

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024 年 12 月 12 日 (12.12.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/251119 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 5/0797 (2010.01) *C12N 15/867* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) *A61K 35/545* (2015.01)
C12N 15/12 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/097338

(22) 国际申请日: 2024 年 6 月 4 日 (04.06.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202310657355.7 2023年6月5日 (05.06.2023) CN

(71) 申请人: 士泽生物医药(苏州)有限公司
(**XELLSMART BIOMEDICAL (SUZHOU) CO., LTD**)
[CN/CN]; 中国江苏省苏州市中国(江苏)自由
贸易试验区苏州片区苏州工业园区金谷

路 99 号生物医药产业园三期 B 区项目 3 号
楼 201 单元, Jiangsu 210008 (CN)。

(72) 发明人: 李翔(**LI, Xiang**); 中国江苏省苏州市中国(江
苏)自由贸易试验区苏州片区苏州工业园区金谷路
99 号生物医药产业园三期 B 区项目 3 号楼 201 单元,
Jiangsu 210008 (CN)。朱珉喆(**ZHU, Minzhe**); 中国
江苏省苏州市中国(江苏)自由贸易试验区苏州片
区苏州工业园区金谷路 99 号生物医药产业园三期
B 区项目 3 号楼 201 单元, Jiangsu 210008 (CN)。

(74) 代理人: 北京市道可特律师事务所 (**BEIJING
DOCVIT LAW FIRM**); 中国北京市朝阳区东
三环中路 5 号财富金融中心 56 层 01-2
室, Beijing 100022 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ,

(54) **Title:** IMMUNE-PRIVILEGED NERVE CELL DIFFERENTIATED FROM INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL AND
USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种免疫豁免性诱导性多能干细胞分化的神经细胞及其应用

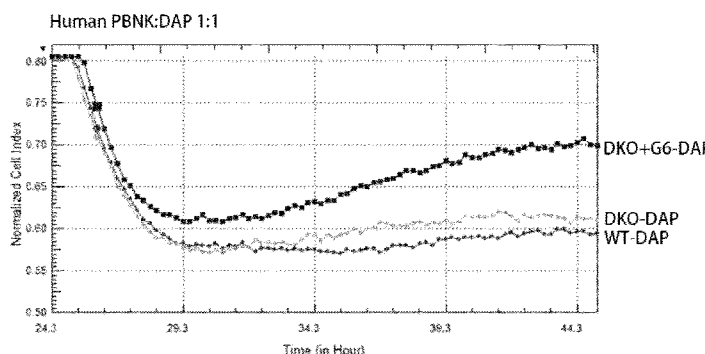


图 9

(57) **Abstract:** Disclosed in the present invention are an immune-privileged nerve cell differentiated from an induced pluripotent stem cell and the use thereof. In the present invention, an induced pluripotent stem cell obtained by means of inactivating the major histocompatibility complex HLA-I and II genes and then overexpressing fusion protein XSG006 constructed from CD47 and CD24 functional domains is differentiated to obtain a separated dopaminergic neural precursor cell with low immunogenicity. The neural precursor cell can escape from T cell attacks, and further escape from NK cell and macrophage killings. The neural precursor cell also effectively escapes from the attack of immune system in vivo. In a Parkinson's disease mouse model and a Parkinson's disease non-human primate (NHP) model, the neural precursor cell can continuously survive and have activity for a long time in a host, and fundamentally reverse Parkinson's disease. The neural precursor cell provides an experimental basis and a theoretical basis for establishing a PD treatment strategy and designing a new stem cell therapeutic drug.

[见续页]



IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN,
MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,
PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚
(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR,
HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO,
PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN,
TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(57) 摘要: 本发明公开了一种免疫豁免性诱导性多能干细胞分化的神经细胞及其应用。本发明在诱导性多能干细胞中失活主要组织相容性复合体HLA-I和II类基因后, 过表达由CD47和CD24的功能结构域构建的融合蛋白XSG006, 获得的诱导性多能干细胞经分化, 得到分离的低免疫原性多巴胺能神经前体细胞, 可在逃逸T细胞攻击的基础上, 进一步逃逸NK细胞及巨噬细胞(Macrophage)的杀伤。并且在体内有效逃逸免疫系统的攻击。在小鼠帕金森氏病模型和非人灵长类(NHP)帕金森氏病模型中能够持续在宿主体内长时间存活并产生活性, 从根本上逆转帕金森病。为建立PD治疗策略和设计新型干细胞治疗药物提供实验依据和理论基础。

一种免疫豁免性诱导性多能干细胞分化的神经细胞及其应用

相关申请的交叉引用

本申请要求 2023 年 06 月 05 日向中国国家知识产权局提交的专利申请号为 202310657355.7, 发明名称为“一种免疫豁免性诱导性多能干细胞分化的神经细胞及其应用”的在先申请的优先权, 该件在先申请的全文通过引用的方式结合于本发明中。

技术领域

本发明属于基因工程与干细胞技术交叉领域, 具体涉及一种免疫豁免性诱导性多能干细胞分化的神经细胞及其应用。

背景技术

干细胞是一类具备自我更新能力及向特定功能体细胞分化能力的“种子”细胞, 依据干细胞特性的程度差异, 主要将干细胞分为: 全能干细胞 (Totipotent stem cells)、多能干细胞 (Pluripotent stem cells, PSCs) 和成体干细胞 (Adult stem cell)。人类胚胎干细胞 (hESC) 和诱导性多能干细胞 (iPSC) 具有无限增殖、自我更新和分化到各种类型细胞的潜力, 在治疗癌症、神经、心血管等相关疾病方面具有良好的应用前景。

神经科学和再生医学的研究, 是国际前沿的重要研究领域; 目前大多数老龄化相关的退行性疾病并无实质临床解决方案, 巨大的市场需求尚未被满足。在中国迈向老龄化社会的大背景下, 神经退行性疾病的研究显得愈发重要。帕金森氏症(PD) 是一种严重的神经退行性疾病, 其总体发病率仅次于阿尔茨海默氏病(AD)。中脑黑质多巴胺能神经元的进行性丢失是 PD 发生的主要病理特征。提供细胞移植, 让移植的多巴胺能神经元(DAP)替代脑内丢失的多巴胺能神经元而发挥作用, 被认为是治疗 PD 的有效疗法。人多能干细胞可在体外高效分化成为多巴胺神经前体细胞, 因此是用于细胞移植疗法治疗帕金森氏症的合适细胞来源。

通过细胞的体外培养或干细胞的诱导分化, 能够在体外大量的再生健康的功能细胞, 从而通过异体功能细胞移植治疗以帕金森病为代表的重大神经系统疾病, 比如脊髓损伤、颅脑外伤等。但是, 免疫不相容和移植细胞遭受的免疫排斥仍然是其临床应用的关键障碍。移植自体细胞治疗可以回避免疫排斥问题, 但自体 iPS 分化细胞治疗技术步骤繁琐, 造价昂贵, 耗费时间, 患者需等待较长时间才能获得治疗, 而异体 iPS 分化细胞治疗面临

移植物受到免疫系统排斥问题、长期服用免疫抑制剂对患者将产生严重毒副作用。

因此急需开发以不依赖于免疫抑制剂的低免疫原性 iPS 衍生细胞药(即通用型 iPS 衍生细胞药) 疗法, 满足再生医学的细胞的需要。

发明内容

针对现有技术所存在的不足, 本发明通过敲除诱导性多能干细胞(iPSC)内质网中 β -2-微球蛋白(B2M)和敲除 MHC-II 基因转录的正调节因子 CIITA, 成功构建 B2M/CIITA 双等位基因敲除阳性克隆(DKO 细胞); 然后使用慢病毒载体在 DKO 细胞中过表达基于 CD47 和 CD24 结构域融合的新基因, 由此获得的诱导性多能干细胞可在逃逸 T 细胞攻击的基础上, 进一步逃逸 NK 细胞的杀伤。该细胞经过分化, 得到分离的免疫豁免性多巴胺能神经细胞。所述多巴胺能神经细胞能够显著减少或逃逸免疫系统的识别和攻击, 尤其是自然杀伤细胞、巨噬细胞等的攻击, 有效地治疗帕金森病。

为了实现上述目的, 本发明采用如下技术方案:

第一方面, 本发明提供一种从免疫豁免性诱导性多能干细胞(即低免疫原性 iPS 细胞)分化的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞, 包含:

- 1) HLA-I 和 HLA-II 人类白细胞抗原的表达降低或不表达;
- 2) 表达由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白;

所述细胞能逃逸 T 细胞攻击及 NK 细胞的杀伤。

在某些方面, 所述免疫豁免性诱导性多能干细胞中使用基因编辑工具(诸如 TALEN 和/或 CRISPR 系统)靶向编码 HLA-I 的一种或多种转录调节因子的一个或多个基因, 以及编码 HLA-II 的一种或多种转录调节因子的一个或多个基因, 来实现 HLA-I 和 HLA-II 基因的表达降低或不表达。

在某些实施方式中, 为实现 HLA-I 和 HLA-II 基因的表达降低或不表达, 所述 HLA-I 的转录调节因子可优选自: B2M、TAP1、TAP2、TAP 相关糖蛋白(Tapasin)或 NLRC5 中的一个或多个; 所述 HLA-II 的转录调节因子可优选自: CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP 中的一个或多个;

根据本发明, 所述转录调节因子优选 B2M 和 CIITA。

在某些实施方式中, 所述免疫豁免性诱导性多能干细胞还包括通过选择性灭活 CIITA 基因的稀有切割核酸内切酶靶向 CIITA 基因的遗传修饰。

在某些实施方式中, 所述免疫豁免性诱导性多能干细胞还包括通过选择性灭活 B2M

基因的稀有切割核酸内切酶靶向 B2M 基因的遗传修饰。

在某些实施方式中，其中通过稀有切割内切核酸酶靶向 CIITA 基因或 B2M 基因的遗传修饰包括 CAS 蛋白或编码 CAS 蛋白的多核苷酸，和至少一个用于特异性靶向 CIITA 基因或 B2M 基因的导向核糖核酸序列。

在具体的实施方式中，使用 CRISPR/CAS9 系统分别对 B2M 和 CIITA 外显子区段进行两端直接敲除，其中，针对 B2M 基因的 gRNA 的靶序列为 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3，针对 CIITA 基因的 gRNA 的靶序列为 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5。

在某些方面，所述免疫豁免性诱导性多能干细胞中通过引入针对编码 HLA-I 的一种或多种转录调节因子的一个或多个基因，或编码 HLA-II 的一种或多种转录调节因子的一个或多个基因的基因表达修饰分子，来实现 HLA-I 和/或 HLA-II 基因的表达降低或不表达，其中所述基因表达修饰分子包括选自 siRNA，shRNA，microRNA，反义 RNA 和另一种 RNA 介导的抑制分子中的一种。

在某些方面，所述包含 CD47 和 CD24 的功能结构域的融合蛋白中的 CD47 的功能结构域为 CD47 跨膜结构域；优选地，所述 CD47 跨膜结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6-10 任一项所示。

在某些方面，所述包含 CD47 和 CD24 的功能结构域的融合蛋白中的 CD24 的功能结构域为 CD24 的信号肽序列、CD24 成熟肽、CD24 胞外肽、CD24 膜锚定序列、CD24 胞外成熟肽；优选地，所述 CD24 的功能结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11-16 任一项所示。

在某些实施方式中，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47 SIRP α 结合域和 CD24 的膜锚定序列连接。

在某些实施方式中，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47 的 SIRP α 结合域插入至 CD24 的胞外肽和膜锚定序列的链接位点。

在某些实施方式中，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47 链接到 CD24 的胞外肽后。

在某些实施方式中，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD24 成熟肽链接到 CD47 的 SIRP α 结合域后。

在某些实施方式中，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD24 的胞外成熟肽插入到 CD47 的 SIRP α 结合域和跨膜结构域链接点。

在某些实施方式中，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD24

的成熟肽序列和 CD47 跨膜结构域连接；

优选地，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白的氨基酸序列与如 SEQ ID NO:1 所示的序列具有 70% 以上的同源性，例如 80% 以上的同源性，再例如 90% 以上、95% 以上、98% 以上的同源性；

进一步优选地，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

在具体的实施方式中，增加的 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白表达是在所述的免疫豁免性诱导性多能干细胞中将至少一个拷贝的融合蛋白基因导入所述 iPSC 中处于启动子的控制下而产生的。

在某些方面，所述编码上述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白核酸序列可以根据所述融合蛋白的氨基酸序列得到。

在某些方面，所述的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞选自多巴胺能神经前体细胞、多巴胺能神经祖细胞、未成熟的多巴胺能神经细胞和成熟的多巴胺能神经细胞；优选为多巴胺能神经前体细胞。

第二方面，本发明提供一种通过体外分化从免疫豁免性诱导性多能干细胞分化的第一方面所述的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞的方法，其中在免疫豁免性 iPSC 细胞中已消除内源性 β -2 微球蛋白 (B2M) 基因活性和内源性 II 类反式激活因子 (CIITA) 基因活性；并且表达由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白；优选地，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白的氨基酸序列与如 SEQ ID NO:1 所示的序列具有 70% 以上的同源性，例如 80% 以上的同源性，再例如 90% 以上、95% 以上、98% 以上的同源性；进一步优选地，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示；

所述方法包括：

免疫豁免性诱导性多能干细胞分化为低免疫原性多巴胺能神经前体细胞：

(1) 免疫豁免性诱导性多能干细胞的培养：

按照约 10 万每孔的数量将免疫豁免性诱导性多能干细胞以团块的形式在预先包被过 Laminin 的基质上进行铺板，并使用 E8 完全培养基进行细胞培养，培养过程中每隔 4~5 天消化传代；

(2) 低免疫原性多巴胺能神经前体细胞的分化：

S1：分化前一天，将汇合度约为 70%~80% 的免疫豁免性诱导性多能干细胞用

TrypLE 酶消化成单细胞,将细胞以 8000/cm² 的密度接种到预先包被过 Vitronectin(Gibco) 的 6 孔板中,接种培养基为 StemFit 完全培养基,并添加 10 μ M Y27632 组分以促进干细胞存活;

S2: 细胞贴壁生长 24h 后,将培养基更换为第一培养基,作为分化的第 0 天,称为 D0,于 37°C、5% CO₂ 的二氧化碳细胞培养箱中培养 8 天,每两天换液一次;

S3: 在分化的第 9 天,用 Accutase(Innovative)消化细胞,然后用第二培养基重悬细胞,再将 1500 万细胞接种至 T75 悬浮培养瓶中,摇晃均匀后,于 37°C、5% CO₂ 的二氧化碳细胞培养箱中培养 2 天,使细胞在悬浮状态中自发形成神经球,得到中脑底板细胞;

S4: 在分化的第 11 天,将培养基更换为第三培养基,于 37°C、5% CO₂ 的二氧化碳细胞培养箱中培养 5 天,每 2.5 天换液一次,得到多巴胺能神经祖细胞;

S5: 在分化的第 16 天,将培养基更换为第四培养基,并将 500 万神经球细胞做贴壁处理,贴于 Vitroectin(Gibco)预先包被的 T75 培养瓶中继续培养,于 37°C、5% CO₂ 的二氧化碳细胞培养箱中培养 7 天,每 2.5 天换液一次;

S6: 在分化的第 23 天,用 Accutase(Innovative)消化细胞,然后用第五培养基重悬细胞,再将 1500 万细胞接种至 T75 悬浮培养瓶中,摇晃均匀后,于 37°C、5% CO₂ 的二氧化碳细胞培养箱中培养一天,使细胞在悬浮状态中自发形成神经球,得到多巴胺能神经前体细胞(DAP 细胞);

其中,第一培养基为含有 1 μ M -20 μ M SB431542、1 μ M -3 μ M DMH1、0.2 μ M -1 μ M CHIR99021 和 1 μ M -1.75 μ M SAG 的神经基础培养基;

优选地,第一培养基为含有 10 μ M SB431542、2 μ M DMH1、0.6 μ M CHIR99021 和 1 μ M SAG 的神经基础培养基;

第二培养基为含有 5 μ M -15 μ M Y27632、1 μ M -20 μ M SB431542、1-3 μ M DMH1、0.2 μ M -1 μ M CHIR99021 和 1 μ M -1.75 μ M SAG 的神经基础培养基;

优选地,第二培养基为含有 10 μ M Y27632、10 μ M SB431542、2 μ M DMH1、0.6 μ M CHIR99021 和 1 μ M SAG 的神经基础培养基;

第三培养基为含有 0.8 μ M -1.2 μ M DMH1、0.1 μ M -0.5 μ M SAG 和 80 ng/mL -120ng/mL 成纤维细胞生长因子 8b(FGF8b)的神经基础培养基;

优选地,第三培养基为含有 1 μ M DMH1、0.2 μ M SAG 和 100ng/mL 成纤维细胞生长因子 8b(FGF8b)的神经基础培养基;

第四培养基为含有 0.1 μ M -0.5 μ M SAG 和 80 ng/mL-120ng/mL FGF8b 的神经基础培养基；

优选地，第四培养基为含有 0.2 μ M SAG 和 100ng/mL FGF8b 的神经基础培养基；

第五培养基为含有 5 μ M -15 μ M Y27632、0.1 μ M -0.5 μ M SAG 和 80 ng/mL -120ng/mL FGF8b 的神经基础培养基；

优选地，第五培养基为含有 10 μ M Y27632、0.2 μ M SAG 和 100ng/mL FGF8b 的神经基础培养基；

所述神经基础培养基选自 IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)培养基、Eagle 's Basal Medium(BME)培养基、GMEM 培养基、MEM 培养基、DMEM 培养基、Ham's F-12 培养基、RPMI1640 培养基、Neurobasal 培养基中的至少一种。

优选的，所述神经基础培养基由以下组分组成：98%(v/v)DMEM/F12(Gibco)、1%(v/v)非必须氨基酸(Non-essential amino acid, Gibco)和 1%(v/v) N2 添加剂(N2 supplement, Gibco)。

第三方面，本发明提供一种组合物，所述组合物包含第一方面所述的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞或根据第二方面的方法制备的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞。

在某些方面，所述组合物包含第一方面所述的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞和一种或多种治疗剂，所述治疗剂包含肽、细胞因子、小分子化合物、大分子、ADC、抗体、纳米粒子、生物类似物、mRNA、中药、蛋白、疫苗、检查点抑制剂、丝裂原、生长因子、小 RNA、双链 RNA(double stranded RNA; dsRNA)、单核血细胞、饲养细胞、饲养细胞组分或其置换因子、包含一种或多种所关注多核酸的载体、抗体等。

第四方面，本发明提供一种治疗患有神经退行性疾病或病况的患者的方法，所述方法包括施用包含治疗有效量的本发明第一方面所述的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞或根据第二方面的方法制备的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞或第三方面所述的组合物。

在某些方面，所述方法，其中所述组合物还包含治疗有效的载体。

在某些方面，所述方法，其中所述分离的低免疫性多巴胺能神经细胞在可生物降解的支架上。

在某些方面，所述方法，其中所述施用包括移植或注射。

在某些方面，所述方法，其中所述神经退行性疾病或病况选自帕金森氏病、亨廷顿

氏病和多发性硬化症。

第五方面，本发明提供第一方面所述的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞或根据第二方面的方法制备的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞或第三方面所述的组合物在制备用于神经退行性疾病或病况治疗的产品中的应用。

在某些方面，所述应用，其中所述神经退行性疾病或病况选自帕金森氏病、亨廷顿氏病和多发性硬化症；优选为帕金森氏病。

本发明的有益效果：

1. 本发明在诱导性多能干细胞中失活主要组织相容性复合体 MHC-I 和 II 类基因后，过表达由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白 XSG006，获得的诱导性多能干细胞经分化，得到分离的低免疫原性多巴胺能神经前体细胞，可在逃逸 T 细胞攻击的基础上，进一步逃逸 NK 细胞及巨噬细胞(Macrophage)的杀伤。

2. 本发明分离的低免疫原性多巴胺能神经前体细胞可在体内(人源化小鼠及非人灵长类)有效逃逸免疫系统的攻击。在小鼠帕金森氏病模型中，进行本发明分离的低免疫原性多巴胺能神经前体细胞移植，4 个月后检测结果显示在阿扑吗啡(APO)诱导的旋转实验中小鼠旋转次数有显著降低，且具有统计学意义；在圆筒实验中小鼠右前肢碰壁次数明显提高，基本恢复至造模前水平，且具有统计学意义；在转棒实验中，小鼠在转棒上停留的时间明显提高，且具有统计学意义。在脑组织冰冻切片免疫荧光染色结果中，移植细胞大量存活于移植部位且一定数量分化为多巴胺能神经元。移植 DAP 注射液可明显改善小鼠帕金森病行为并可从根本上促进了纹状体内的移植细胞分化生成多巴胺能神经元以从根本上逆转帕金森病。

3. 在非人灵长类(NHP)帕金森氏病模型中，本发明分离的猴低免疫原性多巴胺能神经前体细胞能够持续在宿主体内长时间存活并产生活性。

4. 对具有完全免疫系统的非人灵长类(NHP)进行同种异体 DAP 细胞移植，相对于猴 WT-DAP 细胞在猴体内存活期短、很快因出现排异反应而消失，猴 DKO+G6-DAP 细胞具有低免疫原性可逃逸免疫系统攻击，在具有完全免疫系统的同种异体猴脑内长期存活。体内安全性检测显示低免疫原性多巴胺能神经前体细胞(DKO+G6-DAP)与未编辑细胞(WT-DAP)相比具有无差异的增殖能力，且均含有极少量的 Ki67，提示体内致癌风险低。而且，低免疫原性 DAP 细胞可在体内分化生成 TH+即有功能的多巴胺能神经元。

附图说明

图 1. B2M 的 CRISPR/CAS9 基因敲除策略示意图。

图 2. CIITA 的 CRISPR/CAS9 基因敲除策略示意图。

图 3. pGC-EF1a 质粒的结构示意图。

图 4. 实施例 1 中使用流式细胞计数器检测各 DAP 细胞中 OCT-4 表达图；

图 5. 实施例 1 中使用流式细胞计数器检测各 DAP 细胞中 FOXA2、PAX6、OTX2、和 LMX1A 表达图；

图 6. 实施例 1 中使用免疫荧光检测各 DAP 细胞中 OTX2、EN1、LMX1A 和 FOXA2 的表达图；

图 7. 实施例 1 中用 INF-gamma 刺激各 DAP 细胞，通过流式细胞计数器检测各种细胞中 HLA-I/II 的表达图；

图 8. 实施例 1 中对构建的 DKO+G6 细胞株及其衍生的 DAP 细胞进行序列 rt-PCR 鉴定。

其中，T 细胞为检测 HLA-I/II 类分子的阳性对照；

图 9. 实施例 2 中使用 RTCA 检测 PBNK 细胞对 WT、DKO 及 DKO+G6 分化的 DAP 细胞的杀伤结果图；

图 10. 实施例 2 中使用 MAC 对 WT、DKO 及 DKO+G6 分化的 DAP 细胞杀伤的照片；

图 11. 实施例 2 中使用 RTCA 检测 MAC 细胞对 WT、DKO 及 DKO+G6 分化的 DAP 细胞的杀伤结果图；

图 12. 实施例 2 中 DKO+G6 分化的 DAP 细胞在人源免疫系统小鼠中的免疫逃逸作用验证结果图；

图 13. 实施例 3 中 PD 小鼠模型移植 WT-DAP 注射液后阿扑吗啡 (APO) 诱导旋转实验结果；

图 14. 实施例 3 中 PD 小鼠模型移植 WT-DAP 注射液后圆筒实验结果；

图 15. 实施例 3 中 PD 小鼠模型移植 WT-DAP 注射液后转棒实验结果；

图 16. 实施例 3 中细胞移植 4 个月的 PD 小鼠脑切片免疫荧光染色结果；

其中 16B 是 16A 中截取部分的 4x、20x、60x 放大。

图 17. 实施例 4 中 PD 猴模型建模成功后 PET-CT 结果展示图。

图 18. 实施例 4 中使用免疫荧光检测各猴干细胞衍生的 DAP 细胞中 OTX2、EN1、LMX1A 和 FOXA2 的表达图；

图 19. 实施例 4 中 WT-DAP(左脑)和 DKO+G6-DAP(右脑)细胞移植前后猴脑部 MRI 结果图;

图 20. 实施例 4 中 WT-DAP 和 DKO+G6-DAP 细胞移植前后 PD 猴左右收采食率统计图;

图 21. 实施例 5 中 WT-DAP 和 DKO+G6-DAP 细胞移植示意图及移植前后猴脑部 MRI 结果图(A); MRI 检测细胞大小统计图(B)。

图 22. 实施例 5 中小鼠脑免疫荧光染色(A), hNA (红) & Ki67 (绿) & DAPI (蓝) 共染, 其中 hNA 染移植细胞, Ki67 标记增殖细胞; 免疫荧光染色统计(B)。

图 23: 实施例 5 中 DKO+G6-DAP 细胞移植 PD-NOG 后脑部免疫荧光染色结果。

具体实施方式

下文将结合具体实施例对本发明的技术方案做更进一步的详细说明。应当理解, 下列实施例仅为示例性地说明和解释本发明, 而不应被解释为对本发明保护范围的限制。凡基于本发明上述内容所实现的技术均涵盖在本发明旨在保护的范围内。

除非另有说明, 以下实施例中使用的原料和试剂均为市售商品, 或者可以通过已知方法制备。下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件如 Sambrook 等人, 分子克隆: 实验室手册 (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件, 或按照制造厂商所建议的条件。

除非另外定义或由背景清楚指示, 否则在本公开中的全部技术与科学术语具有如本公开所属领域的普通技术人员通常理解的含义。

免疫豁免性多能干细胞的详细描述、其产生方法及其使用方法见于 2022 年 7 月 08 日提交的 202210806871.7 和 2023 年 3 月 24 日提交的 PCT/CN2023/083761 中, 包括序列列表、附图和实例的公开内容以引用的方式整体并入本文。

定义

术语“多能细胞”是指可以自我更新并增殖同时保持未分化状态并且可以在适当条件下被诱导以分化为专门的细胞类型的细胞。如本文所用, 术语“多能细胞”涵盖胚胎干细胞和其他类型的干细胞, 包括胎儿、羊膜或体细胞干细胞。示例性的人干细胞系包括 H9 人胚胎干细胞系。其他示例性干细胞系包括可通过 National Institutes of Health Human Embryonic Stem Cell Registry 和 Howard Hughes Medical Institute HUES collection 获得的那些(描述于 Cowan, C. A. 等人, New England J. Med. 350:13 (2004), 其通过引用

整体并入本文)

如本文所用,“多能干细胞”具有分化成三个胚层中任一个的潜力:内胚层(例如,胃连接、胃肠道、肺等)、中胚层(例如,肌肉、骨骼、血液,泌尿生殖组织等)或外胚层(例如表皮组织和神经系统组织)。如本文所用,术语“多能干细胞”还涵盖“诱导多能干细胞”或“iPSC”,其是来源于非多能细胞的一种多能干细胞。亲代细胞的例子包括已经通过各种方式被重新编程以诱导多能的未分化表型的体细胞。这样的“iPS”或“iPSC”细胞可以通过诱导某些调节基因的表达或通过外源施加某些蛋白质来产生。诱导 iPS 细胞的方法是本领域已知的,并在下文进一步描述。(参见例如,Zhou 等人,Stem Cells 27(11):2667-74(2009); Huangfu 等人,Nature Biotechnol. 26(7):795(2008); Woltjen 等人,Nature 458(7239):766-770(2009); 和 Zhou 等人,Cell Stem Cell 8:381-384(2009); 每篇文献均通过引用整体并入本文)。

如本文所用,术语“受试者”或“患者”是指任何动物,例如家养动物、动物园动物或人。“受试者”或“患者”可以是哺乳动物,如狗、猫、鸟、家畜或人。“受试者”和“患者”的具体例子包括但不限于患有与肝脏、心脏、肺、肾脏、胰腺、脑、神经组织、血液、骨骼、骨髓等相关的疾病或病症的个体(特别是人)。

在本文中,“免疫豁免性诱导性多能干细胞”是指保留其多能特征并且当转移到同种异体宿主中时引起减少的免疫排斥反应的多能细胞。在优选的实施方案中,所述细胞不引起免疫反应。因此,“免疫豁免性”是指与本文概述的免疫工程化之前的亲代(即“野生型”或“wt”)细胞的免疫反应相比,显著降低或消除的免疫反应。在许多情况下,该细胞在免疫学上是低免疫原性的,但仍保留了多能性及分化潜能。

“HLA”或“人白细胞抗原”复合物是编码人中主要组织相容性复合物(MHC)蛋白的基因复合物。构成 HLA 复合物的这些细胞表面蛋白负责调节对抗原的免疫反应。在人中,有两种 MHC,即 I 类和 II 类,“HLA-I”和“HLA-II”。HLA-I 包括三种蛋白质,即 HLA-A、HLA-B 和 HLA-C,它们从细胞内部呈递肽,而 HLA-I 复合物呈递的抗原吸引杀伤性 T 细胞(也称为 CD8+T-细胞或细胞毒性 T 细胞)。HLA-I 蛋白与 β -2 微球蛋白(B2M)相关。HLA-II 包括五种蛋白质,即 HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOB、HLA-DQ 和 HLA-DR,它们将抗原从细胞外呈递给 T 淋巴细胞。这刺激 CD4+细胞(也称为 T 辅助细胞)。应当理解,“MHC”或“HLA”的使用并不意味着是限制性的,因为它取决于基因是来自人(HLA)还是鼠(MHC)。因此,由于它涉及哺乳动物细胞,这些术语在本文中可以互换使用。

本文中“CD47”又称为整合素相关蛋白(integrin-associated protein, IAP), 广泛的表达于各种细胞的表面, 可与信号调节蛋白 α (SIRP α)、血小板反应蛋白-1(TSP-1)相互作用, 在介导某些心血管疾病的氧化应激反应及免疫修复过程发挥着重要的作用。CD47作为膜蛋白免疫球蛋白超家族的成员, 含有3个组分: 氨基端胞外免疫球蛋白可变结构域(IgV)样结构域、5个结构域跨膜区域和羧基末端剪接变异细胞质尾部。

本文中“CD24”全称为 cluster of differentiation 24, 又称热稳定抗原, 是一种高度糖基化的糖基磷脂酰肌醇锚定表面蛋白, 已知与先天免疫细胞上的 Siglec-10 (sialic-acid-binding Ig-like lectin10) 相互作用, 以抑制响应感染、败血症、肝损伤和慢性移植物抗宿主疾病的破坏性炎症反应, CD24 是一种小分子量的唾液酸糖蛋白, 由 31 个氨基酸组成, 具有典型的黏蛋白结构, 通过其糖基化酰肌醇(GPI)锚定定位于脂筏中。

本文的“基因敲除”是指使特定基因在其所驻留的宿主细胞中失活的过程, 导致不产生感兴趣的蛋白质或形成失活形式。如本领域技术人员将理解的并且在下文中进一步描述, 这可以通过许多不同的方式来完成, 包括从基因中去除核酸序列, 或用其他序列中断序列, 改变阅读框, 或改变核酸的调节组分。例如, 感兴趣的基因的编码区的全部或部分可以被去除或被“无义”序列替代, 调节序列如启动子的全部或一部分可以被去除或替代, 翻译起始序列可以被去除或替代等。

本文中的“基因敲入”是指向宿主细胞增加遗传功能的过程。这导致编码的蛋白的水平增加。如本领域技术人员将理解的, 这可以通过几种方式来实现, 包括将基因的一个或多个其他拷贝添加至宿主细胞或改变内源基因的调节组分, 从而增加蛋白质的表达。这可以通过修饰启动子、添加不同的启动子、添加增强子或修饰其他基因表达序列来实现。

本文中的“同种异体”是指宿主生物和细胞移植物的遗传不相似性, 其中产生免疫反应。

在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中, 术语“同一性”百分比是指当就最大对应性进行比较和比对时具有指定百分比的相同核苷酸或氨基酸残基的两个或更多个序列或子序列, 如使用下文描述的序列比较算法之一(例如, BLASTP 和 BLASTN 或本领域技术人员可用的其他算法)或通过目视检查测量的。取决于应用, “同一性”百分比可以存在于被比较的序列的区域上, 例如存在于功能结构域上, 或者可替代地存在于要被比较的两个序列的全长上。对于序列比较, 通常将一个序列用作与测试序列进行比较的参考序列。使用序列比较算法时, 将测试序列和参考序列输入计算机, 必要时指定子

序列坐标，并指定序列算法程序参数。然后，序列比较算法基于指定的程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

用于比较的序列的最佳比对可以例如通过 Smith&Waterman ,*Adv .Appl .Math .*2:482(1981)的局部同源性算法，通过 Needleman&Wunsch ,*J .Mol .Biol .*48:443(1970)的同源性比对算法，通过 Pearson&Lipman ,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444(1988)的相似性搜寻方法，通过这些算法的计算机实施(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575Science Dr. , Madison, Wis.中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA)或通过目视检查(一般参见 Ausubel 等人，见下文)来进行。

BLAST 算法是适合确定序列同一性和序列相似性百分数的算法的一个例子，其描述于 Altschul 等人,*J .Mol .Biol .*215:403-410(1990)。可通过美国国家生物技术信息中心 (www.ncbi.nlm.nih.gov/)公开获得用于进行 BLAST 分析的软件。

“同源物”是在核苷酸序列、肽序列、功能或结构水平上与参考分子相似的生物活性分子。同源物可以包括与参考序列具有一定百分比同一性的序列衍生物。因此，在一个实施方案中，同源或衍生序列共有至少 70%的序列同一性。在一个具体的实施方案中，同源或衍生序列共有至少 80%或 85%的序列同一性。在一个具体的实施方案中，同源或衍生序列共有至少 90%的序列同一性。在一个具体的实施方案中，同源或衍生序列共有至少 95%的序列同一性。在一个更具体的实施方案中，同源或衍生序列共有至少 50、55、60、65、70、75、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99%的序列同一性。同源或衍生核酸序列也可以通过它们在高严格性杂交条件下保持与参考核酸序列结合的能力来定义。与参考分子具有结构或功能相似性的同源物可以是参考分子的化学衍生物。检测、产生和筛选结构和功能同源物以及衍生物的方法是本领域已知的。

本文中的“多巴胺能神经前体细胞”通常是指能够在体外或体内增殖和/或分化为多巴胺能神经元的细胞。多巴胺能神经前体细胞可以来自中脑腹侧神经细胞，可以由多能干细胞分化而来。多巴胺能神经前体细胞也可以从其他细胞类型分化或重编程。

本文中的“多巴胺能神经细胞”是选自多巴胺能神经前体细胞、多巴胺能神经祖细胞、未成熟的多巴胺能神经细胞和成熟的多巴胺能神经细胞；优选为多巴胺能神经前体细胞。

实施例 1. 利用低免疫原性干细胞（即低免疫原性 iPS 细胞）分化为中脑多巴胺能神经前体(DAP)细胞

A、低免疫原性干细胞制备方法以及干细胞体外分化多巴胺能神经前体细胞的方法

将WT、DKO及DKO+G6细胞传代后铺至已预包被Matrigel的培养瓶中，培养24h后换至预分化培养基，诱导细胞向中脑细胞分化；在分化9d后，可获得高纯度的中脑细胞。其后，通过加入神经祖细胞培养基对获得的中脑细胞进行扩增，可获得大量的高纯度的神经祖细胞；最后，再通过加入神经前体细胞培养基，神经祖细胞进一步分化成为神经细胞。该细胞在体外可分化成为多巴胺能神经前体(DAP)细胞。

1. 低免疫原性干细胞制备方法

1.1 细胞培养试剂：

试剂名称	公司
mTeSR™ Plus	Stemcell
TrypLE™ Express 酶（1X），无酚红	ThermoFisher
DPBS，无钙、无镁	ThermoFisher
Matrigel® hESC-Qualified Matrix, *LDEV-Free, 5mL	Corning®
DMEM/F-12, GlutaMAX™ 添加剂	ThermoFisher
Y-27632	Stemcell
TrueCut™ Cas9 Protein v2	ThermoFisher
EasyEdit sgRNA	金斯瑞

1.2 DKO细胞制备方法：

本发明选用了人诱导性多能干细胞（iPSC细胞，人血液PBMC通过CTS™ CytoTune™-iPS 2.1 仙台病毒重编程试剂盒（货号:A34546）重编程为iPSC细胞，即WT细胞），使用CRISPR/CAS9敲除内质网中β-2-微球蛋白（B2M），使细胞表面HLA-I不能形成功能性分子，从而逃逸同种异体CD8+ T细胞的杀伤；逃逸CD4+ T细胞的杀伤则是通过敲除HLA-II基因转录的正调节因子CIITA，而降低HLA-II类分子表达。

其中，B2M的CRISPR/CAS9基因敲除策略如图1所示，使用B2M-gRNA1和B2M-gRNA2对B2M 外显子区段进行两端直接敲除，然后分别使用B2M-F1/R1和B2M-F2/R2两对PCR 引物进行基因组序列敲除验证。

gRNA序列：

B2M-gRNA1: CGTGAGTAAACCTGAATCTT

B2M-gRNA2: AGTCACATGGTTCACACGGC

鉴定引物

B2M-F1: TGGGGCCAAATCATGTAGACTC

B2M-R1: TCAGTGGGGGTGAATTCAGTGT

B2M-F2 + B2M-R2 = 608bp

敲除后: 无条带

B2M-F2: CAGAAGTCCTTGAGAGCCTCC

B2M-R2: TGTGCATCAGTATCTCAGCAGG

B2M-F2 + B2M-R2 = 812 bp

敲除后: 569bp。

另外, CIITA的CRISPR/CAS9基因敲除策略如图2所示, 使用CIITA-gRNA1和CIITA-gRNA2对CIITA外显子区段进行两端直接敲除, 然后分别使用CIITA-F1/R1和CIITA-F2/R2两对PCR引物进行基因组序列敲除验证。

gRNA序列:

CIITA-gRNA1: GATATTGGCATAAGCCTCCC

CIITA-gRNA2: CATCGCTGTTAAGAAGCTCC

鉴定引物:

CIITA-F1: CTGTGCCTCTACCACTTCTATG

CIITA-R1: CCTTCCATGTCACACAACAGCC

CIITA-F1 + CIITA-R1 = 368 bp

敲除后: 无条带

CIITA-F2: TGGAATCCACACTTTCCAGTTC

CIITA-R2: TGGAGTCTCCGTTCCCTCCAG

CIITA-F2 + CIITA-R2 = 889 bp

敲除后: 459bp

具体操作如下:

1) 在Matrigel包被的6孔板上正常使用mTeSR1培养人类诱导性多能干细胞至80%密度。使用TRYPLE消化后加入DMEM/F12中和, 计数。吸取 2×10^6 细胞于EP管中, 离心后弃上清。

2) 根据Neon转染系统100 μ L电转体系, 加入15 μ g TrueCut™ Cas9 Protein+ 3 μ g gRNA (B2MgRNA1 + B2MgRNA2 + CIITA gRNA1 + CIITA gRNA2) 组成RNP体系, 混匀室温下放置20min。

3) 100 μ L RNP电转体系重悬细胞, Neon 转染系统进行电转, 电转参数为1200V, 30ms, 1pause。电转后细胞迅速加入提前预热的培养基, 均匀接种于1孔包被了Matrigel的6孔板中。

4) 每天更换新鲜mTeSR1培养基。待单细胞生长起来, 挑取单个克隆于48孔板内, 待克隆扩增后, 收取基因组样品进行PCR检测基因编辑情况, PCR阳性克隆送公司做Sanger测序进一步验证。

5) 鉴定阳性的B2M/ CIITA双等位基因敲除克隆DKO细胞扩增培养及冻存。

6) 使用下列B2M-F/R和CIITA-F/R引物进行qPCR检测B2M/ CIITA双等位基因敲除克隆DKO的B2M和CIITA在RNA水平的表达情况, 确定敲除。

B2M-F:AAGATGAGTATGCCTGCCGT

B2M-R: ATGCGGCATCTTCAAACCTC

CIITA-F: CCTGGAGCTTCTTAACAGCGA

CIITA-R: TGTGTCGGGTTCTGAGTAGAG。

1.3 DKO+G6制备方法

在1.2制备的 DKO细胞中通过慢病毒感染的方式进行过表达融合蛋白XSG006, 形成融合蛋白稳转细胞株DKO+G6。融合蛋白XSG006由CD47和CD24的功能结构域构建的融合蛋白是将CD24的成熟肽序列和CD47跨膜结构域连接, 其氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYSSETTTGTSSNSSQSTSNSGLAPNPT NATTKAAGGGGSGGGGSGGGGSNILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEK TIALLVAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTS FVIAILVIQVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFV, 直接合成编码XSG006 (XSG006的氨基酸序列如SEQ ID NO: 1所示) 的核酸序列并构建在由EF1a启动, 且带puromycin筛选标记的慢病毒质粒中 (pGC-EF1a), pGC-EF1a质粒的结构如图3所示。质粒用BamHI/NheI 酶切, 连接成功后采用Sanger测序验证插入序列正确性并进行病毒包装。对1.2获得的DKO人类诱导性多能干细胞进行转染后换成带puromycin的培养基进行筛选。XSG006为完全外源序列, 构建的DKO+G6细胞使用PCR检测序列在基因组中的插入情况, DKO细胞为阴性对照, 确认表达无误后进行细胞扩增和后续

功能性检测。

XSG006 F1: CCAGATCTACAGCAGCGAGA

XSG006 R1: GTTCTTCAGGCTGTACTCGC

XSG006 F+XSG006 R=352bp

XSG006 F2: CCAGATCTACAGCAGCGAGA

XSG006 R2: CCAGGATGTAGGCGATCACC

XSG006 F+XSG006 R=488bp

2. 干细胞体外分化多巴胺能神经前体细胞的方法

2.1 人诱导性多能干细胞(WT细胞)、DKO细胞及DKO+G6细胞分化为多巴胺能神经前体细胞的试剂盒, 包含: 第一培养基、第二培养基、第三培养基、第四培养基和第五培养基;

其中, 第一培养基为含有10 μ M SB431542、2 μ M DMH1、0.6 μ M CHIR99021和1 μ M SAG的神经基础培养基;

第二培养基为含有10 μ M Y27632、10 μ M SB431542、2 μ M DMH1、0.6 μ M CHIR99021和1 μ M SAG的神经基础培养基;

第三培养基为含有1 μ M DMH1、0.2 μ M SAG和100ng/mL 成纤维细胞生长因子8b(FGF8b)的神经基础培养基;

第四培养基为含有0.2 μ M SAG和100ng/mL FGF8b的神经基础培养基;

第五培养基为含有10 μ M Y27632、0.2 μ M SAG和100ng/mL FGF8b的神经基础培养基;

其中, 神经基础培养基由以下组分组成: 98%(v/v)DMEM/F12(Gibco)、1%(v/v) 非必须氨基酸(Non-essential amino acid, Gibco)和1%(v/v) N2添加剂(N2 supplement, Gibco)。

2.2 人诱导性多能干细胞(WT细胞)、DKO细胞及DKO+G6细胞分化为多巴胺能神经前体细胞的方法, 包含采用2.1的试剂盒的步骤, 具体如下:

人诱导性多能干细胞分化为多巴胺能神经前体细胞:

1)人多能干细胞的培养:

按照约10万每孔的数量将人诱导性多能干细胞, DKO细胞或DKO+G6细胞以团块的形式在预先包被过Laminin的基质上进行铺板, 并使用E8完全培养基进行细胞培养, 培养过程中每隔4~5天消化传代;

2)多巴胺能神经前体细胞的分化:

S1: 分化前一天, 将汇合度约为70%~80%的人多能干细胞, DKO细胞及DKO+G6

细胞用TrypLE酶消化成单细胞，将细胞以8000/cm²的密度接种到预先包被过Vitronectin(Gibco)的6孔板中，接种培养基为StemFit完全培养基，并添加10μM Y27632组分以促进干细胞存活；

S2：细胞贴壁生长24h后，将培养基更换为2.1的试剂盒中的第一培养基(作为分化的第0天，D0)，于37°C、5% CO₂的二氧化碳细胞培养箱中培养8天(每两天换液一次)；

S3：在分化的第9天，用Accutase(Innovative)消化细胞，然后用2.1的试剂盒中的第二培养基重悬细胞，再将1500万细胞接种至 T75悬浮培养瓶中，摇晃均匀后，于37°C、5% CO₂的二氧化碳细胞培养箱中培养2天，使细胞在悬浮状态中自发形成神经球，得到中脑底板细胞；

S4：在分化的第11天，将培养基更换为2.1中的试剂盒中的第三培养基，于37°C、5% CO₂的二氧化碳细胞培养箱中培养5天(每2.5天换液一次)，得到多巴胺能神经祖细胞；

S5：在分化的第16天，将培养基更换为2.1中的试剂盒中的第四培养基，并将500万神经球细胞做贴壁处理(贴于Vitroectin(Gibco)预先包被的T75培养瓶中继续培养)，于37°C、5% CO₂的二氧化碳细胞培养箱中培养7天(每2.5天换液一次)；

S6：在分化的第23天，用Accutase(Innovative)消化细胞，然后用2.1的试剂盒中的第五培养基重悬细胞，再将1500万细胞接种至 T75悬浮培养瓶中，摇晃均匀后，于37°C、5% CO₂的二氧化碳细胞培养箱中培养一天，使细胞在悬浮状态中自发形成神经球，得到多巴胺能神经前体细胞(DAP细胞)，其中由iPS细胞分化得到的DAP细胞命名为WT-DAP，由DKO细胞分化得到DAP细胞命名为DKO-DAP细胞，由DKO+G6分化得到的DAP细胞命名为DKO+G6-DAP细胞；

B、低免疫原性干细胞分化多巴胺能神经前体(DAP)细胞特性的分析

1. 确认低免疫原性干细胞衍生的DAP细胞标志物

使用流式细胞术及免疫荧光对衍生细胞的身份进行确认。首先验证WT、DKO及DKO+G6分化的DAP细胞中干性基因OCT4的表达均<1%(图4)，确认其已退出多能性且完全为分化细胞。其次通过FACS检测WT、DKO及DKO+G6分化的DAP细胞中多巴胺能神经前体细胞标志基因FOXA2、PAX6、OTX2、和LMX1A的表达量(图5)。

同时还用免疫荧光检测WT、DKO及DKO+G6的衍生细胞表达中多巴胺能神经前体细胞标志基因。具体操作为将细胞铺板在12孔板中，待细胞长到60-80%的密度后吸去培养基，加入4%多聚甲醛进行固定。细胞破膜后使用OTX2、EN1、LMX1A和FOXA2的一抗在4°C过夜孵育，洗去一抗后室温孵育带有荧光标记的二抗，随后使用荧光显微镜进

行拍照。结果如图6所示，所有细胞均表达多巴胺能神经前体细胞标志基因。

2. 低免疫原性衍生细胞低免疫原性表型保留的测定

使用INF-gamma刺激WT及DKO+G6分化的DAP细胞：细胞铺于孔板中，第二天换液时将含有INF-gamma的培养基加入到细胞中。待48h后将细胞消化，使用流式检测HLA-I/II的表达情况。结果如图7所示，B2M/CIITA双等位基因敲除的DKO+G6干细胞阳性克隆分化为DAP后依旧不表达HLA-I/II，且不能响应INF-gamma的刺激而上调HLA-I/II。

XSG006的分子序列为完全外源序列，使用rt-PCR比较WT与由其分化的多巴胺神经前体细胞以及DKO+G6与由其分化的多巴胺神经前体细胞之间的XSG006表达的稳定性(图8)。WT-DAP、DKO-DAP细胞为阴性对照，确认表达无误后进行细胞扩增和后续功能性检测。

使用引物进行XSG006过表达确认

XSG006 F1: CCAGATCTACAGCAGCGAGA

XSG006 R1: GTTCTTCAGGCTGTACTCGC

XSG006 F+XSG006 R=352bp

C、结论

低免疫原性干细胞可在体外成功分化为多巴胺能神经前体(DAP)细胞，衍生细胞具有DAP细胞特性，且保留了低免分子的表达。

实施例2. 低免疫原性多巴胺能神经前体细胞低免疫原性验证

A、背景：

本发明选用的人诱导性多能干细胞使用CRISPR/CAS9敲除内质网中 β -2-微球蛋白(B2M)，使细胞表面HLA-I不能形成功能性分子，从而逃逸同种异体CD8+ T细胞的杀伤；逃逸CD4+ T细胞的杀伤则是通过敲除HLA-II基因转录的正调节因子CIITA，而降低HLA-II类分子表达。并通过慢病毒的方式在B2M/CIITA双等位基因敲除的细胞(DKO)中表达XSG006以逃避固有免疫的杀伤。成功构建的细胞为DKO+G6，为低免疫原性干细胞。由实施例1的低免疫原性干细胞衍生而来的多巴胺能神经前体细胞(DKO+G6-DAP)应同样具有不激活免疫系统并逃逸其杀伤的能力。

B、体外检测逃逸免疫系统的杀伤

1. 逃逸T+NK混合淋巴细胞(PBNK)杀伤功能验证

提前在PBMC中添加NK激活因子，提高PBMC中的NK比例以及T细胞的杀伤性能，将活化的混合淋巴细胞（PBNK）作为效应细胞进行RTCA实验，综合评判DKO+G6-DAP细胞的免疫逃逸能力（PMID: 33309274）。具体操作为在XCelligence平台(ACEA BioSciences, San Diego, CA.)上进行PBNK细胞杀伤测定。将WT-DAP、DKO-DAP和DKO+G6-DAP细胞重悬于100μl细胞特异性培养基(Neurobasal™ 培养基,货号: 21103049, Thermofisher)中，并铺于包被有Matrigel (Sigma-Aldrich)的96孔E-板(ACEA BioSciences)上。在细胞指标值达到1之后，以1:1的E:T比添加T细胞。用RTCA软件(ACEA)对数据进行标准化和分析。结果如图9所示，仅DKO+G6-DAP细胞可逃逸PBNK的杀伤。

2. 逃逸巨噬细胞（MAC）杀伤检测

将WT、DKO及DKO+G6分化的DAP细胞铺于12孔板，24 h后弃除培养基并加入MAC细胞进行共培养。24h观察去除MAC细胞后剩余的WT、DKO及DKO+G6分化的DAP细胞，结果如图10所示。

在XCelligence平台(ACEA BioSciences, San Diego, CA.)上进行MAC细胞杀伤测定。将WT-DAP、DKO-DAP和DKO+G6-DAP细胞重悬于100μl细胞特异性培养基中，并铺于包被有Matrigel (Sigma-Aldrich)的96孔E-板(ACEA BioSciences)上。在细胞指标值达到1之后，以1:1的E:T比添加MAC细胞。用RTCA软件(ACEA)对数据进行标准化和分析。结果如图11所示，两个实验结果均说明，相较DKO分化的DAP细胞，WT及DKO+G6分化的DAP细胞被MAC细胞杀伤的更少，说明WT和DKO+G6分化的DAP细胞可逃逸MAC细胞杀伤的能力显著高于DKO分化的DAP细胞。

C、使用人源化小鼠检测低免疫原性DAP细胞在体内的存活情况

通过观察人源化小鼠脑部注射生物学发光检测(BLI)来观察DAP细胞在体内的存活情况。具体操作为：将携带荧光素酶(luc)的慢病毒感染WT和DKO+G6分化的DAP细胞，然后将表达luc的细胞移植到CD34+HSC重建的人源免疫系统小鼠的脑内。通过腹腔注射luc的发光底物D-荧光素(A025011, 上海翊圣生物科技有限公司)，并使用活体成像仪(iVIS spectrum, PerkinElmer)检测细胞的荧光强度，即可指示细胞在小鼠体内的存活情况。持续检测移植部位荧光51天，WT分化的DAP细胞荧光值趋于背景值，而DKO+G6分化

DAP细胞移植后可以检测到持续上升的荧光值，说明DKO+G6分化的DAP细胞相比于WT分化的DAP细胞，可在体内有效逃逸免疫系统的攻击(图12)。

实施例3. 小鼠帕金森氏病模型中的多巴胺能神经前体细胞

此实施例描述了一项在小鼠模型上探究来自干细胞的体外分化的多巴胺能神经前体细胞(DAP)用于治疗帕金森氏病的用途的研究。采用scid beige 小鼠进行造模，通过阿扑吗啡诱导的旋转、圆筒实验和转棒实验三种行为学进行检测，选出符合标准的造模小鼠进行细胞移植。实验设立溶媒(细胞保存液，人工脑脊液ACSF，懋康生物，MX0951)对照组和受试物组(WT-DAP注射液和DKO+G6-DAP注射液)，给药后通过脑组织病理切片免疫荧光染色及三种行为学检测三组小鼠的行为，比较三组小鼠的行为学差异、给药前后小鼠自身的行为学差异，以及给药部位细胞留存和多巴胺能神经元的变化。

A. 构建帕金森病（Parkinson’s disease, PD）小鼠模型

用异氟烷气麻机麻醉scid beige小鼠，将麻醉好的小鼠固定在小鼠脑立体定位仪上，分别立体定位缓慢注射6-羟基多巴胺（6-OHDA）溶液（H4381-100mg（sigma））进小鼠左脑黑质中。术后进行圆筒实验，转棒实验和阿扑吗啡诱导旋转的行为学检测，确定成模小鼠。

B. 对帕金森病（Parkinson’s disease, PD）小鼠进行DAP细胞移植

对成模小鼠进行分组注射，分别立体定位缓慢注射2μL WT-DAP注射液、2μL DKO+G6-DAP注射液和2μL细胞保存液进小鼠脑部的左纹状体。术后每月进行一次行为学检测，持续4个月。最后一次检测后对小鼠进行脑部取材。

C. 治疗后帕金森病（Parkinson’s disease, PD）小鼠行为学检测

序号	检测方法名称		操作
	中文	英文	
1	阿扑吗啡诱导的旋转	Apomorphine-induced Rotation	腹腔注射阿扑吗啡，注射 5min 后,用摄像机拍摄 30 min，记录旋转次数；
2	圆筒实验	Cylinder Test	将小鼠放在玻璃瓶中，用摄像机记录 3min。记录患侧爪和健侧爪触及圆柱壁的次数。
3	转棒实验	Rotarod Test	使用加速型转棒仪测试运动协调性。 测试前对所有小鼠进行为期两天的训练，使其达到要求： 正式测试：转棒速度为每分钟 1 rpm 加速到 40 rpm。检测 300s 内小鼠停留在杆上的时间。

1. 阿扑吗啡（APO）诱导旋转实验

从APO诱导的旋转实验结果来看，相较于移植前，4个月时受试物组小鼠旋转次数

显著降低；说明WT-DAP注射液后改善了模型小鼠的偏瘫性旋转行为（图13）。

2. 小鼠圆筒实验结果

从圆筒实验结果来看，相较于移植前，4个月时受试物组小鼠有显著行为学改善（ $p<0.05$ ），右前肢碰壁次数所占比例明显提高，说明移植WT-DAP注射液后对改善模型小鼠的帕金森相关静止性震颤行为学有效（图14）。

3. 小鼠转棒实验结果

从转棒实验结果来看，相较于移植前，4个月时受试物组小鼠有显著的行为学改善（ $p<0.05$ ），在转棒上停留的时间明显提高；相较于对照组，行为学改善也比较显著（ $p<0.05$ ）。说明移植WT-DAP注射液后对改善模型小鼠的姿势步态障碍行为有效（图15）。

D. PD小鼠脑部切片染色

PD小鼠脑组织冰冻切片免疫荧光及免疫组化染色：组织切片使用PBS漂洗5min，3次；封闭1h，37℃；封闭液为含5%BSA、0.3%triton-100的PBS溶液。加一抗，24h~48h，4℃冰箱湿盒中缓慢反应；一抗稀释液为含1%BSA、0.3%triton-100的PBS溶液。PBS漂洗5min，3次后，荧光二抗室温避光孵育1~2h。然后PBS漂洗5min，3次，滴加DAPI封片后封片，显微镜下拍摄。对细胞移植4个月后受试物组小鼠的脑组织冠状冰冻切片进行stem101（红）&TH（绿）&DAPI（蓝）的共染（图16）。染色结果显示，移植部位分化生成多巴胺能神经元。

本实施例设立溶媒对照组（细胞保存液）和受试物组（WT-DAP注射液和DKO+G6-DAP注射液），实验后通过三种行为学检测三组小鼠的行为，比较三组小鼠的行为学差异及实验前后小鼠自身的行为学差异。4个月后检测结果显示在阿扑吗啡（APO）诱导的旋转实验中两组受试物组小鼠旋转次数有显著降低，且具有统计学意义；在圆筒实验中两组受试物组小鼠右前肢碰壁次数明显提高，基本恢复至造模前水平，且具有统计学意义；在转棒实验中，两组受试物组小鼠在转棒上停留的时间明显提高，且具有统计学意义。在脑组织冰冻切片免疫荧光染色结果中，移植细胞大量存活于移植部位且一定数量分化为了多巴胺能神经元。移植DAP注射液可明显改善小鼠帕金森病行为并可从根本上促进了纹状体内的移植细胞分化生成多巴胺能神经元以从根本上逆转帕金森病。

实施例4. 非人灵长类(NHP)帕金森氏病模型中的低免疫原性多巴胺能神经前体细胞

此实施例描述了一项在非人灵长类(NHP)模型上探究来自猴干细胞（iPSC）的体外

分化的多巴胺能神经前体细胞(DAP)用于治疗帕金森氏病的用途的研究。采用注射MPTP对非人灵长类(Non human primate, NHP)进行造模,使用用于评价PD症状和所移植细胞的功能的技术和方法定期观测并评价动物。在一些情况下,所述方法包括MRI扫描和分析、PET分析、视频分析和行为分析等(参见例如 Kikuchi 等人, Nature, 2017, 548, 592-596)。

A. 构建帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 非人灵长类(NHP)模型

将猴每周用MPTP盐酸盐静脉内注射两次,直至其存在帕金森症状,诸如但不限于震颤、运动徐缓和平衡受损。并使用18F-PECNT对多巴胺转运体进行特异性靶向标记,PET-CT结果显示,造模后NHP左右脑的多巴胺能神经细胞得到了有效清除(图17),说明帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 非人灵长类(NHP)模型构建成功。

B. 对帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 非人灵长类(NHP)进行DAP细胞移植 由干细胞产生的DAP分化细胞在帕金森氏病(PD)的猴模型中进行评价。

1. 在这项研究中,根据上文所描述的方法使猴干细胞分化以产生猴WT(猴iPSC细胞,猴血液PBMC通过CTSTM CytoTuneTM-iPS 2.1 仙台病毒重编程试剂盒(货号:A34546)制备得到)和猴DKO+G6分化的DAP细胞(猴DKO+G6-DAP细胞)。使用NHP-B2M-gRNA1和NHP-B2M-gRNA2对B2M 外显子区段进行两端直接敲除,然后分别使用NHP-B2M-F/R对PCR 引物进行基因组序列敲除验证。使用NHP-CIITA-gRNA1和NHP-CIITA-gRNA2对CIITA外显子区段进行两端直接敲除,然后分别使用NHP-CIITA-F/R对PCR引物进行基因组序列敲除验证,猴DKO+G6细胞过表达NHP-XSG006蛋白。

猴的DKO+G6细胞所用方法对应材料为:

NHP-B2M-gRNA1 CGTGAGTAAACCTGAATCTT

NHP-B2M-gRNA1 AGTCACATGGTTCACACGGC

NHP-CIITA-gRNA1 CATCGCTGTTGAGAAGCTCC

NHP-CIITA-gRNA1 GATATTGGCATAAGCCTCCC

B2M 鉴定引物

NHP-B2M-F CATTGGCCAGAGTGGAAATG

NHP-B2M-R TGGGACTCATTCAGGGTAGTA

CIITA 鉴定引物

NHP-CIITA-F CTGTGAGGTGACTGAGCATATC

NHP-CIITA-R GGCCAGCAATGAGCATACTA

NHP-XSG006 蛋白序列

MGRAMVARLGLGLLLLALLLPTQIYSTVTTSAPLSSNSSQNTSTTPNPANTTTKA
VGGGGGSGGGGSGGGGSGNIIIVIFPIFAILFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAG
LMITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQ
VIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFV。

2. 确认低免疫原性 iPS 细胞衍生的 DAP 细胞标志物

免疫荧光检测显示猴 WT 及猴 DKO+G6 分化的 DAP 细胞在蛋白水平表达 DAP 特性基因：将细胞铺板在 12 孔板中，待细胞长到 60-80% 的密度后吸去培养基，加入 4% 多聚甲醛进行固定。细胞破膜后使用 OTX2、EN1、LMX1A 和 FOXA2 的一抗在 4℃ 过夜孵育，洗去一抗后室温孵育带有荧光标记的二抗，随后使用荧光显微镜进行拍照。结果如图 18 所示，所有细胞均表达。

3. 将低免疫原性猴 DAP 细胞注射到猴 PD 模型的脑部

将猴 DAP 细胞以立体定向方式两侧移植到 MPTP 处理的猴的壳核区，左侧注射猴 WT-DAP 细胞，右侧注射猴 DKO+G6-DAP 细胞。使用 MRI 的检测手段判定左右脑中 DAP 细胞的存活情况 (图 19)。MRI 结果显示在 28 天的观察周期内，猴 DKO+G6-DAP 细胞在脑内持续存在，猴 WT-DAP 细胞在第五天即观察不到。

并根据本领域技术人员公认的方法来评价所移植的 DA 神经元的影响。用猴 WT 及猴 DKO+G6 分化的 DAP 细胞的猴中评价左右收行为、运动、PD 症状、多巴胺能功能等的变化或差异(图 20)。采食率结果显示，自造模成功后，双前肢细胞移植前完全不进行采食行为。移植细胞后，左前肢(猴 DKO+G6-DAP 注射影响侧)现已有好转迹象；右前肢(WT-DAP 注射影响侧)无明显好转。

实施例 5. 正常非人灵长类(NHP)模型中的低免疫原性多巴胺能神经前体细胞

此实施例描述了一项在具有完全免疫系统的非人灵长类(NHP)模型上探究来自猴干细胞 (iPSC) 的体外分化的多巴胺能神经前体细胞(DAP)的免疫豁免能力的研究。对未造模的正常非人灵长类进行 NHP-DAP 细胞的同种异体移植，确认低免疫原性 iPS 细胞衍生的 DAP 可抵抗免疫系统攻击，使用 MRI 扫描和分析监测细胞的在体存活情况(参见例如 Kikuchi 等人，Nature，2017，548，592-596)。同批次猴 WT-DAP 细胞和猴 DKO+G6-DAP 细胞在免疫缺陷 NOG 小鼠中移植，确认 DAP 细胞体内安全性。并在 PD-NOG 小鼠中注射猴 DKO+G6-DAP 细胞，以确认低免疫原性 DAP 细胞体内分化特性。

A. 对具有完全免疫系统的非人灵长类(NHP)进行同种异体 DAP 细胞移植,

将猴 DAP 细胞以立体定向方式两侧移植到壳核区, 左侧注射猴 WT-DAP 细胞, 右侧注射猴 DKO+G6-DAP 细胞。使用 MRI 的检测手段判定左右脑中 DAP 细胞的存活情况 (图 21A&B)。分别在移植前(pre-TX)、移植当天 (day0)、移植后 day7、14、21、28、42、56、90、122、152、183、212 对猴脑进行 MRI 扫描。结果显示在 259 天的观察周期内, 猴 DKO+G6-DAP 细胞在脑内持续存在, 猴 WT-DAP 细胞在 day14-21 即观察不到。说明猴 DKO+G6-DAP 细胞具有低免疫性可逃逸免疫系统攻击, 在具有完全免疫系统的同种异体猴脑内长期存活; 而与此同时未经改造的 WT-DAP 细胞则在相同环境下被排斥无法存活。

B. 对免疫缺陷的 NOG 小鼠进行 NHP-DAP 细胞移植

使用实施例 3B 的方法将猴 WT-DAP 细胞和猴 DKO+G6-DAP 细胞立体注射至不同 NOG 小鼠的左侧纹状体, 移植后 2 个月对小鼠进行脑部取材, 参照实施例 3D 的方法对 NOG 小鼠脑组织冰冻切片免疫荧光染色。对细胞移植 3 个月后小鼠的脑组织冠状冰冻切片进行 hNA (红) & Ki67 (绿) & DAPI (蓝) 的共染 (图 22A)。染色结果显示, 移植部位可见猴 WT-DAP 细胞和猴 DKO+G6-DAP 细胞, 团块大小、数量在细胞间均无差异, 两种细胞均只有极少量的 Ki67 占比 (图 22B)。体内安全性检测显示低免疫原性多巴胺能神经前体细胞(DKO+G6-DAP)与未编辑细胞(WT-DAP)相比具有相同正常的增殖能力, 且均含有极少量的 Ki67, 体内致瘤性低。

C. 对免疫缺陷的 PD-NOG 小鼠进行 NHP-DAP 细胞移植

使用实施例 3A 的方法对 NOG 小鼠进行 PD 造模, 成模小鼠立体定位缓慢注射猴 DKO+G6-DAP 细胞进左纹状体。移植后 3 个月对小鼠进行脑部取材, 参照实施例 3D 的方法对 PD 小鼠脑组织冰冻切片免疫荧光染色。对细胞移植 3 个月后小鼠的脑组织冠状冰冻切片进行 hNA (红) & TH (绿) & DAPI (蓝) 的共染 (图 23)。染色结果显示, 低免疫原性 DAP 细胞可在体内分化生成 TH+, 即有功能的多巴胺能神经元。

以上, 对本发明的实施方式进行了说明。但是, 本发明不限于上述实施方式。凡在本发明的精神和原则之内, 所做的任何修改、等同替换、改进等, 均应包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求

1. 一种从免疫豁免性诱导性多能干细胞分化的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞，其特征在于，所述神经细胞包含：

- 1) HLA-I 和 HLA-II 人类白细胞抗原的表达降低或不表达；
- 2) 表达由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白；

所述细胞能逃逸 T 细胞攻击及 NK 细胞的杀伤。

2. 根据权利要求 1 所述的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞，其特征在于，所述免疫豁免性诱导性多能干细胞中使用基因编辑工具靶向编码 HLA-I 的一种或多种转录调节因子的一个或多个基因，以及编码 HLA-II 的一种或多种转录调节因子的一个或多个基因，来实现 HLA-I 和 HLA-II 基因的表达降低或不表达；

在某些实施方式中，为实现 HLA-I 和 HLA-II 基因的表达降低或不表达，所述 HLA-I 的转录调节因子可优选自：B2M、TAP1、TAP2、TAP 相关糖蛋白（Tapasin）或 NLRC5 中的一个或多个；所述 HLA-II 的转录调节因子可优选自：CIITA、RFXANK、RFX5、RFXAP 中的一个或多个；

根据本发明，所述转录调节因子优选 B2M 和 CIITA。

3. 根据权利要求 2 所述的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞，其特征在于，所述免疫豁免性诱导性多能干细胞还包括通过选择性灭活 CIITA 基因的稀有切割核酸内切酶靶向 CIITA 基因的遗传修饰。

4. 根据权利要求 2 所述的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞，其特征在于，所述免疫豁免性诱导性多能干细胞还包括通过选择性灭活 B2M 基因的稀有切割核酸内切酶靶向 B2M 基因的遗传修饰。

5. 根据权利要求 3 或 4 所述的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞，其特征在于，其中通过稀有切割内切核酸酶靶向 CIITA 基因或 B2M 基因的遗传修饰包括 CAS 蛋白或编码 CAS 蛋白的多核苷酸，和至少一个用于特异性靶向 CIITA 基因或 B2M 基因的导向核糖核酸序列；

在具体的实施方式中，使用 CRISPR/CAS9 系统分别对 B2M 和 CIITA 外显子区段进行两端直接敲除，其中，针对 B2M 基因的 gRNA 的靶序列为 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3，针对 CIITA 基因的 gRNA 的靶序列为 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞, 其特征在于, 所述免疫豁免性诱导性多能干细胞中通过引入针对编码 HLA-I 的一种或多种转录调节因子的一个或多个基因, 或编码 HLA-II 的一种或多种转录调节因子的一个或多个基因的基因表达修饰分子, 来实现 HLA-I 和/或 HLA-II 基因的表达降低或不表达, 其中所述基因表达修饰分子包括选自 siRNA, shRNA, microRNA, 反义 RNA 和另一种 RNA 介导的抑制分子中的一种。

7. 根据权利要求 1 所述的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞, 其特征在于, 所述包含 CD47 和 CD24 的功能结构域的融合蛋白中的 CD47 的功能结构域为 CD47 跨膜结构域; 优选地, 所述 CD47 跨膜结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6-10 任一项所示;

所述包含 CD47 和 CD24 的功能结构域的融合蛋白中的 CD24 的功能结构域为 CD24 的信号肽序列、CD24 成熟肽、CD24 胞外肽、CD24 膜锚定序列、CD24 胞外成熟肽; 优选地, 所述 CD24 的功能结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11-16 任一项所示;

8. 根据权利要求 7 所述的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞, 其特征在于, 所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47 SIRP α 结合域和 CD24 的膜锚定序列连接; 或者,

在某些实施方式中, 所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47 的 SIRP α 结合域插入至 CD24 的胞外序列和膜锚定序列的链接位点; 或者,

在某些实施方式中, 所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD47 链接到 CD24 的胞外序列后; 或者,

在某些实施方式中, 所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD24 成熟肽链接到 CD47 的 SIRP α 结合域后; 或者,

在某些实施方式中, 所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD24 的胞外成熟肽插入到 CD47 的 SIRP α 结合域和跨膜结构域链接点; 或者

在某些实施方式中, 所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白是将 CD24 的成熟肽序列和 CD47 跨膜结构域连接;

优选地, 所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白的氨基酸序列与如 SEQ ID NO:1 所示的序列具有 70% 以上的同源性, 例如 80% 以上的同源性, 再例如 90% 以上、95% 以上、98% 以上的同源性;

进一步优选地, 所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示;

在具体的实施方式中，增加的 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白表达是在所述的免疫豁免性诱导性多能干细胞中将至少一个拷贝的融合蛋白基因导入所述 iPSC 中处于启动子的控制下而产生的。

9. 编码由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白的核酸序列可以根据权利要求 8 所述融合蛋白的氨基酸序列得到。

10. 权利要求 1-9 任一项所述的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞选自多巴胺能神经前体细胞、多巴胺能神经祖细胞、未成熟的多巴胺能神经细胞和成熟的多巴胺能神经细胞；优选为多巴胺能神经前体细胞。

11. 一种通过体外分化从免疫豁免性诱导性多能干细胞获得权利要求 1-10 任一项所述的分离的低免疫原性多巴胺能神经前体细胞的方法，其中在免疫豁免性 iPSC 细胞中已消除内源性 β -2 微球蛋白 (B2M) 基因活性和内源性 II 类反式激活因子 (CIITA) 基因活性；并且表达由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白；优选地，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白的氨基酸序列与如 SEQ ID NO:1 所示的序列具有 70% 以上的同源性，例如 80% 以上的同源性，再例如 90% 以上、95% 以上、98% 以上的同源性；进一步优选地，所述由 CD47 和 CD24 的功能结构域构建的融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示，其特征在于，所述方法包括：

免疫豁免性诱导性多能干细胞分化为低免疫原性多巴胺能神经前体细胞：

(1) 免疫豁免性诱导性多能干细胞的培养：

按照约 10 万每孔的数量将免疫豁免性诱导性多能干细胞以团块的形式在预先包被过 Laminin 的基质上进行铺板，并使用 E8 完全培养基进行细胞培养，培养过程中每隔 4~5 天消化传代；

(2) 低免疫原性多巴胺能神经前体细胞的分化：

S1：分化前一天，将汇合度约为 70%~80% 的免疫豁免性诱导性多能干细胞用 TrypLE 酶消化成单细胞，将细胞以 8000/cm² 的密度接种到预先包被过 Vitronectin(Gibco) 的 6 孔板中，接种培养基为 StemFit 完全培养基，并添加 10 μ M Y27632 组分以促进干细胞存活；

S2：细胞贴壁生长 24h 后，将培养基更换为第一培养基，作为分化的第 0 天，称为 D0，于 37°C、5% CO₂ 的二氧化碳细胞培养箱中培养 8 天，每两天换液一次；

S3：在分化的第 9 天，用 Accutase(Innovative)消化细胞，然后用第二培养基重悬细胞，再将 1500 万细胞接种至 T75 悬浮培养瓶中，摇晃均匀后，于 37°C、5% CO₂ 的二

氧化碳细胞培养箱中培养 2 天, 使细胞在悬浮状态中自发形成神经球, 得到中脑底板细胞;

S4: 在分化的第 11 天, 将培养基更换为第三培养基, 于 37°C、5% CO₂ 的二氧化碳细胞培养箱中培养 5 天, 每 2.5 天换液一次, 得到多巴胺能神经祖细胞;

S5: 在分化的第 16 天, 将培养基更换为第四培养基, 并将 500 万神经球细胞做贴壁处理, 贴于 Vitroectin(Gibco)预先包被的 T75 培养瓶中继续培养, 于 37°C、5% CO₂ 的二氧化碳细胞培养箱中培养 7 天, 每 2.5 天换液一次;

S6: 在分化的第 23 天, 用 Accutase(Innovative)消化细胞, 然后用第五培养基重悬细胞, 再将 1500 万细胞接种至 T75 悬浮培养瓶中, 摇晃均匀后, 于 37°C、5% CO₂ 的二氧化碳细胞培养箱中培养一天, 使细胞在悬浮状态中自发形成神经球, 得到多巴胺能神经前体细胞 (DAP 细胞);

其中, 第一培养基为含有 1 μ M -20 μ M SB431542、1 μ M -3 μ M DMH1、0.2 μ M -1 μ M CHIR99021 和 1 μ M -1.75 μ M SAG 的神经基础培养基;

优选地, 第一培养基为含有 10 μ M SB431542、2 μ M DMH1、0.6 μ M CHIR99021 和 1 μ M SAG 的神经基础培养基;

第二培养基为含有 5 μ M -15 μ M Y27632、1 μ M -20 μ M SB431542、1-3 μ M DMH1、0.2 μ M -1 μ M CHIR99021 和 1 μ M -1.75 μ M SAG 的神经基础培养基;

优选地, 第二培养基为含有 10 μ M Y27632、10 μ M SB431542、2 μ M DMH1、0.6 μ M CHIR99021 和 1 μ M SAG 的神经基础培养基;

第三培养基为含有 0.8 μ M -1.2 μ M DMH1、0.1 μ M -0.5 μ M SAG 和 80 ng/mL -120ng/mL 成纤维细胞生长因子 8b(FGF8b)的神经基础培养基;

优选地, 第三培养基为含有 1 μ M DMH1、0.2 μ M SAG 和 100ng/mL 成纤维细胞生长因子 8b(FGF8b)的神经基础培养基;

第四培养基为含有 0.1 μ M -0.5 μ M SAG 和 80 ng/mL-120ng/mL FGF8b 的神经基础培养基;

优选地, 第四培养基为含有 0.2 μ M SAG 和 100ng/mL FGF8b 的神经基础培养基;

第五培养基为含有 5 μ M -15 μ M Y27632、0.1 μ M -0.5 μ M SAG 和 80 ng/mL -120ng/mL FGF8b 的神经基础培养基;

优选地, 第五培养基为含有 10 μ M Y27632、0.2 μ M SAG 和 100ng/mL FGF8b 的神经基础培养基;

所述神经基础培养基选自 IMDM (Iscoe's Modified Dulbecco's Medium)培养基、Eagle 's Basal Medium(BME)培养基、GMEM 培养基、MEM 培养基、DMEM 培养基, Ham's F-12 培养基、RPMI1640 培养基、Neurobasal 培养基中的至少一种;

优选的,所述神经基础培养基由以下组分组成:98%(v/v)DMEM/F12(Gibco)、1%(v/v)非必须氨基酸(Non-essential amino acid, Gibco)和 1%(v/v) N2 添加剂(N2 supplement, Gibco)。

12. 一种治疗患有神经退行性疾病或病况的患者的方法,所述方法包括施用包含治疗有效量的权利要求 1-10 任一项所述的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞或根据权利要求 11 所述的方法制备的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞的组合物。

13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述组合物还包含治疗有效的载体;

优选地,所述分离的低免疫性多巴胺能神经细胞在可生物降解的支架上。

14. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述施用包括移植或注射。

15. 根据权利要求 12-14 任一项所述的方法,其中所述神经退行性疾病或病况选自帕金森氏病、亨廷顿氏病和多发性硬化症;优选为帕金森氏病。

16. 一种组合物,其特征在于,所述组合物包含权利要求 1-10 任一项所述的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞或根据权利要求 11 所述的方法制备的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞。

17. 根据权利要求 16 所述的组合物,其特征在于,所述组合物包含权利要求 1-10 任一项所述的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞和一种或多种治疗剂,所述治疗剂包含肽、细胞因子、小分子化合物、大分子、ADC、抗体、纳米粒子、生物类似物、mRNA、中药、蛋白、疫苗、检查点抑制剂、丝裂原、生长因子、小 RNA、双链 RNA(double stranded RNA; dsRNA)、单核血细胞、饲养细胞、饲养细胞组分或其置换因子、包含一种或多种所关注多核酸的载体、抗体等。

18. 权利要求 1-10 任一项所述的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞或根据第权利要求 11 所述的方法制备的分离的低免疫原性多巴胺能神经细胞在制备用于神经退行性疾病或病况治疗的产品中的应用;

在某些方面,所述应用,其中所述神经退行性疾病或病况选自帕金森氏病、亨廷顿氏病和多发性硬化症;优选为帕金森氏病。

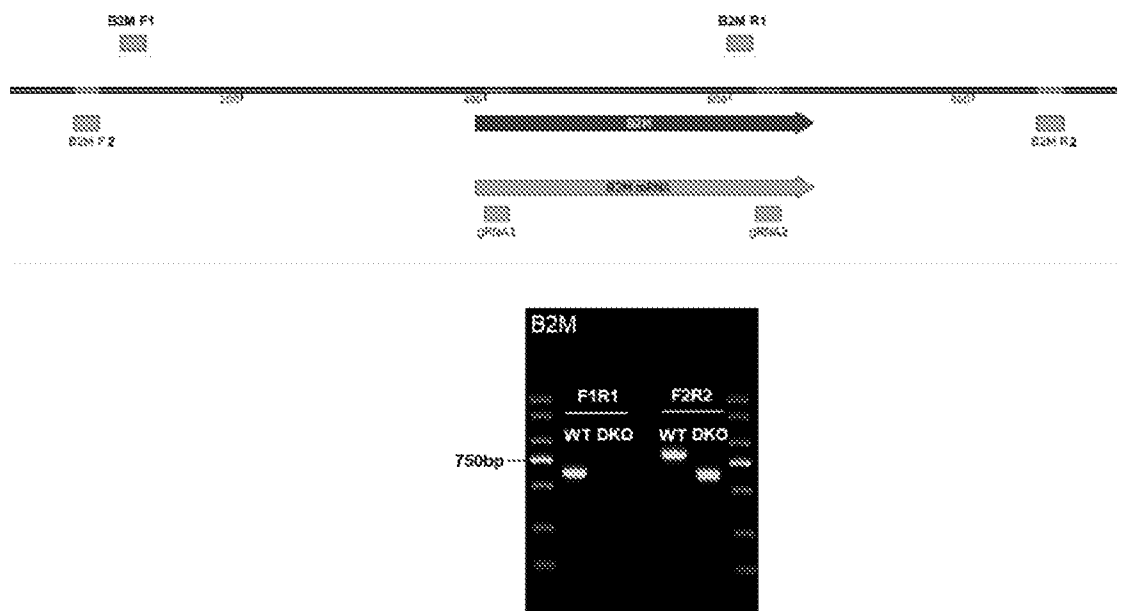


图 1

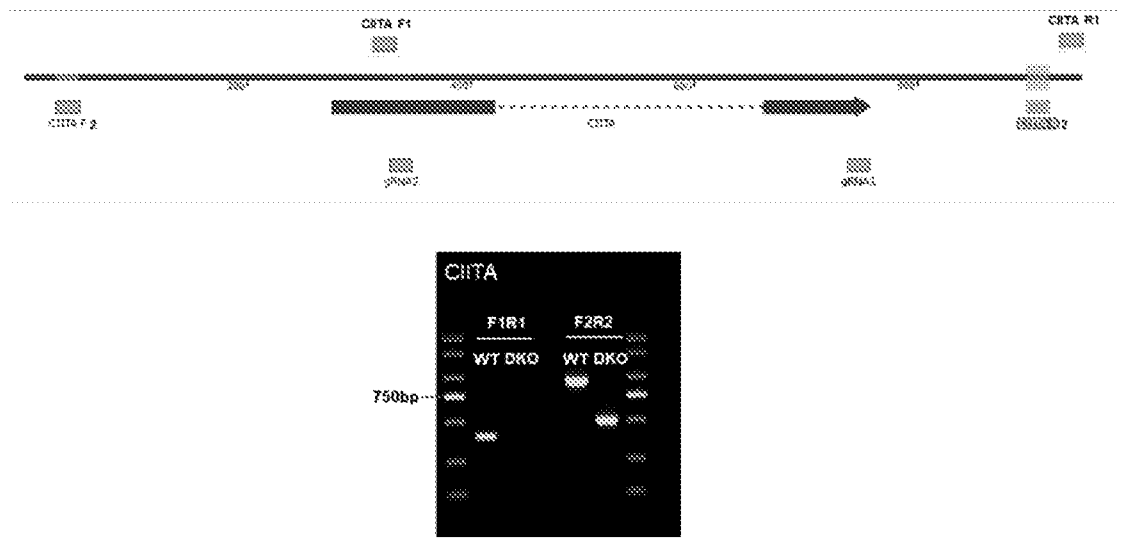


图 2

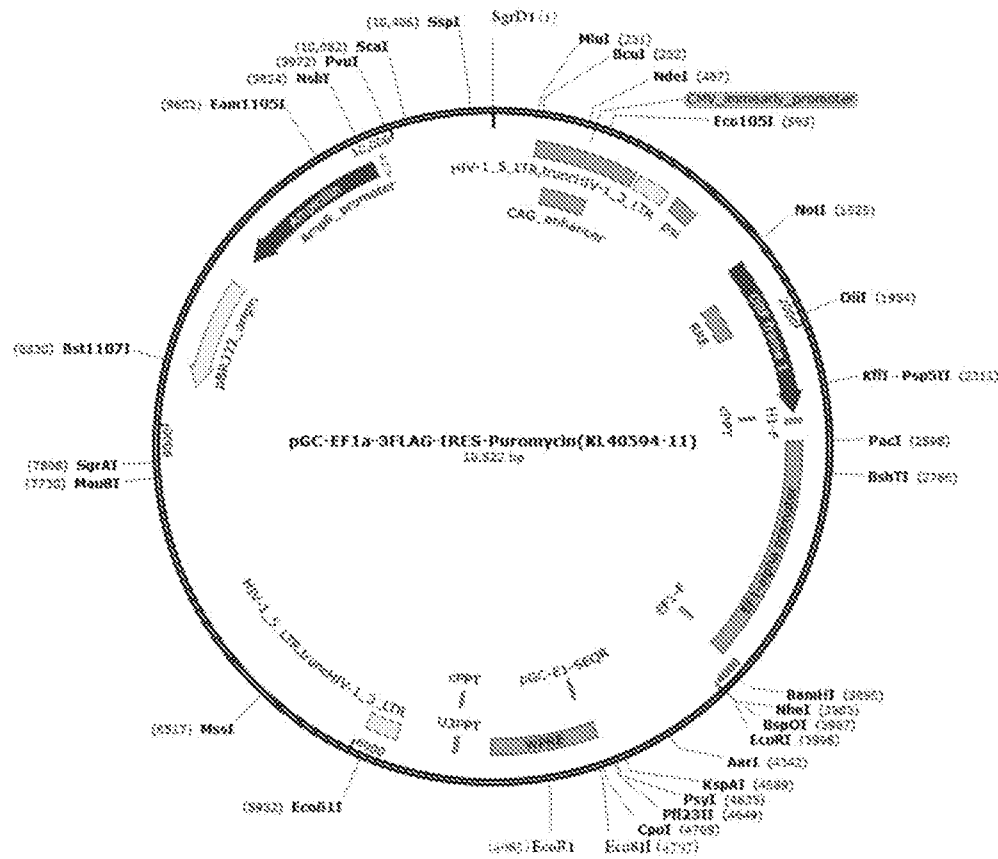


图 3

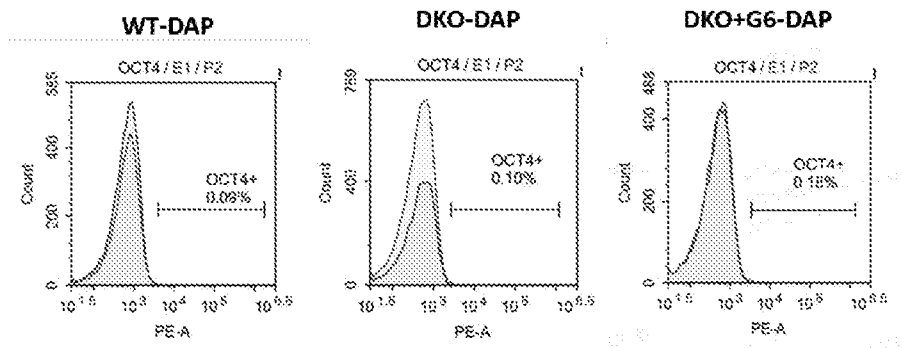


图 4

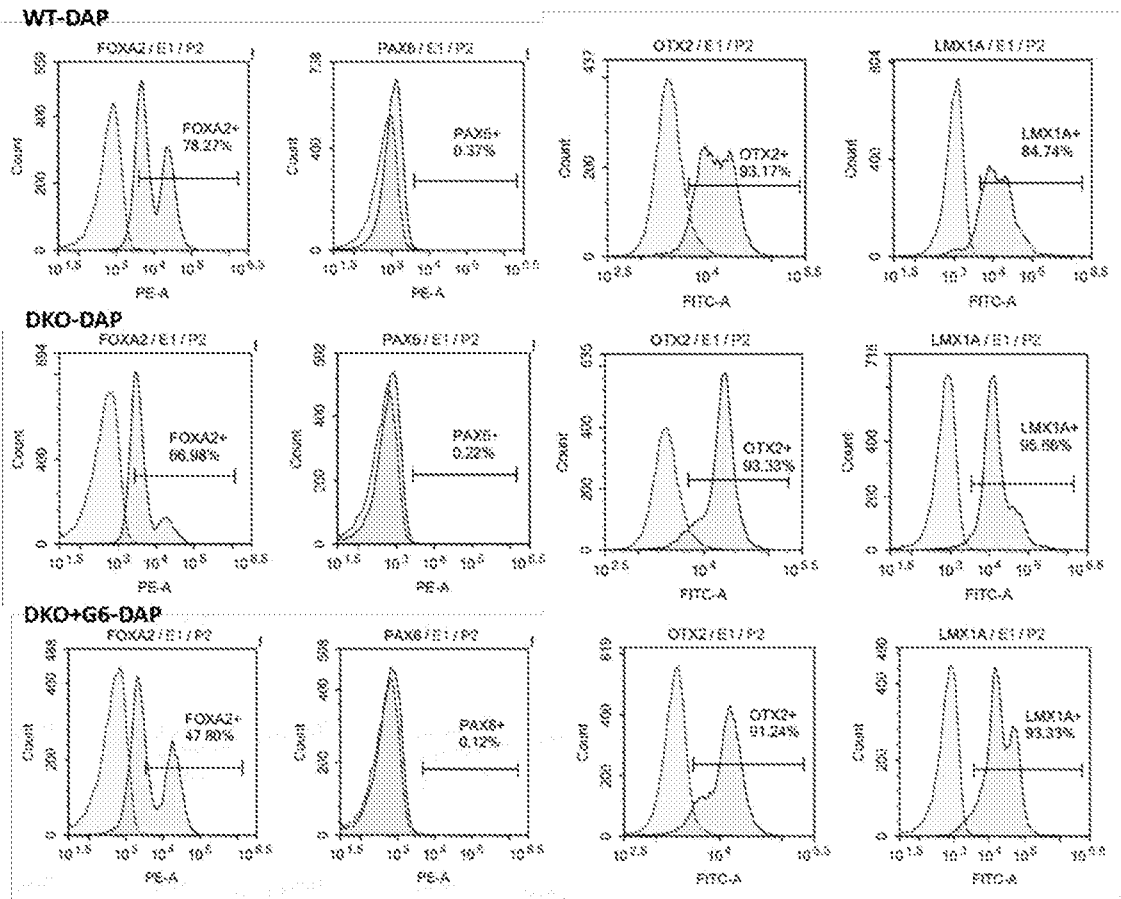


图 5

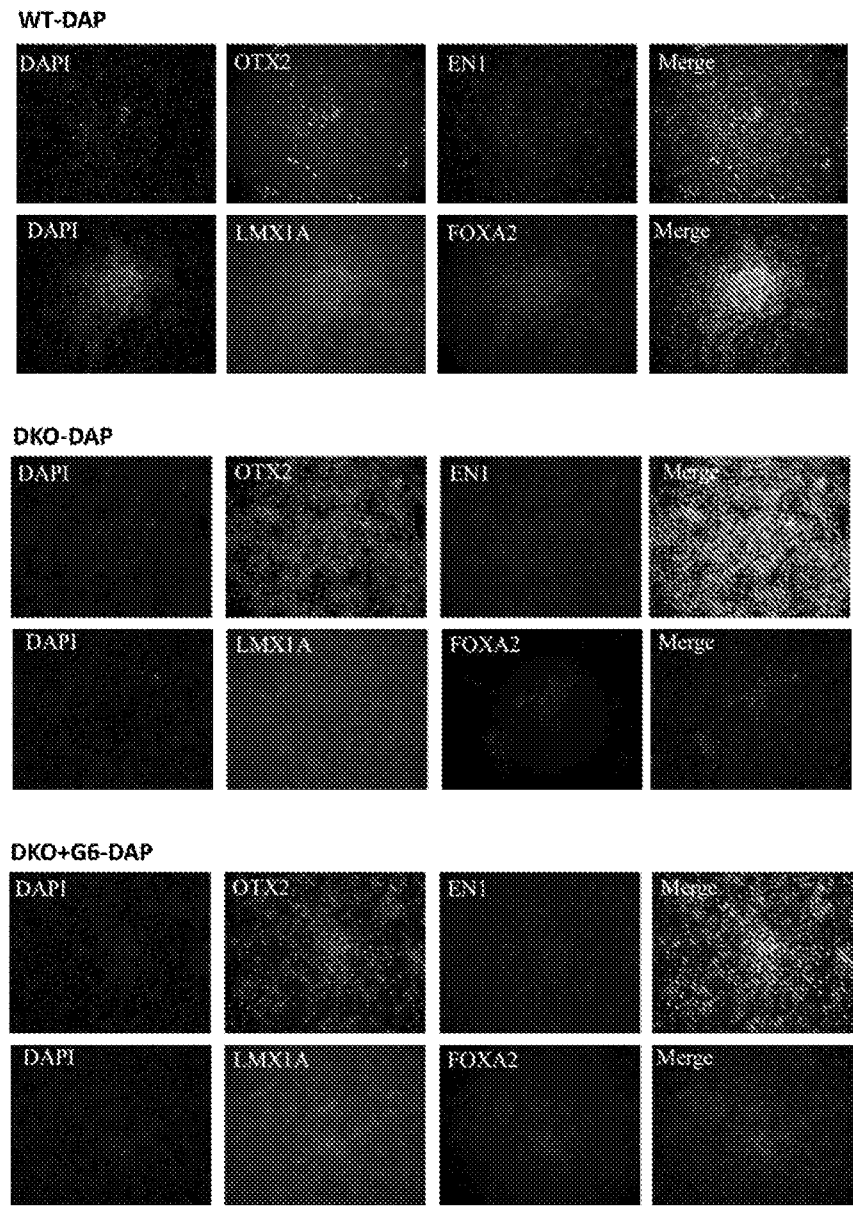


图 6

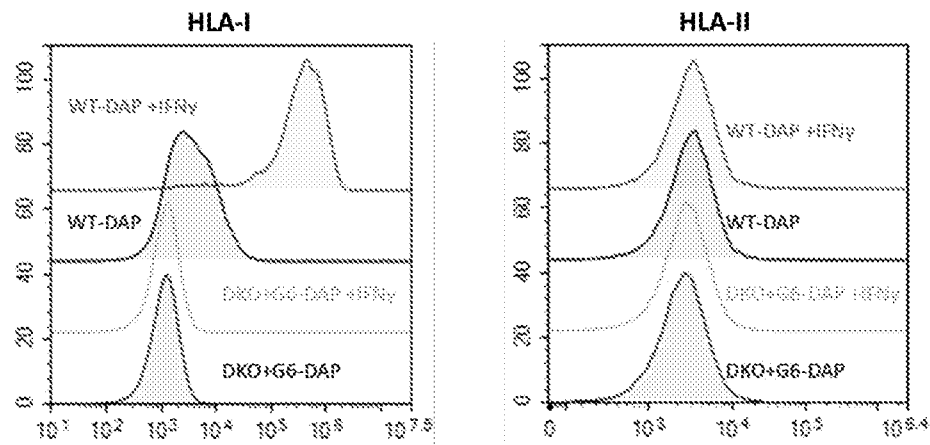


图 7

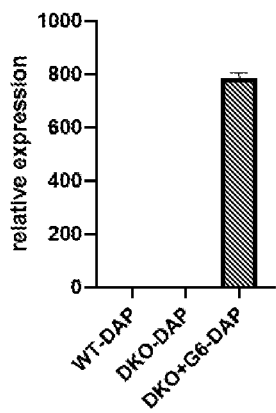


图 8

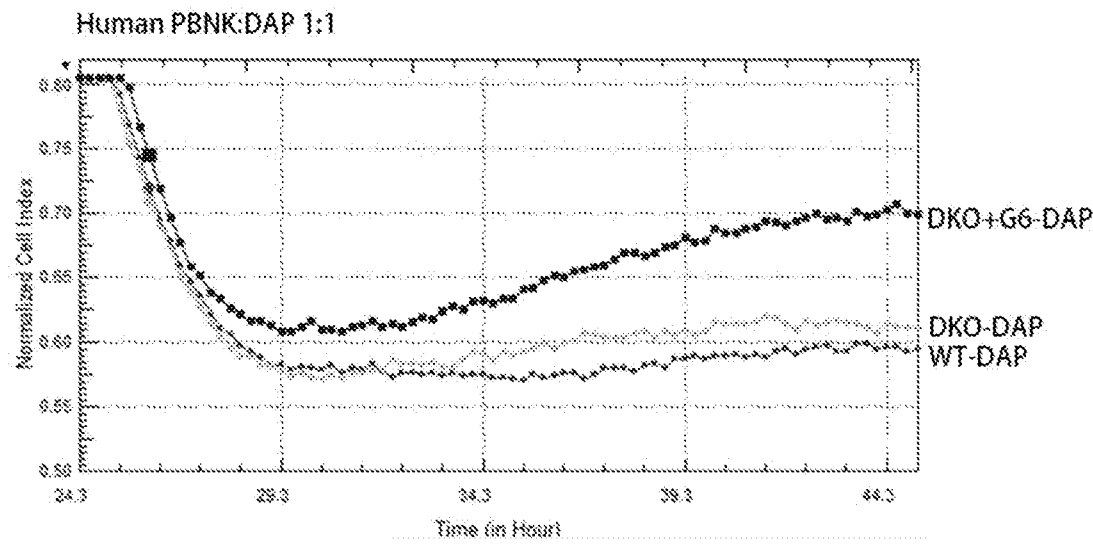


图 9

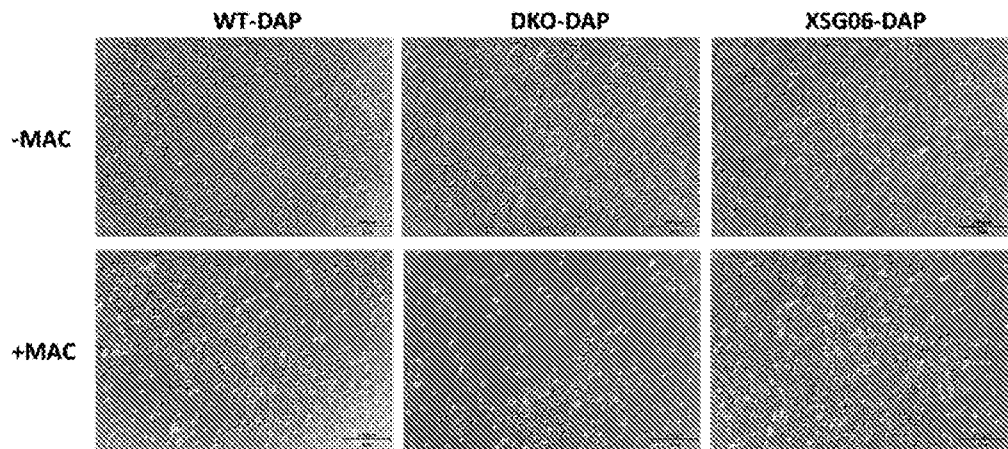


图 10

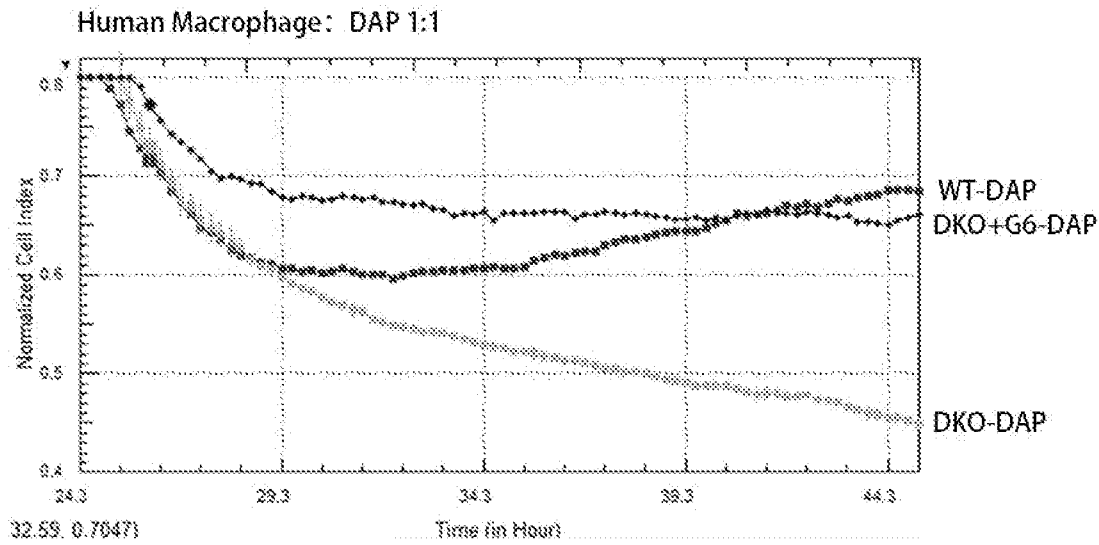


图 11

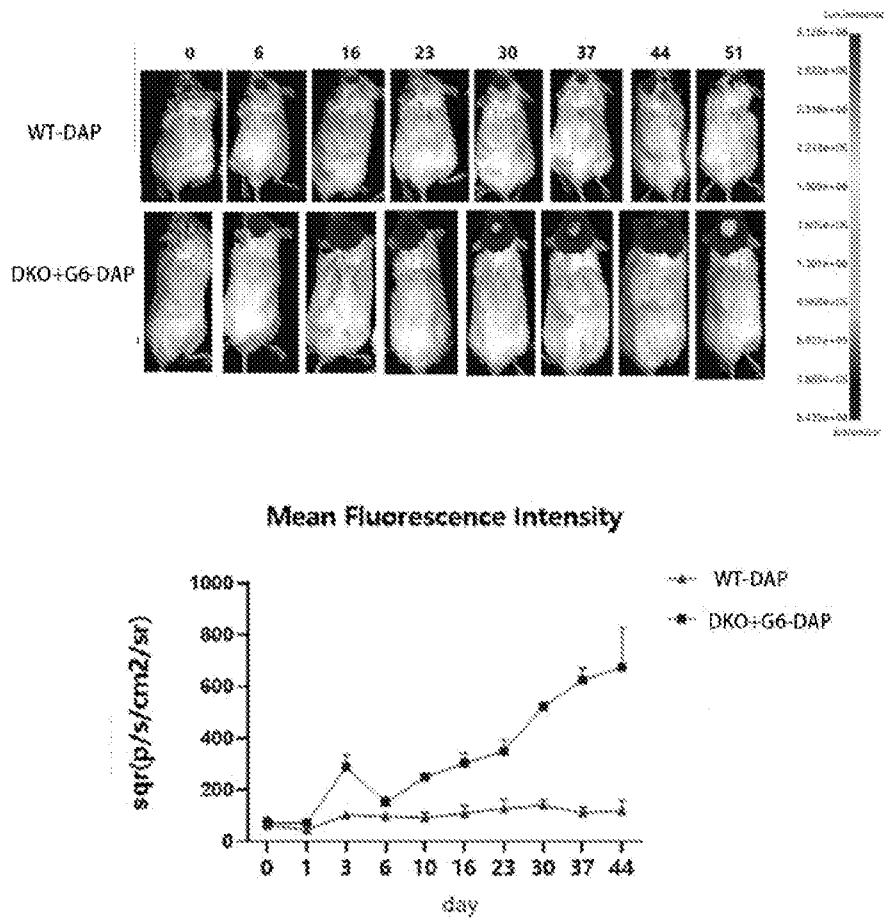


图 12

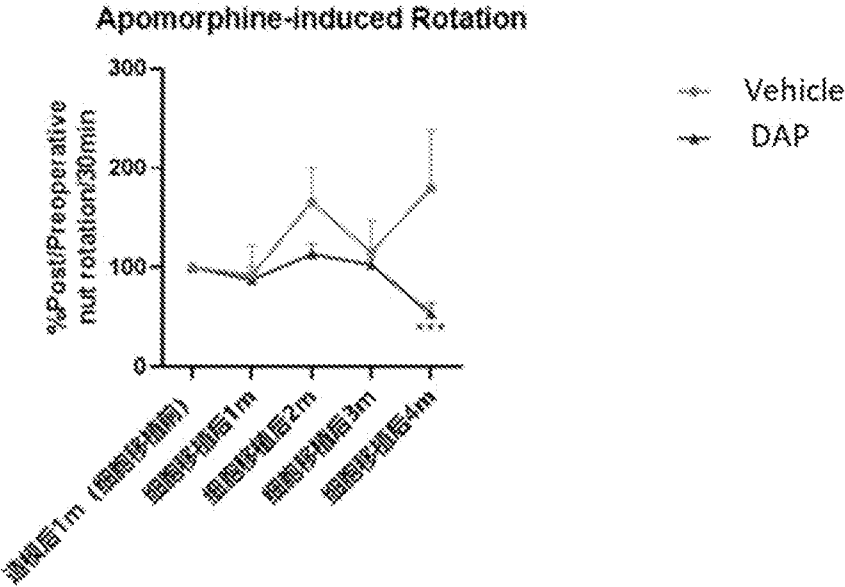


图 13

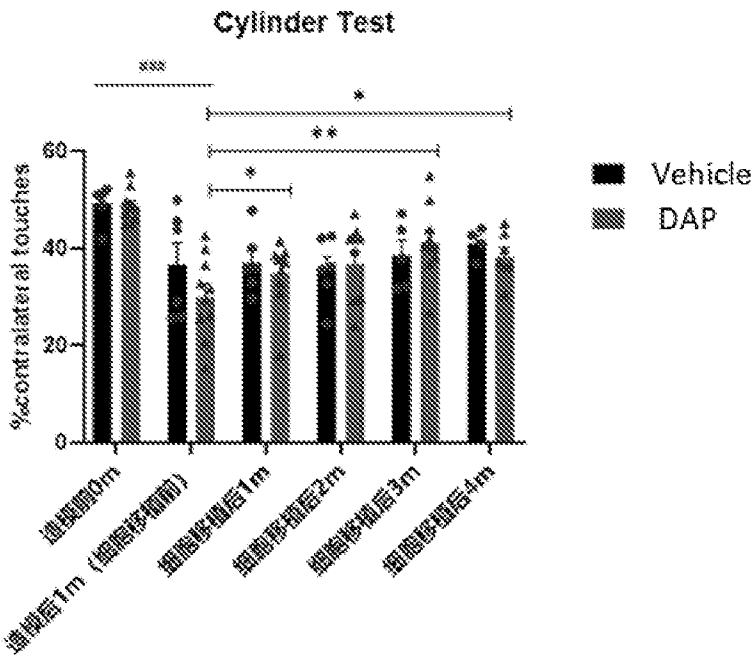


图 14

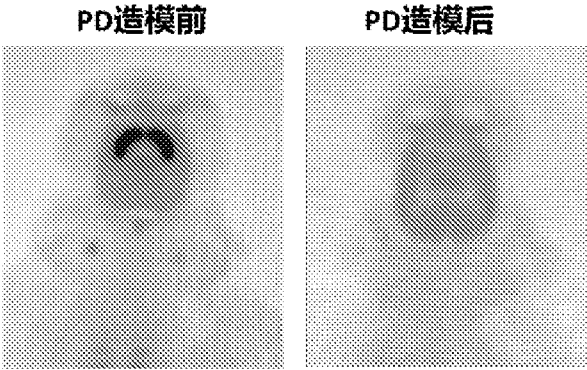


图 17

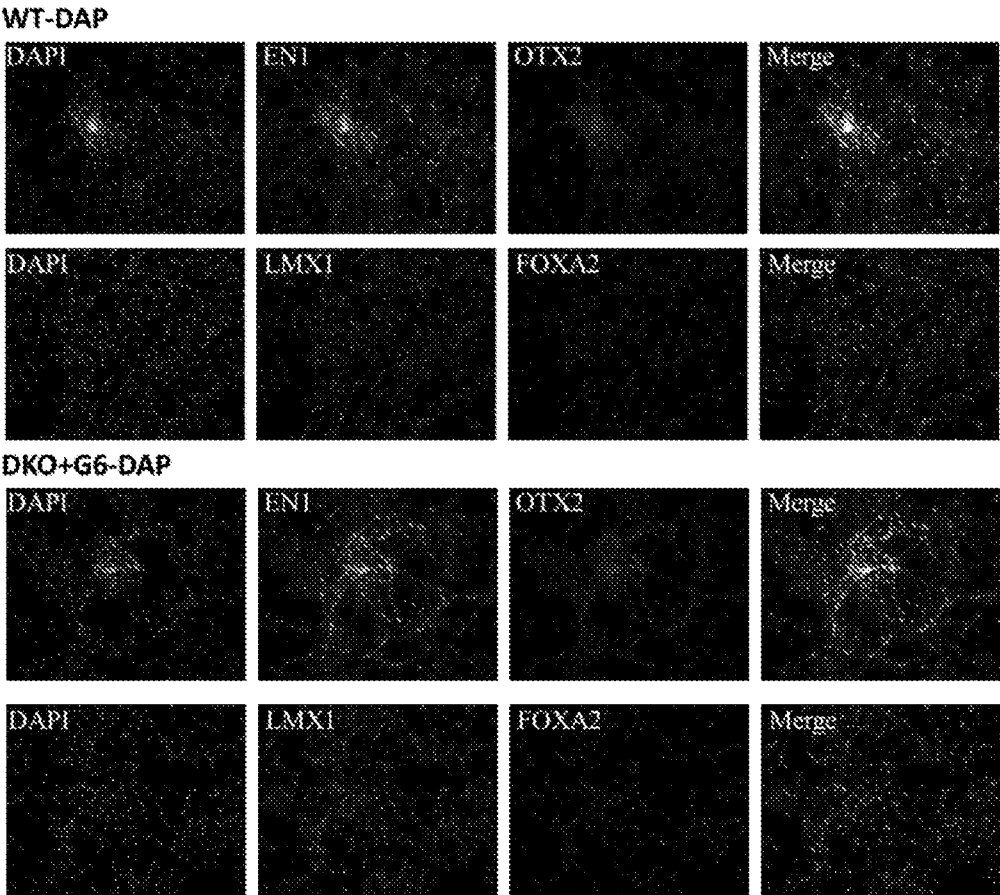


图 18

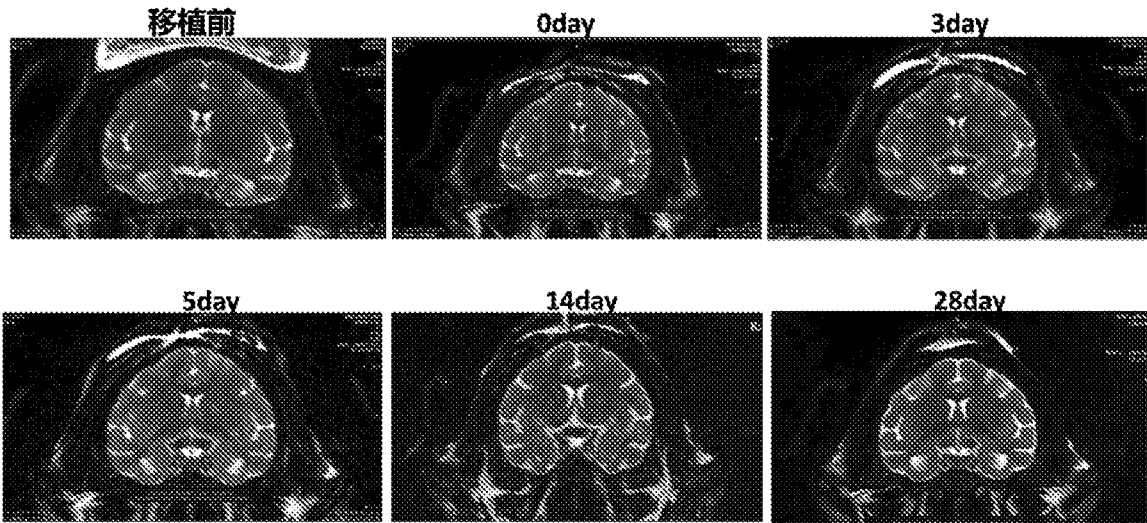


图 19

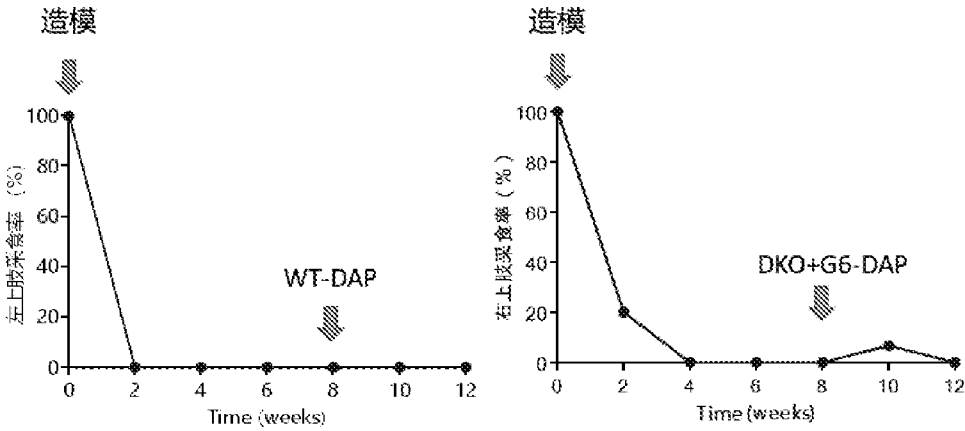


图 20

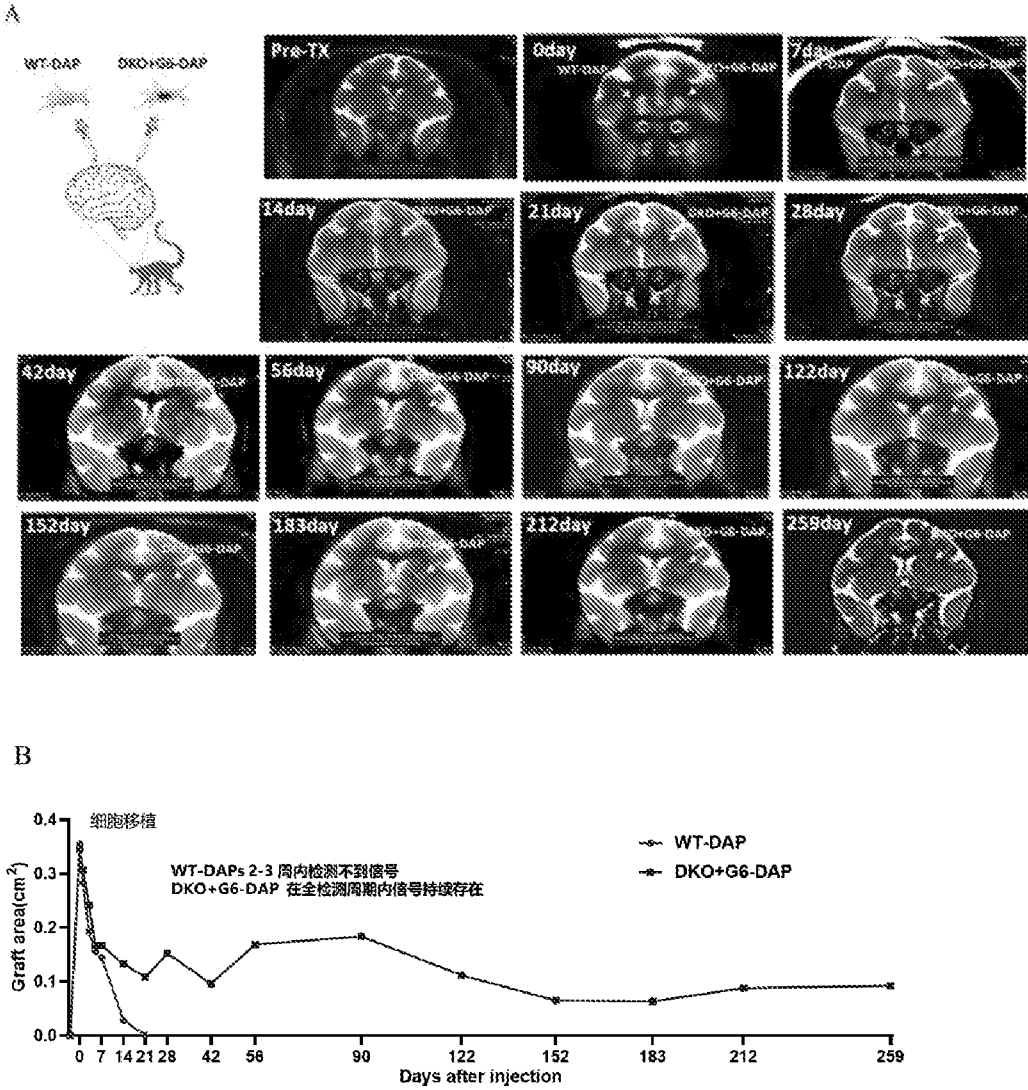


图 21

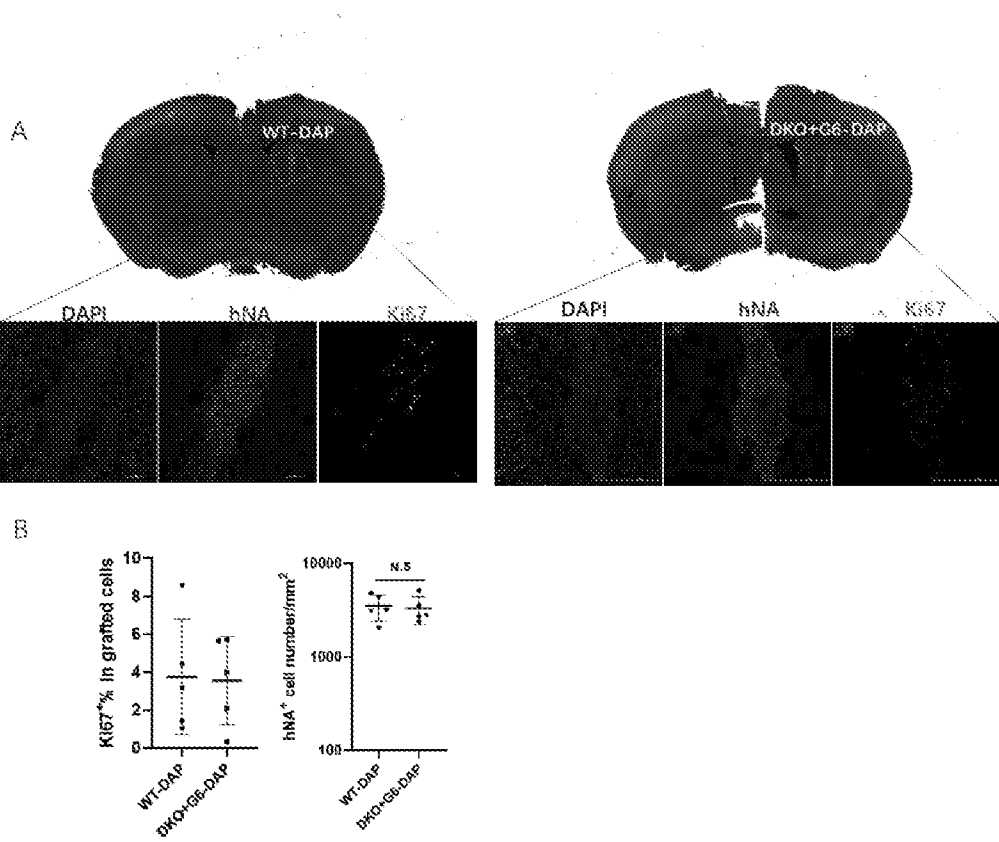


图 22

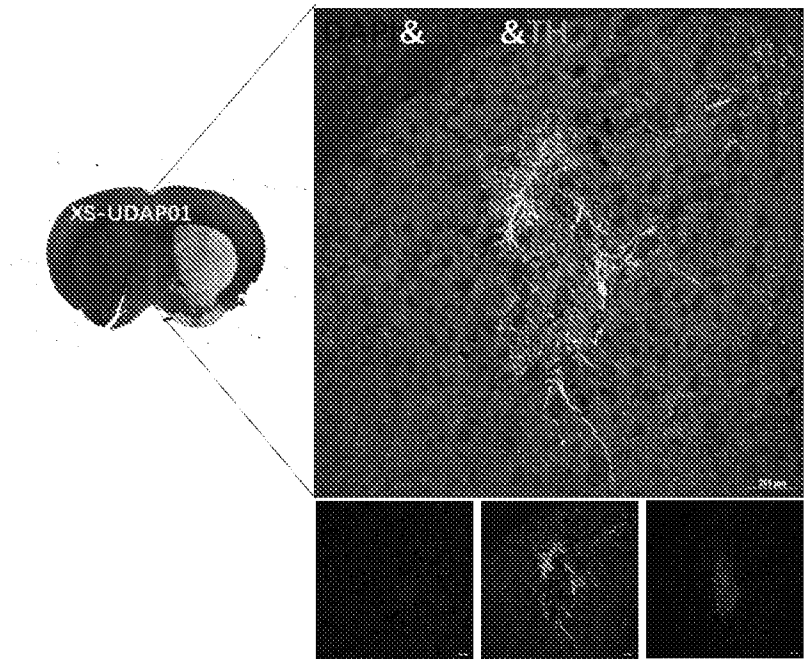


图 23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/097338

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N5/0797(2010.01)i; C12N5/10(2006.01)i; C12N15/12(2006.01)i; C12N15/62(2006.01)i; C12N15/867(2006.01)i; A61K35/545(2015.01)i; A61P25/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C12N A61K A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS; CNTXT; CJFD; CNKI; WPABS; WPABSC; ENTXTC; ENTXT; DWPI; ISI Web of Science; GenBank; STNext; 中国 专利生物序列检索系统, China Patent Biological Sequence Search System: 士泽生物医药, 干细胞, 多巴胺能神经细胞, 退行 性疾病, 帕金森, HLA, MHC, B2M, CIITA, CD24, CD47, stem cells, dopaminergic neural cells, degenerative diseases, parkinson		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2023019203 A1 (SANA BIOTECHNOLOGY INC.) 16 February 2023 (2023-02-16) description, paragraphs 00411, 00451, 00715 and 00934-00944	1-11, 16-18
X	US 2023025289 A1 (SANA BIOTECHNOLOGY INC.) 26 January 2023 (2023-01-26) description, paragraphs 211-238, 326, 334 and 335	1-11, 16-18
X	CN 115135330 A (NEW YORK STEM CELL FOUNDATION, INC. et al.) 30 September 2022 (2022-09-30) claims 1-31	1-11, 16-18
A	CN 115768446 A (SANA BIOTECH INC.) 07 March 2023 (2023-03-07) claims 1-195	1-11, 16-18
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “D” document cited by the applicant in the international application “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 September 2024		Date of mailing of the international search report 19 September 2024
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/097338

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/097338

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **12-15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 12-15 relate to a method for treating a patient suffering from a neurodegenerative disease or condition, which is a method for treatment of a living human or animal body, and belongs to subject matter for which no search is required by the International Searching Authority as defined in PCT Rule 39.1.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2024/097338

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2023019203	A1	16 February 2023	None			
US	2023025289	A1	26 January 2023	AU	2020336302	A1	03 March 2022
				WO	2021041316	A1	04 March 2021
				JP	2022546317	A	04 November 2022
				EP	4017508	A1	29 June 2022
				KR	20220068222	A	25 May 2022
				CA	3148370	A1	04 March 2021
CN	115135330	A	30 September 2022	WO	2021072302	A1	15 April 2021
				EP	4041255	A1	17 August 2022
				EP	4041255	A4	15 November 2023
				KR	20220132521	A	30 September 2022
				IL	291982	A	01 June 2022
				JP	2022551658	A	12 December 2022
				MX	2022004373	A	27 July 2022
				US	2023235280	A1	27 July 2023
				AU	2020364139	A1	26 May 2022
				CA	3157358	A1	15 April 2021
CN	115768446	A	07 March 2023	MX	2022011831	A	04 January 2023
				BR	112022019060	A2	29 November 2022
				WO	2021195426	A1	30 September 2021
				EP	4125961	A1	08 February 2023
				US	2023293593	A1	21 September 2023
				CA	3173096	A1	30 September 2021
				AU	2021241643	A1	24 November 2022
				IL	296665	A	01 November 2022
				KR	20220158046	A	29 November 2022
				JP	2023520997	A	23 May 2023
				TW	202202155	A	16 January 2022

A. 主题的分类

C12N5/0797(2010.01)i; C12N5/10(2006.01)i; C12N15/12(2006.01)i; C12N15/62(2006.01)i; C12N15/867(2006.01)i; A61K35/545(2015.01)i; A61P25/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12N A61K A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS; CNTXT; CJFD; CNKI; WPABS; WPABSC; ENTXTC; ENTXT; DWPI; ISI Web of Science; Gen Bank; STNext; 中国专利生物序列检索系统: 士泽生物医药, 干细胞, 多巴胺能神经细胞, 退行性疾病, 帕金森, HLA, MHC, B2M, CIITA, CD24, CD47, stem cells, dopaminergic neural cells, degenerative diseases, parkinson

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2023019203 A1 (SANA BIOTECHNOLOGY INC) 2023年2月16日 (2023 - 02 - 16) 说明书第00411、00451、00715、00934-00944段	1-11、16-18
X	US 2023025289 A1 (SANA BIOTECHNOLOGY INC) 2023年1月26日 (2023 - 01 - 26) 说明书第211-238、326、334、335段	1-11、16-18
X	CN 115135330 A (纽约干细胞基金会有限公司 等) 2022年9月30日 (2022 - 09 - 30) 权利要求1-31	1-11、16-18
A	CN 115768446 A (萨那生物技术股份有限公司) 2023年3月7日 (2023 - 03 - 07) 权利要求1-195	1-11、16-18

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2024年9月14日

国际检索报告邮寄日期

2024年9月19日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

杨叶波

电话号码 (+86) 0512-88996457

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:
- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交 (细则13之三.1(a)) ,
☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见:

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1.

☒

权利要求： 12-15
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
权利要求12-15涉及一种用于治疗患有神经退行性疾病或病况的患者的方法，均是对有生命的人体或动物体的治疗方法，属于PCT细则39.1定义的不要求国际检索单位检索的主题。
2.

☐

权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3.

☐

权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2024/097338

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2023019203	A1	2023年2月16日	无			
US	2023025289	A1	2023年1月26日	AU	2020336302	A1	2022年3月3日
				WO	2021041316	A1	2021年3月4日
				JP	2022546317	A	2022年11月4日
				EP	4017508	A1	2022年6月29日
				KR	20220068222	A	2022年5月25日
				CA	3148370	A1	2021年3月4日
CN	115135330	A	2022年9月30日	WO	2021072302	A1	2021年4月15日
				EP	4041255	A1	2022年8月17日
				EP	4041255	A4	2023年11月15日
				KR	20220132521	A	2022年9月30日
				IL	291982	A	2022年6月1日
				JP	2022551658	A	2022年12月12日
				MX	2022004373	A	2022年7月27日
				US	2023235280	A1	2023年7月27日
				AU	2020364139	A1	2022年5月26日
				CA	3157358	A1	2021年4月15日
CN	115768446	A	2023年3月7日	MX	2022011831	A	2023年1月4日
				BR	112022019060	A2	2022年11月29日
				WO	2021195426	A1	2021年9月30日
				EP	4125961	A1	2023年2月8日
				US	2023293593	A1	2023年9月21日
				CA	3173096	A1	2021年9月30日
				AU	2021241643	A1	2022年11月24日
				IL	296665	A	2022年11月1日
				KR	20220158046	A	2022年11月29日
				JP	2023520997	A	2023年5月23日
				TW	202202155	A	2022年1月16日