcctgg tagaggccag ctttgtggta 8280

[0227] gctggagagg aagggatgaa accagctgct gttgcaaagg ctgcttgtca ttgatagaag 8340

[0228] gactcacggg cttggattga ttaagactaa acatggagtt ggcaaacttt cttcaagtat 8400

[0229] tgagttctgt tcaatgcatt ggacatgtga tttaagggaa aagtgtgaat gcttatagat 8460

[0230] gatgaaaacc tggtgggctg cagagcccag tttagaagaa gtgagttggg ggttggggac 8520

[0231] agatttggtg gtggtatttc ccaactgttt cctcccctaa attcagagga atgcagctat 8580

[0232] gccagaagcc agagaagagc cactcgtagc ttctgctttg gggacaactg gtcagttgaa 8640

[0233] agtcccagga gttcctttgt ggctttctgt atacttttgc ctggttaaag tctgtggcta 8700

[0234] aaaaatagtc gaacctttct tgagaactct gtaacaaagt atgtttttga ttaaaagaga 8760

[0235] aagccaacta aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 8789

[0236] <210> 3

[0237] <211> 19

[0238] <212> RNA

[0239] <213> 人工(Artificial)

[0240] <220>

[0241] <223> SMAD4 shRNA

[0242] <400> 3

[0243] guaaguagcu ggcugacca 19

[0244] <210> 4

[0245] <211> 19

[0246] <212> DNA

[0247] <213> 智人(Homosapien)

[0248] <400> 4

[0249] tggtcagcca gctacttac 19

[0250] <210> 5

[0251] <211> 21

[0252] <212> DNA
[0253] <213> 人工(Artificial)
[0254] <220>
[0255] <223> 乱序shRNA
[0256] <400> 5
[0257] aagttgcaaa tcgcgtctct a 21
[0258] <210> 6
[0259] <211> 19
[0260] <212> RNA
[0261] <213> 人工(Artificial)
[0262] <220>
[0263] <223> SMAD4 shRNA
[0264] <400> 6
[0265] agaagugagu cauauucau 19
[0266] <210> 7
[0267] <211> 19
[0268] <212> DNA
[0269] <213> 智人(Homosapien)
[0270] <400> 7
[0271] atgaatatga ctcacttct 19
[0272] <210> 8
[0273] <211> 142
[0274] <212> PRT
[0275] <213> 人工(Artificial)
[0276] <220>
[0277] <223> 重组CLP/cotl 1
[0278] <400> 8
[0279] Met Ala Thr Lys Ile Asp Lys Glu Ala Cys Arg Ala Ala Tyr Asn Leu
[0280] 1 5 10 15
[0281] Val Arg Asp Asp Gly Ser Ala Val Ile Trp Val Thr Phe Lys Tyr Asp
[0282] 20 25 30
[0283] Gly Ser Thr Ile Val Pro Gly Glu Gln Gly Ala Glu Tyr Gln His Phe
[0284] 35 40 45
[0285] Ile Gln Gln Cys Thr Asp Asp Val Arg Leu Phe Ala Phe Val Arg Phe
[0286] 50 55 60
[0287] Thr Thr Gly Asp Ala Met Ser Lys Arg Ser Lys Phe Ala Leu Ile Thr
[0288] 65 70 75 80
[0289] Trp Ile Gly Glu Asn Val Ser Gly Leu Gln Arg Ala Lys Thr Gly Thr
[0290] 85 90 95
[0291] Asp Lys Thr Leu Val Lys Glu Val Val Gln Asn Phe Ala Lys Glu Phe
[0292] 100 105 110
[0293] Val Ile Ser Asp Arg Lys Glu Leu Glu Glu Asp Phe Ile Lys Ser Glu

[0294] 115 120 125

[0295] Leu Lys Lys Ala Gly Gly Ala Asn Tyr Asp Ala Gln Thr Glu

[0296] 130 135 140

[0297] <210> 9

[0298] <211> 20

[0299] <212> DNA

[0300] <213> 人工(Artificial)

[0301] <220>

[0302] <223> 引物

[0303] <400> 9

[0304] ctggataccg cagctaggaa 20

[0305] <210> 10

[0306] <211> 20

[0307] <212> DNA

[0308] <213> 人工(Artificial)

[0309] <220>

[0310] <223> 引物

[0311] <400> 10

[0312] ccctcttaat catggcctca 20

[0313] <210> 11

[0314] <211> 17

[0315] <212> DNA

[0316] <213> 人工(Artificial)

[0317] <220>

[0318] <223> 引物

[0319] <400> 11

[0320] tgcggccgat tgtgaac 17

[0321] <210> 12

[0322] <211> 21

[0323] <212> DNA

[0324] <213> 人工(Artificial)

[0325] <220>

[0326] <223> 引物

[0327] <400> 12

[0328] cctcttttct ctgcggaacg t 21

[0329] <210> 13

[0330] <211> 20

[0331] <212> DNA

[0332] <213> 人工(Artificial)

[0333] <220>

[0334] <223> 引物

[0335] <400> 13

[0336] ctaccatgga ccatcctgct 20

[0337] <210> 14

[0338] <211> 20

[0339] <212> DNA

[0340] <213> 人工(Artificial)

[0341] <220>

[0342] <223> 引物

[0343] <400> 14

[0344] cctatcccaa ggtcttgctg 20

[0345] <210> 15

[0346] <211> 20

[0347] <212> DNA

[0348] <213> 人工(Artificial)

[0349] <220>

[0350] <223> 引物

[0351] <400> 15

[0352] gtggacgagg caagagtttc 20

[0353] <210> 16

[0354] <211> 20

[0355] <212> DNA

[0356] <213> 人工(Artificial)

[0357] <220>

[0358] <223> 引物

[0359] <400> 16

[0360] ttcccgaggt ccatctactg 20

[0361] <210> 17

[0362] <211> 20

[0363] <212> DNA

[0364] <213> 人工(Artificial)

[0365] <220>

[0366] <223> 引物

[0367] <400> 17

[0368] tcaggaacct caccttggac 20

[0369] <210> 18

[0370] <211> 20

[0371] <212> DNA

[0372] <213> 人工(Artificial)

[0373] <220>

[0374] <223> 引物

[0375] <400> 18

[0376] gcacagtggg gagaagagag 20

[0377] <210> 19

[0378] <211> 20
[0379] <212> DNA
[0380] <213> 人工(Artificial)
[0381] <220>
[0382] <223> 引物
[0383] <400> 19
[0384] gattgatgac aagggcatgg 20
[0385] <210> 20
[0386] <211> 20
[0387] <212> DNA
[0388] <213> 人工(Artificial)
[0389] <220>
[0390] <223> 引物
[0391] <400> 20
[0392] cccatagggt gagaaaacca 20
[0393] <210> 21
[0394] <211> 20
[0395] <212> DNA
[0396] <213> 人工(Artificial)
[0397] <220>
[0398] <223> 引物
[0399] <400> 21
[0400] atcgccactc cagctacatc 20
[0401] <210> 22
[0402] <211> 20
[0403] <212> DNA
[0404] <213> 人工(Artificial)
[0405] <220>
[0406] <223> 引物
[0407] <400> 22
[0408] ggcagcatca cagtagcatc 20
[0409] <210> 23
[0410] <211> 20
[0411] <212> DNA
[0412] <213> 人工(Artificial)
[0413] <220>
[0414] <223> 引物
[0415] <400> 23
[0416] ccatttccaa tcatcctgct 20
[0417] <210> 24
[0418] <211> 20
[0419] <212> DNA

[0420] <213> 人工(Artificial)

[0421] <220>

[0422] <223> 引物

[0423] <400> 24

[0424] acctttgcct atgtgcaacc 20

[0425] <210> 25

[0426] <211> 20

[0427] <212> DNA

[0428] <213> 人工(Artificial)

[0429] <220>

[0430] <223> 引物

[0431] <400> 25

[0432] ggaggacgtg aatgacaaca 20

[0433] <210> 26

[0434] <211> 23

[0435] <212> DNA

[0436] <213> 人工(Artificial)

[0437] <220>

[0438] <223> 引物

[0439] <400> 26

[0440] cacgttctca cacgtttctt tac 23

[0441] <210> 27

[0442] <211> 20

[0443] <212> DNA

[0444] <213> 人工(Artificial)

[0445] <220>

[0446] <223> 引物

[0447] <400> 27

[0448] ggccagtgca actctttcta 20

[0449] <210> 28

[0450] <211> 21

[0451] <212> DNA

[0452] <213> 人工(Artificial)

[0453] <220>

[0454] <223> 引物

[0455] <400> 28

[0456] ctgtagttca gggcagttga g 21

[0457] <210> 29

[0458] <211> 20

[0459] <212> DNA

[0460] <213> 人工(Artificial)

[0461] <220>

[0462] <223> 引物

[0463] <400> 29

[0464] gttatcctcg agggcatggt 20

[0465] <210> 30

[0466] <211> 20

[0467] <212> DNA

[0468] <213> 人工(Artificial)

[0469] <220>

[0470] <223> 引物

[0471] <400> 30

[0472] cgtcctccag agtcagcact 20

[0473] <210> 31

[0474] <211> 22

[0475] <212> DNA

[0476] <213> 人工(Artificial)

[0477] <220>

[0478] <223> 引物

[0479] <400> 31

[0480] aactgttaga cgacggacat ag 22

[0481] <210> 32

[0482] <211> 20

[0483] <212> DNA

[0484] <213> 人工(Artificial)

[0485] <220>

[0486] <223> 引物

[0487] <400> 32

[0488] cttcggtctg gtgtccattt 20

[0489] <210> 33

[0490] <211> 22

[0491] <212> DNA

[0492] <213> 人工(Artificial)

[0493] <220>

[0494] <223> 引物

[0495] <400> 33

[0496] tgaaccatcc aacgacaatc ta 22

[0497] <210> 34

[0498] <211> 21

[0499] <212> DNA

[0500] <213> 人工(Artificial)

[0501] <220>

[0502] <223> 引物

[0503] <400> 34

[0504] cttgctgagg taccatgttc t 21

[0505] <210> 35

[0506] <211> 32

[0507] <212> PRT

[0508] <213> 人工(Artificial)

[0509] <220>

[0510] <223> SBD肽

[0511] <400> 35

[0512] Ala Pro Gly Leu Pro Asn Gly Leu Leu Ser Gly Asp Glu Asp Phe Ser

[0513] 1 5 10 15

[0514] Ser Ile Ala Asp Met Asp Phe Ser Ala Leu Leu Ser Gln Ile Ser Ser

[0515] 20 25 30

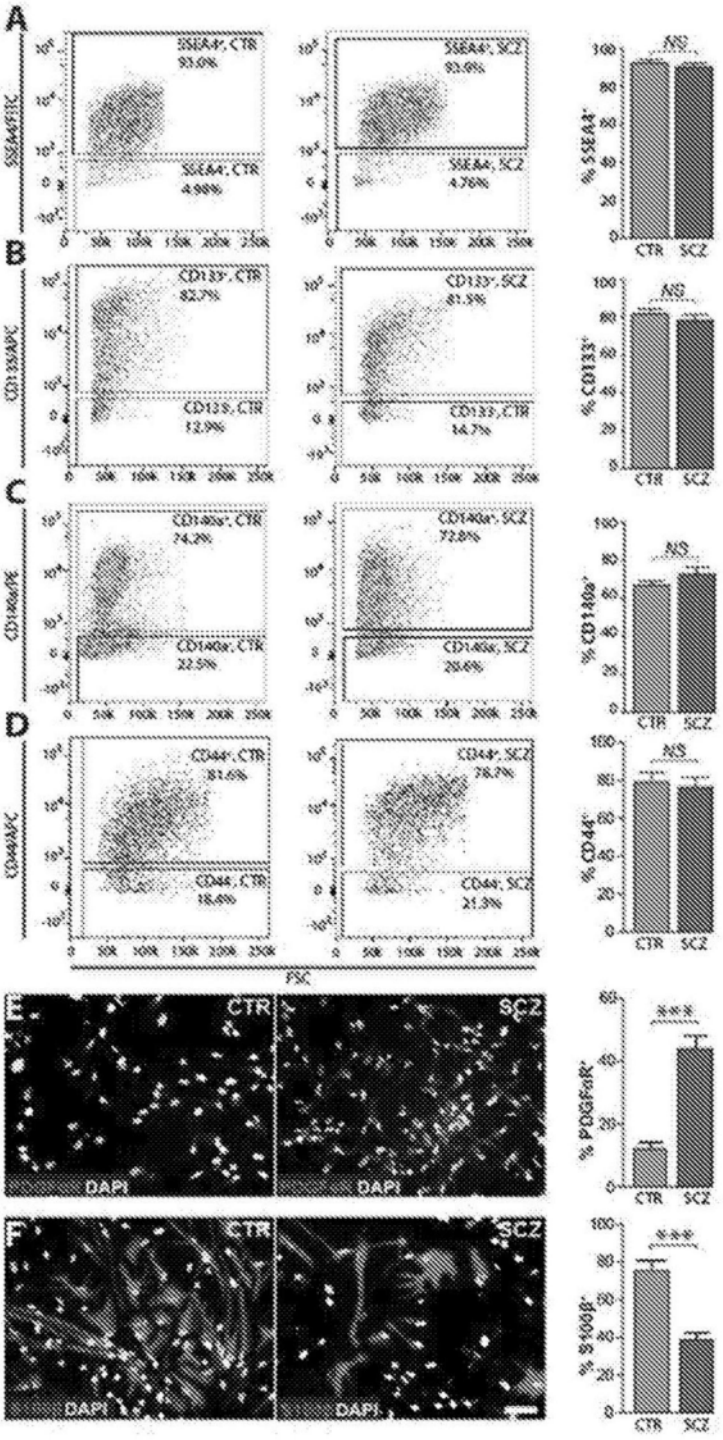

A
SSEA4-FITC
SSEA4+, CTR
93.0%
SSEA4-, CTR
4.98%
SSEA4+, SCZ
93.6%
SSEA4-, SCZ
4.76%
% SSEA4+
NS
CTR
SCZ
B
CD133-APC
CD133+, CTR
82.7%
CD133-, CTR
12.9%
CD133+, SCZ
81.5%
CD133-, SCZ
14.7%
% CD133+
NS
C
CD140a-PE
CD140a+, CTR
74.2%
CD140a-, CTR
22.5%
CD140a+, SCZ
72.8%
CD140a-, SCZ
20.6%
% CD140a+
NS
D
CD44-APC
CD44+, CTR
81.6%
CD44-, CTR
18.6%
CD44+, SCZ
78.7%
CD44-, SCZ
21.3%
% CD44+
NS
FSC
E
CTR
SCZ
DAPI
% PDGFαR+
***
F
CTR
SCZ
DAPI
% S100β+
***

图1

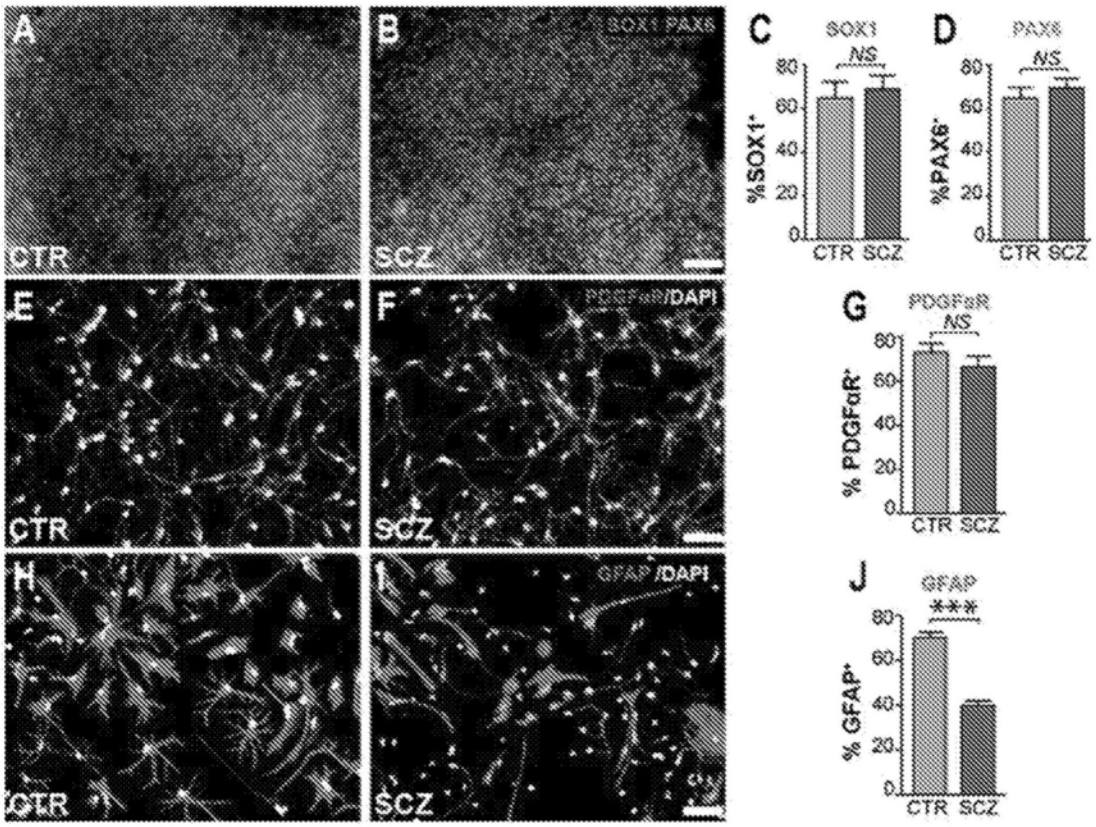

A
CTR
B
SOX1 PAX6
SCZ
C
SOX1
NS
%SOX1+
80
60
40
20
0
CTR SCZ
D
PAX6
NS
%PAX6+
80
60
40
20
0
CTR SCZ
E
CTR
F
PDGFαR/DAPI
SCZ
G
PDGFαR
NS
% PDGFαR+
80
60
40
20
0
CTR SCZ
H
CTR
I
GFAP/DAPI
SCZ
J
GFAP
***
% GFAP+
80
60
40
20
0
CTR SCZ

图2

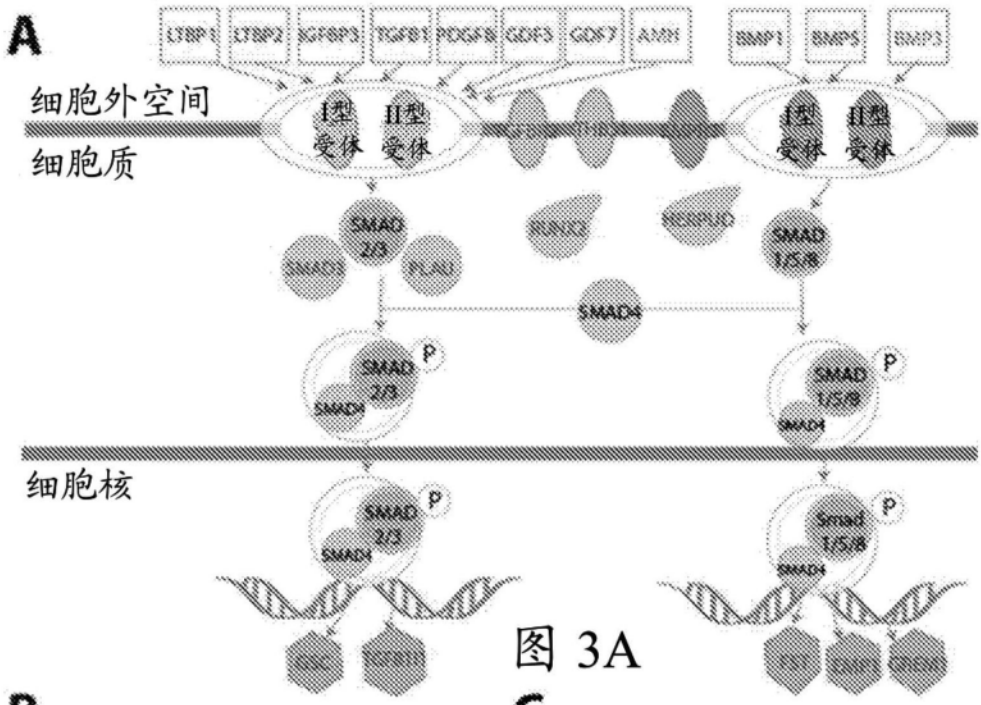


图 3A

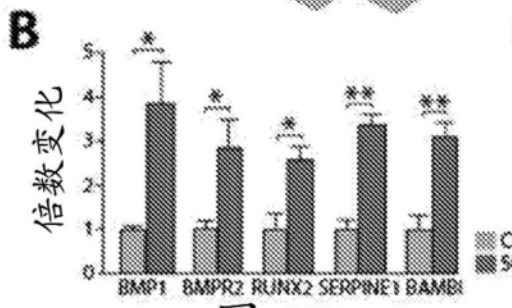


图 3B

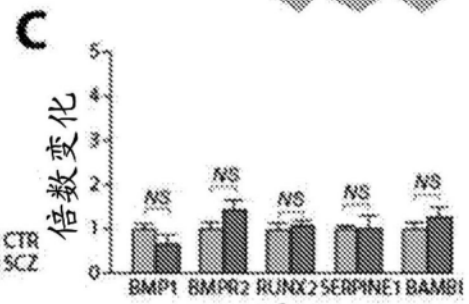


图 3C

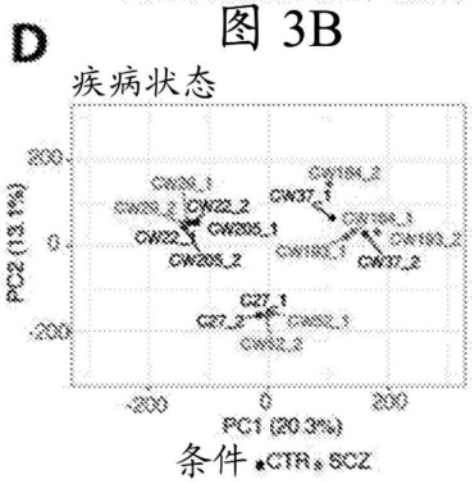


图 3D

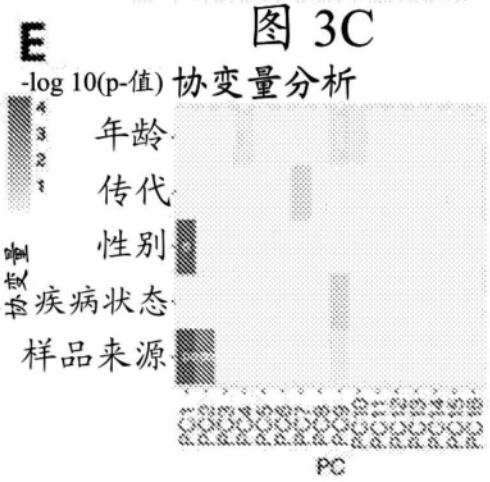


图 3E

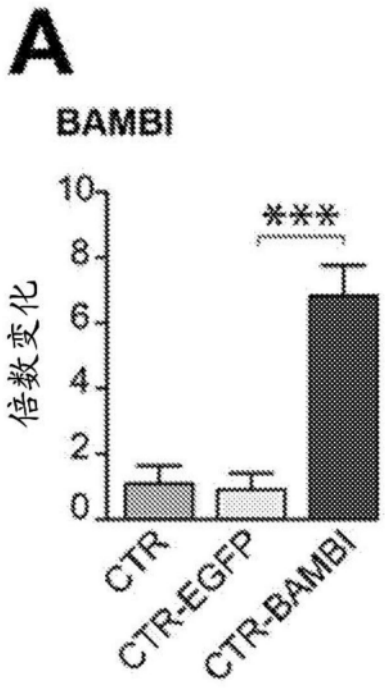

A
BAMBI
倍数变化
10
8
6
4
2
0
***
CTR
CTR-EGFP
CTR-BAMBI

图4A

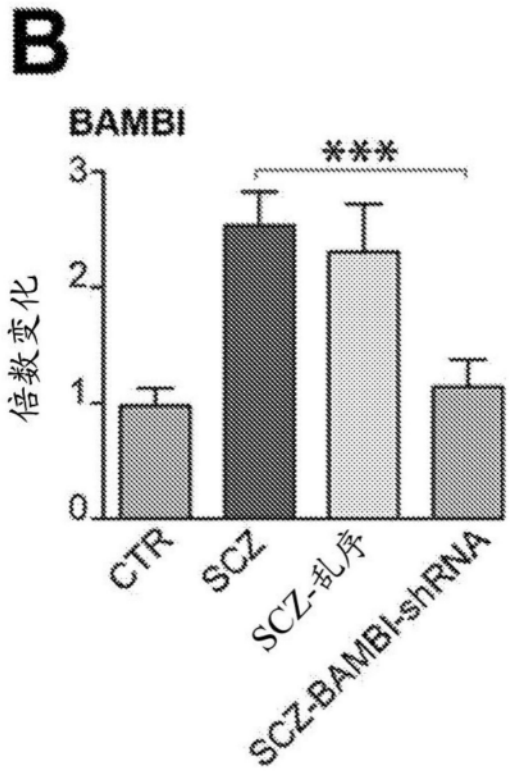

B
BAMBI
倍数变化
3
2
1
0
***
CTR
SCZ
SCZ-乱序
SCZ-BAMBI-shRNA

图4B

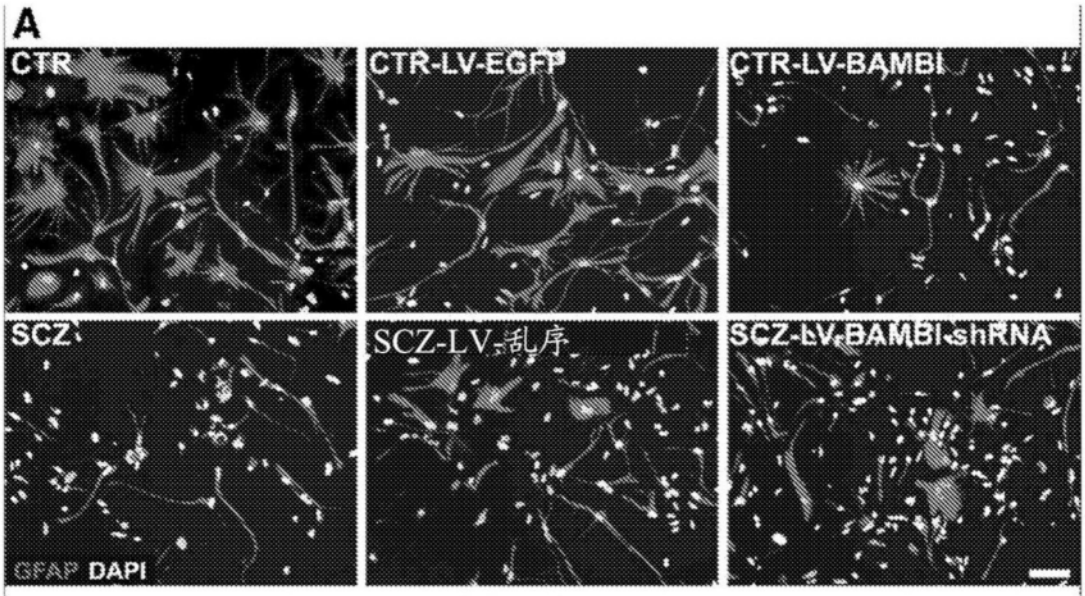

A
CTR
CTR-LV-EGFP
CTR-LV-BAMBI
SCZ
SCZ-LV-乱序
SCZ-LV-BAMBI-shRNA
GFAP DAPI

图 5A

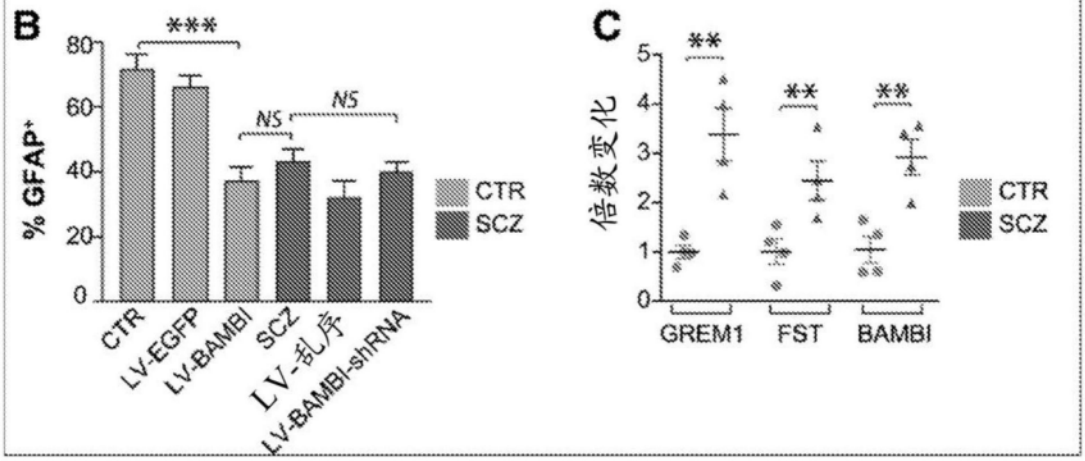

B
% GFAP+
***
NS
NS
CTR
LV-EGFP
LV-BAMBI
SCZ
LV-乱序
LV-BAMBI-shRNA
C
倍数变化
**
**
**
GREM1
FST
BAMBI
CTR
SCZ

图 5B

图 5C

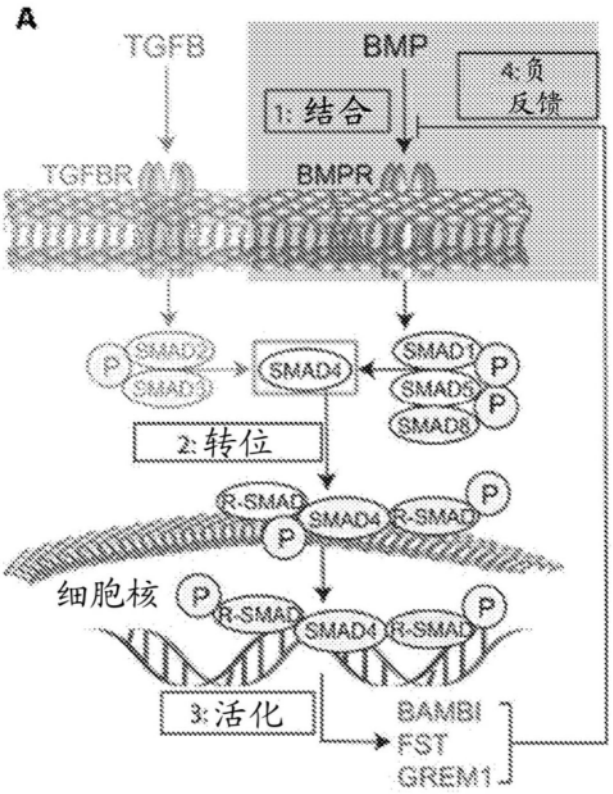

A
TGFB
BMP
4:负
反馈
1:结合
TGFBR
BMPR
SMAD2
SMAD3
SMAD4
SMAD1
SMAD5
SMAD8
2:转位
R-SMAD
SMAD4
R-SMAD
细胞核
3:活化
BAMBI
FST
GREM1

图6A

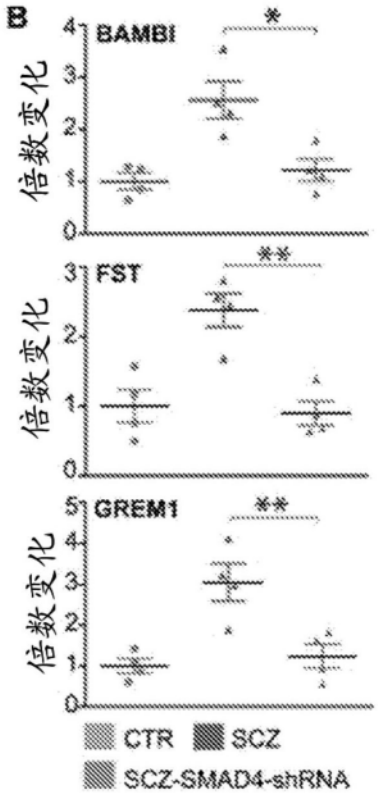

B
BAMBI
FST
GREM1
倍数变化
CTR
SCZ
SCZ-SMAD4-shRNA

图6B

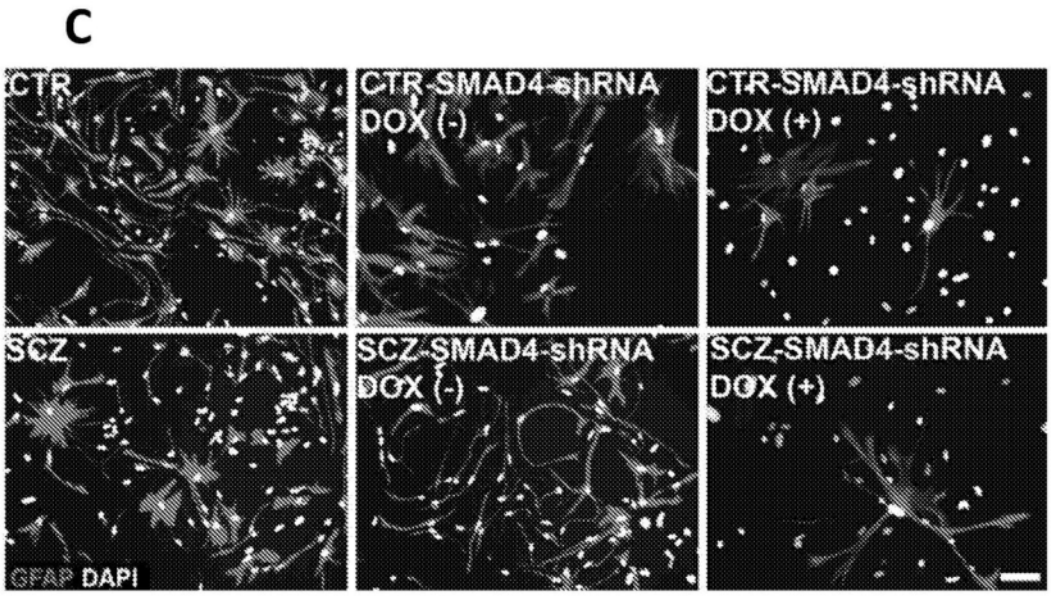

C
CTR
CTR-SMAD4-shRNA DOX (-)
CTR-SMAD4-shRNA DOX (+)
SCZ
SCZ-SMAD4-shRNA DOX (-)
SCZ-SMAD4-shRNA DOX (+)
GFAP DAPI

图6C

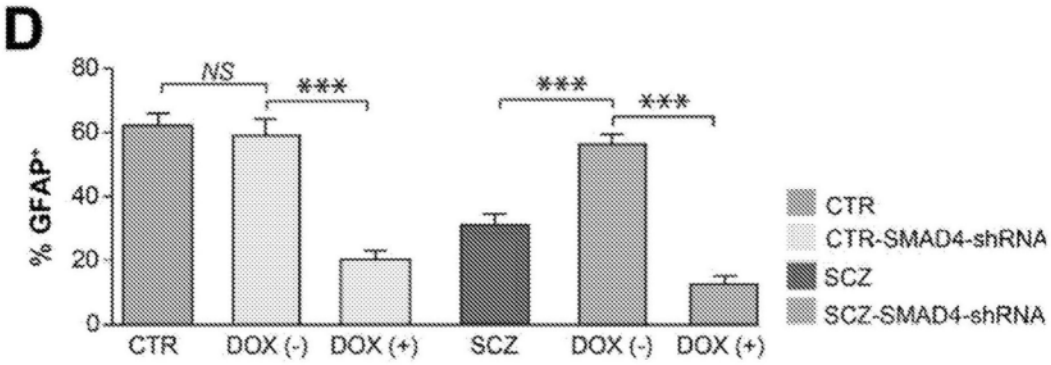

D
% GFAP+
80
60
40
20
0
NS
***
***
***
CTR
DOX (-)
DOX (+)
SCZ
DOX (-)
DOX (+)
CTR
CTR-SMAD4-shRNA
SCZ
SCZ-SMAD4-shRNA

图6D

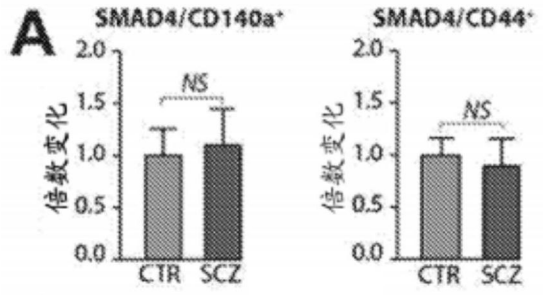

A
SMAD4/CD140a+
SMAD4/CD44+
倍数变化
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
NS
NS
CTR
SCZ
CTR
SCZ

图7A


B
LV-SMAD4-shRNA
感染
GPC
4d
DOX(+)
7d
4周 DOX(+)
% GFAP+
+用于星形胶质细胞诱导的BMP4
4周 DOX(-)
% GFAP+

图7B

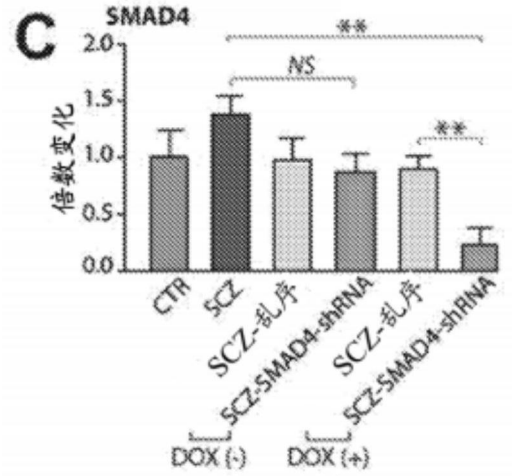

C
SMAD4
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
倍数变化
**
NS
**
CTR
SCZ
SCZ-乱序
SCZ-SMAD4-shRNA
SCZ-乱序
SCZ-SMAD4-shRNA
DOX (-)
DOX (+)

图7C

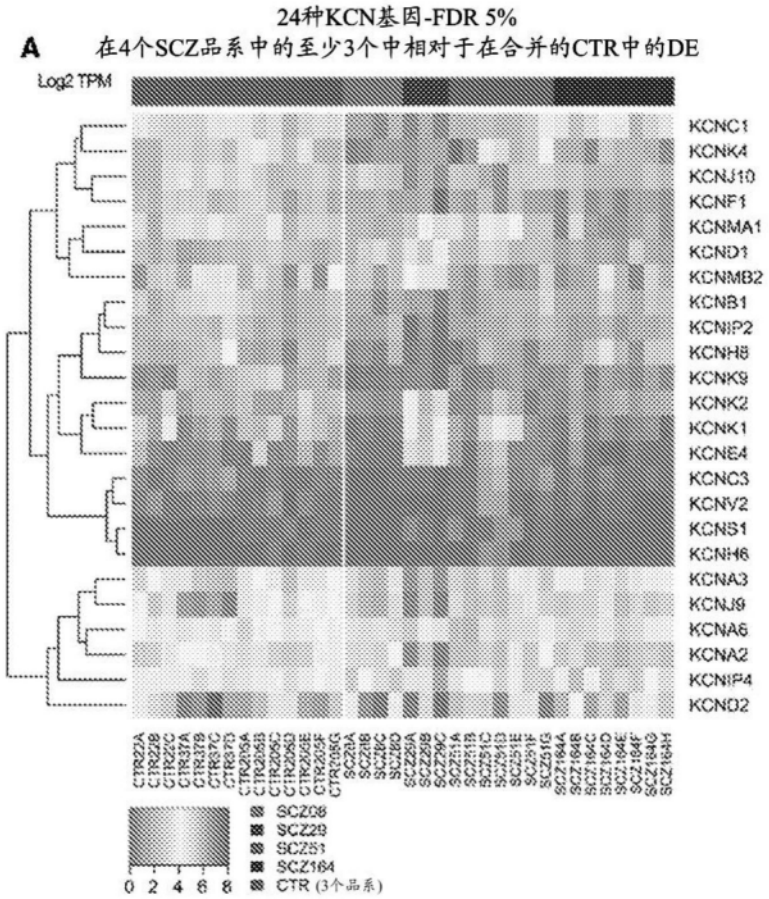

24种KCN基因-FDR 5%
A 在4个SCZ品系中的至少3个中相对于在合并的CTR中的DE
Log2 TPM
KCNC1
KCNK4
KCNJ10
KCNF1
KCNMA1
KCND1
KCNMB2
KCNB1
KCNIP2
KCNH8
KCNK9
KCNK2
KCNK1
KCNE4
KCNC3
KCNV2
KCNS1
KCNH6
KCNA3
KCNJ9
KCNA6
KCNA2
KCNIP4
KCND2
SCZ06
SCZ29
SCZ51
SCZ164
CTR (3个品系)
0 2 4 6 8

图8A

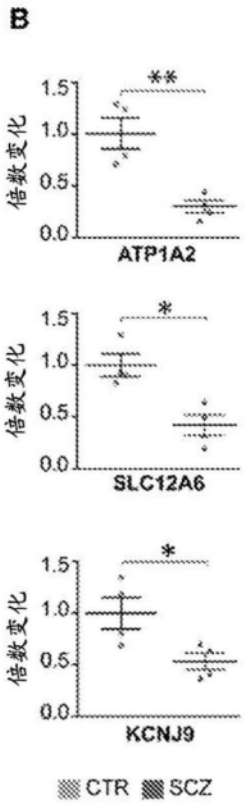

B
**
*
*
1.5
1.0
0.5
0.0
倍数变化
ATP1A2
SLC12A6
KCNJ9
CTR
SCZ

图8B

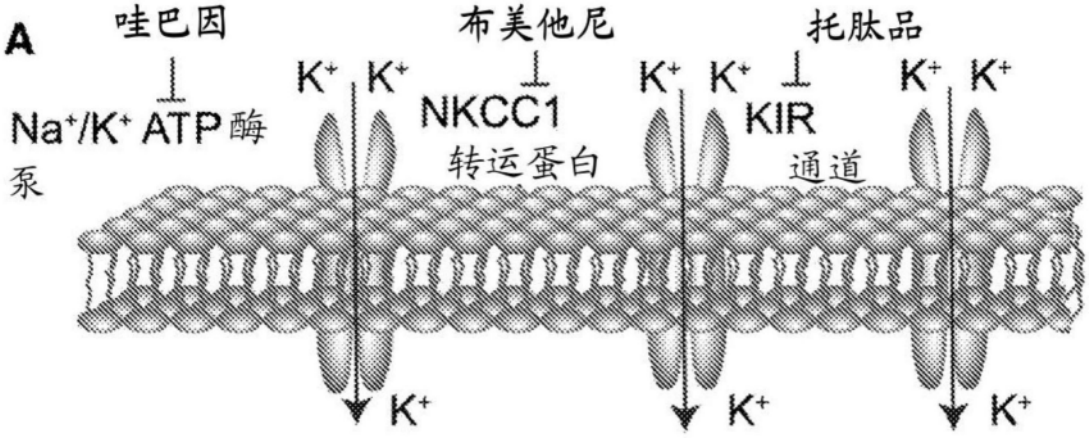

A
哇巴因
布美他尼
托肽品
Na+/K+ ATP酶
泵
NKCC1
转运蛋白
KIR
通道
K+

图9A

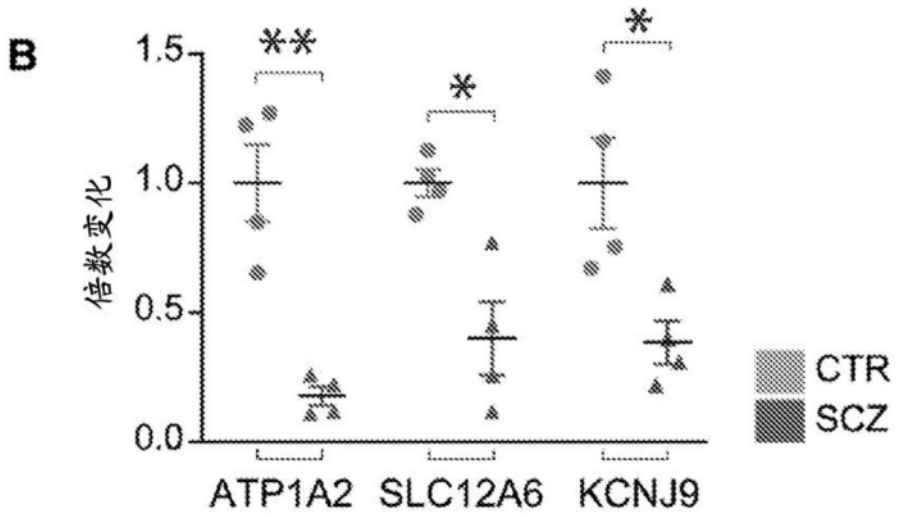

B
1.5
1.0
0.5
0.0
倍数变化
**
*
*
ATP1A2
SLC12A6
KCNJ9
CTR
SCZ

图9B

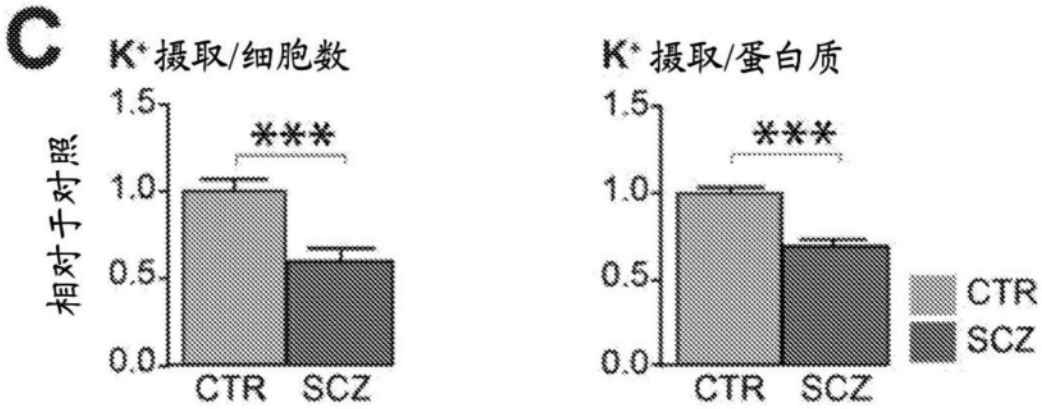

C
K+摄取/细胞数
相对于对照
1.5
1.0
0.5
0.0
***
CTR
SCZ
K+摄取/蛋白质
1.5
1.0
0.5
0.0
***
CTR
SCZ
CTR
SCZ

图9C

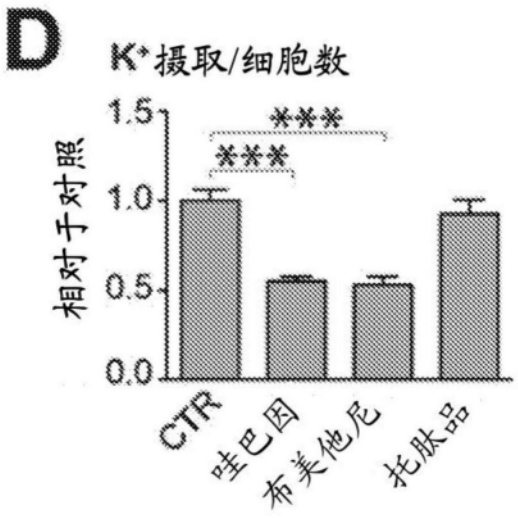

D
K+摄取/细胞数
相对于对照
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
CTR
哇巴因
布美他尼
托肽品

图9D

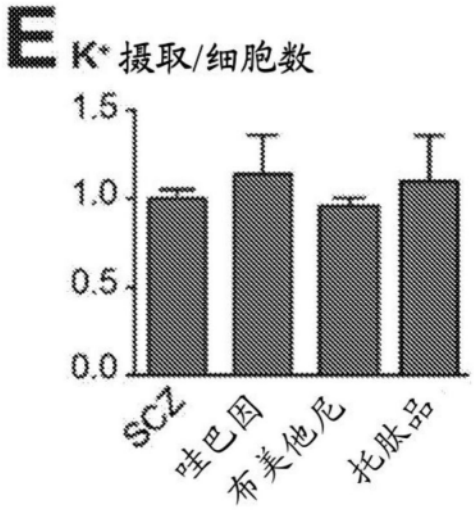

E
K+摄取/细胞数
1.5
1.0
0.5
0.0
SCZ
哇巴因
布美他尼
托肽品

图9E

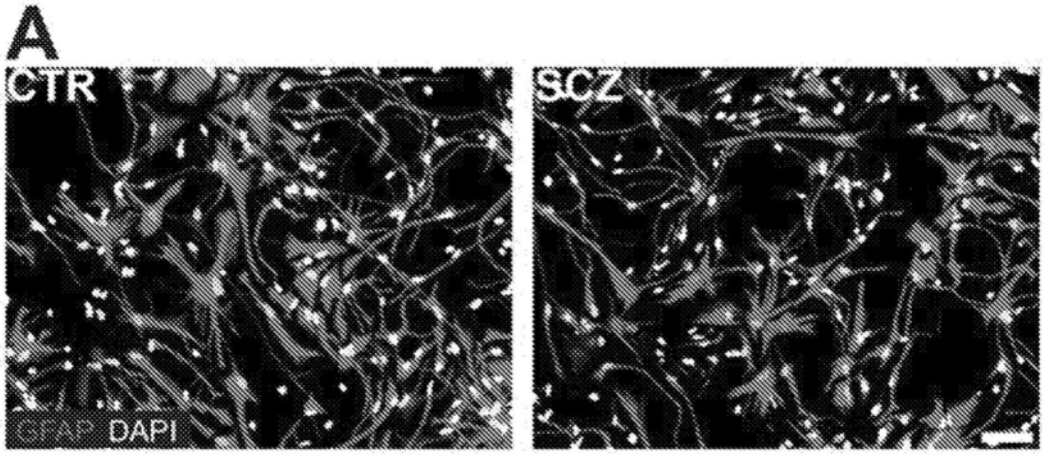


图10A

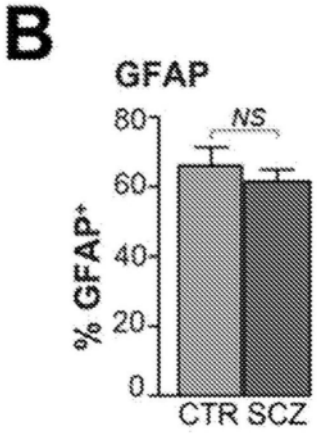


图10B

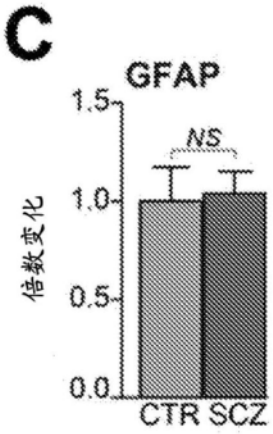


图10C