(19) Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 20 2022 003 132 U1** 2025.03.27

(12) # Gebrauchsmusterschrift

(21) Aktenzeichen: **20 2022 003 132.7**
(22) Anmeldetag: **01.04.2022**
(67) aus Patentanmeldung: **EP 22 78 2325.9**
(47) Eintragungstag: **17.02.2025**
(45) Bekanntmachungstag im Patentblatt: **27.03.2025**

(51) Int Cl.: ***C12N 5/10*** (2006.01)
C12N 5/074 (2010.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01)
A61K 35/12 (2015.01)

(30) Unionspriorität:

63/169,578	**01.04.2021**	**US**
63/236,951	**25.08.2021**	**US**

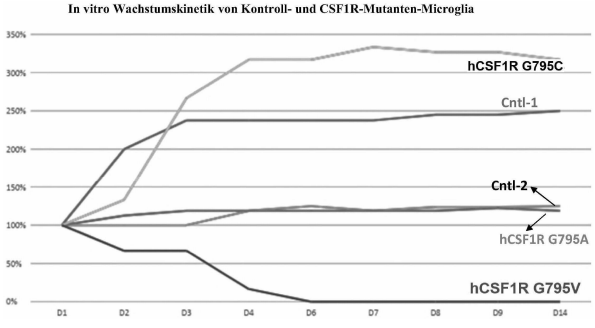
(73) Name und Wohnsitz des Inhabers:
The Regents of the University of California, Oakland, CA, US

(74) Name und Wohnsitz des Vertreters:
dompatent von Kreisler Selting Werner - Partnerschaft von Patentanwälten und Rechtsanwälten mbB, 50667 Köln, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.

(54) Bezeichnung: **Genetische Modifikation von Säugerzellen zur Verleihung von Resistenz gegen CSF1R-Antagonisten**

(57) Hauptanspruch: Modifizierte humane Zelle, die ein modifiziertes CSF1R-Protein umfasst, das Resistenz gegenüber einem CSF1R-Antagonisten aufweist, wobei das modifizierte CSF1R-Protein eine modifizierte ATP-Bindungstasche umfasst, die ATP binden kann.



Beschreibung

Querverweis auf verwandte Anmeldungen

[0001] Diese Anmeldung beansprucht die Priorität der am 1. April 2021 eingereichten vorläufigen US-Anmeldung Nr. 63/169,578 und der am 25. August 2021 eingereichten vorläufigen US-Anmeldung Nr. 63/236,951, deren Inhalte hierin in vollem Umfang durch Bezugnahme enthalten sind.

Verweis auf ein Sequenzprotokoll

[0002] Die Anmelderin macht geltend, dass die in Form einer nach Regel 13ter.1(a) eingereichten Textdatei in Anlage C/ST.25 mit dem Titel >UCI 21.03 PCT Sequencing Listing_ST25< aufgezeichneten Informationen mit denjenigen identisch sind, die Bestandteil der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung sind. Der Inhalt des Sequenzprotokolls ist hierin in vollem Umfang durch Bezugnahme enthalten.

Gebiet der Offenbarung

[0003] Die vorliegende Offenbarung umfasst Verfahren und Zusammensetzungen für die Behandlung neurologischer Erkrankungen; insbesondere weisen die Verfahren und Zusammensetzungen Zellen mit teilweiser oder vollständiger Resistenz gegen CSF1R-Antagonisten auf.

Hintergrund der Offenbarung

[0004] Fast jede neurologische Erkrankung und Verletzung des Menschen geht mit Beeinträchtigungen oder Modifikationen der Funktion, der Genexpression und des Aktivierungszustands der Microglia, der residenten Immunzelle des Gehirns, einher. In einigen Fällen sind genetische Mutationen in Microglia die Hauptursache für neurologische Erkrankungen, während bei anderen Erkrankungen Polymorphismen in Microglia-Genen das Erkrankungsrisiko erhöhen. Leider gibt es nur wenige, wenn überhaupt, wirksame Therapien für viele dieser Erkrankungen und Verletzungen.

[0005] Microglia, Monozyten und Makrophagen kommen in einer „Nische“ vor, die die Gesamtzahl der Microglia, Monozyten und Makrophagen, die sich im zentralen Nervensystem (ZNS) von Säugetieren befinden, begrenzen kann. Daher sind Verfahren erforderlich, mit denen Microglia, Monozyten und Makrophagen oder die Zellen, aus denen sie hervorgehen, therapeutisch derart modifiziert werden können, dass sie mit den endogenen Microglia konkurrieren und die ZNS-Nische teilweise oder vollständig besetzen. Das Ziel der vorliegenden Offenbarung ist die Entwicklung von Therapeutika auf Microglia-Basis, einschließlich Ansätzen zur Transplantation genetisch modifizierter humaner Microglia oder verwandter Monozytenlinien oder Progenitorzellen in Patienten.

Kurze Zusammenfassung der Offenbarung

[0006] Ziel der vorliegenden Offenbarung ist es, Zusammensetzungen und Verfahren bereitzustellen, die eine differenzierte Resistenz gegen CSF1R-Antagonisten (z. B. teilweise, vollständig, Zunahme, Abnahme) für die Behandlung neurologischer Erkrankungen ermöglichen.

[0007] Microglia sind für ihr Überleben, ihre Proliferation und ihre Selbsterneuerung auf die Signalisierung von CSF1R über zwei Liganden (CSF1 und IL-34) angewiesen. Die Behandlung von Säugetiermodellen mit verschiedenen CSF1R-Antagonisten verringert die Zahl der Microglia im zentralen Nervensystem. Wenn diese Verbindungen entfernt werden, vermehren sich die überlebenden Microglia und füllen die Nische schnell wieder auf. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass humane Stammzellen-abgeleitete Microglia, die in das Gehirn von Mäusen transplantiert wurden, ebenfalls anfällig für CSF1R-Inhibition sind und durch diese abgetötet werden (**Fig.** 11F, 11G, 11H, 11I, 11J).

[0008] Um mit der endogenen Microglia-Nische zu konkurrieren, müssten therapeutische Microglia, Monozyten, Makrophagen oder ihre Progenitoren oder Vorläufer einen selektiven Vorteil gegenüber den endogenen, im Gehirn ansässigen Microglia in ihrer Reaktion auf CSF1R-Inhibitoren haben. Konkret müssten therapeutische Zellen entwickelt werden, die bei einer bestimmten Dosis des CSF1R-Inhibitors, die ausreicht, um endogene Microglia abzutöten, nicht absterben. In einigen Fällen sollte dieser selektive Vorteil nur partiell sein, sodass eine höhere Dosis von CSF1R-Inhibitoren auch therapeutische Microglia, Makrophagen, Monozyten

oder deren Progenitoren oder Vorläufer abtöten könnte, falls dies aus Sicherheitsgründen erforderlich sein sollte.

[0009] In einigen Ausführungsformen weist die vorliegende Offenbarung eine Zelle (z. B. eine modifizierte humane Zelle) auf, die eine Nukleinsäure umfasst, die für ein modifiziertes CSF1R-Protein (z. B. ein humanes CSF1R-Protein) kodiert, das eine differentielle Resistenz gegenüber einem CSF1R-Antagonisten aufweist. In anderen Ausführungsformen zeichnet sich die vorliegende Offenbarung durch eine modifizierte humane Zelle aus, die eine differentielle Resistenz gegenüber einem CSF1R-Antagonisten aufweist. In weiteren Ausführungsformen weist die vorliegende Offenbarung eine modifizierte humane Zelle auf, die eine Nukleinsäure umfasst, die für ein modifiziertes CSF1R-Protein kodiert, das eine differentielle Resistenz gegenüber einem CSF1R-Antagonisten aufweist.

[0010] Weiterhin offenbart ist ein Verfahren zur Behandlung eines Subjekts. Das Verfahren kann die Verabreichung eines CSF1R-Antagonisten an das Subjekt in einer ausreichenden Menge, um ein CSF1R-Signal in einer Zelle des Subjekts zu hemmen, und das Inkontaktbringen des Subjekts mit einer modifizierten CSF1R-exprimierenden Zelle (z. B. einem modifizierten CSF1R-exprimierenden Phagozyten) die eine differentielle Resistenz gegenüber einem CSF1R-Antagonisten aufweist, umfassen. Das Verfahren kann das Inkontaktbringen des Subjekts mit einer modifizierten CSF1R-exprimierenden Zelle (z. B. einem modifizierten CSF1R-exprimierenden Phagozyten), die eine differentielle Resistenz gegenüber einem CSF1R-Antagonisten aufweist, und die Verabreichung des CSF1 R-Antagonisten an das Subjekt in einer ausreichenden Menge umfassen, um ein CSF1R-Signal in einer Zelle des Subjekts zu hemmen.

[0011] Die vorliegende Offenbarung umfasst auch ein Verfahren zur Behandlung eines Subjekts. Das Verfahren umfasst das Inkontaktbringen des Subjekts mit einer modifizierten CSF1R-exprimierenden Zelle (z. B. einem modifizierten CSF1R-exprimierenden Phagozyten) und das unterschiedliche Verändern der Proliferation oder des Überlebens einer nicht modifizierten CSF1R-exprimierenden Zelle (z. B. einem modifizierten CSF1R-exprimierenden Phagozyten) im Vergleich zu der modifizierten CSF1R-exprimierenden Zelle (z. B. einem modifizierten CSF1R-exprimierenden Phagozyten).

[0012] In einigen Ausführungsformen kann die vorliegende Offenbarung ferner eine Nukleinsäurezusammensetzung und -vektoren aufweisen, die für ein modifiziertes CSF1R-Protein kodieren, das eine differentielle Resistenz gegenüber einem CSF1R-Antagonisten, wie hierin beschrieben, aufweist.

[0013] Zu den technischen Merkmalen der vorliegenden Offenbarung gehört die Verwendung einer differentiellen Resistenz gegen CSF1R-Antagonisten (z. B. eine partielle, vollständige, erhöhte oder verringerte Resistenz), um therapeutische Microglia, Makrophagen, Monozyten oder deren Progenitoren oder Vorläufer für die Behandlung neurologischer Erkrankungen zu erzeugen. Ohne die Offenbarung auf eine Theorie oder einen Mechanismus beschränken zu wollen, wird angenommen, dass das technische Merkmal der vorliegenden Offenbarung vorteilhafterweise die Erzeugung von Microglia, Monozyten, HSPCs (hämatopoetische Stamm- oder Progenitorzellen) oder primitiven Makrophagen aus pluripotenten Stammzellen mit differentieller Resistenz gegen CSF1R-Antagonisten (z. B. CSF1R-Antagonistenresistenz) bereitstellt. Wie hierin beschrieben, wird die Transplantation der vorgenannten Zellen ohne irgendeine Form der Konditionierung oder des selektiven Vorteils wahrscheinlich nur ein teilweises oder begrenztes Anwachsen in das zentrale Nervensystem (ZNS) aufweisen. Die vorliegende Offenbarung entwickelt den bisher beschriebenen Ansatz weiter, der das therapeutische Anwachsen von Microglia, Makrophagen oder Monozyten oder deren Progenitoren (HSPCs, PMPs) im Gehirn von Säugetieren erheblich erleichtern wird. Keine der derzeit bekannten früheren Referenzen oder Arbeiten weist das einzigartige, erfinderische, technische Merkmal der vorliegenden Erfindung auf.

[0014] Die Zusammensetzungen und Verfahren dieser Offenbarung stellen eine erhebliche Abweichung vom derzeitigen Paradigma für die Verwendung von CSF1R-Antagonisten in der Medizin dar. So lehrt der Stand der Technik beispielsweise die Verwendung eines CSF1R-Inhibitors, um endogene Microglia zu beseitigen und den Eintritt von Knochenmark- und/oder Blut-abgeleiteten Monozyten in das Gehirn zu erleichtern. Knochenmark- und/oder Blut-abgeleitete Monozyten, die in das Gehirn eindringen, unterscheiden sich jedoch auch noch viele Monate nach der Infiltration funktionell und in der Transkription von den Microglia. Außerdem reagieren die Knochenmark- und/oder Blut- abgeleiteten Monozyten nicht so empfindlich auf CSF1R-Antagonisten wie Microglia, was beweist, dass diese Zellen keine Microglia sind. Dies führt von der vorliegenden Offenbarung weg, die die Expansion therapeutischer Microglia (z. B. humaner Microglia) mit einem modifizierten CSF1R-Protein zur Behandlung neurologischer Erkrankungen erleichtert.

[0015] Darüber hinaus haben die meisten großen Pharmaunternehmen CSF1R-Antagonisten für die Behandlung einiger Krebsarten entwickelt. Die endogenen Microglia reagieren jedoch äußerst empfindlich auf CSF1R-Antagonisten und sterben ab, wenn sie mit höheren Dosen dieser Verbindungen behandelt werden. Dies gilt für humane Stammzellen-abgeleitete Microglia, die in das Gehirn von Mäusen transplantiert wurden (**Fig.** 11F, 11G, 11H, 11I, 11J), und auch für kultivierte humane Microglia (**Fig.** 4A, 4B, 4C, 4D und 4E). Paradoxerweise werden im Rahmen der vorliegenden Offenbarung Verbindungen (z. B. CSF1R-Antagonisten) verwendet, die für Microglia toxisch sind, um das langfristige Anwachsen transplantierter Microglia (z. B. transplantierte therapeutische Microglia, d. h. Microglia mit einem modifizierten CSF1R-Protein) zu verbessern. Die Verfahren dieser Offenbarung bewältigen die Schwierigkeit, ein weitreichendes Anwachsen von transplantierten Microglia (z. B. transplantierte therapeutische Microglia, d.h. Microglia, die ein modifiziertes CSF1R-Protein umfassen) in einer etablierten Microglia-Nische zu erreichen, die normalerweise nicht für ein solches Anwachsen empfänglich wäre.

[0016] Darüber hinaus trugen die technischen Merkmale der vorliegenden Offenbarung zu einem überraschenden Ergebnis bei und verdeutlichen die Unvorhersehbarkeit der mit diesen Mutationen verbundenen Ergebnisse. Zum Beispiel führen zwei der vorgeschlagenen Punktmutationen zu einem vollständigen (100 %) Schutz gegen zwei CSF1R-Inhibitoren (d. h. CSF1R-Antagonisten) über mehrere steigende Dosen, wenn sie 24 Stunden nach der Behandlung mit dem Inhibitor bewertet werden (**Fig.** 4A, 4B, 4C, 4D und 4E). Im Gegensatz dazu verhinderte eine dritte Mutation, G795V, die erfolgreiche Differenzierung von iPSCs in Microglia (**Fig.** 1). Diese Daten zeigen, wie wichtig die spezifische DNA und die daraus resultierende Aminosäureänderung ist, die in CSF1R eingeführt wird, und dass einige Veränderungen zwar die gewünschte Resistenz gegen CSF1R-Inhibitoren (d. h. CSF1R-Antagonisten) bewirken, andere jedoch die Fähigkeit zur Differenzierung oder zum Überleben von Microglia beeinträchtigen können.

[0017] Die vorliegende Offenbarung umfasst daher Verfahren und Zusammensetzungen zur Erleichterung des kompetitiven Anwachsens von humanen Microglia, Makrophagen und Monozyten und/oder deren Vorläuferzellen (HSPCs, erythromyeloische Progenitoren (EMPs) oder primitive Makrophagenprogenitoren (PMPs)). Die Zellen können aus verschiedenen Quellen stammen, darunter pluripotente Stammzellen, einschließlich embryonaler Stammzellen und induzierter pluripotenter Stammzellen (iPSCs), Knochenmark-abgeleitete hämatopoetische Stammzellen, Nabelschnurblutzellen, Blut-abgeleitete Monozyten, Makrophagen aus fetalem Dottersack oder Gewebe, Makrophagen aus erwachsenem Gewebe oder durch direkte Umprogrammierung eines anderen Zelltyps in Microglia, HSPC, Monozyten oder Makrophagen. Darüber hinaus kann die vorliegende Offenbarung Verfahren und Zusammensetzungen zur Erleichterung des kompetitiven Anwachsens von CSF1R exprimierenden Zellen, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Zellen aus Herz, Haut, Leber, Lunge, Niere, Auge, Prostata und Eierstock, umfassen.

[0018] Jedes Merkmal oder jede Kombination von Merkmalen, die hierin beschrieben werden, fallen in den Anwendungsbereich der vorliegenden Offenbarung, vorausgesetzt, dass die Merkmale, die in einer solchen Kombination enthalten sind, nicht miteinander unvereinbar sind, wie aus dem Kontext, dieser Beschreibung und dem Wissen von Fachleuten auf dem Gebiet der Technik ersichtlich ist. Weitere Vorteile und Aspekte der vorliegenden Offenbarung ergeben sich aus der folgenden detaillierten Beschreibung und den Ansprüchen.

Kurze Beschreibung der verschiedenen Ansichten der Zeichnung(en)

[0019] Die Merkmale und Vorteile der vorliegenden Offenbarung werden aus der Betrachtung der folgenden detaillierten Beschreibung ersichtlich, die in Verbindung mit den beigefügten Zeichnungen dargestellt ist, wobei die Figuren Folgendes zeigen:

Fig. 1 zeigt die in vitro Wachstumskinetik von Kontroll- und CSF1R Mutanten-Microglia. Isogene iPSC-abgeleitete hämatopoetische Progenitoren wurden zu Microglia differenziert, und die Zelldichte wurde für die ersten 14 Tage verwendet. Die beiden isogenen Wildtyp-Kontrolllinien (Cntl-1 und Cntl-2) zeigen, dass ein gewisses Maß an Variabilität bei den Proliferationsraten von iPSC-Microglia zu erwarten ist. Sowohl die hCSF1R G795A- als auch die G785C-Mutanten weisen Proliferationsraten auf, die mit denen der beiden Kontrolllinien vergleichbar sind. Im Gegensatz dazu zeigt die hCSFR G794V-Mutante eine rasche Abnahme der Zelldichte, wobei nach dem sechsten Tag der Differenzierung keine lebensfähigen Zellen mehr vorhanden sind. Diese Daten zeigen, dass die spezifische Wahl der Aminosäuresubstitution entscheidend für die erfolgreiche Erzeugung lebensfähiger Microglia ist, die auch eine Resistenz gegen CSF1R-Antagonisten aufweisen können.

Fig. 2A, 2B, 2C, 2D, 2E und 2F zeigen, dass ausgewählte CSF1R-Mutationen nur geringe Auswirkungen auf die transkriptomische Signatur haben und gleichzeitig eine Resistenz gegen PLX5622 verleihen. **Fig.** 2A zeigt eine Hauptkomponentenanalyse unter Verwendung der obersten 2.000 Gene, aus der hervorgeht, dass die Hauptquelle der Variation im Datensatz die WT-Reaktion auf PLX5622 ist. **Fig.** 2B und **Fig.** 2C zeigen eine lineare Regressionsanalyse und die Berechnung des Pearson-Korrelationskoeffizienten zwischen DMSObehandeltem MUT1 (d.h. G795A; **Fig.** 2B) oder MUT2 (d.h. G795C; **Fig.** 2C) und WT-Microglia, was ein hohes Maß an Übereinstimmung bei der Untersuchung des vollständigen Transkriptoms und der 249 Gene der Kernsignatur der Microgliagene bestätigt. **Fig.** 2D, 2E und 2F zeigen, dass eine 24-stündige Behandlung von WT- (**Fig.** 2D), MUT1- (d.h. G795A; **Fig.** 2E) und MUT2- (d.h. G795C; **Fig.** 2F) Microglia mit PLX5622 signifikante transkriptomische Modifikationen in den WT-Zellen (FDR ≤ 0,05; log2(FC) >_ ±1) im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen induzierte. Die Behandlung der MUT1- und MUT2-Linien führte jedoch zu keiner signifikanten Modifikation der Genexpression, was darauf hindeutet, dass diese Linien gegen die Wirkung von PLX5622 resistent sind.

Fig. 3 zeigt eine Distanzmatrix von CSF1R-Mutanten und Kontroll-xMGs (Microglia). Die RNA-seq-Expressionszahlen wurden normalisiert und mit einer Varianz-stabilisierenden Transformation transformiert. Zwischen allen Proben wurden paarweise euklidische Abstände berechnet, und die Proben wurden anhand der Abstände hierarchisch geclustert. Diese Daten zeigen, dass das Transkriptom der G795A-Microglia-Mutanten dem der WT CSF1R-Microglia am ähnlichsten ist.

Fig. 4A, 4B, 4C, 4D und 4E zeigen, dass humane Stammzellen-abgeleitete Microglia auch für CSF1R-Hemmung in vitro empfänglich sind und abgetötet werden. **Fig.** 4A zeigt die Caspase 3/7-Werte, die über 24 Stunden in einer Kultur mit vollständigem Medium mit 0,1% DMSO, 250 nm PLX3397, 500 nm PLX3397 und 1 µm PLX 3397 aufgenommen wurden. Die Bilder wurden mit dem Incucyte S3 Live-Cell Imager aufgenommen. **Fig.** 4B zeigt die Caspase 3/7-Werte, die über 24 Stunden in einer Kultur mit vollständigem Medium mit 0,1% DMSO, 250 nm PLX5622, 500 nm PLX5622 und 1 µm PLX5622 gemessen wurden. Die Bilder wurden mit dem Incucyte S3 Live-Cell Imager aufgenommen. **Fig.** 4C zeigt die Caspase 3/7-Werte, die über 24 Stunden in einer Kultur mit vollständigem Medium mit 0,1% DMSO, 250 nm Edicotinib (JNJ-40346527), 500 nm Edicotinib und 1 µm Edicotinib gemessen wurden. Die Bilder wurden mit dem Incucyte S3 Live-Cell Imager aufgenommen. **Fig.** 4D zeigt die Caspase 3/7-Werte, die über 24 Stunden in einer Kultur mit vollständigem Medium mit 0,1% DMSO, 250 nm BLZ945, 500 nm BLZ945 und 1 µm BLZ945 gemessen wurden. Die Bilder wurden mit dem Incucyte S3 Live-Cell Imager aufgenommen. **Fig.** 4E zeigt repräsentative Bilder der Caspase 3/7-Fluoreszenzaktivität für Wildtyp-, G795A- und G795C-Microglia nach 24 Stunden in Kultur mit PLX3397. Für alle Panels wurden n = 4 Bilder in sechs unabhängigen Vertiefungen quantifiziert. Daten dargestellt als Mittelwerte ± SEM.

Fig. 5A und 5B zeigen, dass G795A iPSC-abgeleitete Microglia resistent gegen den durch den CSF1R-Antagonisten induzierten Zelltod sind. Da Zellen auch durch andere Prozesse als die Caspase-vermittelte Apoptose absterben können, ist es wichtig festzustellen, ob die G795A-Mutation eine breit angelegte Resistenz gegen jede Form des durch CSF1R-Antagonisten ausgelösten Zelltods bewirkt. Daher wurden G795A- und Wildtyp-(WT)-iPSC-Microglia 24 Stunden lang entweder mit 500 nM (**Fig.** 5A) oder 1 nM (**Fig.** 5B) DMSO-Vehikelkontrolle oder einem von vier CSF1R-Antagonisten behandelt: PLX3397, PLX5622, Edicotinib und BLZ945. Der prozentuale Anteil lebender bzw. abgestorbener Zellen wurde dann mit einem Zweifarben-Viabilitäts-/Zytotoxizitätsansatz (Thermo L3224; LIVE/DEADTM Viability/Cytotoxicity Kit) quantifiziert. 24 Stunden nach der Behandlung mit DMSO werden nur sehr wenige tote Microglia festgestellt. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung mit CSF1R-Antagonisten bei Wildtyp-Microglia zu einem erheblichen Zelltod, bei G795A-Microglia jedoch nur zu einem geringen bis gar keinem Zelltod. Lebende Zellen sind mit einem Kreis gekennzeichnet.

Fig. 6 zeigt, dass die Behandlung von Microglia, die mutiertes CSF1R exprimieren, mit 25 ng/ml Human Macrophage Colony Stimulating Factor (Peprotech #300-25) nach 48 Stunden die Tyrosinphosphorylierung des CSF-1R/M-CSF-R-Proteins stimuliert, wie mit dem PathScan® Phospho-CSF-1R/M-CSF-R (pan-Tyr) Sandwich ELISA Kit (n=7) nachgewiesen wurde. Microglia, die CSF1R G795A exprimieren, phosphorylieren auf ähnliche Weise, während Microglia, die CSF1R G795C exprimieren, im Vergleich zu WT-Microglia erhöhte Phosphorylierungswerte aufweisen. Diese Daten deuten darauf hin, dass sowohl G795A als auch G795C eine Resistenz gegen CSF1R-Antagonisten bewirken, während die G795C-Mutation zu einer verstärkten Signalisierung von CSF1R führen kann. Daten dargestellt als Mittelwerte ± SEM.

Fig. 7A, 7B, 7C und 7D zeigen die Kristallstruktur des CSF1R-Rezeptors, der an einen CSF1R-Antagonisten gebunden ist. **Fig.** 7A zeigt einen humanen CSF1R-Rezeptor, der an einen PLX5622 CSF1R-Antagonisten gebunden ist, und **Fig.** 7B zeigt einen CSF1R-Rezeptor, der an einen PLX3397CSF1R-Antagonisten gebunden ist. Die Kristallstruktur wurde untersucht, um Aminosäuresubstitutionen vorher-

zusagen, die die Bindung von CSF1R-Antagonisten sterisch behindern können, während sie die normale Bindung von ATP in dieselbe Bindungstasche nicht beeinträchtigen. Die Kristallstruktur des CSF1R-Antagonisten PLX5622 (**Fig.** 7A) oder PLX3397 (**Fig.** 7B), der an den humanen CSF1R gebunden ist, wurde bereits veröffentlicht. Anhand dieser öffentlich zugänglichen Daten wurde die ATP-Bindungstasche untersucht. Durch molekulare Modellierung wurden einzelne Aminosäureänderungen vorhergesagt (**Fig.** 7C), die die Bindung von PLX5622 oder PLX3397 oder anderen CSF1R-Antagonisten wahrscheinlich beeinträchtigen würden, während die normale ATP-Bindung an CSF1R nicht gestört wird. Diese Modellierung legt insbesondere nahe, dass der Ersatz der Aminosäure G795 durch ein Alanin (A), Valin (V) oder Cystein (C) die sterische Hinderung der Bindung von PLX5622 und/oder PLX3397 erhöht, ohne die normale Bindungsfähigkeit von ATP zu beeinträchtigen. Auch andere Mutationen könnten untersucht werden, um die Bindung zu verhindern (**Fig.** 7D).

Fig. 8 zeigt DNA-Chromatogramme, die die erfolgreiche Herstellung isogener humaner iPSC-Zelllinien demonstrieren, die für einzelne Aminosäuren-Punktmutationen an Position 795 innerhalb der CSF1R-Kodiersequenz kodieren. In diesem speziellen Fall wurde jede Linie durch CRISPR-vermitteltes Gen-Editing erzeugt. Ähnliche Veränderungen könnten jedoch auch durch verschiedene andere Gen-Editing-Methoden herbeigeführt werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf TALENs, traditionelle homologe Rekombination, viralen Genübertragung oder andere CRISPR-Varianten.

Fig. 9A, 9B, 9C, 9D und 9E zeigen, dass ausgewählte CSF1R-Mutationen nur geringe Auswirkungen auf die transkriptomische Signatur in vivo haben. **Fig.** 9A zeigt eine Hauptkomponentenanalyse unter Verwendung der 2.000 wichtigsten Gene, die zeigt, dass die Hauptquelle der Variation zwischen G795A, G795C und WT-Microglia auf einzelne Tiere und nicht auf CSF1R-Mutationen zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu gibt es beim Vergleich mit G795V eine gewisse Trennung auf der Grundlage dieser Mutation, was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass G795V die Bildung von Microglia möglicherweise nicht ermöglicht, ohne die Genexpression wesentlich zu verändern. **Fig.** 9B und 9C zeigen eine lineare Regressionsanalyse und die Berechnung des Pearson-Korrelationskoeffizienten zwischen G795A (**Fig.** 9B) oder G795C (**Fig.** 9C) und WT-Microglia bestätigte ein hohes Maß an Übereinstimmung bei der Untersuchung des vollständigen Transkriptoms und der 190 Gene umfassenden Microglia-Signatur. **Fig.** 9D und 9E zeigen ein Vulkandiagramm humaner Microglia, die 2 Monate nach der Transplantation in MITRG-Mäusen explantiert wurden und im Vergleich zu WT-Zellen nur minimale signifikante transkriptionelle Modifikationen in den mutierten Zellen aufweisen (FDR ≤ 0,05; log2(FC) ≥ ±1).

Fig. 10A und 10B zeigen, dass aus G795A iPSC-abgeleitete Microglia nach Xenotransplantation in vivo Transkriptomsignaturen aufweisen, die denen von isogenen Wildtyp-iPSC-abgeleiteten Microglia sehr ähnlich sind. Xenotransplantations-kompatiblen Mäusen wurden entweder Wildtyp (WT) oder G795A iPSC-Microglia eingepflanzt, und nach zwei Monaten wurden humane Zellen isoliert und mittels Massen-RNA-Sequenzierung untersucht. **Fig.** 10A zeigt eine Korrelation aller entdeckten Gene für xMGs, die aus einzelnen WT- und G795A-eingepflanzten Mäusen isoliert wurden. Unterschiede zwischen den einzelnen Mäusen führen zu einer gewissen Variabilität, aber WT- und G795-xMGs bleiben hoch korreliert mit R2 zwischen 0,80 und 0,95. **Fig.** 10B zeigt, dass ein ähnlicher Vergleich mit einer ausgewählteren Microglia-spezifischen Genliste durchgeführt wurde. Dieser Vergleich ergab ebenfalls starke Korrelationen zwischen Wildtyp- und G795A-xMGs mit R2 zwischen 0,78 und 0,97. In Übereinstimmung mit früheren in vitro RNA-Sequenzierungen zeigen diese Ergebnisse, dass die G795A CSF1R-Mutation nur geringe bis gar keine Auswirkungen auf die zugrundeliegenden Transkriptoren humaner Microglia nach einem in vivo Anwachsen hat und dass der größte Teil der festgestellten Varianz auf Unterschiede zwischen den einzelnen Empfängern von Mäusetransplantaten zurückzuführen ist.

Fig. 11A, 11B, 11C, 11D, 11E, 11F, 11G, 11H, 11I und 11J zeigen, dass G795A iPSC-abgeleitete Microglia resistent gegen die Behandlung mit CSF1R-Agonisten sind und ein robustes Anwachsen humaner Microglia in das erwachsene Säugetiergehirn ermöglichen. Xenotransplantations-kompatible Mäuse erhielten im Alter von 2 Monaten bilaterale stereotaktische intrahippocampale Injektionen von 500.000 humanen iPSC-abgeleiteten Microglia (xMGs). Die Mäuse erhielten xMGs, die entweder aus einer homozygoten CSF1R-resistenten G795A humanen iPSC-Linie oder aus einer isogenen unmodifizierten humanen Wildtyp-iPSC-Linie differenziert wurden. Im Alter von vier Jahren wurden die Mäuse 4 Wochen lang mit 600mg/kg PLX3397 in Nagerfutter ad libitum behandelt. Anschließend wurden die Mäuse geofpert und die Hirnhälften mittels Fluoreszenz-Immunhistochemie und Konfocalmikroskopie untersucht. **Fig.** 11A-11E zeigt, dass sich G795A xMGs im Laufe der einmonatigen PLX3397-Behandlung von den anfänglichen Injektionsstellen im Hippocampus und Kortex aus vermehren und ausdehnen. Microglia sind mit IBA-1 markiert (**Fig.** 11A und 11F), der human-spezifische Marker Ku80 (**Fig.** 11B und 11G) wird verwendet, um die Nuklei humaner Microglia zu ko markieren, und Ki67 (**Fig.** 11C und 11H) wird verwendet, um „Wellenfronten“ proliferativer humaner xMGs zu zeigen, die in Richtung verbleibender

unbesetzter Nischen im Kortex und Thalamus wandern (Pfeile). **Fig.** 11E zeigt ein Bild mit höherer Leistung des umrahmten Bereichs in **Fig.** 11D, das zeigt, dass alle IBA1+ Microglia Ku80 mitexprimieren. Im Gegensatz dazu überlebt nur eine Handvoll humaner Wildtyp-xMGs einen Monat Behandlung mit PLX3397 (**Fig.** 11F - 11I). Die Pfeile in **Fig.** 11J zeigen zum Beispiel nur vier überlebende xMGs innerhalb des in **Fig.** 11I umrahmten Bereichs.

Fig. 12 zeigt die Quantifizierung des CSF1R-G795A humanen iPSC-Microglia-Anwachsens nach Transplantation in erwachsene hCSF1-Mäuse. Die Transplantation von CSF1R-G795A iPSC-Microglia in eine vollständig besetzte adulte Microglia-Nische (ohne Behandlung mit CSF1R-Antagonisten) führt zu einem sehr begrenzten Anwachsen humaner Microglia (5-10% der Gesamtmicroglia), gemessen durch Ko-Lokalisierung des Microglia-Markers IBA1 und des humanspezifischen Nuklearmarkers Ku30 (Ku30 +/Iba1+). Im Gegensatz dazu steigt der Prozentsatz humaner Microglia auf fast 25 %, wenn nach der CSF1R-G795A-iPSC-Microglia-Transplantation Mäuse 10 Tage lang mit PLX3397-haltigem Mäusefutter (600mg/kg PLX3397 im Futter) behandelt werden. Nach einer 30-tägigen Behandlung mit PLX3397 (600mg/kg PLX3397 im Futter) sind 90-95% aller Microglia im Gehirn human, was durch die Koexpression von Ku80 und IBM belegt wird. Durch die Transplantation von CSF1R-G795A iPSC-Microglia und die Variation der Konzentration und Dauer der Behandlung mit dem CSF1R-Antagonisten vor, während oder nach der Transplantation lässt sich der Grad der Transplantation humaner iPSC-Microglia steuern.

Detaillierte Beschreibung der Offenbarung

[0020] Obwohl Ausführungsformen der Offenbarung im Detail beschrieben wurden, sind bestimmte Variationen und Modifikationen für Fachleute offensichtlich, einschließlich Ausführungsformen, die nicht alle hierin beschriebenen Merkmale und Vorteile bereitstellen. Fachleute werden verstehen, dass sich die vorliegende Offenbarung über die spezifisch offenbarten Ausführungsformen hinaus auf andere alternative oder zusätzliche Ausführungsformen und/oder Verwendungen und offensichtliche Modifikationen und Äquivalente davon erstreckt. Auch wenn eine Reihe von Variationen gezeigt und in unterschiedlicher Ausführlichkeit beschrieben wurde, werden andere Modifikationen, die in den Anwendungsbereich der vorliegenden Offenbarung fallen, für Fachleute auf der Grundlage dieser Offenbarung leicht erkennbar sein. Es wird auch berücksichtigt, dass verschiedene Kombinationen oder Subkombinationen der spezifischen Merkmale und Aspekte der Ausführungsformen gemacht werden können und immer noch in den Anwendungsbereich der vorliegenden Offenbarung fallen. Dementsprechend sollten verschiedene Merkmale und Aspekte der offenbarten Ausführungsformen miteinander kombiniert oder ersetzt werden können, um verschiedene Arten der vorliegenden Offenbarung zu bilden. Es ist daher beabsichtigt, dass der Umfang der vorliegenden Offenbarung nicht durch die hierin beschriebenen besonderen Ausführungsformen eingeschränkt wird.

[0021] Wie hierin verwendet, sollen die Singularformen „ein“, „eine”, und „der/die/das“ auch die Pluralformen einschließen, sofern der Kontext nicht eindeutig etwas Anderes verlangt. Darüber hinaus sind die Begriffe „einschließlich“, „beinhalten“, „aufweisen“, „haben“, „mit“ oder Varianten davon in der detaillierten Beschreibung und/oder den Ansprüchen so zu verstehen, dass sie in ähnlicher Weise wie der Begriff „umfassend“ einschließend sind.

Begriffe

[0022] Der hierin verwendete Begriff „CSF1R-exprimierende Zelle“ kann sich auf Zellen beziehen, die CSF1R exprimieren, oder auf Zellen, die zur Expression von CSF1R induziert werden können, oder auf Zellen, die zu CSF1R-exprimierenden Zellen differenziert werden. Nicht einschränkende Beispiele für CSF1R-exprimierende Zellen können Microglia, Monozyten, HSPCs (hämatopoetische Stammzellen oder Progenitoren), Makrophagen, dendritische Zellen, Langerhans-Zellen, Kupffer-Zellen, Hofbauer-Zellen, extravillöse Trophoblasten, Phagozyten oder primitive Makrophagen aus pluripotenten Stammzellen sein, sind aber nicht darauf beschränkt. Darüber hinaus kann sich eine CSF1R-exprimierende Zelle auf Microglia beziehen, die direkt aus iPSCs, Monozyten oder Fibroblasten durch genetische oder niedermolekulare Ansätze umprogrammiert wurde.
Der hierin verwendete Begriff „CSF1R-exprimierender Phagozyt“ kann sich auf eine Zelle beziehen, die den CSF1R-Rezeptor exprimiert und die Fähigkeit zur Phagozytose besitzt, d. h. den Prozess, bei dem eine Zelle ihre Plasmamembran verwendet, um extrazelluläre Partikel oder Bakterien, Substrate, Proteine, Lipide oder Aggregate zu verschlingen, und diesen Bereich dann internalisiert, um ein Phagosom zu bilden. Nicht einschränkende Beispiele für CSF1R-exprimierende Phagozyten können Microglia, Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen oder andere Phagozyten sein, sind aber nicht darauf beschränkt. In einigen Ausführungsformen ist ein CSF1R-exprimierender Phagozyt eine CSF1R-exprimierende Zelle.

[0023] Der hierin verwendete Begriff „differentielle Resistenz“ kann sich auf einen Zustand beziehen, der in einer modifizierten Zelle auftritt, in der die Hemmung eines CSF1R-Signals durch einen CSF1R-Antagonisten eine andere Dosis-Wirkungs-Beziehung oder ein anderes Ausmaß der Reaktion aufweist, als dies in einer unmodifizierten Zelle zu beobachten ist. In anderen Ausführungsformen kann sich die differentielle Resistenz auf die Modifikation der Proliferation oder des Überlebens einer unmodifizierten CSF1R-exprimierenden Zelle im Vergleich zu einer modifizierten CSF1R-exprimierenden Zelle beziehen. In einigen Ausführungsformen kann die differentielle Resistenz eine teilweise, vollständige, erhöhte oder verringerte Resistenz gegen einen CSF1R-Antagonisten umfassen.

[0024] Der hierin verwendete Begriff „CSF1R-Signalhemmung“ kann sich auf eine dosisabhängige Reduktion beziehen, die durch einen CSF1R-Antagonisten in einem Schritt einer CSF1R-Signalkaskade verursacht wird, wie z. B. Phosphorylierungs- oder Dephosphorylierungsvorgänge, Genexpression usw.

[0025] Der hierin verwendete Begriff „partielle Resistenz“ bezieht sich auf modifizierte Zellen, die noch durch höhere Dosen des CSF1R-Antagonisten zerstört werden. Eine partielle Resistenz könnte auf eine erhöhte Bindungskonstante (Kd) oder ATP, eine verringerte Kinaseaktivität, eine verringerte Bindungsaffinität zum CSF1-Liganden oder eine reduzierte Signaltransduktion zurückzuführen sein.

[0026] Der hierin verwendete Begriff „vollständige Resistenz“ bezieht sich auf modifizierte Zellen, in denen bei keiner Konzentration des Antagonisten eine Hemmung des CSF1R-Signals auftritt.

[0027] Der hierin verwendete Begriff „erhöhte Resistenz“ bezieht sich auf modifizierte Zellen, in denen die Hemmung des CSF1R-Signals bei einer höheren Konzentration des Antagonisten im Vergleich zu unmodifizierten Zellen auftritt.

[0028] Der hierin verwendete Begriff „verringerte Resistenz“ bezieht sich auf modifizierte Zellen, in denen die Hemmung des CSF1R-Signals bei einer geringeren Konzentration eines Rezeptorantagonisten auftritt als in unmodifizierten Zellen zu beobachten ist.
Die Begriffe „Subjekt“ und „Patient“ werden hierin synonym verwendet. Wie hierin verwendet, kann ein Subjekt ein Nicht-Primat (z. B. Kuh, Schwein, Pferd, Katze, Hund, Ratte, Maus usw.) oder ein Primat (z. B. Affe, Menschenaffe und Mensch) sein. In bestimmten Ausführungsformen ist das Subjekt ein Mensch. In einer Ausführungsform ist das Subjekt ein Säugetier (z. B. ein Mensch) mit einer hierin beschriebenen Erkrankung, Störung oder einem Zustand. In einer anderen Ausführungsform ist das Subjekt ein Säugetier (z. B. ein Mensch) mit dem Risiko, eine hierin beschriebene Krankheit, Störung oder einen Zustand zu entwickeln. In bestimmten Fällen bezieht sich der Begriff „Patient“ auf einen Menschen in medizinischer Behandlung oder auf ein Tier in tierärztlicher Behandlung.

[0029] Der hierin verwendete Begriff „neurologische Erkrankungen“ bezieht sich auf Verletzungen, Traumata, Störungen oder Krankheiten, die das Gehirn sowie die im ganzen Körper verlaufenden Nerven und das Rückenmark betreffen.

[0030] Die hierin verwendeten Begriffe „behandeln“ oder „Behandlung“ oder „behandelnd“ beziehen sich sowohl auf die therapeutische Behandlung als auch auf prophylaktische oder präventive Maßnahmen, wobei das Ziel darin besteht, die Entwicklung einer Erkrankung (z. B. einer neurologischen Erkrankung) zu verhindern oder zu verlangsamen, wie z. B. die Verlangsamung der Entwicklung einer Störung oder die Verringerung mindestens einer nachteiligen Auswirkung oder eines Symptoms eines Zustands, einer Erkrankung oder Störung, z. B. einer Störung, die durch eine unzureichende oder unerwünschte Organ- oder Gewebefunktion gekennzeichnet ist. Die Behandlung ist im Allgemeinen „wirksam“, wenn ein oder mehrere Symptome oder klinische Marker reduziert werden, wie der Begriff hierin definiert ist. Alternativ dazu ist eine Behandlung „wirksam“, wenn das Fortschreiten einer Krankheit verringert oder aufgehalten wird. Das bedeutet, dass der Begriff „Behandlung“ nicht nur die Verbesserung der Symptome oder den Rückgang der Krankheitsmarker umfasst, sondern auch die Einstellung oder Verlangsamung des Fortschritts oder der Verschlimmerung eines Symptoms, das ohne Behandlung zu erwarten wäre. Zu den vorteilhaften oder erwünschten klinischen Ergebnissen gehören unter anderem die Linderung eines oder mehrerer Symptome, die Verringerung des Ausmaßes der Erkrankung, die Stabilisierung (z. B. keine Verschlechterung) des Krankheitszustands, die Verzögerung oder Verlangsamung des Krankheitsverlaufs, die Besserung oder Linderung des Krankheitszustands und die (teilweise oder vollständige) Remission, unabhängig davon, ob sie nachweisbar oder nicht nachweisbar sind. „Behandlung“ kann auch bedeuten, dass das Überleben im Vergleich zum erwarteten Überleben ohne Behandlung verlängert wird. Der Begriff „Behandlung“ umfasst auch die Linderung einer Erkrankung, die Verringerung der Schwere ihrer Komplikationen, die Verhinderung ihres Aus-

bruchs, die Verhinderung ihres Wiederauftretens, die bloße Verhinderung ihrer Verschlechterung, die Milderung einer damit verbundenen Entzündungsreaktion oder therapeutische Bemühungen zur Beeinflussung eines der vorgenannten Punkte, selbst wenn diese therapeutischen Bemühungen letztlich erfolglos bleiben.

[0031] Unter Bezugnahme auf **Fig.** 1-12 beschreibt die vorliegende Offenbarung Verfahren und Zusammensetzungen zur Herstellung und Verwendung von therapeutisch konzipierten CSF1R-exprimierenden Zellen (z. B. therapeutische Microglia), die eine differentielle Resistenz gegen CSF1R-Antagonisten aufweisen, zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen.

[0032] Die Zellen des zentralen Nervensystems können innerhalb einer „Nische“ existieren, die die Gesamtzahl der Zellen im ZNS von Säugetieren begrenzen kann. Die vorliegende Offenbarung zielt darauf ab, CSF1R-exprimierende Zellen (z. B. CSF1R-exprimierende Phagozyten, HSPCs, dendritische Zellen, erythromyeloische Progenitoren, Microglia, Makrophagen oder Monozyten) zur Entwicklung neuer Behandlungsmethoden für neurologische Erkrankungen und Verletzungen zu nutzen. Bei einigen Erkrankungen wird das Anwachsen und/oder Reifung solcher Zellen im ZNS jedoch wahrscheinlich durch das Vorhandensein endogener Microglia eingeschränkt. Bei solchen Indikationen würde ein Verfahren, das den transplantierten Säugetierzellen einen selektiven Überlebens- oder Proliferationsvorteil verschafft, das Anwachsen und damit die therapeutische Wirkung verbessern. Wichtig ist, dass ein solcher Ansatz auch sicher ist und keine unkontrollierte Proliferation induziert.

[0033] Die vorliegende Offenbarung zeichnet sich durch modifizierte CSF1R-exprimierende Zellen oder deren Progenitoren oder Stammzellen aus, die in Zellen differenziert sind, die CSF1R exprimieren, wobei die modifizierten CSF1R-exprimierenden Zellen eine differentielle Resistenz gegen CSF1R-Antagonisten aufweisen. Umfasst sind auch Verfahren zur Herstellung modifizierter Zellen gemäß der vorliegenden Offenbarung, die im Falle einer von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC-) oder hämatopoetischen Stamm- und Progenitoren (HSPC-) abgeleiteten modifizierten Zelle die Einführung einer Modifikation in eine undifferenzierte Zelle, gegebenenfalls das Screening oder die Selektion für die Modifikation und die Differenzierung der modifizierten Zelle in eine Zelle oder Zelllinien wie eine Monozyten- oder Makrophagenlinie umfassen können.

[0034] Bei der vorliegenden Offenbarung handelt es sich um eine Zelle (z. B. eine humane Zelle), die eine differentielle Resistenz gegenüber einem CSF1R-Antagonisten aufweist. In einigen Ausführungsformen zeichnet sich die vorliegende Offenbarung durch eine modifizierte humane Zelle aus, die eine differentielle Resistenz gegenüber einem CSF1R-Antagonisten aufweist. Die vorliegende Offenbarung kann auch eine Zelle (z. B. eine humane Zelle) umfassen, die eine Nukleinsäure enthält, die für ein modifiziertes CSF1R-Protein kodiert, das eine differentielle Resistenz gegenüber einem CSF1R-Antagonisten aufweist. In einigen Ausführungsformen weist die vorliegende Offenbarung eine modifizierte humane Zelle auf, die eine Nukleinsäure umfasst, die für ein modifiziertes CSF1R-Protein kodiert, das eine differentielle Resistenz gegenüber einem CSF1R-Antagonisten aufweist. In einigen Ausführungsformen exprimiert die Zelle (z. B. eine humane Zelle) der vorliegenden Offenbarung CSF1R und kann eine CSF1R-exprimierende Zelle sein. In anderen Ausführungsformen kann die Zelle (z. B. eine humane Zelle) der vorliegenden Offenbarung zur Expression von CSF1R induziert oder differenziert werden.

[0035] Die vorliegende Offenbarung kann auch eine modifizierte Zelle, wie hierin beschrieben, umfassen, die CSF1R exprimiert. In einigen Ausführungsformen weist die vorliegende Offenbarung eine modifizierte humane Zelle auf, wie hierin beschrieben, die CSF1R exprimiert. Die Zelle kann induziert und/oder differenziert werden, um CSF1R zu exprimieren, und kann aus einer Gruppe ausgewählt sein, die aus einer pluripotenten Stammzelle, einer hämatopoetischen Stammzelle, einem erythromyeloischen Progenitor und einer hämatopoetischen Progenitorzelle besteht.

[0036] In einigen Ausführungsformen können CSF1R-exprimierende Zellen (z. B. CSF1R-exprimierende humane Zellen) Microglia, Makrophagen, Monozyten oder andere Phagozyten umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt. In anderen Ausführungsformen können Zellen, die zur Expression von CSF1R induziert oder differenziert werden können, pluripotente Stammzellen, hämatopoetische Stammzellen, erythromyeloide Progenitoren oder hämatopoetische Progenitorzellen sein, sind aber nicht darauf beschränkt. In einigen Ausführungsformen ist die modifizierte Zelle (z. B. die modifizierte humane Zelle) eine Vorläuferzelle, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Microglia, Monozyten, Makrophagen, hämatopoetische Vorläuferzellen (HPCs) und hämatopoetische Stammzellen (HSCs), erythromyeloische progenitoren (EMPs), primitive Makrophagen und primitive Makrophagenprogenitoren (PMPs) oder hämatopoetische Stammzellen aus Nabelschnurblut.

[0037] In einigen Fällen sind die modifizierten Zellen differentiell resistent gegen CSF1R-Antagonisten. In einigen Ausführungsformen können CSF1R-Antagonisten PLX5622, PLX3397 (Pexidartinib), BLZ945, Ki20227, JNJ-40346527; JNJ-527 (Edicotinib), cFMS-Rezeptor-Inhibitor II, AZ304, ARRY-382, YM-90709, GW2580, PLX108-01, PLX7486, PLX647, ARRY-382; JNJ-40346527, Emactuzumab (RG7155), AMG820, IMC-CS4 (LY3022855), MCS110, BPR1R024, AZD7507, JTE-952, JNJ-28312141, c-FMS-IN-8 oder CSF1R-IN-22 umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0038] In anderen Ausführungsformen kann ein CSF1R-Antagonist jede Verbindung umfassen, die die Interaktion des CSF1R mit seinen kognitiven Liganden (z. B. CSF1 oder IL-34), Substraten oder nachgeschalteten Effektoren hemmt. Zu den nicht einschränkenden Beispielen von Verbindungen, die die Interaktion von CSF1 R mit seinen kognitiven Liganden, Substraten oder nachgeschalteten Effektoren hemmen, gehören unter anderem Antikörper oder Arzneimittel, die die Interaktionen zwischen CSF1R und Phospholipase C-gamma2 (PLCg2), Spleen-Tyrosinkinase (Syk) und dem Grb2/Gab2/Shp2-Komplex blockieren. In einigen Ausführungsformen wird die differentielle Resistenz gegen CSF1R-Antagonisten durch die Modifikation von Genen, die dem CSF1R nachgeschaltet sind, vermittelt. Nicht einschränkende Beispiele können INPP5D (SHIP1), TREM2, DAP12, PLCG2, PI3K, AKT, PKC, FIMP, JNK, A-SMase, Milztyrosinkinase (Syk) und der Grb2/Gab2/Shp2-Komplex umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt. In anderen Ausführungsformen wird eine partielle Resistenz gegen CSF1R-Antagonisten durch Vorbehandlung von Microglia mit Agonisten oder Antagonisten der CSF1R-Signalisierung erreicht. In weiteren Ausführungsformen können CSF1R-Antagonisten jede Verbindung umfassen, die die Signalisierung von CSF1R durch Blockierung der ATP-Bindungsstelle (d. h. der ATP-Bindungstasche) hemmt.

[0039] Tabelle 1 zeigt eine Wildtyp-CSF1R-Sequenz und nicht-einschränkende Beispiele für modifizierte CSF1R-Aminosäuresequenzen (d. h. das hier beschriebene modifizierte CSF1R-Protein) sowie nicht-einschränkende Beispiele für die Nukleinsäuresequenzen, die für das hierin beschriebene modifizierte CSF1R-Protein kodieren. Beispiele für solche Nukleinsäuren sind solche mit einer oder mehreren stillen oder konservierten Nukleinsäuresubstitutionen im Vergleich zur Wildtyp-Nukleinsäuresequenz. Die fettgedruckten Nukleinsäuren (NAs) sind Beispiele dafür, wo eine oder mehrere stille oder konservierte Nukleinsäuresubstitutionen in die Sequenz eingebaut werden können. Potentielle Nukleinsäuren sind in der Beschreibung hervorgehoben.

Beschreibung	Sequenz	SEQ ID Nr:
Wildtyp CSF1R (Nukleinsäure)	atgggcccaggagttctgctgctcctgctggtggccacagcttggcatggtcagggaatcccagtgatag agcccagtgtccctgagctggtcgtgaagccaggagcaacggtgaccttgcgatgtgtgggcaatggc agcgtggaatgggatggccccccatcacctcactggaccctgtactctgatggctccagcagcatcctca gcaccaacaacgctaccttccaaaacacggggacctatcgctgcactgagcctggagacccccctggg aggcagcgccgccatccacctctatgtcaaagaccctgcccggccctggaacgtgctagcacaggag gtggtcgtgttcgaggaccaggacgcactactgccctgtctgctcacagacccggtgctggaagcaggc gtctcgctggtgcgtgtgcgtggccggcccctcatgcgccacaccaactactccttctcgccctggcatgg cttcaccatccacagggccaagttcattcagagccaggactatcaatgcagtgccctgatgggtggcag gaaggtgatgtccatcagcatccggctgaaagtgcagaaagtcatcccagggcccccagccttgacac tggtgcctgcagagctggtgcggattcgaggggaggctgcccagatcgtgtgctcagccagcagcgttg atgttaactttgatgtcttcctccaacacaacaacaccaagctcgcaatccctcaacaatctgactttcataa taaccgttaccaaaaagtcctgaccctcaacctcgatcaagtagatttccaacatgccggcaactactcct gcgtggccagcaacgtgcagggcaagcactccacctccatgttcttccgggtggtagagagtgcctactt gaacttgagctctgagcagaacctcatccaggaggtgaccgtgggggaggggctcaacctcaaagtc atggtggaggcctacccaggcctgcaaggttttaactggacctacctgggacccttttctgaccaccagcc tgagcccaagcttgctaatgctaccaccaaggacacatacaggcacaccttcaccctctctctgccccgc ctgaagccctctgaggctggccgctactccttcctggccagaaacccaggaggctggagagctctgacg tttgagctcacccttcgataccccccagaggtaagcgtcatatggacattcatcaacggctctggcaccctt ttgtgtgctgcctctgggtaccccagcccaacgtgacatggctgcagtgcagtggccacactgataggt gtgatgaggcccaagtgctgcaggtctgggatgacccataccctgaggtcctgagccaggagcccttcc acaaggtgacggtgcagagcctgctgactgttgagaccttagagcacaaccaaacctacgagtgcag ggcccacaacagcgtggggagtggctcctgggccttcatacccatctctgcaggagcccacacgcatc ccccggatgagttcctcttcacaccagtggtggtcgcctgcatgtccatcatggccttgctgctgctgctgct cctgctgctattgtacaagtataagcagaagcccaagtaccaggtccgctggaagatcatcgagagcta	1

	tgagggcaacagttatactttcatcgaccccacgcagctgccttacaacgagaagtgggagttcccccg gaacaacctgcagtttggtaagaccctcggagctggagcctttgggaaggtggtggaggccacggcctt tggtctgggcaaggaggatgctgtcctgaaggtggctgtgaagatgctgaagtccacggcccatgctgat gagaaggaggccctcatgtccgagctgaagatcatgagccacctgggccagcacgagaacatcgtca accttctgggagcctgtacccatggaggccctgtactggtcatcacggagtactgttgctatggcgacctg ctcaactttctgcgaaggaaggctgaggccatgctgggacccagcctgagccccggccaggaccccg agggaggcgtcgactataagaacatccacctcgagaagaaatatgtccgcagggacagtggcttctcc agccagggtgtggacacctatgtggagatgaggcctgtctccacttcttcaaatgactccttctctgagcaa gacctggacaaggaggatggacggcccctggagctccgggacctgcttcacttctccagccaagtagc ccagggcatggccttcctcgcttccaagaattgcatccaccgggacgtggcagcgcgtaacgtgctgttg accaatggtcatgtggccaagattggggacttcgggctggctagggacatcatgaatgactccaactac attgtcaagggcaatgcccgcctgcctgtgaagtggatggccccagagagcatctttgactgtgtctacac ggttcagagcgacgtctggtcctatggcatcctcctctgggagatcttctcacttgggctgaatccctaccct ggcatcctggtgaacagcaagttctataaactggtgaaggatggataccaaatggcccagcctgcatttg ccccaaagaatatatacagcatcatgcaggcctgctgggccttggagcccacccacagacccaccttc cagcagatctgctccttccttcaggagcaggcccaagaggacaggagagagcgggactataccaatct gccgagcagcagcagaagcggtggcagcggcagcagcagcagtgagctggaggaggagagctct agtgagcacctgacctgctgcgagcaaggggatatcgcccagcccttgctgcagcccaacaactatca gttctgctga	
Wildtyp CSF1R (Aminosäure)	MGPGVLLLLLVATAWHGQGIPVIEPSVPELVVKPGATVTLRCVGNGSVEWD GPPSPHWTLYSDGSSILSTNNATFQNTGTYRCTEPGDPLGGSAAIHLYVK DPARPWNVLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDPVLEAGVSLVRVRGRPLMRHT NYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSISIRLKVQKVIPGPP ALTLVPAELVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFDVFLQHNNTKLAIPQQSDFHNN RYQKVLTLNLDQVDFQHAGNYSCVASNVQGKHSTSMFFRVVESAYLNLSS EQNLIQEVTVGEGLNLKVMVEAYPGLQGFNWTYLGPFSDHQPEPKLANAT TKDTYRHTFTLSLPRLKPSEAGRYSFLARNPGGWRALTFELTLRYPPEVSV IWTFINGSGTLLCAASGYPQPNVTWLQCSGHTDRCDEAQVLQVWDDPYP EVLSQEPFHKVTVQSLLTVETLEHNQTYECRAHNSVGSGSWAFIPISAGAH THPPDEFLFTPVVVACMSIMALLLLLLLLLLYKYKQKPKYQVRWKIIESYEG NSYTFIDPTQLPYNEKWEFPRNNLQFGKTLGAGAFGKVVEATAFGLGKED AVLKVAVKMLKSTAHADEKEALMSELKIMSHLGQHENIVNLLGACTHGGPV LVITEYCCYGDLLNFLRRKAEAMLGPSLSPGQDPEGGVDYKNIHLEKKYVR RDSGFSSQGVDTYVEMRPVSTSSNDSFSEQDLDKEDGRPLELRDLLHFS SQVAQGMAFLASKNCIHRDVAARNVLLTNGHVAKIGDFGLARDIMNDSNYI VKGNARLPVKWMAPESIFDCVYTVQSDVWSYGILLWEIFSLGLNPYPGILV NSKFYKLVKDGYQMAQPAFAPKNIYSIMQACWALEPTHRPTFQQICSFLQE	**2**

	QAQEDRRERDYTNLPSSSRSGGSGSSSSELEEESSSEHLTCCEQGDIAQ PLLQPNNYQFC	
G795A CSF1R (Nukleinsäure) wobei NNN umfassen kann: GCT, GCC, GCA und GCG	atgggcccaggagttctgctgctcctgctggtggccacagcttggcatggtcagggaatcccagtgatag agcccagtgtccctgagctggtcgtgaagccaggagcaacggtgaccttgcgatgtgtgggcaatggc agcgtggaatgggatggccccccatcacctcactggaccctgtactctgatggctccagcagcatcctca gcaccaacaacgctaccttccaaaacacggggacctatcgctgcactgagcctggagacccccctggg aggcagcgccgccatccacctctatgtcaaagaccctgcccggccctggaacgtgctagcacaggag gtggtcgtgttcgaggaccaggacgcactactgccctgtctgctcacagacccggtgctggaagcaggc gtctcgctggtgcgtgtgcgtggccggcccctcatgcgccacaccaactactccttctcgccctggcatgg cttcaccatccacagggccaagttcattcagagccaggactatcaatgcagtgccctgatgggtggcag gaaggtgatgtccatcagcatccggctgaaagtgcagaaagtcatcccagggcccccagccttgacac tggtgcctgcagagctggtgcggattcgaggggaggctgcccagatcgtgtgctcagccagcagcgttg atgttaactttgatgtcttcctccaacacaacaacaccaagctcgcaatccctcaacaatctgactttcataa taaccgttaccaaaaagtcctgaccctcaacctcgatcaagtagatttccaacatgccggcaactactcct gcgtggccagcaacgtgcagggcaagcactccacctccatgttcttccgggtggtagagagtgcctactt gaacttgagctctgagcagaacctcatccaggaggtgaccgtgggggaggggctcaacctcaaagtc atggtggaggcctacccaggcctgcaaggttttaactggacctacctgggacccttttctgaccaccagcc tgagcccaagcttgctaatgctaccaccaaggacacatacaggcacaccttcaccctctctctgccccgc ctgaagccctctgaggctggccgctactccttcctggccagaaacccaggaggctggagagctctgacg tttgagctcaccttcgataccccccagaggtaagcgtcatatggacattcatcaacggctctggcaccctt ttgtgtgctgcctctgggtacccccagcccaacgtgacatggctgcagtgcagtggccacactgataggt gtgatgaggcccaagtgctgcaggtctgggatgacccataccctgaggtcctgagccaggagcccttcc acaaggtgacggtgcagagcctgctgactgttgagaccttagagcacaaccaaacctacgagtgcag ggcccacaacagcgtggggagtggctcctgggccttcatacccatctctgcaggagcccacacgcatc ccccggatgagttcctcttcacaccagtggtggtcgcctgcatgtccatcatggccttgctgctgctgctgct cctgctgctattgtacaagtataagcagaagcccaagtaccaggtccgctggaagatcatcgagagcta tgagggcaacagttatactttcatcgaccccacgcagctgccttacaacgagaagtgggagttcccccg gaacaacctgcagtttggtaagaccctcggagctggagcctttgggaaggtggtggaggccacggcctt tggtctgggcaaggaggatgctgtcctgaaggtggctgtgaagatgctgaagtccacggcccatgctgat gagaaggaggccctcatgtccgagctgaagatcatgagccacctgggccagcacgagaacatcgtca accttctgggagcctgtacccatggaggccctgtactggtcatcacggagtactgttgctatggcgacctg ctcaactttctgcgaaggaaggctgaggccatgctgggacccagcctgagccccggccaggaccccg agggaggcgtcgactataagaacatccacctcgagaagaaatatgtccgcagggacagtggcttctcc agccagggtgtggacacctatgtggagatgaggcctgtctccacttcttcaaatgactccttctctgagcaa gacctggacaaggaggatggacggcccctggagctccgggacctgcttcacttctccagccaagtagc ccagggcatggccttcctcgcttccaagaattgcatccaccgggacgtggcagcgcgtaacgtgctgttg accaatggtcatgtggccaagatt**NNN**gacttcgggctggctagggacatcatgaatgactccaacta	**3**

	cattgtcaagggcaatgcccgcctgcctgtgaagtggatggccccagagagcatctttgactgtgtctaca cggttcagagcgacgtctggtcctatggcatcctcctctgggagatcttctcacttgggctgaatccctaccc tggcatcctggtgaacagcaagttctataaactggtgaaggatggataccaaatggcccagcctgcattt gccccaaagaatatatacagcatcatgcaggcctgctgggccttggagcccacccacagacccaccttt ccagcagatctgctccttccttcaggagcaggcccaagaggacaggagagagcgggactataccaat ctgccgagcagcagcagaagcggtggcagcggcagcagcagtgagctggaggaggagagct ctagtgagcacctgacctgctgcgagcaaggggatatcgcccagcccttgctgcagcccaacaactatc agttctgctga	
G795A CSF1R (Aminosäure)	MGPGVLLLLLVATAWHGQGIPVIEPSVPELVVKPGATVTLRCVGNGSVEWD GPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTGTYRCTEPGDPLGGSAAIHLYVK DPARPWNVLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDPVLEAGVSLVRVRGRPLMRHT NYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSISIRLKVQKVIPGPP ALTLVPAELVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFDVFLQHNNTKLAIPQQSDFHNN RYQKVLTLNLDQVDFQHAGNYSCVASNVQGKHSTSMFFRVVESAYLNLSS EQNLIQEVTVGEGLNLKVMVEAYPGLQGFNWTYLGPFSDHQPEPKLANAT TKDTYRHTFTLSLPRLKPSEAGRYSFLARNPGGWRALTFELTLRYPPEVSV IWTFINGSGTLLCAASGYPQPNVTWLQCSGHTDRCDEAQVLQVWDDPYP EVLSQEPFHKVTVQSLLTVETLEHNQTYECRAHNSVGSGSWAFIPISAGAH THPPDEFLFTPVVVACMSIMALLLLLLLLLLYKYKQKPKYQVRWKIIESYEG NSYTFIDPTQLPYNEKWEFPRNNLQFGKTLGAGAFGKVVEATAFGLGKED AVLKVAVKMLKSTAHADEKEALMSELKIMSHLGQHENIVNLLGACTHGGPV LVITEYCCYGDLLNFLRRKAEAMLGPSLSPGQDPEGGVDYKNIHLEKKYVR RDSGFSSQGVDTYVEMRPVSTSSNDSFSEQDLDKEDGRPLELRDLLHFS SQVAQGMAFLASKNCIHRDVAARNVLLTNGHVAKIADFGLARDIMNDSNYI VKGNARLPVKWMAPESIFDCVYTVQSDVWSYGILLWEIFSLGLNPYPGILV NSKFYKLVKDGYQMAQPAFAPKNIYSIMQACWALEPTHRPTFQQICSFLQE QAQEDRRERDYTNLPSSSRSGGSGSSSSELEEESSSEHLTCCEQGDIAQ PLLQPNNYQFC	4
G795C CSF1R (Nukleinsäure): wobei NNN umfassen kann: TGT und TGC.	atgggcccaggagttctgctgctcctgctggtggccacagcttggcatggtcagggaatcccagtgatag agcccagtgtccctgagctggtcgtgaagccaggagcaacggtgaccttgcgatgtgtgggcaatggc agcgtggaatgggatggccccccatcacctcactggaccctgtactctgatggctccagcagcatcctca gcaccaacaacgctaccttccaaaacacggggacctatcgctgcactgagcctggagacccccctggg aggcagcgccgccatccacctctatgtcaaagaccctgcccggccctggaacgtgctagcacaggag gtggtcgtgttcgaggaccaggacgcactactgccctgtctgctcacagacccggtgctggaagcaggc gtctcgctggtgcgtgtgcgtggccggcccctcatgcgccacaccaactactccttctcgccctggcatgg cttcaccatccacagggccaagttcattcagagccaggactatcaatgcagtgccctgatgggtggcag gaaggtgatgtccatcagcatccggctgaaagtgcagaaagtcatcccagggcccccagccttgacac	5

	tggtgcctgcagagctggtgcggattcgaggggaggctgcccagatcgtgtgctcagccagcagcgttg atgttaactttgatgtcttcctccaacacaacaacaccaagctcgcaatccctcaacaatctgactttcataa taaccgttaccaaaaagtcctgaccctcaacctcgatcaagtagatttccaacatgccggcaactactcct gcgtggccagcaacgtgcagggcaagcactccacctccatgttcttccgggtggtagagagtgcctactt gaacttgagctctgagcagaacctcatccaggaggtgaccgtgggggaggggctcaacctcaaagtc atggtggaggcctacccaggcctgcaaggttttaactggacctacctgggacccttttctgaccaccagcc tgagcccaagcttgctaatgctaccaccaaggacacatacaggcacaccttcaccctctctctgccccgc ctgaagccctctgaggctggccgctactccttcctggccagaaacccaggaggctggagagctctgacg tttgagctcaccttcgataccccccagaggtaagcgtcatatggacattcatcaacggctctggcaccctt ttgtgtgctgcctctgggtacccccagcccaacgtgacatggctgcagtgcagtggccacactgataggt gtgatgaggcccaagtgctgcaggtctgggatgacccatacctgaggtcctgagccaggagcccttcc acaaggtgacggtgcagagcctgctgactgttgagaccttagagcacaaccaaacctacgagtgcag ggcccacaacagcgtggggagtggctcctgggccttcatacccatctctgcaggagcccacacgcatc ccccggatgagttcctcttcacaccagtggtggtcgcctgcatgtccatcatggccttgctgctgctgct cctgctgctattgtacaagtataagcagaagcccaagtaccaggtccgctggaagatcatcgagagcta tgagggcaacagttatactttcatcgaccccacgcagctgccttacaacgagaagtgggagttcccccg gaacaacctgcagtttggtaagaccctcggagctggagcctttgggaaggtggtggaggccacggcctt tggtctgggcaaggaggatgctgtcctgaaggtggctgtgaagatgctgaagtccacggcccatgctgat gagaaggaggccctcatgtccgagctgaagatcatgagccacctgggccagcacgagaacatcgtca accttctgggagcctgtacccatggaggccctgtactggtcatcacggagtactgttgctatggcgacctg ctcaactttctgcgaaggaaggctgaggccatgctgggacccagcctgagccccggccaggaccccg agggaggcgtcgactataagaacatccacctcgagaagaaatatgtccgcagggacagtggcttctcc agccagggtgtggacacctatgtggagatgaggcctgtctccacttcttcaaatgactccttctctgagcaa gacctggacaaggaggatggacggcccctggagctccgggacctgcttcacttctccagccaagtagc ccagggcatggccttcctcgcttccaagaattgcatccaccgggacgtggcagcgcgtaacgtgctgttg accaatggtcatgtggccaagatt**NNN**gacttcgggctggctagggacatcatgaatgactccaacta cattgtcaagggcaatgcccgcctgcctgtgaagtggatggccccagagagcatctttgactgtgtctaca cggttcagagcgacgtctggtcctatggcatcctcctctgggagatcttctcacttgggctgaatccctaccc tggcatcctggtgaacagcaagttctataaactggtgaaggatggataccaaatggcccagcctgcattt gccccaaagaatatatacagcatcatgcaggcctgctgggccttggagcccacccacagacccacctt ccagcagatctgctccttccttcaggagcaggcccaagaggacaggagagagcgggactataccaat ctgccgagcagcagcagaagcggtggcagcggcagcagcagcagtgagctggaggaggagagct ctagtgagcacctgacctgctgcgagcaaggggatatcgcccagcccttgctgcagcccaacaactatc agttctgctga	
G795C CSF1R (Aminosäure)	MGPGVLLLLLVATAWHGQGIPVIEPSVPELVVKPGATVTLRCVGNGSVEWD GPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTGTYRCTEPGDPLGGSAAIHLYVK DPARPWNVLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDPVLEAGVSLVRVRGRPLMRHT	**6**

	NYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSISIRLKVQKVIPGPP ALTLVPAELVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFDVFLQHNNTKLAIPQQSDFHNN RYQKVLTLNLDQVDFQHAGNYSCVASNVQGKHSTSMFFRVVESAYLNLSS EQNLIQEVTVGEGLNLKVMVEAYPGLQGFNWTYLGPFSDHQPEPKLANAT TKDTYRHTFTLSLPRLKPSEAGRYSFLARNPGGWRALTFELTLRYPPEVSV IWTFINGSGTLLCAASGYPQPNVTWLQCSGHTDRCDEAQVLQVWDDPYP EVLSQEPFHKVTVQSLLTVETLEHNQTYECRAHNSVGSGSWAFIPISAGAH THPPDEFLFTPVVVACMSIMALLLLLLLLLLYKYKQKPKYQVRWKIIESYEG NSYTFIDPTQLPYNEKWEFPRNNLQFGKTLGAGAFGKVVEATAFGLGKED AVLKVAVKMLKSTAHADEKEALMSELKIMSHLGQHENIVNLLGACTHGGPV LVITEYCCYGDLLNFLRRKAEAMLGPSLSPGQDPEGGVDYKNIHLEKKYVR RDSGFSSQGVDTYVEMRPVSTSSNDSFSEQDLDKEDGRPLELRDLLHFS SQVAQGMAFLASKNCIHRDVAARNVLLTNGHVAKICDFGLARDIMNDSNYI VKGNARLPVKWMAPESIFDCVYTVQSDVWSYGILLWEIFSLGLNPYPGILV NSKFYKLVKDGYQMAQPAFAPKNIYSIMQACWALEPTHRPTFQQICSFLQE QAQEDRRERDYTNLPSSSRSGGSGSSSSELEEESSSEHLTCCEQGDIAQ PLLQPNNYQFC	
CSF1R G795V (Nukleinsäure): wobei NNN umfassen kann: GTT, GTC, GTA und GTG	atgggcccaggagttctgctgctcctgctggtggccacagcttggcatggtcagggaatcccagtgatag agcccagtgtccctgagctggtcgtgaagccaggagcaacggtgaccttgcgatgtgtgggcaatggc agcgtggaatgggatggccccccatcacctcactggaccctgtactctgatggctccagcagcatcctca gcaccaacaacgctaccttccaaaacacggggacctatcgctgcactgagcctggagacccccctggg aggcagcgccgccatccacctctatgtcaaagaccctgcccggccctggaacgtgctagcacaggag gtggtcgtgttcgaggaccaggacgcactactgccctgtctgctcacagacccggtgctggaagcaggc gtctcgctggtgcgtgtgcgtggccggcccctcatgcgccacaccaactactccttctcgccctggcatgg cttcaccatccacagggccaagttcattcagagccaggactatcaatgcagtgccctgatgggtggcag gaaggtgatgtccatcagcatccggctgaaagtgcagaaagtcatcccagggcccccagccttgacac tggtgcctgcagagctggtgcggattcgaggggaggctgcccagatcgtgtgctcagccagcagcgttg atgttaactttgatgtcttcctccaacacaacaacaccaagctcgcaatccctcaacaatctgactttcataa taaccgttaccaaaaagtcctgaccctcaacctcgatcaagtagatttccaacatgccggcaactactcct gcgtggccagcaacgtgcagggcaagcactccacctccatgttcttccgggtggtagagagtgcctactt gaacttgagctctgagcagaacctcatccaggaggtgaccgtgggggaggggctcaacctcaaagtc atggtggaggcctacccaggcctgcaaggttttaactggacctacctgggacccttttctgaccaccagcc tgagcccaagcttgctaatgctaccaccaaggacacatacaggcacaccttcaccctctctctgccccgc ctgaagccctctgaggctggccgctactccttcctggccagaaacccaggaggctggagagctctgacg tttgagctcacccttcgataccccccagaggtaagcgtcatatggacattcatcaacggctctggcacccctt ttgtgtgctgcctctgggtaccccagcccaacgtgacatggctgcagtgcagtggccacactgataggt gtgatgaggcccaagtgctgcaggtctgggatgacccataccctgaggtcctgagccaggagcccttcc	7

	acaaggtgacggtgcagagcctgctgactgttgagaccttagagcacaaccaaacctacgagtgcag ggcccacaacagcgtggggagtggctcctgggccttcatacccatctctgcaggagcccacacgcatc ccccggatgagttcctcttcacaccagtggtggtcgcctgcatgtccatcatggccttgctgctgctgctgct cctgctgctattgtacaagtataagcagaagcccaagtaccaggtccgctggaagatcatcgagagcta tgagggcaacagttatactttcatcgaccccacgcagctgccttacaacgagaagtgggagttcccccg gaacaacctgcagtttggtaagaccctcggagctggagcctttgggaaggtggtggaggccacggcctt tggtctgggcaaggaggatgctgtcctgaaggtggctgtgaagatgctgaagtccacggcccatgctgat gagaaggaggccctcatgtccgagctgaagatcatgagccacctgggccagcacgagaacatcgtca accttctgggagcctgtacccatggaggccctgtactggtcatcacggagtactgttgctatggcgacctg ctcaactttctgcgaaggaaggctgaggccatgctgggacccagcctgagccccggccaggaccccg agggaggcgtcgactataagaacatccacctcgagaagaaatatgtccgcagggacagtggcttctcc agccagggtgtggacacctatgtggagatgaggcctgtctccacttcttcaaatgactccttctctgagcaa gacctggacaaggaggatggacggcccctggagctccgggacctgcttcacttctccagccaagtagc ccagggcatggccttcctcgcttccaagaattgcatccaccgggacgtggcagcgcgtaacgtgctgttg accaatggtcatgtggccaagatt**NNN**gacttcgggctggctagggacatcatgaatgactccaacta cattgtcaagggcaatgcccgcctgcctgtgaagtggatggccccagagagcatctttgactgtgtctaca cggttcagagcgacgtctggtcctatggcatcctcctctgggagatcttctcacttgggctgaatccctaccc tggcatcctggtgaacagcaagttctataaactggtgaaggatggataccaaatggcccagcctgcattt gccccaaagaatatatacagcatcatgcaggcctgctgggccttggagcccacccacagacccaccttt ccagcagatctgctccttccttcaggagcaggcccaagaggacaggagagagcgggactataccaat ctgccgagcagcagcagaagcggtggcagcggcagcagcagcagtgagctggaggaggagagct ctagtgagcacctgacctgctgcgagcaaggggatatcgcccagcccttgctgcagcccaacaactatc agttctgctga	
CSF1R G795V (Aminosäure)	MGPGVLLLLLVATAWHGQGIPVIEPSVPELVVKPGATVTLRCVGNGSVEWD GPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTGTYRCTEPGDPLGGSAAIHLYVK DPARPWNVLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDPVLEAGVSLVRVRGRPLMRHT NYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSISIRLKVQKVIPGPP ALTLVPAELVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFDVFLQHNNTKLAIPQQSDFHNN RYQKVLTLNLDQVDFQHAGNYSCVASNVQGKHSTSMFFRVVESAYLNLSS EQNLIQEVTVGEGLNLKVMVEAYPGLQGFNWTYLGPFSDHQPEPKLANAT TKDTYRHTFTLSLPRLKPSEAGRYSFLARNPGGWRALTFELTLRYPPEVSV IWTFINGSGTLLCAASGYPQPNVTWLQCSGHTDRCDEAQVLQVWDDPYP EVLSQEPFHKVTVQSLLTVETLEHNQTYECRAHNSVGSGSWAFIPISAGAH THPPDEFLFTPVVVACMSIMALLLLLLLLLLYKYKQKPKYQVRWKIIESYEG NSYTFIDPTQLPYNEKWEFPRNNLQFGKTLGAGAFGKVVEATAFGLGKED AVLKVAVKMLKSTAHADEKEALMSELKIMSHLGQHENIVNLLGACTHGGPV LVITEYCCYGDLLNFLRRKAEAMLGPSLSPGQDPEGGVDYKNIHLEKKYVR	**8**

	RDSGFSSQGVDTYVEMRPVSTSSNDSFSEQDLDKEDGRPLELRDLLHFS SQVAQGMAFLASKNCIHRDVAARNVLLTNGHVAKIVDFGLARDIMNDSNYI VKGNARLPVKWMAPESIFDCVYTVQSDVWSYGILLWEIFSLGLNPYPGILV NSKFYKLVKDGYQMAQPAFAPKNIYSIMQACWALEPTHRPTFQQICSFLQE QAQEDRRERDYTNLPSSSRSGGSGSSSSELEEESSSEHLTCCEQGDIAQ PLLQPNNYQFC	

[0040] In einigen Ausführungsformen umfasst die Zelle (z. B. die modifizierte humane Zelle) eine oder mehrere genetische Modifikationen in einem Gen für einen CSF1R-Rezeptor (d. h. ein CSF1R-Protein). In einigen Ausführungsformen umfasst die Zelle (z. B. die modifizierte humane Zelle) eine oder mehrere genetische Modifikationen in einem CSF1R-Protein (d. h. einem CSF1R-Rezeptor).

[0041] In einigen Ausführungsformen führen die eine oder mehreren genetischen Modifikationen des CSF1R-Rezeptors (d. h. des CSF1R-Proteins) nicht zu einer konstitutiv aktiven Signalisierung des CSF1R. Der modifizierte CSF1R-Rezeptor (d. h. das CSF1R-Protein) kann weiterhin durch einen Liganden des CSF1R-Proteins aktiviert (z. B. phosphoryliert) werden. In einigen Ausführungsformen kann der Ligand des CSF1R-Proteins CSF1, IL-34, einen CSF1R-Agonisten oder aktivierenden Antikörper oder eine Kombination davon umfassen, ist aber nicht darauf beschränkt. In einigen Ausführungsformen wird das modifizierte CSF1R-Protein durch einen CSF1-Liganden aktiviert. In einigen Ausführungsformen induziert der CSF1-Ligand die Phosphorylierung des modifizierten CSF1R-Proteins. In anderen Ausführungsformen wird das modifizierte CSF1R-Protein durch einen IL-34-Liganden aktiviert. In einigen Ausführungsformen induziert der IL-34-Ligand die Phosphorylierung des modifizierten CSF1R-Proteins.

[0042] In einigen Ausführungsformen führen die eine oder mehreren genetischen Modifikationen zu einer modifizierten ATP-Bindungstasche. Die modifizierte ATP-Bindungstasche des CSF1R-Rezeptors (d. h. des CSF1R-Proteins) kann einen reduzierten Bindungsraum aufweisen (im Vergleich zu einem Wildtyp-CSF1R-Protein). In einigen Ausführungsformen kann die modifizierte ATP-Bindungstasche kein Arzneimittel (z. B. einen CSF1R-Antagonisten oder -Agonisten) binden. In anderen Ausführungsformen kann die modifizierte ATP-Bindungstasche ATP binden. In einigen Ausführungsformen beeinträchtigen die eine oder mehreren genetischen Modifikationen des CSF1R-Rezeptors nicht die ATP-Bindungsaktivität des CSF1R-Proteins. In einigen Ausführungsformen fehlt den ein oder mehreren genetischen Modifikationen im CSF1R-Rezeptor eine Tasche, an die ein Arzneimittel (z. B. ein CSF1R-Antagonist oder -Agonist) binden kann, die aber die normale ATP-Bindungsaktivität des CSF1R-Proteins nicht beeinträchtigt.

[0043] In einigen Ausführungsformen sind die eine oder mehrere genetische Modifikationen eine Punktmutation. In einigen Ausführungsformen führen die eine oder mehreren genetischen Modifikationen zu einer einzigen Aminosäuresubstitution. In anderen Ausführungsformen führen die eine oder mehreren genetischen Modifikationen zu einer einzelnen Aminosäureinsertion. In weiteren Ausführungsformen führen die eine oder die mehreren genetischen Modifikationen zu einer einzelnen Aminosäuredeletion.

[0044] In einigen Ausführungsformen führen die eine oder mehreren genetischen Modifikationen zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des CSF1R-Proteins. Die Änderung der Aminosäuresequenz kann gegebenenfalls die Substitution eines Aminosäurerestes umfassen, der aus G795, L785, M637, E633 und V647 ausgewählt ist. In einigen Ausführungsformen führen die eine oder mehreren genetischen Modifikationen zu einer Aminosäuresubstitution. In einigen Ausführungsformen führen die eine oder mehreren genetischen Modifikationen zu einer einzigen Aminosäuresubstitution. Die einzelnen Aminosäure-Punktmutationen können aus einer Gruppe ausgewählt sein, die aus G795A, G795V und G795C besteht.

[0045] In einigen Ausführungsformen ist das CSF1R-Gen so modifiziert, dass in den modifizierten Zellen eine partielle oder vollständige Resistenz gegen den CSF1R-Antagonisten entsteht. In einigen Ausführungsformen ist das CSF1R-Gen mit einer einzigen Punktmutation modifiziert. In anderen Ausführungsformen können einzelne Punktmutationen des CSF1R-Gens diese einzelnen Aminosäuresubstitutionen an den Positionen G795, L785, M637, E633 und/oder V647 umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt. Als nicht einschränkende Beispiele können die Substitutionen G795A, G795V oder G795C oder G795D oder G795E

oder G795F oder G795G oder G795H oder G795I oder G795K oder G795L oder G795M oder G795N oder G795P oder G795Q oder G795R oder G795S oder G795T oder G795W oder G795Y umfassen.

[0046] Ohne an irgendwelche Theorien oder Mechanismen gebunden sein zu wollen, würde die Substitution dieser Reste oder jedes anderen Aminosäurerestes, der in direktem Kontakt mit an die ATP-Bindungsstelle gebundenen niedermolekularen Inhibitoren steht, deren Bindung verändern. Aminosäuresubstitutionen, die etwas größere funktionelle Gruppen umfassen: Serin, Threonin, Cystein, Valin, Leucin, Isoleucin und Methionin sollen sperrige Substituenten einführen, die mit der Plexxikonbindung kollidieren, aber dennoch die ATP-Bindung für die CSF1R-Funktion ermöglichen. Es ist zu erwarten, dass viel größere Aminosäuresubstitutionen - Phenylalanin, Tyrosin, Lysin, Arginin und Tryptophan - sterisch sowohl mit Inhibitoren als auch mit ATP kollidieren und dadurch die normale CSF1R-Funktion hemmen. Im Gegensatz dazu können Substitutionen durch Aminosäuren mit weniger sperrigen Seitenketten wie Glycin oder Alanin die Bindung an Antagonisten verbessern, die von der nativen Sequenz aufgrund der sterischen Hinderung durch etwas größere oder inkompatibel polare Seitenketten nur schwach gebunden werden. Fachleute werden daher verstehen, dass diese und andere Reste, die Bindungsstellen für allosterische Antagonisten definieren, gemäß dem Ziel dieser Offenbarung modifiziert werden können.

[0047] In anderen Ausführungsformen führen die eine oder mehreren genetischen Modifikationen zu einer Änderung einer Vielzahl von Aminosäuren des CSF1R-Proteins. In einigen Ausführungsformen betrifft die Änderung einer Vielzahl von Aminosäuren angrenzende Aminosäuren. In anderen Ausführungsformen betrifft die Änderung einer Vielzahl von Aminosäuren nicht angrenzende Aminosäuren.

[0048] In einigen Ausführungsformen befinden sich die eine oder mehreren genetischen Modifikationen (z. B. Punktmutationen) innerhalb der ATP-Bindungstasche des CSF1R-Proteins (d. h. eines CSF1R-Rezeptors). In anderen Ausführungsformen liegen die eine oder mehreren genetischen Modifikationen (z. B. Punktmutationen) außerhalb der ATP-Bindungstasche des CSF1R-Proteins (d. h. eines CSF1R-Rezeptors). Ohne die vorliegende Offenbarung auf Theorien oder Mechanismen einschränken zu wollen, wird angenommen, dass Mutationen außerhalb der ATP-Bindungstasche des CSF1R-Proteins durch Allosterie die Bindung des Antagonisten hemmen können.

[0049] In einigen Ausführungsformen werden die eine oder mehrere genetische Modifikationen ex vivo eingeführt. In anderen Ausführungsformen werden die eine oder mehreren genetischen Modifikationen durch Transfektion oder Einführung einer Nukleinsäure, die für ein Transgen kodiert, in eine Zelle (z. B. eine humane Zelle) induziert. In weiteren Ausführungsformen werden die eine oder mehreren genetischen Modifikationen durch Transduktion oder Einführung einer gezielten Nuklease, Nickase oder eines Base-Editing-Effektors oder Ribonukleoprotein-Komplexes eingeführt. In einigen Ausführungsformen umfasst das Einführen der für ein Transgen kodierenden Nukleinsäure in eine Zelle das Inkontaktbringen der Zelle (z. B. der humanen Zelle) mit einem viralen Vektor.

[0050] In einigen Ausführungsformen werden die eine oder mehreren genetischen Modifikationen (z. B. Punktmutationen) im CSF1R-Gen durch ortsgerichtete oder zufällige Mutageneseverfahren erzeugt, die in der Fachwelt bekannt sind, einschließlich, aber nicht beschränkt auf CRISPR-Cas-, TALEN- und ZFN-Genome-Editing-Systeme. Alternativ oder zusätzlich können modifizierte CSF1R-Transgene in Zellen (z. B. humane Zellen) eingeführt werden, z. B. durch DNA- oder RNA-Vektoren wie nackte Nukleinsäuren, Liposomen oder andere eingekapselte Nukleinsäurevektoren, künstliche Chromosomen und/oder virale Vektoren wie lentivirale und adeno-assoziierte virale Vektoren.

[0051] In einigen Ausführungsformen behalten Zellen (z. B. humane Zellen), die ein modifiziertes CSF1R-Protein wie hierin beschrieben umfassen, ein Genexpressionsprofil einer Zelle (z. B. einer humanen Zelle), die ein Wildtyp-CSF1R-Protein umfasst. In einigen Ausführungsformen haben in vitro Zellen (z. B. humane in vitro Zellen), die ein modifiziertes CSF1R-Protein umfassen, ein ähnliches Genexpressionsprofil wie in vitro Zellen (z. B. humane in vitro Zellen), die ein Wildtyp-CSF1R-Protein umfassen. In anderen Ausführungsformen haben Zellen (z. B. humane Zellen), die ein modifiziertes CSF1R-Protein enthalten und in vivo transplantiert werden, ein ähnliches Genexpressionsprofil wie eine transplantierte Zelle (z. B. eine humane Zelle), die kein modifiziertes CSF1R-Protein umfasst. In weiteren Ausführungsformen behalten hierin beschriebene modifizierte CSF1R-exprimierende Zellen (z. B. CSF1R-exprimierende Phagozyten) ein Genexpressionsprofil von Wildtyp-CSF1R-exprimierenden Zellen (z. B. CSF1R-exprimierende Phagozyten).

[0052] Die vorliegende Offenbarung kann auch eine Zusammensetzung umfassen, die eine CSF1R-exprimierende Zelle wie hierin beschrieben umfasst. Die vorliegende Offenbarung kann auch eine Zusammenset-

zung umfassen, die einen CSF1R-exprimierenden Phagozyten wie hierin beschrieben umfasst. In einigen Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung eine Vielzahl von Zellen.

[0053] In einigen Ausführungsformen sind mindestens 0,1 %, mindestens 1 %, mindestens 5 %, mindestens 10 %, mindestens 20 %, mindestens 30 %, mindestens 40 %, mindestens 50 % oder mindestens 60 % oder mindestens 70 % oder mindestens 80 % oder mindestens 90 % oder mindestens 99 % oder mindestens 99,5 % der Vielzahl von Zellen CSF1R-exprimierende Zellen mit differentieller Resistenz gegenüber einem CSF1R-Antagonisten. In anderen Ausführungsformen sind mindestens 0,1 %, mindestens 1 %, mindestens 5 %, mindestens 10 %, mindestens 20 %, mindestens 30 %, mindestens 40 %, mindestens 50 % oder mindestens 60 % oder mindestens 70 % oder mindestens 80 % oder mindestens 90 % oder mindestens 99 % oder mindestens 99,5 % der Vielzahl von Zellen CSF1R-exprimierende Phagozyten mit differentieller Resistenz gegenüber einem CSF1R-Antagonisten.

[0054] Weiterhin offenbart ist ein Verfahren zur Behandlung eines Subjekts. Das Verfahren umfasst die Verabreichung eines CSF1R-Antagonisten an das Subjekt in einer ausreichenden Menge, um ein CSF1R-Signal in einer Zelle des Subjekts zu hemmen, und das Inkontaktbringen des Subjekts mit einer modifizierten CSF1R-exprimierenden Zelle (z. B. einem modifizierten CSF1R-exprimierenden Phagozyten) die eine differentielle Resistenz gegenüber einem CSF1R-Antagonisten aufweist. In anderen Ausführungsformen umfasst das Verfahren das Inkontaktbringen des Subjekts mit einer modifizierten CSF1R-exprimierenden Zelle (z. B. einem modifizierten CSF1R-exprimierenden Phagozyten), die eine differentielle Resistenz gegenüber einem CSF1R-Antagonisten aufweist, und die Verabreichung des CSF1R-Antagonisten an das Subjekt in einer ausreichenden Menge, um ein CSF1R-Signal in einer Zelle des Subjekts zu hemmen. Die differentielle Resistenz gegen den CSF1R-Antagonisten kann eine partielle oder vollständige Resistenz gegen den CSF1R-Antagonisten sein.

[0055] Die hierin beschriebenen modifizierten CSF1R-exprimierenden Zellen (z. B. modifizierte humane CSF1R-exprimierende Zellen) können darüber hinaus eine oder mehrere Modifikationen umfassen (z. B. eine oder mehrere genetische Modifikationen in einem anderen Gen (z. B. außerhalb des CSF1R-Gens). In einigen Ausführungsformen exprimiert die modifizierte CSF1R-exprimierende Zelle (z. B. ein modifizierter CSF1R-exprimierender Phagozyt) ein Genprodukt, das zur Behandlung, Heilung, Verbesserung, Vorbeugung oder Linderung einer neurologischen Erkrankung nützlich ist. In einigen Ausführungsformen wird das Genprodukt nicht anderweitig von der CSF1R-exprimierenden Zelle (z. B. einem modifizierten CSF1R-exprimierenden Phagozyten) exprimiert. In anderen Ausführungsformen exprimiert die modifizierte CSF1R-exprimierende Zelle (z. B. ein modifizierter CSF1R-exprimierender Phagozyt) andere genetische Modifikationen, das zur Behandlung, Heilung, Verbesserung, Vorbeugung oder Linderung einer neurologischen Erkrankung nützlich ist. In anderen Ausführungsformen werden andere genetische Modifikationen (außerhalb des CSF1R-Gens) verwendet, um ein mutiertes Gen zu korrigieren und eine durch Mutationen in diesem anderen Gen verursachte Erkrankung zu behandeln.

[0056] In einigen Ausführungsformen ist das CSF1R-Signal, das durch den CSF1R-Antagonisten gehemmt wird, die Proliferation oder das Überleben einer CSF1R-exprimierenden Zelle (z. B. eines CSF1R-exprimierenden Phagozyten), die für das Subjekt endogen ist. In anderen Ausführungsformen wird der CSF1R-Antagonist dem Subjekt in einer ausreichenden Menge verabreicht, um die Proliferation oder das Überleben der endogenen CSF1R-exprimierenden Zelle (z. B. eines CSF1R-exprimierenden Phagozyten) des Subjekts im Vergleich zu der modifizierten CSF1R-exprimierenden Zelle (z. B. einem modifizierten CSF1R-exprimierenden Phagozyten) zu verringern.

[0057] Ebenfalls offenbart ist ein Verfahren zur Behandlung eines Subjekts. Das Verfahren kann das Inkontaktbringen des Subjekts mit einer modifizierten CSF1R-exprimierenden Zelle (z. B. einem modifizierten CSF1R-exprimierenden Phagozyten) und die differentielle Modifikation der Proliferation oder des Überlebens einer nicht modifizierten CSF1R-exprimierenden Zelle (z. B. einem modifizierten CSF1R-exprimierenden Phagozyten) im Vergleich zu der modifizierten CSF1R-exprimierenden Zelle (z. B. einem modifizierten CSF1R-exprimierenden Phagozyten) umfassen. In einigen Ausführungsformen ist die modifizierte CSF1R-exprimierende Zelle (z. B. ein modifizierter CSF1R-exprimierender Phagozyt) partiell resistent gegen einen CSF1R-Antagonisten. In einigen Ausführungsformen umfasst der Schritt der differentiellen Modifikation der Proliferation oder des Überlebens der unmodifizierten CSF1R-exprimierenden Zelle (z. B. eines unmodifizierten CSF1R-exprimierenden Phagozyten) die Verabreichung des CSF1 R-Antagonisten an das Subjekt in einer ausreichenden Menge, um die Proliferation oder das Überleben der unmodifizierten CSF1R-exprimierenden Zelle (z. B, eines unmodifizierten CSF1R-exprimierenden Phagozyten) im Vergleich zu der modifizier-

ten CSF1R-exprimierenden Zelle (z. B. einem modifizierten CSF1R-exprimierenden Phagozyten) zu verringern.

[0058] Die hierin beschriebenen Verfahren können etwa 0,1 % oder etwa 1 % oder etwa 5 % oder etwa 10 % oder etwa 20 % oder etwa 30 % oder etwa 40 % oder etwa 50 % oder etwa 60 % oder etwa 70 % oder etwa 80 % oder etwa 90 % oder etwa 99 % oder etwa 99,5 % der endogenen CSF1R-exprimierenden Phagozyten im ZNS des Subjekts töten. In anderen Ausführungsformen können die hierin beschriebenen Verfahren alle endogenen CSF1R-exprimierenden Phagozyten im ZNS des Subjekts abtöten. Die hierin beschriebenen Verfahren können ferner das Anwachsen von etwa 0,1 % oder etwa 1 % oder etwa 5 % oder etwa 10 % oder etwa 20 % oder etwa 30 % oder etwa 40 % oder etwa 50 % oder etwa 60 % oder etwa 70 % oder etwa 80 % oder etwa 90 % oder etwa 99 % oder etwa 99,5 % der modifizierten CSF1R-exprimierenden Phagozyten in das ZNS des Subjekts ermöglichen. In einigen Ausführungsformen ermöglichen die hierin beschriebenen Verfahren das vollständige Anwachsen der modifizierten CSF1R-exprimierenden Phagozyten in das ZNS des Subjekts.

[0059] Die hierin beschriebenen Verfahren können auf die Behandlung, Prävention, Linderung oder Verbesserung einer neurologischen Erkrankung gerichtet sein, indem ein Subjekt mit einer modifizierten Zelle oder einem Vektor dieser Offenbarung in Kontakt gebracht wird. In einigen Ausführungsformen umfasst eine neurologische Erkrankung eine Erkrankung des Nervensystems. Nicht einschränkende Beispiele für neurologische Erkrankungen umfassen unter anderem Demenz, eine neurodegenerative Erkrankung, eine genetische Erkrankung, eine Rückenmarksverletzung, eine traumatische Hirnverletzung, eine Erkrankung, die durch den Kontakt mit einer Chemikalie oder einem anderen Stoff verursacht oder verschlechtert wurde, usw.

[0060] Die vorliegende Offenbarung kann auch eine Zusammensetzung zur Behandlung neurologischer Erkrankungen umfassen, wobei die Zusammensetzung eine Vielzahl modifizierter Zellen mit differentieller (z. B. erhöhter, verringerter, partieller oder vollständiger) Resistenz gegen CSF1R-Antagonisten umfasst. In einigen Ausführungsformen sind die modifizierten Zellen CSF1R-exprimierende Zellen.

[0061] Die vorliegende Offenbarung kann ferner Nukleinsäurezusammensetzungen und -vektoren umfassen, die für ein modifiziertes CSF1R-Protein kodieren, das eine differentielle Resistenz gegen einen CSF1R-Antagonisten, wie hierin beschrieben, aufweist. In einigen Ausführungsformen können die Nukleinsäurezusammensetzungen und -vektoren eine Nutzlast umfassen, einschließlich, aber nicht beschränkt auf ein Transgen, einen Marker oder ein Reportergen usw. In einigen Ausführungsformen umfasst der Expressionsvektor eine Nukleinsäurezusammensetzung, wie hierin beschrieben, die funktionell mit einer Expressionskontrollsequenz verbunden ist.

[0062] In einigen Ausführungsformen umfasst die Nukleinsäurezusammensetzung ein modifiziertes CSF1R-Protein, das eine differentielle Resistenz gegenüber einem CSF1R-Antagonisten aufweist. In einigen Ausführungsformen handelt es sich bei der differentiellen Resistenz gegenüber dem CSF1R-Antagonisten um eine partielle, vollständige, erhöhte oder verringerte Resistenz gegenüber dem CSF1R-Antagonisten.

[0063] In anderen Ausführungsformen umfasst die Nukleinsäurezusammensetzung ein modifiziertes CSF1R-Protein, das eine oder mehrere genetische Modifikationen umfasst. In einigen Ausführungsformen führen die eine oder mehreren genetischen Modifikationen zu einer Aminosäuresubstitution, die aus einer Gruppe ausgewählt ist, die aus G795A, G795V, G795C, L785, M637, E633 und V647 gebildet ist.

[0064] In einigen Ausführungsformen weist die vorliegende Offenbarung einen Expressionsvektor auf, der eine Nukleinsäurezusammensetzung umfasst, die ein modifiziertes CSF1R-Protein umfasst, das differentielle Resistenz gegenüber einem CSF1R-Antagonisten aufweist.

[0065] In einigen Ausführungsformen können die hierin beschriebenen Expressionsvektoren verwendet werden, um kultivierte oder endogene Zellen zu verändern. In einigen Ausführungsformen werden die hierin beschriebenen Expressionsvektoren zur Transfektion einer kultivierten Zelle verwendet, sodass die Kulturzelle oder deren Nachkommen das Polypeptid exprimieren. In anderen Ausführungsformen werden die hierin beschriebenen Expressionsvektoren verwendet, um eine endogene CSF1R-exprimierende Zelle durch Transduktion der Nukleinsäure zu verändern (z. B. durch Infektion mit dem viralen Vektor, um in situ eine gegen CSF1R-Antagonisten resistente Zelle zu erzeugen).

[0066] Verfahren und Zusammensetzungen der vorliegenden Offenbarung können vorteilhaft in human- oder veterinärmedizinischen Anwendungen eingesetzt werden, wobei eine modifizierte Zelle oder ein Vektor oder

ein Genome-Editing-System (z. B. ein CRISPR-Cas-, TALEN- oder ZFN-System), das so konfiguriert ist, dass es eine Mutation der vorliegenden Offenbarung einführt und dadurch eine modifizierte Zelle erzeugt, zur Prävention, Linderung, Verbesserung oder Heilung einer Erkrankung oder Störung verwendet wird. Im Allgemeinen umfassen diese Verfahren die Schritte des Inkontaktbringens eines Subjekts mit einer modifizierten Zelle oder einem Vektor oder einem Genome-Editing-System, das zur Erzeugung einer solchen Zelle konfiguriert ist, und des Inkontaktbringens des Subjekts mit einem CSF1R-Antagonisten.

[0067] Zunächst zu den Subjekten, für die die Verfahren dieser Offenbarung geeignet sind: jedes Subjekt kann ein möglicher Kandidat für eine Behandlung gemäß diesen Verfahren sein, aber es kann vorteilhaft sein, solche Subjekte zu behandeln, die an einer Erkrankung, wie z. B. einer neurologischen Erkrankung, leiden oder für eine solche Erkrankung veranlagt oder prädisponiert sind, die durch den Kontakt des Subjekts mit einer Zelle der vorliegenden Offenbarung, die durch eine unterschiedliche Reaktion auf CSF1R-Antagonisten im Vergleich zu einer nativen oder endogenen Zelle des Subjekts gekennzeichnet ist, verhindert, gelindert, gebessert oder geheilt werden kann. Ohne das Vorstehende einzuschränken, kann eine neurologische Erkrankung, die durch Verfahren dieser Offenbarung behandelt werden kann, Demenz, eine neurodegenerative Erkrankung, eine demyelinisierende Erkrankung, eine Stimmungs- oder Persönlichkeitsstörung, eine traumatische Hirnverletzung, eine genetische Erkrankung, einen bösartigen oder gutartigen Tumor, einen metastatischen Tumor oder Wachstum usw. umfassen.

[0068] Ein Subjekt kann mit einer modifizierten Zelle oder einem Vektor der Offenbarung zu jedem geeigneten Zeitpunkt und auf jedem geeigneten Verabreichungsweg in Kontakt gebracht werden, einschließlich ohne Einschränkung durch intravenöse, intramuskuläre, intraperitoneale, intraparenchymale, intrathekale, interkraniale, interossale oder sonstige Injektion oder Infusion, transdermale Verabreichung (bei Vektoren) und/oder durch chirurgische Implantation oder Transplantation. Jede geeignete Anzahl von Zellen oder Titer des Vektors kann verabreicht werden, z. B. 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108 usw. Zellen und/oder 1014, 1013, 1012, 1011, 1010, 109 oder weniger Virionen oder virale Genome. Was die modifizierten Zellen betrifft, so können die Zellen, mit denen das Subjekt in Kontakt kommt, von den eigenen Zellen des Subjekts (autologe Zellen) oder von einem anderen Donor (allogene Zellen) stammen.

[0069] Fachleute werden erkennen, dass sich die differentielle Empfindlichkeit der modifizierten Zellen dieser Offenbarung gegenüber CSF1R-Antagonisten am deutlichsten in Gegenwart eines CSF1R-Antagonisten zeigt. Daher umfassen einige Ausführungsformen dieser Offenbarung die Verabreichung eines CSF1R-Antagonisten an ein Subjekt gleichzeitig mit und/oder nach dem Schritt des Inkontaktbringens des Subjekts mit der modifizierten Zelle oder dem Vektor, während das Subjekt jederzeit mit einem CSF1R-Antagonisten in Kontakt gebracht werden kann (einschließlich und ohne Einschränkung als Vorbehandlung oder Konditionierungsbehandlung vor dem Inkontaktbringen eines Subjekts mit einer modifizierten Zelle dieser Offenbarung). Der CSF1R-Antagonist kann kontinuierlich oder diskontinuierlich verabreicht werden, und der Beginn oder die Beendigung der Verabreichung kann geplant oder vorprogrammiert sein, oder sie kann als Reaktion auf eine physiologische Ablesung des Subjekts erfolgen, wie zum Beispiel eine Biomarkerkonzentration, eine Serum- oder Gewebekonzentration eines Biomarkers oder eines niedermolekularen Wirkstoffs oder Metaboliten davon, ein bildgebendes Signal oder Zeichen usw.

[0070] Als ein nicht einschränkendes Beispiel kann im Fall einer modifizierten Zelle, die eine verringerte Empfindlichkeit (d. h. eine partielle oder vollständige Resistenz) gegenüber einem CSF1R-Antagonisten aufweist, der CSF1R-Antagonist einem Subjekt verabreicht werden, um die Proliferation oder das Überleben nativer Zellen innerhalb einer von solchen Zellen besetzten Nische zu verringern, wodurch den modifizierten Zellen ein selektiver Vorteil verliehen wird und gegebenenfalls die Transplantationsrate oder ein anderes Verhalten der modifizierten Zellen im Vergleich zu dem in Abwesenheit des CSF1R-Antagonisten beobachteten Verhalten erhöht wird. Diese Verabreichung kann vor, gleichzeitig oder im Anschluss an den Schritt des Inkontaktbringens des Subjekts mit der modifizierten Zelle oder dem modifizierten Vektor eingeleitet - und gegebenenfalls beendet - werden. Ohne das Vorstehende einzuschränken, kann in dem Fall, in dem es sich bei der modifizierten Zelle um eine Microglia-Zelle oder eine Microglia-Progenitorzelle handelt, einem Subjekt vor, gleichzeitig mit und/oder nach der Transplantation der modifizierten Microglia-Linien-Zellen ein CSF1R-Antagonist verabreicht werden, um die Proliferation und/oder das Überleben der endogenen Microglia zu begrenzen und dadurch den modifizierten Microglia einen Vorteil zu verschaffen, der zu einem höheren Grad des Anwachsens und/oder einer größeren räumlichen Verteilung der modifizierten Microglia führen kann, als dies sonst zu beobachten wäre.

[0071] Alternativ oder zusätzlich kann eine modifizierte Zelle dieser Offenbarung eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber CSF1R-Antagonisten im Vergleich zu einer unmodifizierten Zelle aufweisen. In diesem Fall

wird der CSF1R-Antagonist im Allgemeinen (aber nicht notwendigerweise) vor und während des Schritts des Inkontaktbringens des Subjekts mit der modifizierten Zelle zurückgehalten und stattdessen verabreicht, nachdem das Subjekt mit der modifizierten Zelle oder dem Vektor in Kontakt gekommen ist, beispielsweise um die Proliferation oder das Überleben der modifizierten Zellen am Ende eines Behandlungsverlaufs zu begrenzen, als Reaktion auf ein Signal einer physiologischen oder pharmakologischen Messung und/oder als Reaktion auf ein unerwünschtes Ereignis oder eine Verringerung der Wirksamkeit einer therapeutischen Intervention unter Verwendung der modifizierten Zellen.

[0072] Eine modifizierte Zelle im Sinne dieser Offenbarung umfasst gegebenenfalls eine oder mehrere zusätzliche Modifikationen im Vergleich zu einer nativen Zelle desselben Typs. Diese Modifikationen können ohne Einschränkung ein oder mehrere Transgene oder eine oder mehrere genetische Modifikationen umfassen, die eine Mutation korrigieren oder die Expression eines Genprodukts verringern oder erhöhen. Ohne das Vorstehende einzuschränken, umfasst diese Offenbarung eine Microgliazelle, die so manipuliert wurde, dass sie ein CSF1R-Allel mit verringerter Empfindlichkeit gegenüber einem CSF1R-Antagonisten exprimiert, und ein sekretiertes Transgen, wie zum Beispiel ein Enzym oder ein Bindungsprotein, eine RNA, wie zum Beispiel eine antisense-, miRNA- oder siRNA, ein Zelloberflächenprotein, wie zum Beispiel einen chimären Antigenrezeptor, ein membrangebundenes Immunglobulin oder ein Fragment davon, ein Aptamer, usw. Die Offenbarung umfasst auch Vektoren und Verfahren zur Herstellung solcher Zellen, im Wesentlichen wie vorstehend beschrieben, sowie ein Verfahren zur Behandlung eines Subjekts unter Verwendung einer Zelle oder eines Vektors zur Behandlung des Subjekts.

[0073] Ohne die vorliegende Offenbarung auf eine Theorie oder einen Mechanismus beschränken zu wollen, wird davon ausgegangen, dass eine Vielzahl von Verfahren eingesetzt werden kann, um die hierin beanspruchten Zellen mit differentieller Resistenz gegen einen CSF1R-Antagonisten zu erhalten. Hierin werden nicht einschränkende Vorgehensweisen/Beispiele beschrieben, mit denen dieses Ziel erreicht werden kann. Äquivalente oder Ersatzstoffe fallen in den Anwendungsbereich der vorliegenden Offenbarung.

Beispiel

[0074] Es folgt ein nicht einschränkendes Beispiel für die vorliegende Erfindung. Es versteht sich, dass dieses Beispiel die vorliegende Erfindung in keiner Weise einschränken soll. Äquivalente oder Ersatzstoffe fallen in den Anwendungsbereich der vorliegenden Erfindung.

[0075] Zur Erleichterung das kompetitiven Anwachsens humaner Microglia, Makrophagen und Monozyten und/oder ihrer Vorläuferzellen (hämatopoetische Progenitorzellen (HPCs) und hämatopoetische Stammzellen (HSCs), erythromyeloide Progenitoren (EMPs) oder primitive Makrophagenprogenitoren (PMPs)) können verschiedene Ansätze unabhängig voneinander oder in Kombination angewendet werden. 1) Verwendung der bereits veröffentlichten Kristallstruktur des an einen Antagonisten gebundenen CSF1R-Rezeptors (PMID: 31434879) zur Vorhersage von Aminosäuresubstitutionen, die die Bindung von CSF1R-Antagonisten sterisch behindern können, während sie die normale Bindung von ATP in dieselbe Bindungstasche nicht beeinträchtigen. 2) Verwendung von PCR-vermittelter Zufallsmutagenese zur Einführung von Aminosäureänderungen, gefolgt von der Exposition von iPS-Microglia gegenüber CSF1R-Antagonisten und anschließender Sequenzierung der überlebenden Mutanten, um Mutationen zu identifizieren, die Resistenz gegen CSF1R-Antagonisten verleihen, aber nicht gleichzeitig eine konstitutiv aktive CSF1R-Signalisierung auslösen. 3) Die Veränderung von Genen, die dem CSF1R nachgeschaltet sind, zum Beispiel die Deletion oder transiente Reduzierung der Expression von SHIP1 (INPP5D), um die CSF1R-Signaltransduktion zu verstärken. 4) Vorbehandlung von Microglia, die mit Agonisten der CSF1R-Signalisierung transplantiert werden, könnte auch ein siRNA- oder microRNA-Genbereitstellungsansatz verwendet werden, um die CSF1R-Signalisierung in transplantierten Zellen zu modulieren und vorübergehend zu erhöhen, um die Resistenz gegen CSF1R-Antagonisten zu fördern. Nachstehend werden zusätzliche Einzelheiten und Daten zu den ersten beiden Strategien bereitgestellt.

[0076] Strategie 1: Eine Kristallstruktur des an einen Antagonisten gebundenen CSF1R-Rezeptors (PMID: 31434879) zur Vorhersage von Aminosäuresubstitutionen, die die Bindung von CSF1R-Antagonisten sterisch behindern können, während sie die normale Bindung von ATP in dieselbe Bindungstasche nicht beeinträchtigen. Die Kristallstruktur von PLX5622, das an den humanen CSF1R gebunden ist, wurde erhalten, und die ATP-Bindungstasche wurde untersucht (**Fig.** 7A). Durch molekulare Modellierung wurden einzelne Aminosäureänderungen vorhergesagt, die die Bindung von PLX5622 oder PLX3397 oder anderen CSF1R-Antagonisten wahrscheinlich beeinträchtigen würden, während die normale ATP-Bindung an CSF1R nicht gestört wird. Diese Modellierung legt insbesondere nahe, dass der Ersatz der Aminosäure G795 durch ein Alanin

(A), Valin (V) oder Cystein (C) die sterische Hinderung der Bindung von PLX5622 und/oder PLX3397 erhöht, ohne die normale Bindungsfähigkeit von ATP zu beeinträchtigen (**Fig.** 7A und 7B). Auch andere Mutationen könnten untersucht werden, um die Bindung zu verhindern (**Fig.** 7D). Eine zielgerichtete CRISPR-Strategie wurde entwickelt, um menschliche iPSCs zu erzeugen, die jede dieser einzelnen Aminosäuresubstitutionen tragen; G795A, G795V, G795C und produzierten erfolgreich diese veränderten humanen iPSC-Linien (Sanger-Sequenzierungs-Chromatogramme, die die editierten Sequenzen zeigen, sind in **Fig.** 8 dargestellt). Die resultierenden iPSCs wurden dann in Microglia differenziert und unterschiedlichen Konzentrationen von PLX3397 oder PLX5622 ausgesetzt. Zum Nachweis des Microglia-Zelltods (Apoptose) wurde ein fluorogener Caspase-3/7-Reporter verwendet. **Fig.** 4A zeigt die dosisabhängige Induktion des Zelltods in uneditierten humanen iPSC-Microglia des Wildtyps (WT) im Vergleich zu den CSF1R-Mutantenlinien G795A und G795C als Reaktion auf PLX3397 und **Fig.** 4B zeigt die Reaktion auf PLX5622. Innerhalb von 24 Stunden nach der Behandlung mit PLX Präparat zeigen menschliche WT-Microglia eine robuste dosisabhängige Induktion von Apoptose als Reaktion auf beide Verbindungen. Im Gegensatz dazu zeigen sowohl die G795A- als auch die G795C-Mutantenlinien eine vollständige Resistenz gegen den Zelltod. In **Fig.** 4E wurden repräsentative Bilder der Zelldichte (Phasenkontrastmikroskopie, 1. Spalte) und der fluoreszierenden Caspase-3/7-Aktivität (2. Spalte) für jede Dosis von PLX3397 und PLX5622 bereitgestellt.

[0077] Eine weitere Untersuchung der Kristallstruktur zeigt auch andere Positionen, die, wenn sie mutiert sind, zu einer Reduzierung der Bindung von PLX5622 und/oder PLX3397 führen könnten. Beispiele hierfür sind L785, M637, E633 und V647 (**Fig.** 4D). Diese Positionen befinden sich alle in engem Kontakt zu den Bindungsstellen von PLX5622 und/oder PLX3397 und können die Bindung verhindern, wenn sie mutiert sind.

[0078] Strategie 2: Durch PCR-vermittelte Zufallsmutagenese werden Aminosäureänderungen eingeführt, gefolgt von der Exposition von iPS-Microglia gegenüber CSF1R-Antagonisten und anschließender Sequenzierung der überlebenden Mutanten, um Mutationen zu identifizieren, die eine Resistenz gegen CSF1R-Antagonisten verleihen, aber nicht gleichzeitig eine konstitutiv aktive oder unterdrückte CSF1R-Signalisierung auslösen. Es wird ein Pool von iPSC- oder Monozyten-Zelllinien erzeugt, die zufällige Mutationen im CSF1R-Gen tragen. Dieser Pool wird dann in Microglia differenziert und das Überleben der Zellen als Reaktion auf den Entzug von CSF1/IL-34 oder die Behandlung mit CSF1R-Antagonisten überwacht. Zellen, die unter diesen Zuständen länger überleben, werden mittels PCR und Sequenzierung untersucht, um CSF1R-Mutationen zu identifizieren, die möglicherweise eine Resistenz gegen CSF1R-Antagonisten verleihen. Anschließend werden Counter-Screens durchgeführt, um diejenigen CSF1R-Mutationen zu identifizieren, die nicht auch zu einer Hyperproliferation oder einem signifikanten Verlust der Proliferation führen. Sobald die optimalen Mutationen identifiziert sind, werden iPSC-Linien, die diese Mutationen tragen, erweitert, und die von diesen Linien abgeleiteten Microglia werden in vivo in chimären Modellen untersucht, um die Resistenz gegen CSF1R-Antagonisten in vivo zu bestimmen.

[0079] Die Resistenz gegen jeden der getesteten CSF1R-Inhibitoren wurde mit einem fluorogenen Caspase 3/7-Detektor (Essen BioScience) und Zeitrafferaufnahmen über 24 Stunden quantifiziert. WT-Microglia wiesen im Vergleich zur DMSO-Kontrollbehandlung während der 24-stündigen Aufnahme signifikant erhöhte Caspase-Werte bis steigende Konzentrationen von PLX3397 (MedChemExpress), PLX5622 (MedChemExpress), Edicotinib und BLZ945 auf, was auf eine verstärkte Zelltod-Reaktion auf die Hemmung des Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktor/Kolonie-stimulierenden Faktor 1-Rezeptors (CSF1R) hinweist. Andererseits zeigten G795A und G795C iPSC-Microglia keinen signifikanten Anstieg der Caspase-Werte bei steigenden Konzentrationen von PLX3397, PLX5622, Edicotinib oder BLZ945 im Vergleich zur DMSO-Kontrollbehandlung. Diese Ergebnisse weisen auf eine erworbene Resistenz gegen die PLX-Behandlung hin, die auf den genetisch veränderten CSF1-Rezeptor zurückzuführen ist (siehe **Fig.** 4A, 4B, 4C, 4D und 4E).

[0080] Zelltod-Assay: iPS-Microglia wurden mit 70 000 Zellen pro 96-Well-Platte (6 Wells pro Linie und Zustand) plattiert. Zum Zeitpunkt 0 wurden alle Microglia mit IncuCyte Caspase-3/7 Green Apoptosis Assay Reagent 1:1000 behandelt. Die Zellen wurden in dem beschriebenen Medium gehalten: frisches komplettes Medium +0,1 %DMSO, komplettes Medium + 250nM PLX3397, komplettes Medium + 500nM PLX3397, komplettes Medium + 1µm PLX3397, komplettes Medium + 250nM PLX5622, komplettes Medium + 500nM PLX5622, komplettes Medium + 1 µm PLX5622, komplettes Medium + 250nM Edicotinib, komplettes Medium + 500nM Edicotinib, komplettes Medium + 1 µm Edicotinib, komplettes Medium + 250nM BLZ945, komplettes Medium + 500nM BLZ945, komplettes Medium + 1 µm BLZ945. 24 Stunden lang wurden stündlich vier 20x-Bilder pro Well aufgenommen. Mit der Software IncuCyte 2020B wurden Bildmasken für die Phasenkonfluenz (visuelles Ausblenden apoptotischer Zellen) sowie das Caspase 3/7-Signal (grün) erstellt. Die Diagramme zeigen die Caspase normalisiert auf die Phasenkonfluenz, ergänzt durch 3 Linien: WT, G795A, G795C (siehe **Fig.** 4A, 4B, 4C, 4D und 4E).

Ausführungsformen

[0081] Die folgenden Ausführungsformen sollen nur illustrativen Zwecken dienen und sind in keiner Weise einschränkend zu verstehen.

[0082] Ausführungsform 1: Modifizierte humane Zelle, die eine differentielle Resistenz gegenüber einem CSF1R-Antagonisten aufweist.

[0083] Ausführungsform 2: Zelle nach Ausführungsform 1, die eine Nukleinsäure umfasst, die für ein modifiziertes CSF1R-Protein kodiert, das differentielle Resistenz gegenüber einem CSF1R-Antagonisten aufweist.

[0084] Ausführungsform 3: Modifizierte humane Zelle, umfassend eine Nukleinsäure, die für ein modifiziertes CSF1R-Protein kodiert, das eine differentielle Resistenz gegenüber einem CSF1R-Antagonisten aufweist.

[0085] Ausführungsform 4: Zelle nach einer der Ausführungsformen 1 bis 3, die eine oder mehrere genetische Modifikationen des CSF1R-Proteins umfasst. Ausführungsform 5: Zelle nach Ausführungsform 4, wobei die eine oder mehrere genetische Modifikationen zu einer Veränderung in der Aminosäuresequenz von CSF1R führen, wobei die Veränderung gegebenenfalls die Substitution eines Aminosäurerests umfasst, der aus G795, L785, M637, E633 und V647 ausgewählt ist.

[0086] Ausführungsform 6: Zelle nach einer der Ausführungsformen 1 bis 5, wobei die eine oder mehrere genetische Modifikationen zu einer modifizierten ATP-Bindungstasche führen.

[0087] Ausführungsform 7: Zelle nach Ausführungsform 6, wobei die modifizierte ATP-Bindungstasche einen reduzierten Bindungsraum aufweist. Ausführungsform 8: Zelle nach Ausführungsform 7, wobei die veränderte ATP-Bindungstasche einen CSF1R-Antagonisten nicht binden kann. Ausführungsform 9: Zelle nach Ausführungsform 6, wobei die veränderte ATP-Bindungstasche ATP binden kann.

[0088] Ausführungsform 10: Zelle nach einer der Ausführungsformen 1 bis 9, wobei die eine oder mehreren genetischen Modifikationen im CSF1R-Protein die ATP-Bindungsaktivität des CSF1R-Proteins nicht beeinträchtigen.

[0089] Ausführungsform 11: Zelle nach einer der Ausführungsformen 1 bis 10, wobei die eine oder mehrere genetische Modifikationen des CSF1R-Proteins keine konstitutiv aktive CSF1R-Signalisierung induzieren.

[0090] Ausführungsform 12: Zelle nach Ausführungsform 11, wobei das veränderte CSF1R-Protein durch einen CSF1-Liganden aktiviert wird.

[0091] Ausführungsform 13: Zelle nach Ausführungsform 12, wobei der CSF1-Ligand die Phosphorylierung des modifizierten CSF1R-Proteins induziert. Ausführungsform 14: Zelle nach Ausführungsform 11, wobei das modifizierte CSF1R-Protein durch einen IL-34-Liganden aktiviert wird.

[0092] Ausführungsform 15: Zelle nach Ausführungsform 14, wobei der IL-34-Ligand die Phosphorylierung des modifizierten CSF1R-Proteins induziert. Ausführungsform 16: Zelle nach Ausführungsform 4, wobei die eine oder mehrere genetische Modifikationen ex vivo eingeführt werden.

[0093] Ausführungsform 17: Zelle nach Ausführungsform 4, wobei die eine oder mehrere genetische Modifikationen durch Transfektion oder Einführung einer für ein Transgen kodierenden Nukleinsäure in die Zelle oder durch Transduktion oder Einführung eines zielgerichteten Nuklease-, Nickase- oder Base-Editing-Effektors oder Ribonukleoprotein-Komplexes induziert werden. Ausführungsform 18: Zelle nach Ausführungsform 17, wobei das Einbringen der für ein Transgen kodierenden Nukleinsäure in eine Zelle das Inkontaktbringen der Zelle mit einem viralen Vektor umfasst.

[0094] Ausführungsform 19: Zelle nach einer der Ausführungsformen 1 bis 18, wobei die Zelle, die ein modifiziertes CSF1R-Protein umfasst, ein Genexpressionsprofil einer Zelle beibehält, die ein Wildtyp-CSF1R-Protein umfasst. Ausführungsform 20: Zelle nach einer der Ausführungsformen 1 bis 19, die außerdem eine oder mehrere Modifikationen in einem anderen Gen umfasst. Ausführungsform 21: Modifizierte humane Zelle gemäß einer der Ausführungsformen 1 bis 20, die CSF1R exprimiert.

[0095] Ausführungsform 22: Zelle nach Ausführungsform 21, wobei die Zelle induziert und differenziert ist, um CSF1R zu exprimieren, und aus einer Gruppe ausgewählt ist, die aus pluripotenter Stammzelle, hämatopoetischer Stammzelle, einem erythromyeloischen Progenitor und hämatopoetischer Progenitorzelle besteht.

[0096] Ausführungsform 23: Zelle nach Ausführungsform 22, wobei die Zelle eine CSF1R-exprimierende Zelle ist und aus einer Gruppe ausgewählt ist, die aus Microglia, Makrophagen, Monozyten oder anderen Phagozyten besteht. Ausführungsform 24: Zusammensetzung, die eine CSF1R-exprimierende Zelle gemäß einer der Ausführungsformen 20 bis 23 umfasst.

[0097] Ausführungsform 25: Zusammensetzung nach Ausführungsform 24, wobei die CSF1R-exprimierende Zelle eine CSF1R-exprimierende Zelle ist.

[0098] Ausführungsform 26: Zusammensetzung nach Ausführungsform 25, umfassend eine Vielzahl von Zellen, wobei mindestens 0,1 %, 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % oder 99 % der Zellen CSF1R-exprimierende Zellen mit differentieller Resistenz gegenüber einem CSF1R-Antagonisten sind.

[0099] Ausführungsform 27: Nukleinsäurezusammensetzung, die für ein modifiziertes CSF1R-Protein kodiert, das differentielle Resistenz gegen einen CSF1R-Antagonisten aufweist.

[0100] Ausführungsform 28: Zusammensetzung nach Ausführungsform 27, wobei die differentielle Resistenz gegenüber dem CSF1R-Antagonisten eine partielle Resistenz oder eine vollständige Resistenz gegenüber dem CSF1R-Antagonisten ist.

[0101] Ausführungsform 29: Zusammensetzung nach Ausführungsform 27, wobei die differentielle Resistenz gegenüber dem CSF1R-Antagonisten eine erhöhte Resistenz gegenüber dem CSF1R-Antagonisten ist.

[0102] Ausführungsform 30: Zusammensetzung nach Ausführungsform 27, wobei die differentielle Resistenz gegenüber dem CSF1R-Antagonisten eine verringerte Resistenz gegenüber dem CSF1R-Antagonisten ist.

[0103] Ausführungsform 31: Zusammensetzung nach einer der Ausführungsformen 27 bis 30, wobei das modifizierte CSF1R-Protein eine oder mehrere genetische Modifikationen umfasst.

[0104] Ausführungsform 32: Zusammensetzung nach Ausführungsform 31, wobei die eine oder mehrere genetische Modifikationen zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz von CSF1R führen, wobei die Veränderung gegebenenfalls die Substitution eines Aminosäurerestes umfasst, der aus G795, L785, M637, E633 und V647 ausgewählt ist.

[0105] Ausführungsform 33: Zusammensetzung nach Ausführungsform 31, wobei die eine oder mehrere genetische Modifikationen zu einer modifizierten ATP-Bindungstasche führen.

[0106] Ausführungsform 34: Zusammensetzung nach Ausführungsform 33, wobei die modifizierte ATP-Bindungstasche einen reduzierten Bindungsraum aufweist.

[0107] Ausführungsform 35: Zusammensetzung nach Ausführungsform 34, wobei die modifizierte ATP-Bindungstasche einen CSF1R-Antagonisten nicht binden kann.

[0108] Ausführungsform 36: Zusammensetzung nach Ausführungsform 33, wobei die modifizierte ATP-Bindungstasche ATP binden kann.

[0109] Ausführungsform 37: Zusammensetzung nach Ausführungsform 31, wobei die eine oder mehreren genetischen Modifikationen im CSF1R-Protein die ATP-Bindungsaktivität des CSF1R-Proteins nicht beeinträchtigen. Ausführungsform 38: Zusammensetzung nach Ausführungsform 31, wobei die eine oder mehreren genetischen Modifikationen des CSF1R- R Proteins keine konstitutiv aktive CSF1R-Signalisierung induzieren.

[0110] Ausführungsform 39: Zusammensetzung nach Ausführungsform 38, wobei das modifizierte CSF1R-Protein durch einen CSF1-Liganden aktiviert wird.

[0111] Ausführungsform 40: Zusammensetzung nach Ausführungsform 39, wobei der CSF1-Ligand die Phosphorylierung des modifizierten CSF1R-Proteins induziert. Ausführungsform 41: Zusammensetzung nach Ausführungsform 38, wobei das modifizierte CSF1R-Protein durch einen CSF1-Liganden aktiviert wird. Ausführungsform 42: Zelle nach Ausführungsform 41, wobei der IL-34-Ligand die Phosphorylierung des modifizierten CSF1R-Proteins induziert. Ausführungsform 43: Expressionsvektor, umfassend die Nukleinsäurezusammensetzung einer der Ausführungsformen 27 bis 42, die funktionell mit einer Expressionskontrollsequenz verbunden ist.

[0112] Ausführungsform 44: Kultivierte Zelle, die mit dem Vektor der Ausführungsform 43 transfiziert ist, oder ein Nachkomme dieser Zelle, wobei die kultivierten Zellen das Polypeptid exprimieren.

[0113] Ausführungsform 45: Endogene Zelle, die mit dem Vektor der Ausführungsform 43 infiziert ist, wobei die endogenen Zellen das Polypeptid exprimieren. Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „etwa“ auf plus oder minus 20 % der angegebenen Zahl.

[0114] Obwohl die bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Offenbarung gezeigt und beschrieben wurde, ist es für Fachleute ohne weiteres ersichtlich, dass Modifikationen vorgenommen werden können, die den Umfang der beigefügten Ansprüche nicht übersteigen. Der Umfang der Offenbarung ist daher nur durch die folgenden Ansprüche zu beschränken. In einigen Ausführungsformen sind die in dieser Patentanmeldung dargestellten Figuren maßstabsgetreu gezeichnet, einschließlich der Winkel, Größenverhältnisse usw. In einigen Ausführungsformen sind die Figuren nur repräsentativ und die Ansprüche sind nicht durch die Abmessungen der Figuren beschränkt. In einigen Ausführungsformen enthalten Beschreibungen der hierin beschriebenen Offenbarung unter Verwendung des Ausdrucks „umfassend“ Ausführungsformen, die als „im Wesentlichen bestehend aus“ oder „bestehend aus“ beschrieben werden könnten, und als solche ist die Anforderung an die schriftliche Beschreibung für die Beanspruchung einer oder mehrerer Ausführungsformen der vorliegenden Offenbarung unter Verwendung des Ausdrucks „im Wesentlichen bestehend aus“ oder „bestehend aus“ erfüllt.

Es folgt ein Sequenzprotokoll als elektronisches Dokument. Dieses kann sowohl in DEPATISnet als auch im DPMAregister aufgerufen werden.

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

- US 63/169,578 [0001]
- US 63/236,951 [0001]

Schutzansprüche

1. Modifizierte humane Zelle, die ein modifiziertes CSF1R-Protein umfasst, das Resistenz gegenüber einem CSF1R-Antagonisten aufweist, wobei das modifizierte CSF1R-Protein eine modifizierte ATP-Bindungstasche umfasst, die ATP binden kann.

2. Modifizierte humane Zelle gemäß Anspruch 1, wobei das modifizierte CSF1R-Protein eine Substitution des Glutamatrests an der Position 633 in Bezug auf SEQ ID Nr. 2 umfasst.

3. Modifizierte humane Zelle gemäß Anspruch 1, wobei das modifizierte CSF1R-Protein eine Substitution des Methioninrests an der Position 637 in Bezug auf SEQ ID Nr. 2 umfasst.

4. Modifizierte humane Zelle gemäß Anspruch 1, wobei das modifizierte CSF1R-Protein eine Substitution des Valinrests an der Position 647 in Bezug auf SEQ ID Nr. 2 umfasst.

5. Modifizierte humane Zelle gemäß Anspruch 1, wobei das modifizierte CSF1R-Protein eine Substitution des Leucinrests an der Position 785 in Bezug auf SEQ ID Nr. 2 umfasst.

6. Modifizierte humane Zelle gemäß Anspruch 1, wobei das modifizierte CSF1R-Protein eine Substitution des Glycinrests an der Position 795 in Bezug auf SEQ ID Nr. 2 umfasst.

7. Modifizierte humane Zelle gemäß Anspruch 6, wobei das modifizierte CSF1R-Protein eine G795A-Mutation umfasst.

8. Modifizierte humane Zelle gemäß Anspruch 6, wobei das modifizierte CSF1R-Protein die Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 4 umfasst.

9. Modifizierte humane Zelle gemäß Anspruch 6, wobei das modifizierte CSF1R-Protein die Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 6 umfasst.

10. Modifizierte humane Zelle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei das modifizierte CSF1R-Protein eine reduzierte Bindungsaffinität gegenüber einem CSF1R-Antagonisten aufweist.

11. Modifizierte humane Zelle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei das modifizierte CSF1R-Protein eine Modifikation umfasst, die die ATP-Bindungsaktivität des CSF1R-Proteins nicht stört.

12. Modifizierte humane Zelle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei das modifizierte CSF1R-Protein eine Modifikation umfasst, die keine konstitutiv aktive CSF1R-Signalgebung induziert.

13. Modifizierte humane Zelle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei das modifizierte CSF1R-Protein durch einen CSF1-Liganden aktiviert wird.

14. Modifizierte humane Zelle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei das modifizierte CSF1R-Protein durch einen IL-34-Liganden aktiviert wird.

15. Modifizierte humane Zelle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei das aktivierte modifizierte CSF1R-Protein eine phosphorylierte Aminosäure umfasst.

16. Modifizierte humane Zelle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei die modifizierte humane Zelle eine induzierte pluripotente Stammzelle (iPSC), eine hämatopoetische Stammzelle (HSC), eine Erythromyeloid-Vorläuferzelle oder eine hämatopoetische Vorläuferzelle ist.

17. Modifizierte humane Zelle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei die modifizierte humane Zelle eine iPSC-abgeleitete Mikrogliazelle ist.

18. Modifizierte humane Zelle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17, weiterhin umfassend eine oder mehrere Modifikationen in einem anderen Gen.

19. Modifizierte humane Zelle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 18, weiterhin umfassend ein Transgen, das ansonsten nicht durch die CSF1R-exprimierende modifizierte humane Zelle exprimiert wird.

20. Zusammensetzung, umfassend die modifizierte humane Zelle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 19.

21. Zusammensetzung gemäß Anspruch 20, die eine Vielzahl von Zellen umfasst, wobei wenigstens 80% der Zellen CSF1R-exprimierende Zellen sind, die eine differentielle Resistenz gegenüber einem CSF1R-Antagonisten aufweisen.

22. CSF1R-Antagonist zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung eines Patienten, wobei das Verfahren umfasst:
a) Verabreichen des CSF1R-Antagonisten an den Patienten in einer ausreichenden Menge, um ein CSF1R-Signal in einer Zelle des Patienten zu hemmen; und
b) In-Kontakt-Bringen des Patienten mit der modifizierten humanen Zelle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 19 oder der Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 20 bis 21.

23. Modifizierte humane Zelle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 19 oder Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 20 bis 21 zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung eines Patienten, wobei das Verfahren umfasst:
a) Verabreichen eines CSF1R-Antagonisten an den Patienten in einer ausreichenden Menge, um ein CSF1R-Signal in einer Zelle des Patienten zu hemmen; und
b) In-Kontakt-Bringen des Patienten mit der modifizierten humanen Zelle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 19 oder der Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 20 bis 21.

24. CSF1R-Antagonist und die modifizierte humane Zelle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 19 oder die Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 20 bis 21 zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung eines Patienten, wobei das Verfahren umfasst:
a) Verabreichen des CSF1R-Antagonisten an den Patienten in einer ausreichenden Menge, um ein CSF1R-Signal in einer Zelle des Patienten zu hemmen; und
b) In-Kontakt-Bringen des Patienten mit der modifizierten humanen Zelle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 19 oder der Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 20 bis 21.

25. CSF1R-Antagonist und/oder modifizierte humane Zelle oder Zusammensetzung zur Verwendung gemäß einem der Ansprüche 22 bis 24, wobei das Verabreichen vor dem In-Kontakt-Bringen erfolgt.

26. CSF1R-Antagonist und/oder modifizierte humane Zelle oder Zusammensetzung zur Verwendung gemäß einem der Ansprüche 22 bis 24, wobei das In-Kontakt-Bringen vor dem Verabreichen erfolgt.

27. CSF1R-Antagonist und/oder modifizierte humane Zelle oder Zusammensetzung zur Verwendung gemäß einem der Ansprüche 22 bis 26, wobei das CSF1R-Signal, das von dem CSF1R-Antagonisten gehemmt wird, für die Proliferation oder das Überleben einer CSF1R-exprimierenden Zelle, die dem Patienten endogen ist, essentiell ist.

28. CSF1R-Antagonist und/oder modifizierte humane Zelle oder Zusammensetzung zur Verwendung gemäß einem der Ansprüche 22 bis 27, wobei der CSF1R-Antagonist dem Patienten in einer Menge verabreicht wird, die ausreicht, um die Proliferation und/oder das Überleben der endogenen CSF1R-exprimierenden Zelle relativ zu der modifizierten humanen Zelle zu reduzieren.

29. Nucleinsäure, die das modifizierte CSF1R-Protein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 codiert.

30. Expressionsvektor, der die Nucleinsäure gemäß Anspruch 29 umfasst, die funktionell mit einer Expressionskontrollsequenz verknüpft ist.

31. Modifizierte humane Zelle gemäß einem der Ansprüche 1 bis 19, wobei nach einer Transplantation der modifizierten humanen Zelle in das Gehirn eines Patienten es sich bei wenigstens 5% der gesamten Mikroglia im Gehirn des Patienten um die modifizierte humane Zelle handelt.

Es folgen 15 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

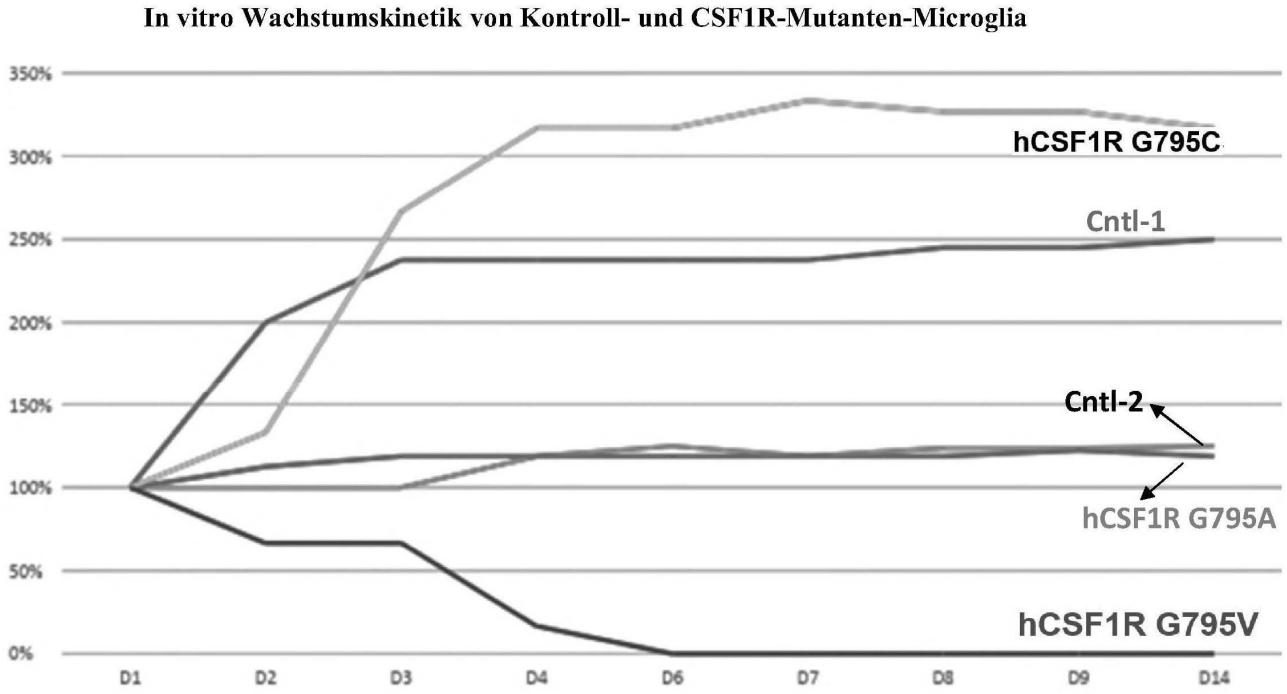


FIG. 2A

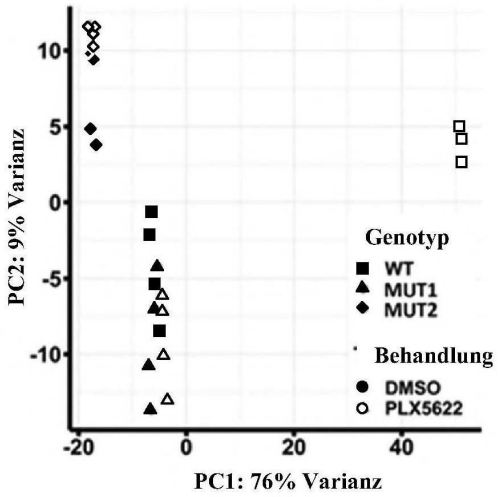


FIG. 2B

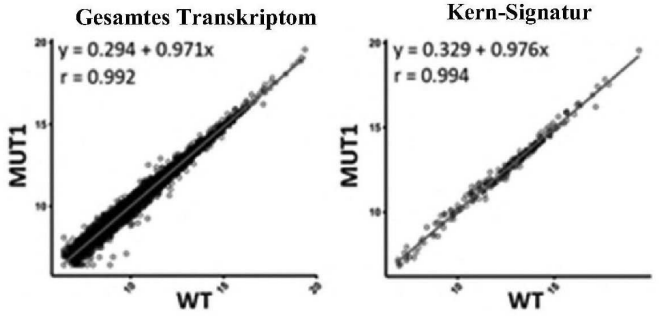


FIG. 2C

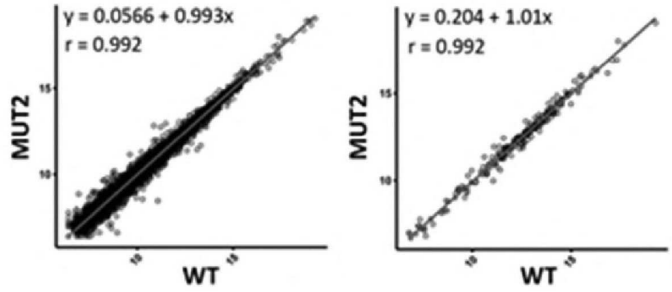


FIG. 2D

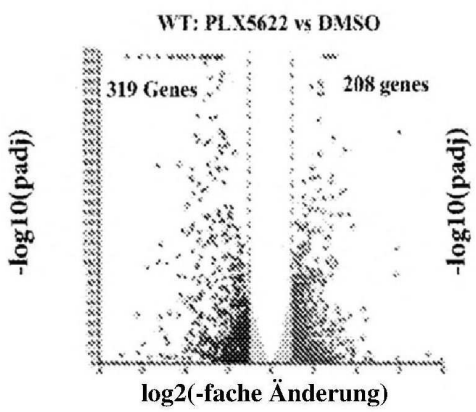


FIG. 2E

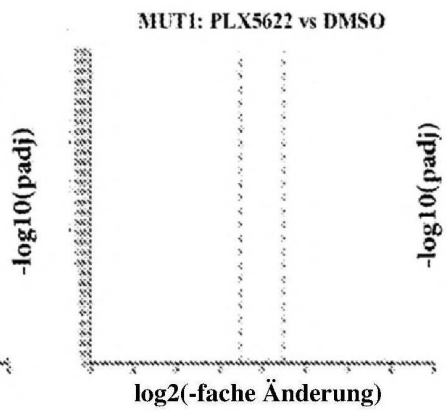


FIG. 2F

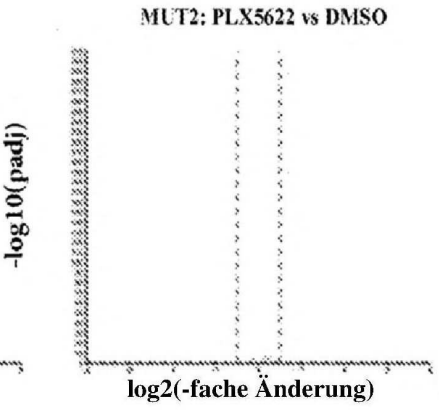


FIG. 3

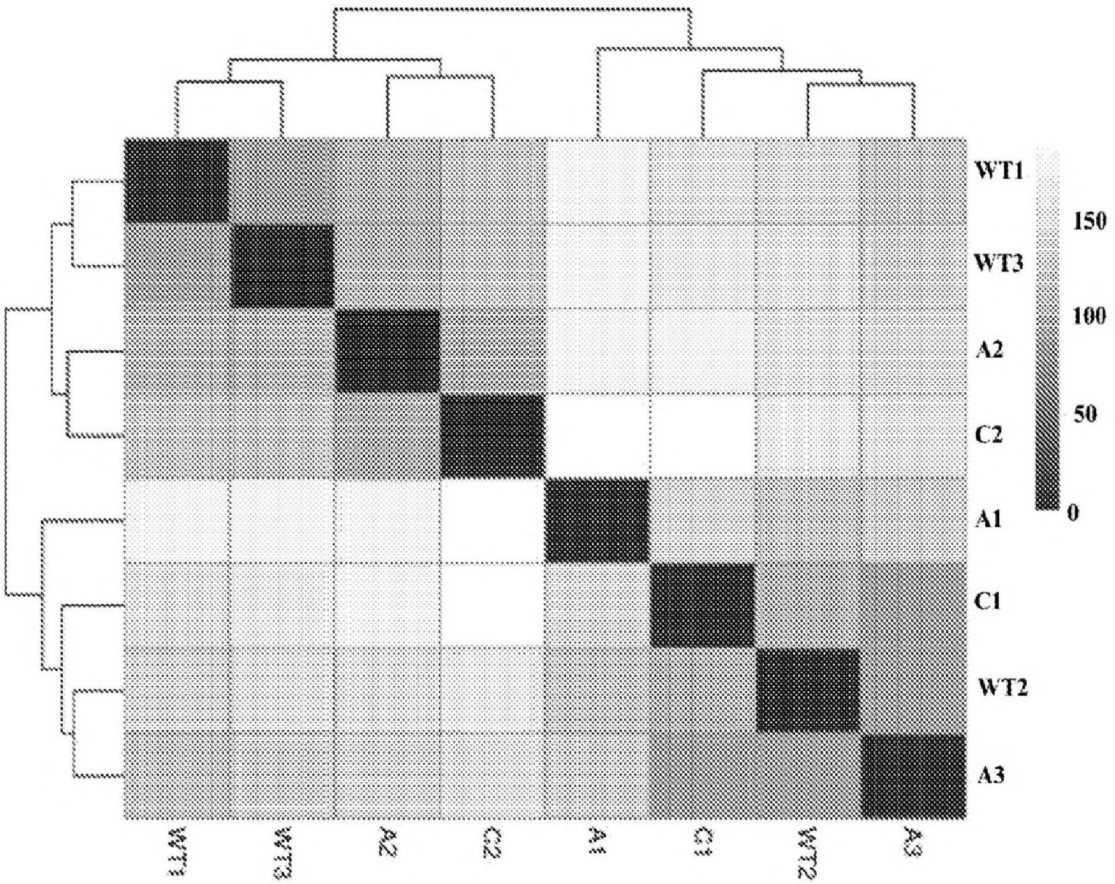


FIG. 4A

Plexxikon 3397

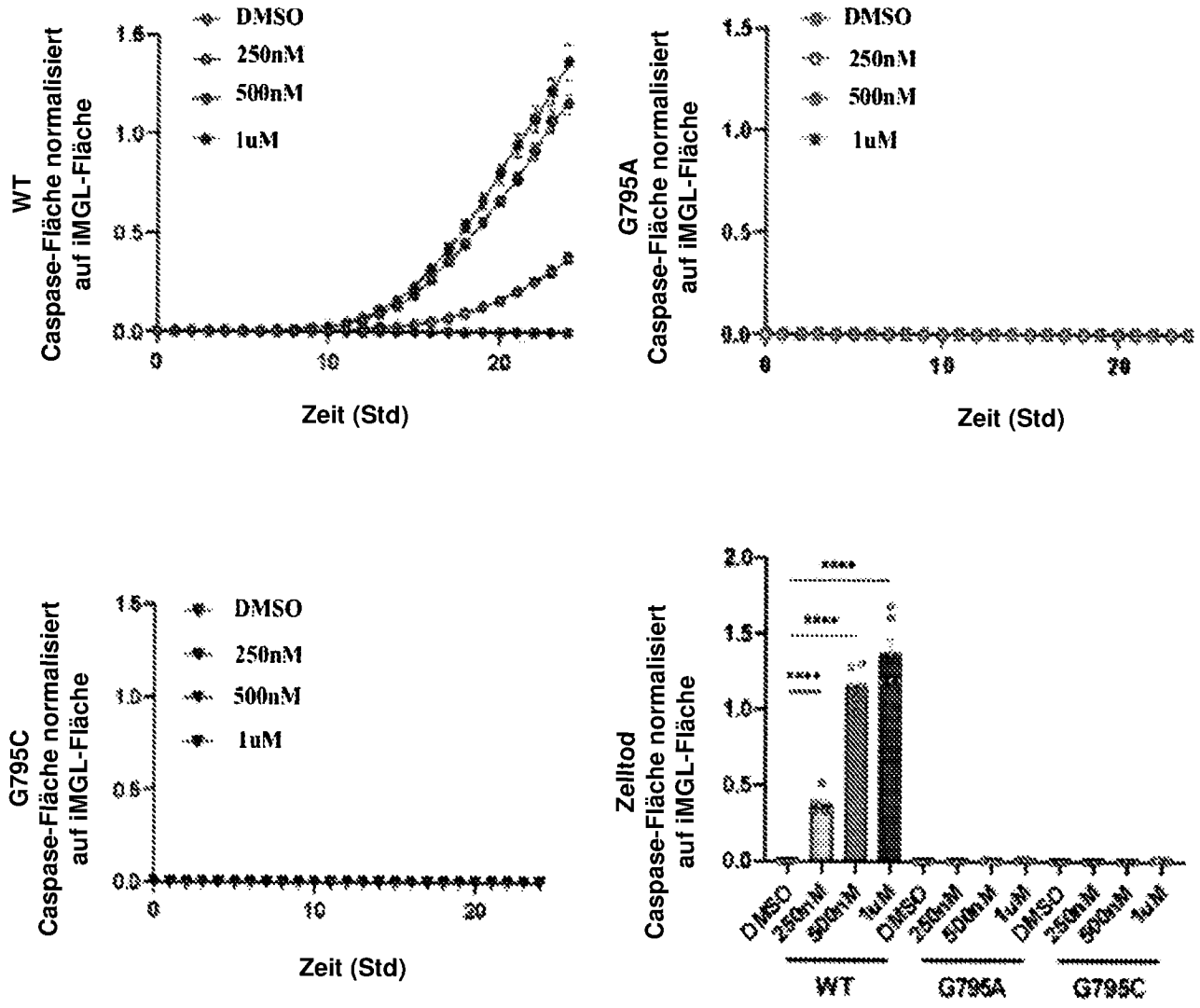


FIG. 4B

Plexxikon 5622

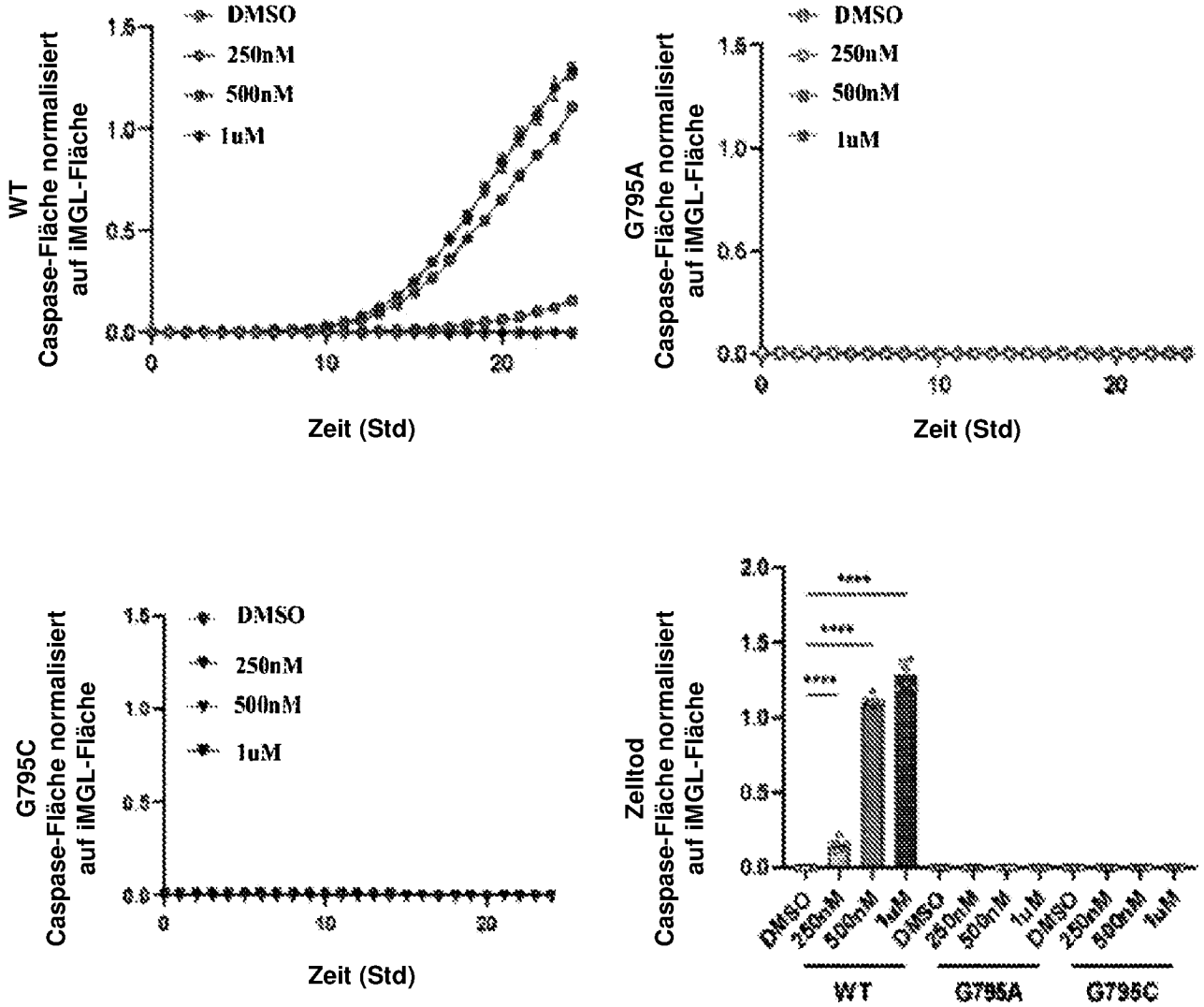


FIG. 4C

Edicotinib

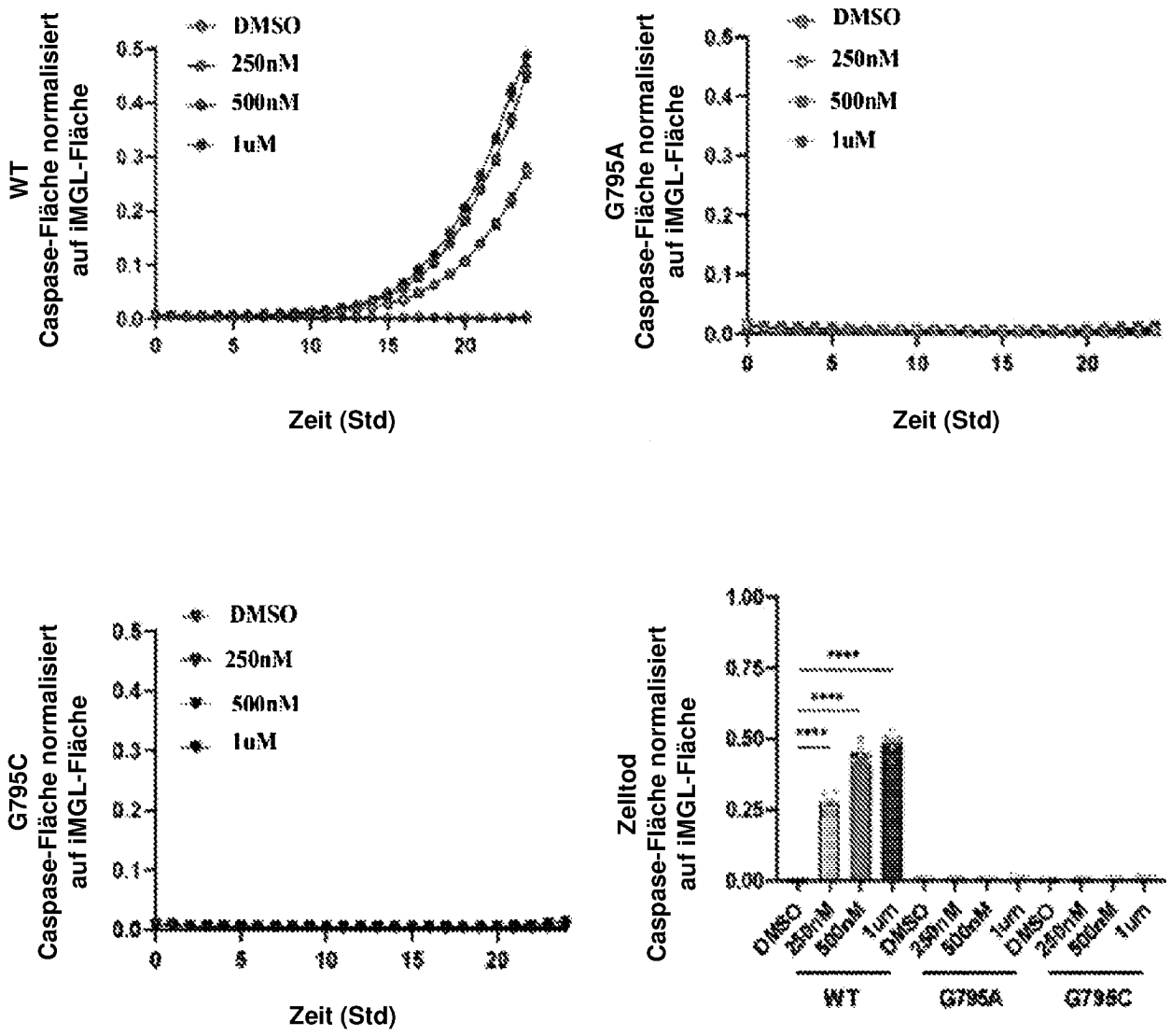


FIG. 4D

BLZ945

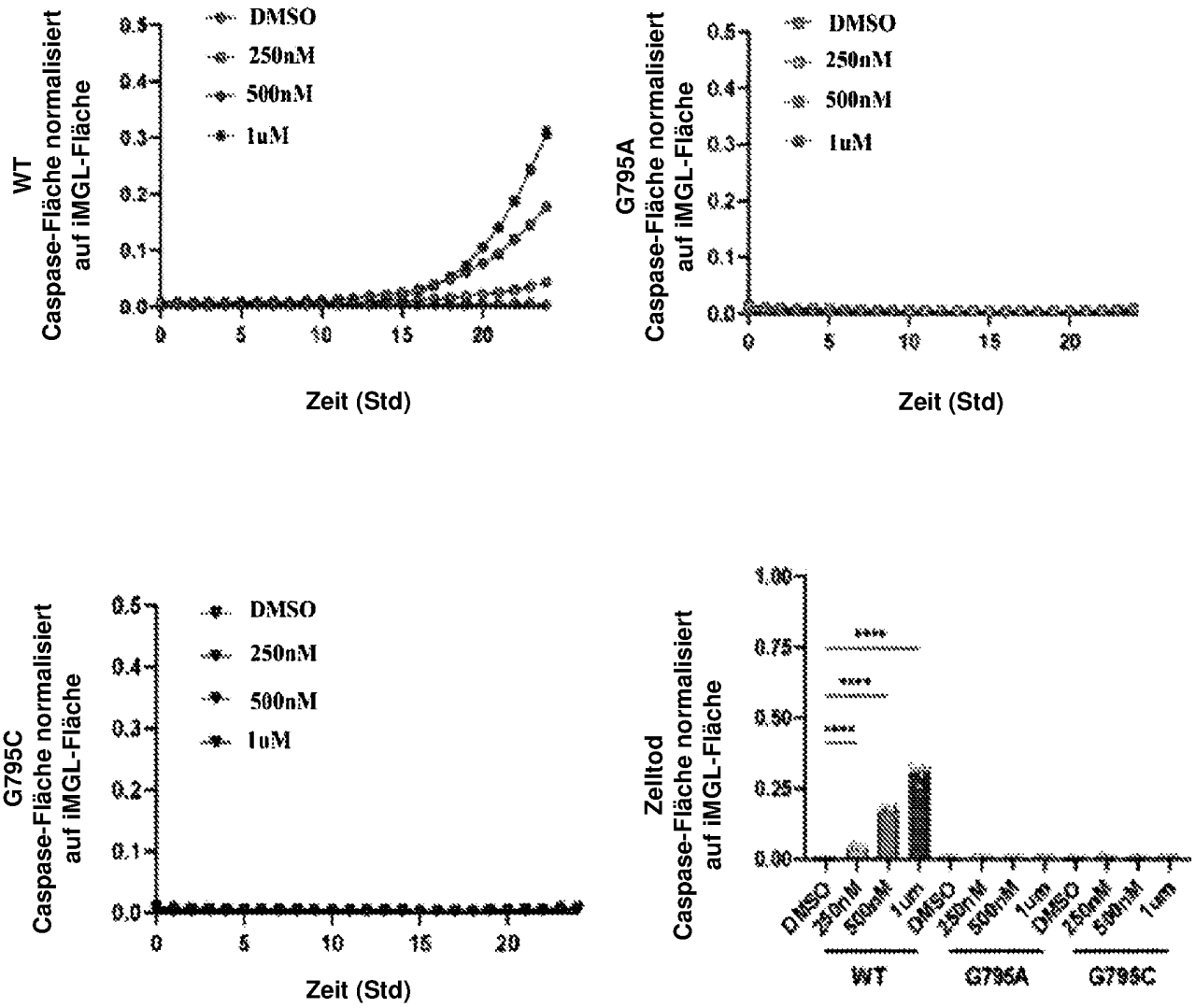


FIG. 4E

Plexxikon 3397

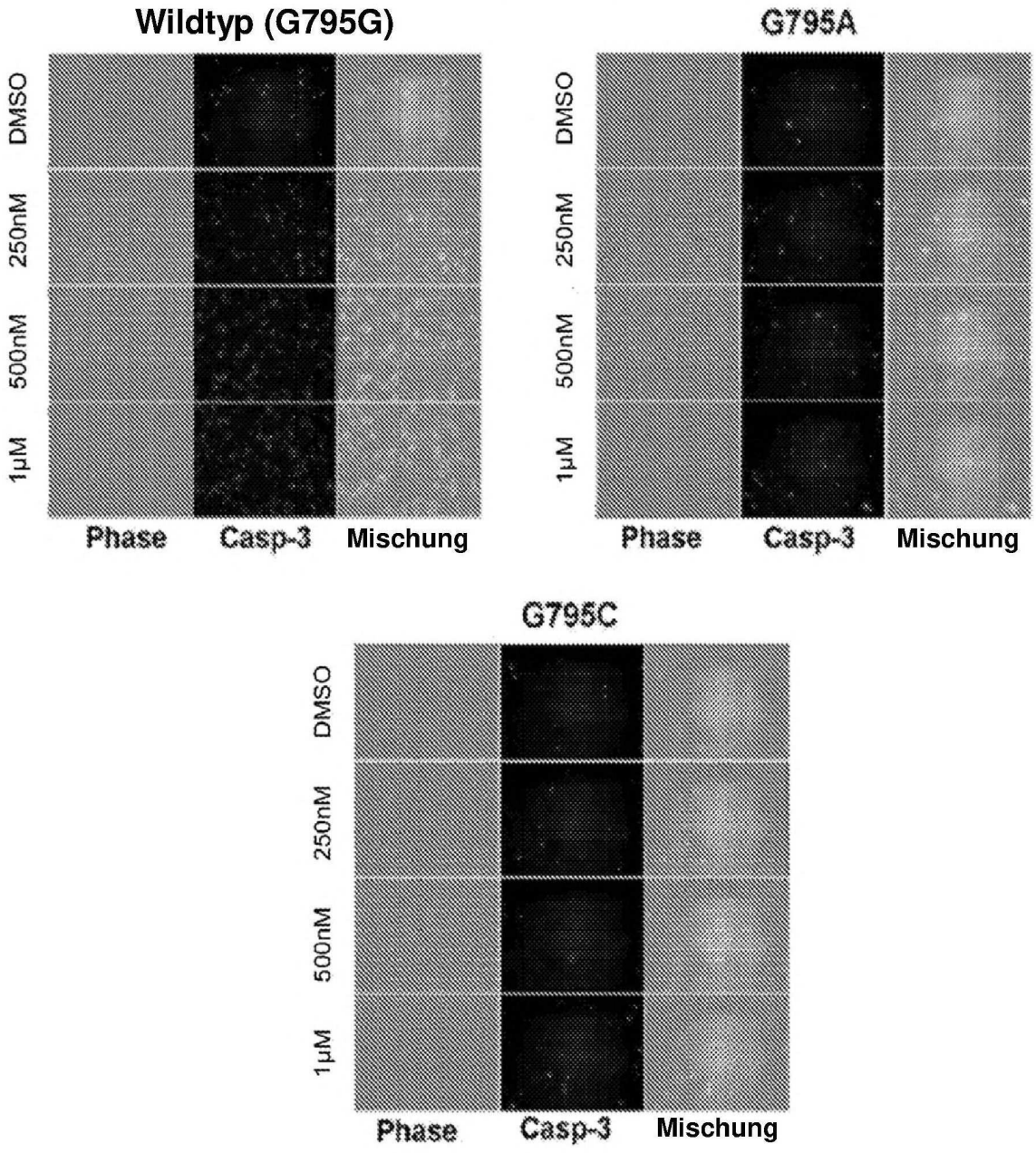


FIG. 5A

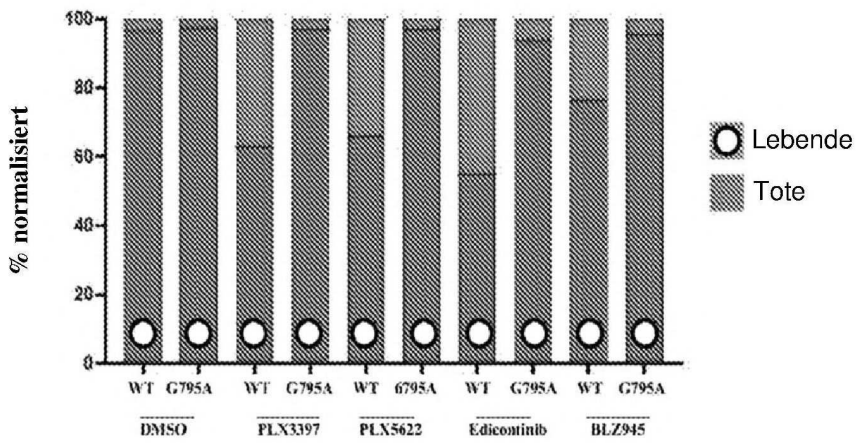


FIG. 5B

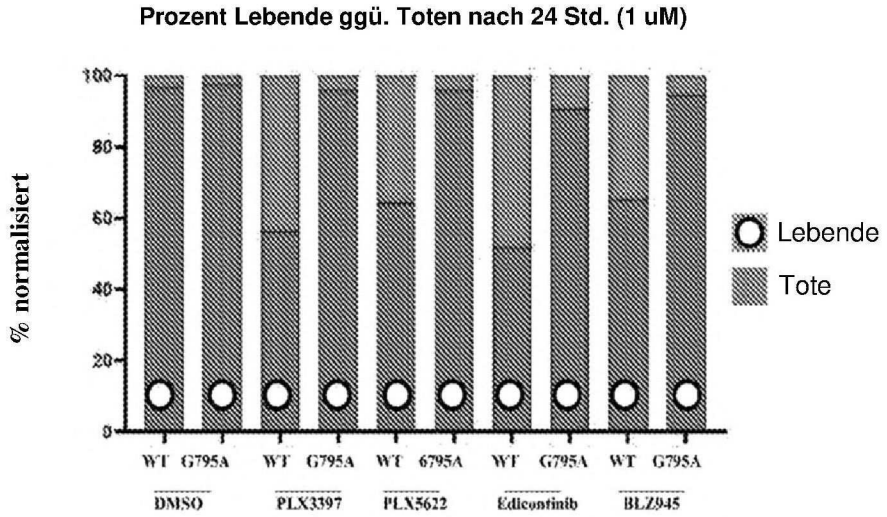

Prozent Lebende ggü. Toten nach 24 Std. (1 uM)
% normalisiert
100
80
60
40
20
0
WT G795A WT G795A WT 6795A WT G795A WT G795A
DMSO
PLX3397
PLX5622
Edicotinib
BLZ945
Lebende
Tote

FIG. 6

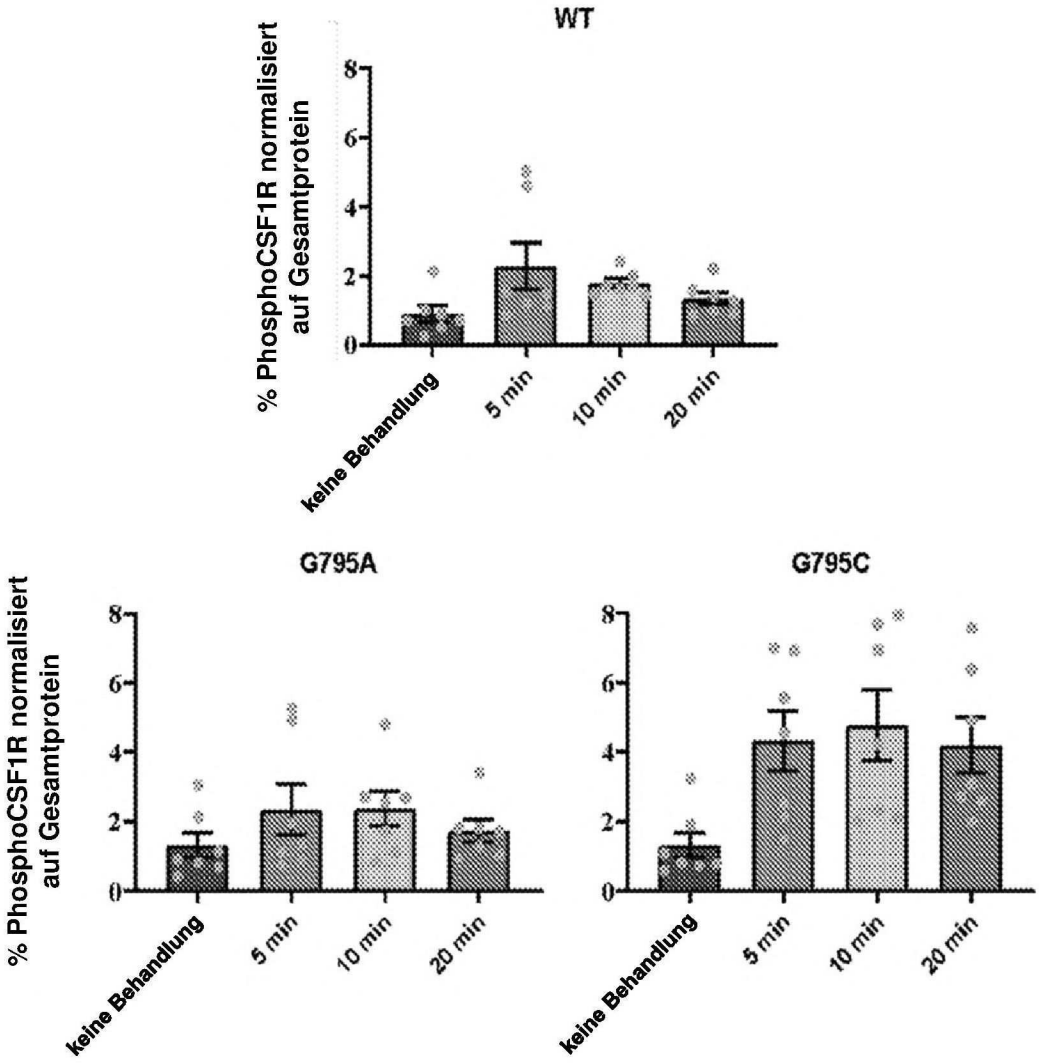
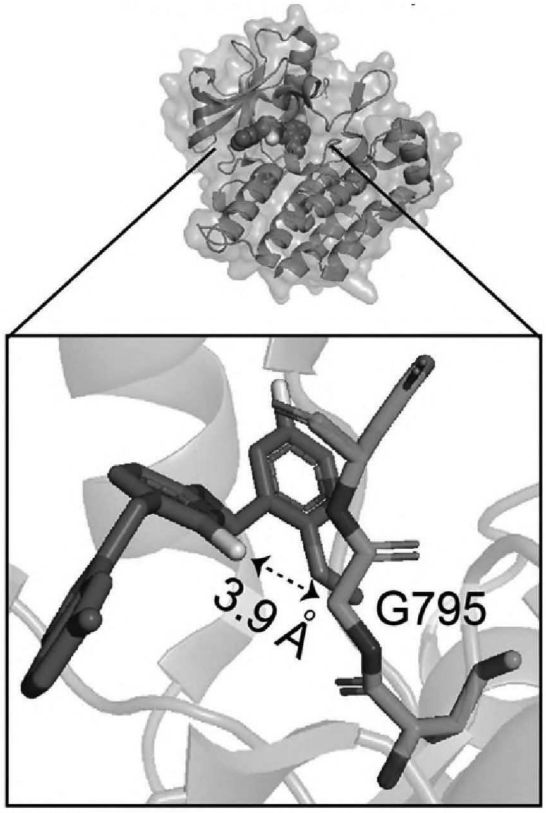

WT
% PhosphoCSF1R normalisiert auf Gesamtprotein
8
6
4
2
0
keine Behandlung
5 min
10 min
20 min
G795A
G795C

FIG. 7A

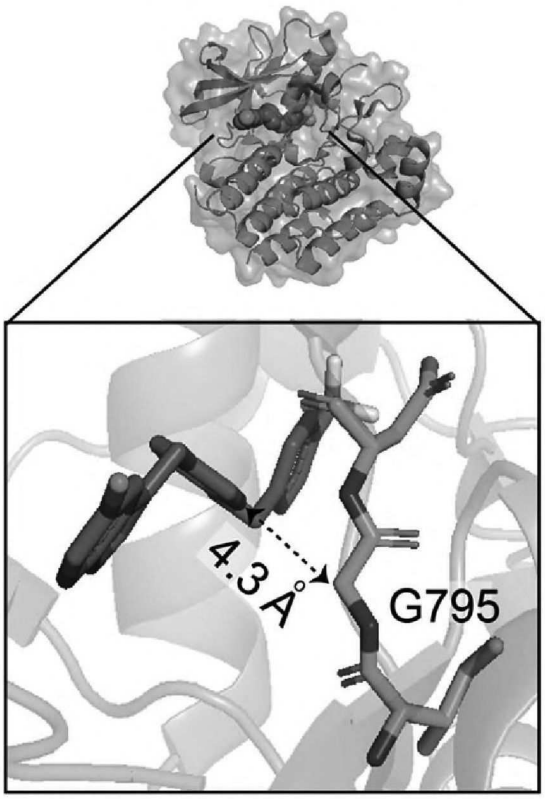
hCSF1R-PLX5622-Komplex



PDB 6N33
PLX5622

FIG. 7B

hCSF1R-PLX3397-Komplex



PDB 4R7H
PLX3397

FIG. 7C

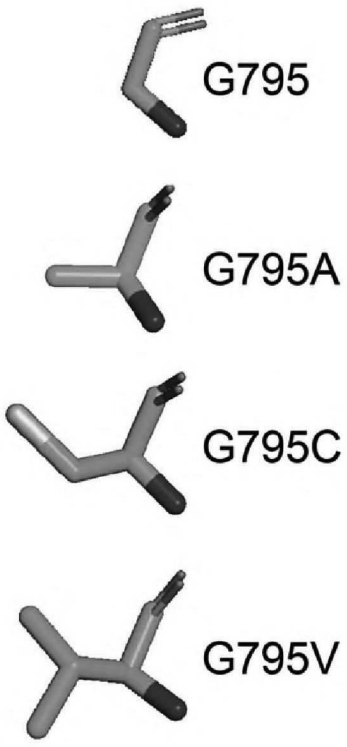


FIG. 7D

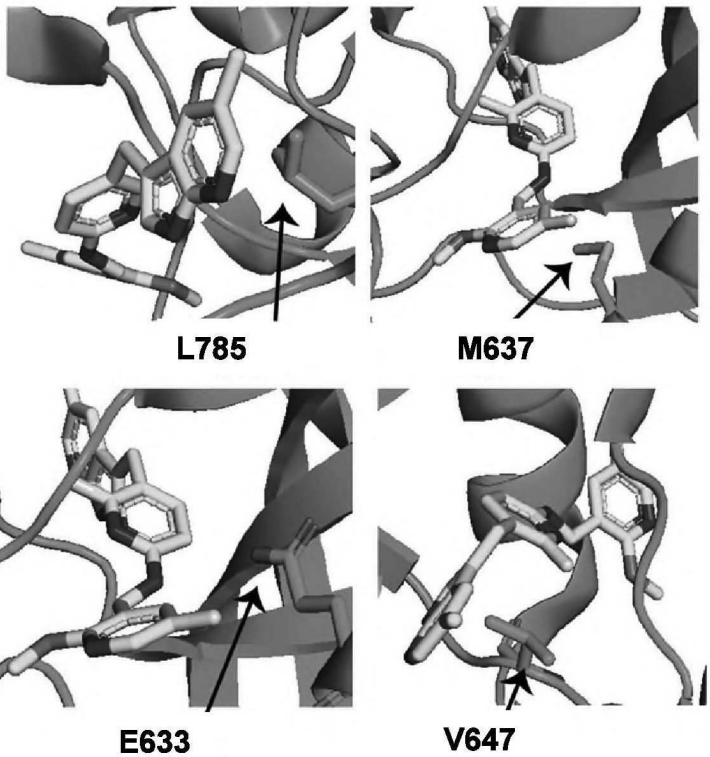


FIG. 8

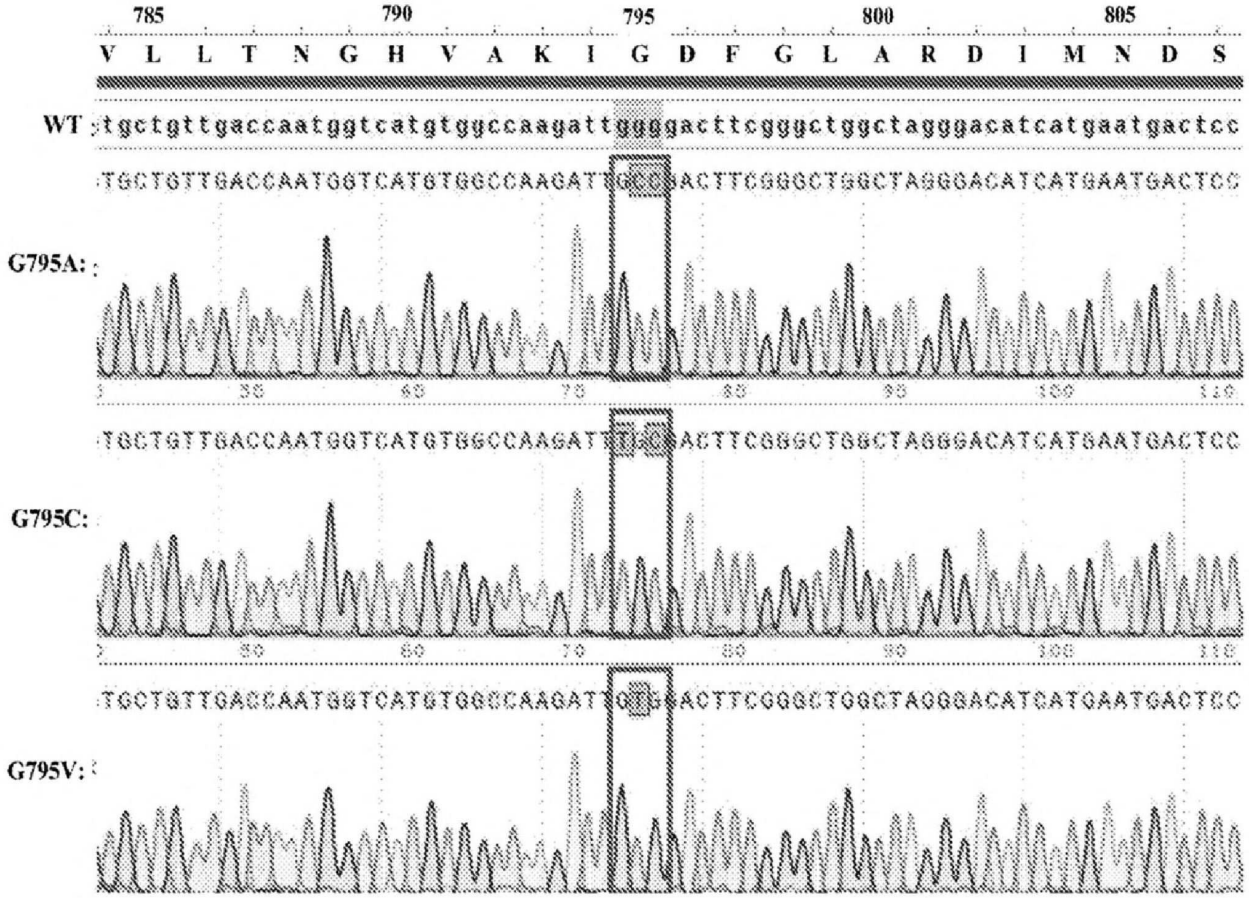

785
790
795
800
805
V L L T N G H V A K I G D F G L A R D I M N D S
WT
G795A:
G795C:
G795V:

FIG. 9A

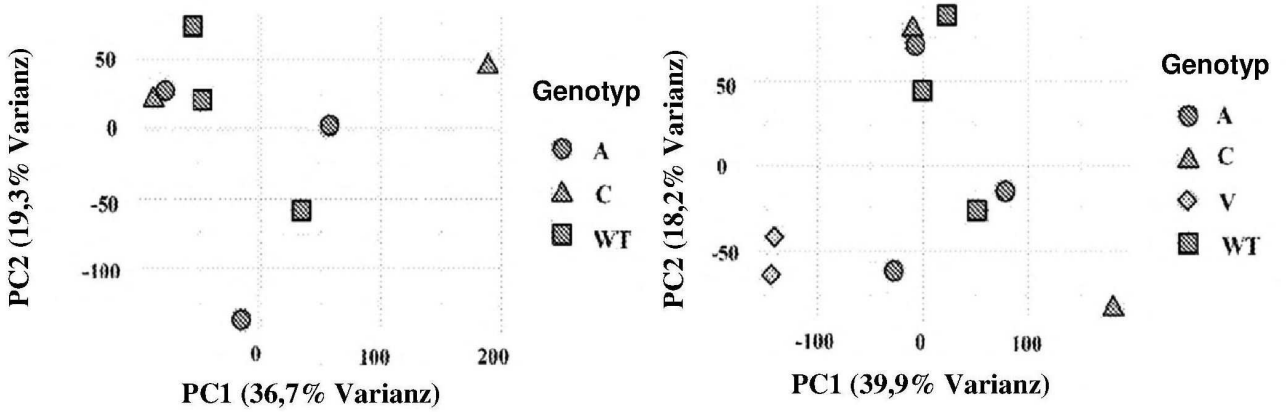

PC2 (19,3% Varianz)
PC1 (36,7% Varianz)
Genotyp
A
C
WT
PC2 (18,2% Varianz)
PC1 (39,9% Varianz)
Genotyp
A
C
V
WT

FIG. 9B

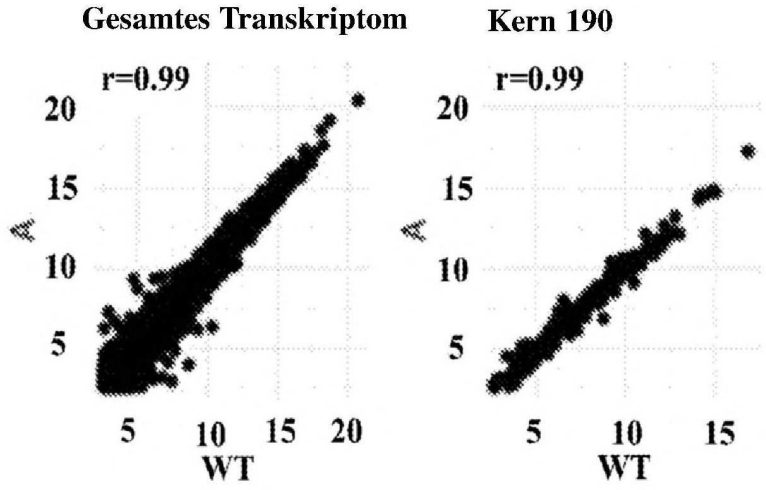


FIG. 9C

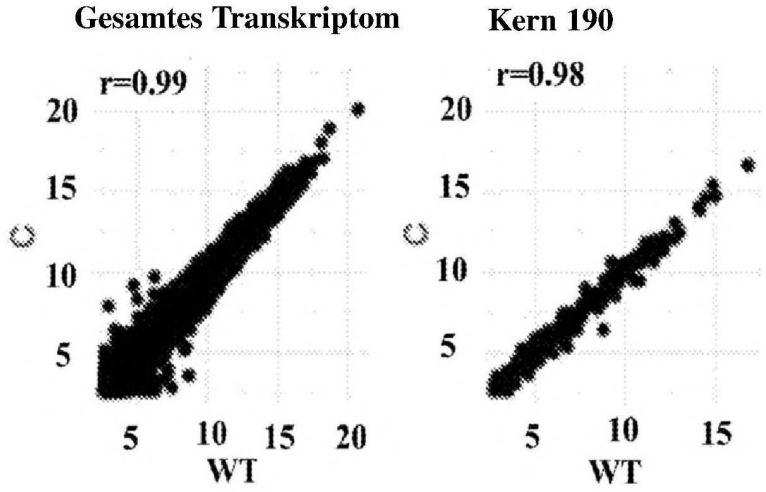


FIG. 9D

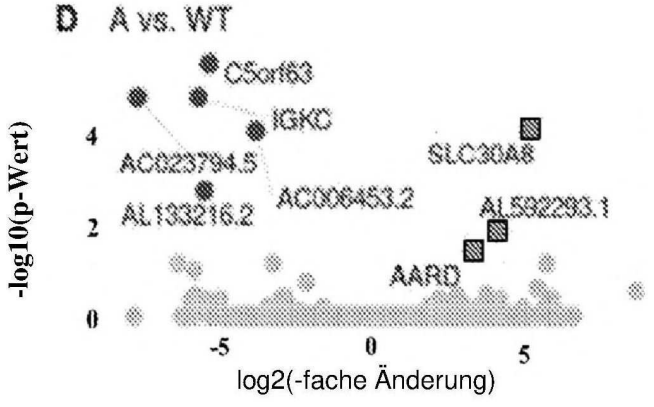


FIG. 9E

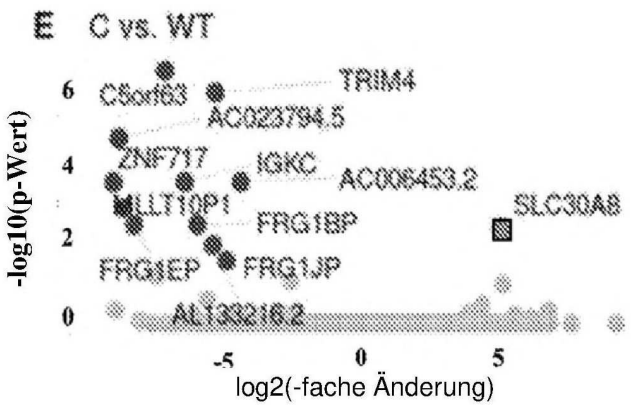


FIG. 10A

WT_vs_G795A-Zelllinien-Korrelationsgraphen

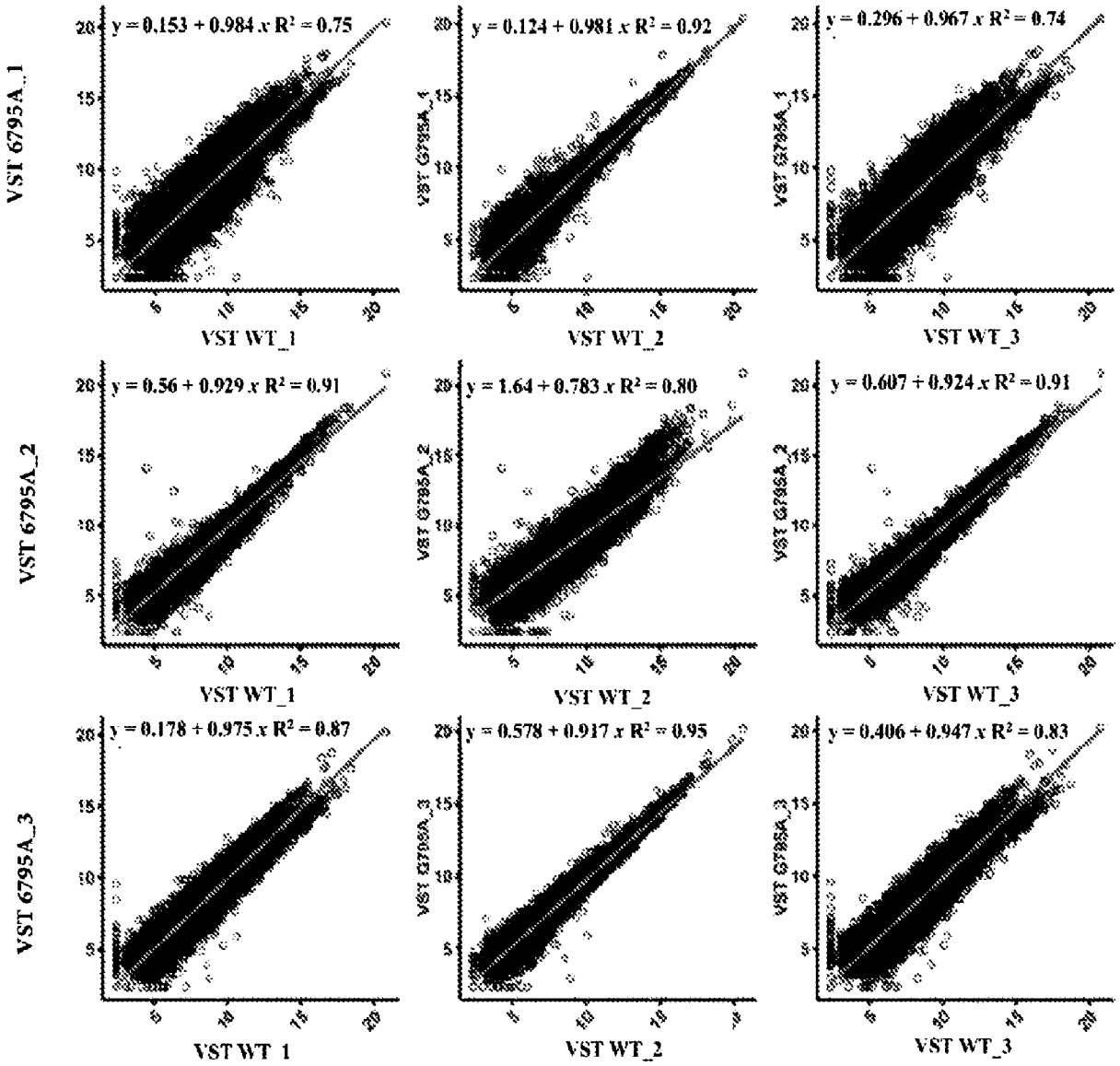


FIG. 10B

WT_vs_G795A-Freeman-Signatur-Zelllinien-Korrelationsgraphen

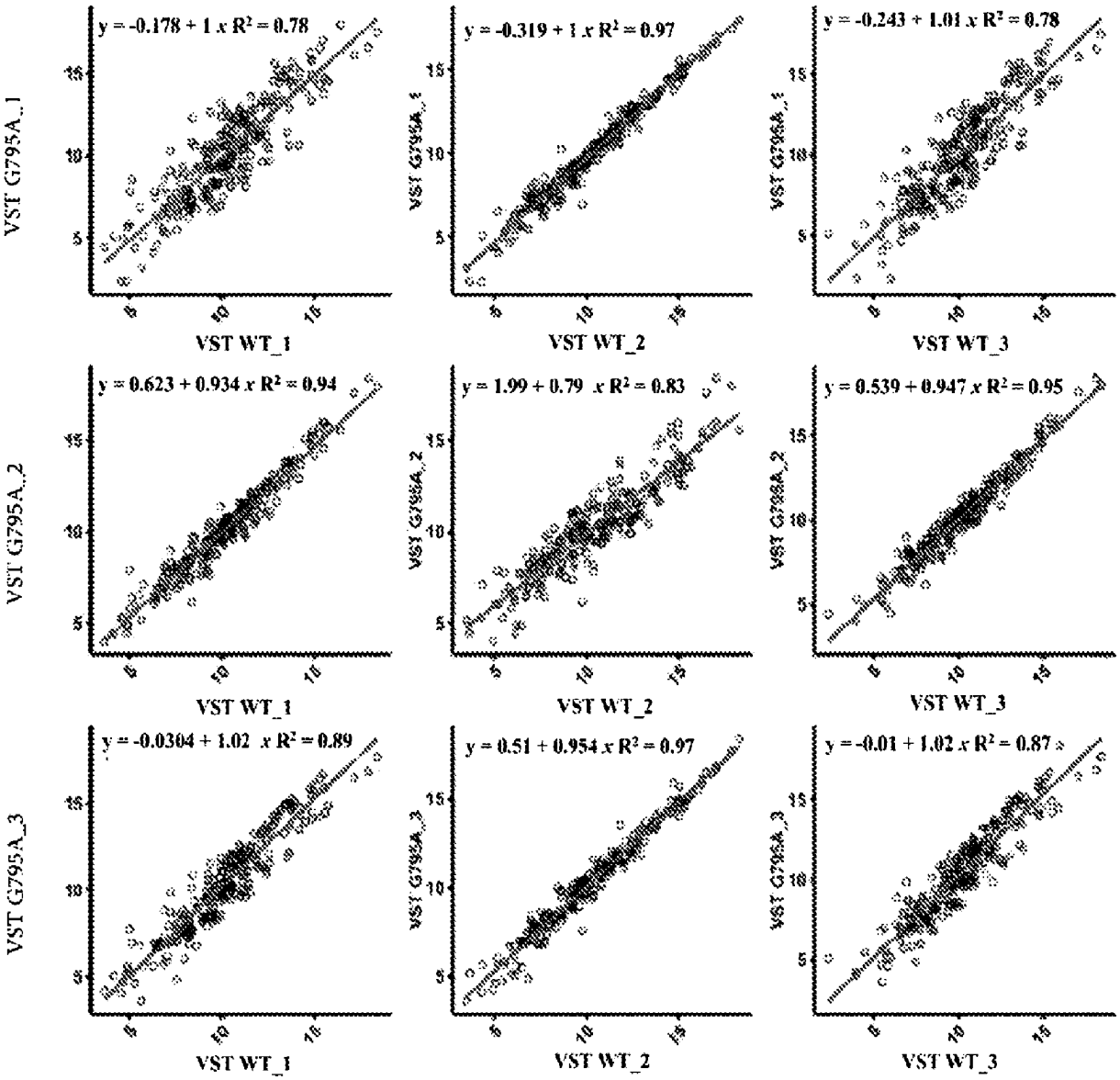


FIG. 11A

IBA-1

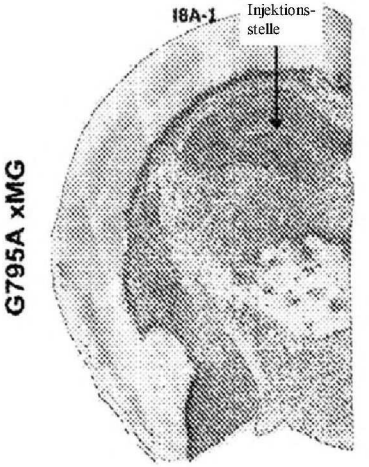


FIG. 11B

Humane Nuclei (Ku80)

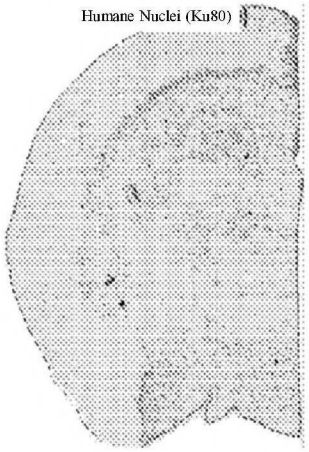


FIG. 11C

Ki67 (mitotische Nuclei)

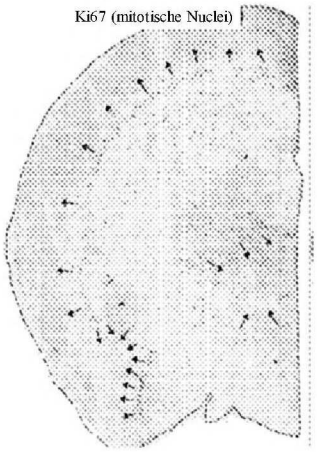


FIG. 11D

IBA-1/Ku80/Ki67

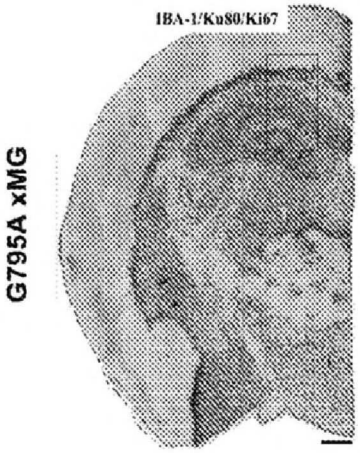


FIG. 11E

IBA-1/Ku80/Ki67

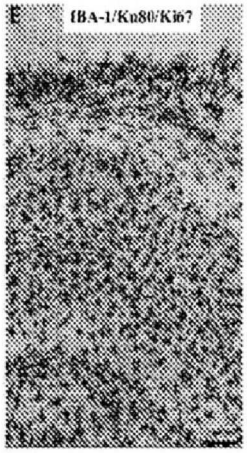


FIG. 11F

IBA-1

FIG. 11G

Humane Nuclei (Ku80)

FIG. 11H

Ki67 (mitotische Nuclei)

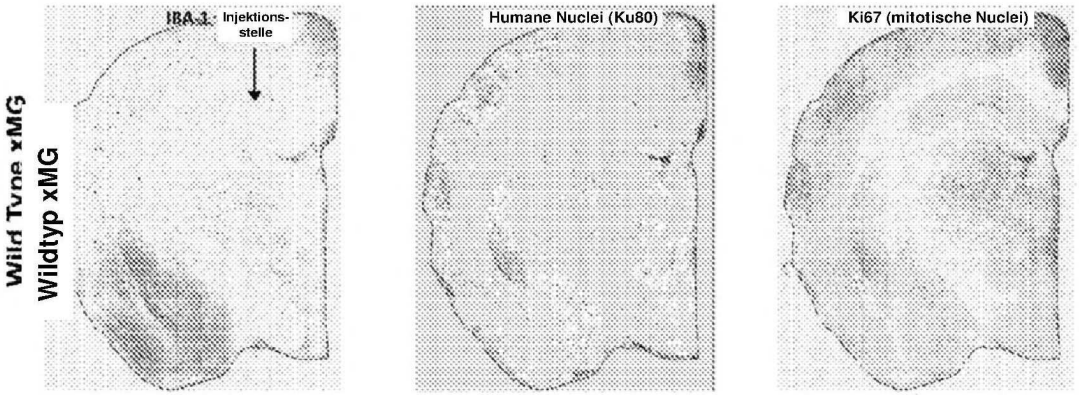


FIG. 11I

IBA-1/Ku80/Ki67

FIG. 11J

IBA-1/Ku80/Ki67

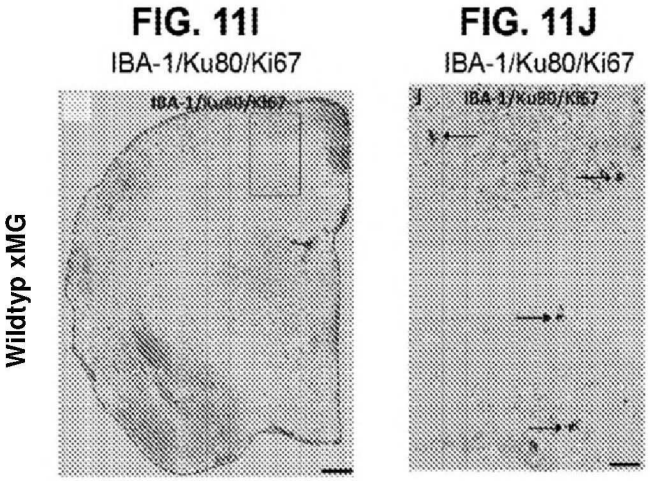
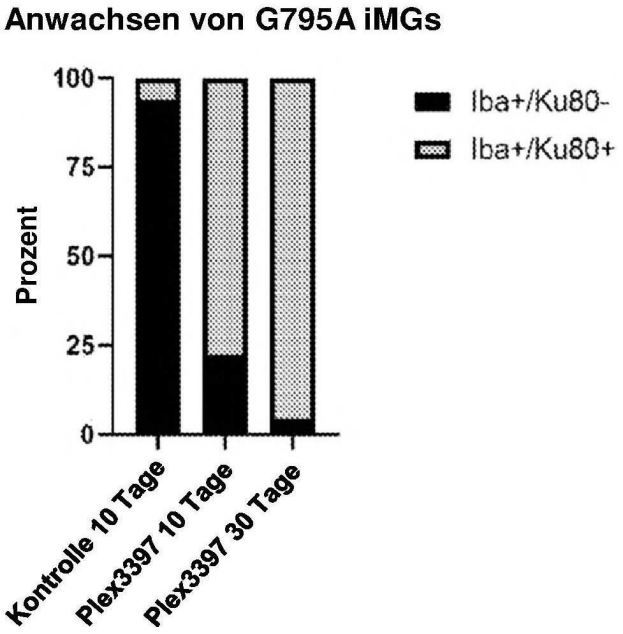


FIG. 12



 Das Dokument wurde durch die Firma Luminess hergestellt.