

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192770 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.04.13(51) Int. Cl. C12N 5/079 (2010.01)
A61K 35/30 (2015.01)
C12N 15/90 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2020.05.27

(54) БЫСТРАЯ И ДЕТЕРМИНИСТИЧЕСКАЯ ГЕНЕРАЦИЯ МИКРОГЛИИ ИЗ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

(31) 19176722.7

(72) Изобретатель:

(32) 2019.05.27

Павловски Маттиас, Шпайхер Анна
Мартин (DE)

(33) EP

(86) PCT/EP2020/064649

(74) Представитель:

(87) WO 2020/239807 2020.12.03

Нилова М.И. (RU)

(71) Заявитель:

ВЕСТФЕЛИШЕ ВИЛЬХЕЛЬМС-
УНИВЕРЗИТЕТ МЮНСТЕР (DE)

(57) Настоящее изобретение относится к способу получения микроглии из стволовых клеток, включающему следующие стадии: а) направленная инсерция нуклеотидной последовательности, кодирующей белок-регулятор транскрипции, в первый сайт "безопасная гавань" генома; и б) направленная инсерция кодирующей последовательности фактора транскрипции PU.1 (SEQ ID NO: 1) во второй сайт "безопасная гавань" генома, где ген функционально связан с индуцибельным промотором, который регулируется белком-регулятором транскрипции; экспрессия PU.1 (SEQ ID NO: 2); и в) культивирование стволовых клеток, полученных на этапах а) и б), с воздействием по меньшей мере одного фактора роста или малой молекулы, которая воспроизводит передачу сигналов во время по меньшей мере одной стадии эмбрионального развития микроглии или пролиферации, дифференцировки или поляризации взрослой микроглии. Кроме того, настоящее изобретение относится к микроглии, полученной согласно способам по настоящему изобретению, и к её различным применениям.



A1

202192770

202192770

A1

БЫСТРАЯ И ДЕТЕРМИНИСТИЧЕСКАЯ ГЕНЕРАЦИЯ МИКРОГЛИИ ИЗ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[001] Настоящее изобретение относится к способу получения микроглии из стволовых клеток, включающему стадии: а) направленной инсерции нуклеотидной последовательности, кодирующей белок-регулятор транскрипции, в первый сайт «безопасная гавань» генома; и б) направленной инсерции кодирующей последовательности фактора транскрипции PU.1 во второй сайт «безопасная гавань» генома, где ген функционально связан с индуцибельным промотором, который регулируется белком-регулятором транскрипции; экспрессии PU.1; и в) культивирования стволовых клеток, полученных на этапах а) и б), с воздействием по меньшей мере одного фактора роста или малой молекулы, которая воспроизводит передачу сигналов во время по меньшей мере одной стадии эмбрионального развития микроглии или пролиферации, дифференцировки или поляризации взрослой микроглии. Кроме того, настоящее изобретение относится к микроглии, полученной согласно способам по настоящему изобретению, и к её различным применениям.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[002] Микроглия является резидентными иммунными клетками в центральной нервной системе (ЦНС) [Schafer *et al.*, 2015]. Они происходят из ранних макрофагов желточного мешка, которые появляются во время первой волны примитивного гематопоеза в ходе раннего эмбрионального развития. Примитивные макрофаги желточного мешка распространяются по кровотоку, как только система кровообращения начинает заполнять развивающуюся ЦНС. В отличие от тканевых макрофагов в других органах, микроглия не замещается фетальными моноцитами на более поздних стадиях эмбрионального развития [McGrath *et al.*, 303; Ginhoux *et al.*, 2010; Gomez Perdiguero *et al.*, 2015]. После основания популяции микроглии во время раннего эмбрионального развития микроглия самоподдерживается на протяжении всей жизни за счёт локальной пролиферации, не замещается клетками костномозгового происхождения [Réu *et al.*, 2017]. Микроглия равномерно распределена по головному и спинному мозгу и играет решающую роль в развитии, поддержании, пластичности и защите ЦНС [Schafer *et al.*, 2015]. В здоровой ЦНС «покоящаяся» гомеостатическая микроглия представляет собой сильно разветвленные

клетки с небольшим клеточным телом и тонкими клеточными отростками. Эти микроглиальные отростки подвижны и непрерывно исследуют окружающую среду для отслеживания сигналов внутренней или внешней опасности (таких как вторжение патогенов или сигналы, генерируемые локально поврежденными или умирающими клетками). Обнаружение таких сигналов приводит к активации микроглии, которая подразумевает глубокие изменения в морфологии микроглии, экспрессии генов и функционировании. После активации микроглия втягивает свои отростки и принимает амебоидный вид. Они активно мигрируют к участкам повреждения ЦНС, следуя хемотаксическим градиентам, и секретируют воспалительные цитокины.

[003] С помощью огромного количества рецепторов клеточной поверхности, включая рецепторы нейротрансмиттеров и цитокинов, они взаимодействуют с нейронами, другими глиальными клетками и клетками периферической иммунной системы [Kettenmann *et al.*, 2011]. В свете их многообразных функций и уникального положения как представителей иммунной системы в здоровой ЦНС, неудивительно, что микроглия причастна к возникновению и прогрессированию многих неврологических заболеваний [Ransohoff *et al.*, 2016].

[004] Совсем недавно транскриптомное профилирование одиночной клетки микроглии на мышинных моделях болезни Альцгеймера (Alzheimer's disease, AD) и других нейродегенеративных заболеваний, включая старение, боковой амиотрофический склероз или связанную с таупатией лобно-височную лобарную дегенерацию (frontotemporal lobar degeneration, FTLD-tau) выявило провоспалительную транскриптомную сигнатуру в небольшой субпопуляции микроглии, названной микроглиальным нейродегенеративным фенотипом (MGnD) [Krasemann *et al.*, 2017] или микроглией, ассоциированной с патологией (disease-associated microglia, DAM) [Keren-Saul *et al.*, 2017]. Считается, что переключение микроглии с гомеостатического на ассоциированный с патологией фенотип происходит в ответ на измененный гомеостаз мозга при нейродегенерации и зависит от уникальных программ транскрипции, контролируемых во времени и пространстве [Krasemann *et al.*, 2017; Keren-Shaul *et al.*, 2017; Butovsky *et al.*, 1998]. В большинстве случаев остается неясным, обладают ли эти клетки защитной или индуцирующей болезнь/способствующей распространению болезни функцией. Доступ к микроглии человека *in vitro* и *in vivo*, в состоянии здоровья и болезни облегчил бы идентификацию факторов, связанных как с их полезными, так и с оказывающими вредное воздействие функциями и разработку стратегий восстановления гомеостатической микроглиальной сигнатуры или индукции микроглиальной сигнатуры DAM. Это могло бы позволить нам

целенаправленно воздействовать на микроглию для лечения нейродегенеративных заболеваний.

[005] Выделение или образование *in vitro* многих типов клеток человека остается проблематичным и неэффективным. Особенно трудно получить клетки ЦНС человека, включая микроглию. В прошлом единственным путем доступа являлось малоэффективное выделение из нейрохирургического образца или ткани мозга после вскрытия. Человеческие плюрипотентные стволовые клетки (чПСК) (human pluripotent stem cells, hPSCs) представляют собой неограниченный и возобновляемый источник, из которого теоретически могут быть продуцированы все типы клеток человеческого организма [Thomson *et al.*, 1998]. Революционное открытие того, что фибробласты кожи человека могут быть легко преобразованы в человеческие индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (чиПСК) (human induced pluripotent stem cells, hiPSC), которые проявляют те же свойства, что и эмбриональные стволовые клетки, позволяет генерировать аутологические и специализированные типы клеток для применения в регенеративной медицине. Для нескольких ключевых применений, включая моделирование болезней, разработку новых лекарственных средств и трансплантацию клеток, требуется крупномасштабное производство зрелых типов клеток человека из чПСК. Недавно был опубликован первый протокол дифференцировки чПСК для генерации микроглии. Он был основан на начальном образовании эмбриоидных телец (embryoid-bodies, EB), культивируемых в течение нескольких месяцев в той же «питательной среде нейроглиальной дифференцировки, концентрации компонентов которой были скорректированы так, чтобы соответствовать концентрациям в спинномозговой жидкости человека» с добавлением интерлейкина (ИЛ)-34 и колониестимулирующего фактора 1 (КСФ-1) [Muffat *et al.*, 2016]. Эта новаторская публикация предоставила детально разработанный состав питательных сред для окончательного созревания и поддержания микроглии человека. Однако длительность протокола, неточно определенные начальные этапы дифференцировки (т.е. промежуточные этапы на основе EB вряд ли следуют эмбриональным обоснованиям) и необходимость в нескольких этапах механических манипуляций для очистки клетки, вероятно, препятствуют широкому применению этого протокола. Впоследствии несколько других групп продемонстрировали генерацию микроглиеподобных клеток из чПСК с помощью аналогичных, но различных классических подходов к дифференцировке [Abud *et al.*, 2017; Takata *et al.*, 2017; Haenseler *et al.*, 2017; Pandya *et al.*, 2017; Douvaras *et al.*, 2017]. Тем не менее, образование *in vitro* определенных типов клеток человека, включая микроглию, в количестве и степени чистоты, необходимых для последующих применений, остается проблематичным, и в настоящее время ведутся

поиски альтернативных способов [Cohen *et al.*, 2011]. Более современной производственной стратегией по сравнению с классической дифференцировкой является прямое репрограммирование клеток [Ladewig *et al.*, 2013]. Это относится к прямому преобразованию одного типа клеток (обычно фибробластов кожи) в другой тип без прохождения через плюрипотентный промежуточный вид. Несмотря на то, что обеспечивается быстрый путь получения клетки из легко доступных типов клетки, выход и степень чистоты необходимых популяций клетки остаются низкими и недостаточными [Zhang *et al.*, 2013]. Недавно был предложен третий путь, названный «прямое программирование», для производства зрелых типов клетки человека с беспрецедентной скоростью и эффективностью [Zhang *et al.*, 2013].

[006] Прямое программирование как способ прямого преобразования плюрипотентных стволовых клеток, включая чПСК, в зрелые типы клеток было признано эффективной стратегией образования клеток человека. Оно включает в себя принудительную экспрессию факторов транскрипции ключевой линии (или некодирующих РНК, включая днкРНК (lncRNA, длинные некодирующие РНК) и микроРНК (microRNA, малые некодирующие РНК)) для того, чтобы преобразовать стволовую клетку в определенный тип зрелой клетки. Доступные в настоящее время протоколы прямого программирования, как правило, основаны на лентивирусной трансдукции клеток, которая приводит к мозаичной экспрессии или полному выключению (сайленсингу) случайно вставленных индуцибельных кассет. Это приводит к необходимости в дополнительных стадиях очистки для выделения субпопуляции, экспрессирующей необходимые факторы транскрипции. Таким образом, очевидно, что необходимы дальнейшие уточнения этих способов.

[007] Любые уточнения к указанным способам должны гарантировать, что стабильная транскрипция генетического материала, содержащегося в индуцибельной кассете, например, трансгена, устойчива к сайленсингу генов и другим негативным воздействиям, связанным с сайтом интеграции. Сайленсинг генов может быть вызван множественными эпигенетическими механизмами, включая метилирование ДНК или модификации гистонов. В способах предшествующего уровня техники, основанных на лентивирусной трансдукции, полученные клетки представляют собой гетерогенную популяцию с трансгеном, экспрессирующимся полностью, частично или в выключенном состоянии. Разумеется, что для многих вариантов применения это является нежелательным. Вирусные векторы демонстрируют тенденцию к интеграции своего генетического материала в транскрипционно активные области генома, тем самым увеличивая вероятность онкогенных событий из-за инсерционного мутагенеза. Для многих вариантов применения желательно контролировать транскрипцию встроенного генетического материала в клетку,

чтобы индуцибельная кассета могла быть включена по мере необходимости и транскрибироваться на определенных уровнях, включая высокие уровни. Этого нельзя достичь, если инсерция индуцибельной кассеты в геном является случайной.

[008] Проблема того, что микроглия одновременно участвует в нескольких серьезных заболеваниях и запутана в ткани мозга таким образом, что её выделение из живой ткани остается недостижимым, рассматривалась в нескольких публикациях. Чтобы преодолеть эту проблему, стволовые клетки человека используют для генерации микроглии или микроглиеподобных клеток, например, с помощью определенных условий культивирования [Muffat *et al.*, 2016] или совместного культивирования с нейронами, полученными из стволовой клетки [Haenseler *et al.*, 2017; Takata *et al.*, 2017]. Эти способы основаны только на воздействии факторов роста и цитокинов для дифференцировки стволовых клеток в микроглию.

[009] Кроме того, потребность в этом особом типе клетки огромна, поскольку они играют важную роль практически во всех заболеваниях центральной нервной системы, включая нейродегенеративные заболевания, нейровоспалительные или аутоиммунные заболевания, опосредованный аутоантителами энцефалит или инфекционные заболевания, нейроваскулярные заболевания, инсульт, черепно-мозговые травмы и рак, но точные механизмы, лежащие в основе их роли в различных заболеваниях, остаются неясными. Согласно предшествующему уровню техники микроглии, полученная из стволовых клеток, действительно воспроизводит исходный фенотип болезни пациентов [Muffat *et al.*, 2016; Abud *et al.*, 2017; Takata *et al.*, 2017]. Обладая этими знаниями, огромный научный пробел в участии микроглии в некоторых заболеваниях может быть преодолен путем генерации микроглии из стволовых клеток. Однако классические протоколы дифференцировки стволовых клеток требуют очень много времени, и результаты являются неубедительными.

[0010] Таким образом, авторы настоящего изобретения разработали быстрый способ генерации микроглии из стволовых клеток путем применения стабильного введения индуцибельной кассеты в геном стволовой клетки, при этом имея возможность контролировать транскрипцию этой индуцибельной кассеты и тем самым вставленные факторы транскрипции. Потенциал этих факторов транскрипции функционировать в качестве факторов репрограммирования для генерации микроглии ранее не был известен и представляет собой уникальное знание авторов настоящего изобретения. Это позволяет им создать чистую популяцию микроглии, экспрессирующую все поверхностные маркеры и РНК, наблюдаемые в естественных популяциях микроглии. Кроме того, этот способ может быть использован для дифференцировки микроглии из iPSC клеток человека у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями и, таким образом, позволяет анализировать

популяцию клетки, которая в противном случае остается полностью инертной для медицинских обследований. Соответственно, существует острая потребность в производстве зрелой микроглии человека из легкодоступных источников. Таким образом, техническая задача, лежащая в основе настоящей заявки, состоит в том, чтобы удовлетворить эти потребности. Техническая задача решается путем предоставления вариантов реализации, отраженных в формуле изобретения, описанных в описании и проиллюстрированных в примерах и фигурах, приведенных ниже.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0011] Авторы настоящего изобретения разработали способ получения микроглии из стволовых клеток.

[0012] Настоящее изобретение относится к способу получения микроглии из стволовых клеток, включающему стадии: а) направленной инсерции нуклеотидной последовательности, кодирующей белок-регулятор транскрипции, в первый сайт «безопасная гавань» генома; и б) направленной инсерции кодирующей последовательности фактора транскрипции PU.1 (SEQ ID NO:1), во второй сайт «безопасная гавань» генома, где ген функционально связан с индуцибельным промотором, который регулируется белком-регулятором транскрипции; экспрессии PU.1 (SEQ ID NO:2); и в) культивирования стволовых клеток, полученных на этапах а) и б), с воздействием по меньшей мере одного фактора роста или малой молекулы, которая воспроизводит передачу сигналов во время по меньшей мере одной стадии эмбрионального развития микроглии или пролиферации, дифференцировки или поляризации взрослой микроглии.

[0013] Согласно одному варианту реализации способа согласно настоящему изобретению по меньшей мере один фактор роста или малая молекула выбраны из группы, состоящей из Активина А (SEQ ID NO:7), BMP4 (bone morphogenetic protein 4, костный морфогенетический белок 4) (SEQ ID NO: 8), FGF (fibroblast growth factor, фактор роста фибробластов) (SEQ ID NO: 9), VEGF-A (vascular endothelial growth factor A, фактор роста эндотелия сосудов А) (SEQ ID NO: 10), LY294002, CHIR99021, ФСК (stem cell factor, фактор стволовых клеток, SCF) (SEQ ID NO: 11), ИЛ-3 (SEQ ID NO: 12), ИЛ-6 (SEQ ID NO: 13), ФСК1 (SEQ ID NO: 14), ИЛ-34 (SEQ ID NO: 15), ФСК2 (SEQ ID NO: 16), CD200 (SEQ ID NO: 17), CX3CL1 (C-X3-C motif chemokine ligand 1, хемокиновый лиганд 1 с мотивом C-X3-C) (SEQ ID NO: 18), TGFβ1 (transforming growth factor beta 1, трансформирующий ростовой фактор бета 1) (SEQ ID NO: 19) и IDE1 (Insulin-degrading enzyme 1, инсулин-разрушающий фермент 1).

[0014] Согласно другому варианту реализации способа согласно настоящему изобретению по меньшей мере один фактор роста представляет собой ФСК1 (SEQ ID NO:14) или ИЛ-34 (SEQ ID NO:15).

[0015] Согласно дополнительному варианту реализации способа согласно настоящему изобретению по меньшей мере одна малая молекула представляет собой CHIR99021, LY294002 или IDE1.

[0016] Согласно другому варианту реализации способа согласно настоящему изобретению первый и второй сайты “безопасная гавань” генома различаются.

[0017] Согласно другому варианту реализации способа согласно настоящему изобретению способ дополнительно включает инсерцию кодирующей последовательности гена фактора транскрипции СЕВРВ (CCAAT enhancer binding protein beta, CCAAT энхансер связывающий белок бета) (SEQ ID NO: 3) и его экспрессию.

[0018] Согласно другому варианту реализации способа согласно настоящему изобретению способ дополнительно включает инсерцию кодирующей последовательности гена фактора транскрипции RUNX1 (фактор транскрипции 1, связанный с Runt) (SEQ ID NO: 4) и его экспрессию.

[0019] Согласно другому варианту реализации способа согласно настоящему изобретению способ дополнительно включает инсерцию кодирующей последовательности гена фактора транскрипции IRF8 (Interferon regulatory factor 8, регуляторный фактор интерферона 8) (SEQ ID NO: 5) и его экспрессию.

[0020] Согласно другому варианту реализации способа согласно настоящему изобретению способ дополнительно включает инсерцию кодирующей последовательности гена фактора транскрипции SALL1 (spalt like transcription factor 1, spalt-подобный фактор транскрипции 1) (SEQ ID NO: 6) и его экспрессию.

[0021] Согласно дополнительному варианту реализации способа согласно настоящему изобретению белок-регулятор транскрипции представляет собой обратный трансаактиватор тетрациклина rtTA (reverse tetracycline-controlled transactivator) (SEQ ID NO:20), и его активность контролируют доксициклином или тетрациклином.

[0022] Согласно другому варианту реализации способа согласно настоящему изобретению индуцибельный промотор включает в себя Tet-чувствительный элемент TRE (тетрациклин-чувствительный элемент, Tet-responsive element) (SEQ ID NO:21).

[0023] Согласно другому варианту реализации способа согласно настоящему изобретению указанные первый и второй сайты «безопасная гавань» генома выбраны из группы, состоящей из локуса hROSA26 (SEQ ID NO: 22), локуса AAVS1 (adeno-associated virus integration site 1, сайт интеграции аденоассоциированного вируса 1) (SEQ ID NO: 23), гена

CLYBL (citramalyl-CoA lyase, цитрамалил-КоА-лиаза) (SEQ ID NO: 24), гена CCR5 (C-C chemokine receptor type 5, С-С-рецептор хемокина 5) (SEQ ID NO: 25), гена ГФТ (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, HPRT, гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза) (SEQ ID NO: 26) или генов с сайтом ID 325 на хромосоме 8 (SEQ ID NO: 27), сайтом ID 227 на хромосоме 1 (SEQ ID NO: 28), сайтом ID 229 на хромосоме 2 (SEQ ID NO: 29), сайтом ID 255 на хромосоме 5 (SEQ ID NO: 30), сайтом ID 259 на хромосоме 14 (SEQ ID NO: 31), сайтом ID 263 на хромосоме X (SEQ ID NO: 32), сайтом ID 303 на хромосоме 2 (SEQ ID NO: 33), сайтом ID 231 на хромосоме 4 (SEQ ID NO: 34), сайтом ID 315 на хромосоме 5 (SEQ ID NO: 35), сайтом ID 307 на хромосоме 16 (SEQ ID NO: 36), сайтом ID 285 на хромосоме 6 (SEQ ID NO: 37), сайтом ID 233 на хромосоме 6 (SEQ ID NO : 38), сайтом ID 311 на хромосоме 134 (SEQ ID NO: 39), сайтом ID 301 на хромосоме 7 (SEQ ID NO: 40), сайтом ID 293 на хромосоме 8 (SEQ ID NO: 41), сайтом ID 319 на хромосоме 11 (SEQ ID NO: 42), сайтом ID 329 на хромосоме 12 (SEQ ID NO: 43), сайтом ID 313 на хромосоме X (SEQ ID NO: 44).

[0024] Согласно другому варианту реализации способа согласно настоящему изобретению указанная стволовая клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку, индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (иПСК), нейральную клетку-предшественницу, гемопоэтическую стволовую клетку или эмбриональную стволовую клетку (ЭСК).

[0025] Согласно другому варианту реализации способа согласно настоящему изобретению указанная стволовая клетка представляет собой стволовую клетку человека или мыши.

[0026] Настоящее изобретение также относится к клетке микроглии, полученной любым из способов согласно настоящему изобретению, где предпочтительно микроглия экспрессирует по меньшей мере один поверхностный белок микроглии, выбранный из группы, состоящей из ITGAM (Integrin alpha M, интегрин альфа-М) (CD11B) (SEQ ID NO: 45), ITGAX (Integrin alpha X, интегрин альфа-Х) (CD11C) (SEQ ID NO: 46), CD14 (SEQ ID NO: 47), CD16 (SEQ ID NO: 48), ENTPD1 (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1, эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза 1) (CD39) (SEQ ID NO: 49), PTPRC (protein tyrosine phosphatase receptor type c, протеинтирозинфосфатаза С рецепторного типа) (CD45) (SEQ ID NO: 50), CD68 (SEQ ID NO: 51), CSF1R (colony stimulating factor 1 receptor, рецептор колониестимулирующего фактора 1) (CD115) (SEQ ID NO: 52), CD163 (SEQ ID NO: 53), CX3CR1 (CX3C chemokine receptor 1, рецептор 1 хемокина CX3C) (SEQ ID NO: 54), TREM2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2, триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках 2) (SEQ ID NO: 55), P2RY12 (purinergic receptor P2RY12, пуринергический рецептор P2Y12) (SEQ ID NO: 56), TMEM119 (transmembrane

protein 119, трансмембранный белок 11) (SEQ ID NO: 57) и HLA-DR (human leukocyte antigen, человеческий лейкоцитарный антиген) (SEQ ID NO: 58).

[0027] Согласно другому варианту реализации способа согласно настоящему изобретению клетка микроглии предназначена для применения в терапии.

[0028] Кроме того, настоящее изобретение направлено на применение такой клетки микроглии согласно настоящему изобретению для диагностики заболевания *in vitro*. Предпочтительно заболевание выбрано из группы, состоящей из заболеваний центральной нервной системы, предпочтительно нейродегенеративных заболеваний; более предпочтительно болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, лобно-височной деменции или бокового амиотрофического склероза; нейровоспалительных или аутоиммунных заболеваний, предпочтительно рассеянного склероза, опосредованного аутоантителами энцефалита или инфекционных заболеваний, невровакулярных заболеваний; предпочтительно инсульта, васкулита; черепно-мозговой травмы и рака.

[0029] Кроме того, настоящее изобретение направлено на применение такой клетки микроглии согласно настоящему изобретению для культивирования *in vitro* с органоидами мозга.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0030] На **фигуре 1** показана схема основных путей производства клеток, которые представляют собой перепрограммирование соматических клеток (фибробластов) в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) с использованием четырех определенных факторов транскрипции Klf4 (kruppel-like factor 4, kruppel-подобный фактор 4), Oct4 (octamer-4, октамер 4), c-Myc и Sox2 (SRY-box transcription factor 2, фактор транскрипции SRY-box 2), прямое репрограммирование как прямое преобразование соматических клеток в необходимый тип клетки-мишени с использованием определенных факторов транскрипции, классические подходы к дифференцировке, представляющие собой поэтапное преобразование плюрипотентной стволовой клетки в необходимую клетку-мишень, и прямое программирование как прямое преобразование чПСК в тип клетки-мишени. (Аббревиатуры: TF = фактор транскрипции, ЭСК = эмбриональные стволовые клетки, иПСК = индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ЭСК и иПСК вместе называются плюрипотентными стволовыми клетками (ПСК)).

[0031] На **фигуре 2** показана стратегия нацеливания, используемая в настоящем изобретении. Дох-индуцируемая (индуцируемая доксициклином) система Tet-ON была

нацелена на человеческий локус ROSA26 (CAG-rtTA) и сайт AAVS1 (TRE-EGFP) чПСК. (Аббревиатуры: HAR = плечо гомологии, Neo = ген устойчивости к неомицину, CAG = конститутивный промотор CAG, rtTA = обратный контролируемый тетрациклином трансактиватор, Puго = ген устойчивости к пурамицину, TRE = индуцибельный Tet-чувствительный элемент, EGFP = усиленный зеленый флуоресцентный белок, SA = акцептор сплайсинга, T2A = сайт расщепления T2A, pA = сайт полиаденилирования).

[0032] На **фигуре 3** показана таблица ключевых факторов транскрипции линии микроглии, выбранных в качестве потенциальных факторов репрограммирования, длина их кодирующей последовательности и их источник.

[0033] На **фигуре 4** показаны донорские плазмиды, которые генерировали путем молекулярного клонирования и использовали для генетической модификации либо ROSA26 GSH, либо AAVS1 GSH. (Аббревиатуры: HAR = плечо гомологии, Neo = ген устойчивости к неомицину, CAG = конститутивный промотор CAG, rtTA = обратный контролируемый тетрациклином трансактиватор, Puго = ген устойчивости к пурамицину, TRE = индуцибельный Tet-чувствительный элемент, EGFP = усиленный зеленый флуоресцентный белок, SA = акцептор сплайсинга, T2A = сайт расщепления T2A, pA = сайт полиаденилирования).

[0034] На **фигуре 5** показана схема протокола прямого программирования микроглии (см. фигуру 5A). Временная динамика маркеров клеточной поверхности, экспрессируемых на примитивных макрофагах и микроглии, оцененная путем проточной цитометрии (n = 2 биологических повторов) (см. фигуру 5B и фигуру 5C). Монокультура микроглии на 20 день: полученное методом фазово-контрастной микроскопии изображение живой микроглиеподобной клетки и ИЦХ (immunocytochemistry, ИСС, иммуноцитохимия) для трансмембранного белка сигнатуры микроглии TMEM119, для которого отсутствуют меченые антитела, предназначенные для проточной цитометрии (см. фигуру 5D). Сокультура микроглия/нейрон на 20 день: ИЦХ для внутриклеточного кальций-связывающего белка IBA1 (также известного как AIF1) и нейронального маркера β III-тубулина (TUBB3) (см. фигуру 5E). кПЦР (SYBR зеленый) чПСК и микроглия в монокультуре (20 день). Все значения являются относительными к гену домашнего хозяйства GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа) и нормализуются к чПСК. Для транскриптов SPI1 (Spi-1 proto-oncogene, протоонкоген Spi-1) и СЕВРВ использовали две разные пары праймеров (см. SEQ ID NO: 80-87; SEQ ID NO: 80: общий прямой праймер SPI1; SEQ ID NO: 81: общий обратный праймер SPI1; SEQ ID NO: 82: внутренний прямой праймер SPI1; SEQ ID NO: 83: внутренний обратный праймер SPI1; SEQ ID NO: 84: общий прямой праймер СЕВРВ; SEQ

ID NO: 85: общий обратный праймер СЕВРВ; SEQ ID NO: 86: внутренний прямой праймер СЕВРВ; SEQ ID NO: 87: внутренний обратный праймер СЕВРВ), обнаруживая либо все транскрипты (общие), либо только транскрипты из соответствующих локусов эндогенного гена, но не трансгены, нацеленные на AAVS1 (внутренние). Как и ожидалось, разницы в относительных уровнях экспрессии не обнаружили, так как экспрессия трансгена была выключена (путем прекращения добавления дох (доксидоцилина) на 10 день протокола), тем самым подтверждая независимость клеточного фенотипа (F) от трансгена.

[0035] На **фигуре 6** показана иммуноцитохимия линии иПС клеток с двойной мишенью, индуцированной доксициклином в течение 24 часов. Клетки были положительными для PU.1 и СЕВРВ, но отрицательными для OCT4.

[0036] На **фигуре 7** показана карта донорской плазмиды pUC_AAVS1_p-Resp-(PU.1-СЕВРВ) (SEQ ID NO: 61) для генетической модификации локуса AAVS1, содержащей кодирующую последовательность факторов транскрипции PU.1 и СЕВРВ.

[0037] На **фигуре 8** показана карта донорской плазмиды pUC_AAVS1_p-Resp-(PU.1-IRF8) (SEQ ID NO: 62) для генетической модификации локуса AAVS1, содержащей кодирующую последовательность факторов транскрипции PU.1 и IRF8.

[0038] На **фигуре 9** показана карта донорской плазмиды pUC_AAVS1_p-Resp-(PU.1-RUNX1) (SEQ ID NO: 63) для генетической модификации локуса AAVS1, содержащей кодирующую последовательность факторов транскрипции PU.1 и RUNX1.

[0039] На **фигуре 10** показана карта донорской плазмиды pUC_AAVS1_p-Resp-(PU.1) (SEQ ID NO: 64) для генетической модификации локуса AAVS1, содержащей кодирующую последовательность фактора транскрипции PU.1.

[0040] На **фигуре 11** показана карта донорской плазмиды pUC_AAVS1_p-Resp-(PU.1-SALL1) (SEQ ID NO: 65) для генетической модификации локуса AAVS1, содержащей кодирующую последовательность факторов транскрипции PU.1 и SALL1.

[0041] На **фигуре 12** показана карта плазмиды ROSA-guideA_Cas9n (SEQ ID NO: 66), содержащей кодирующую последовательность фермента Cas и направляющей РНК А.

[0042] На **фигуре 13** показана карта плазмиды ROSA-guideB_Cas9n (SEQ ID NO: 67), содержащей кодирующую последовательность фермента Cas и направляющей РНК В.

[0043] На **фигуре 14** показана карта донорской плазмиды pUC_ROSA_n_CAG-rtTA (SEQ ID NO: 72), содержащей конститутивный промотор CAG и rtTA.

[0044] На **фигуре 15** показана карта плазмиды pZFN-AAVS1-L_ELD (SEQ ID NO: 68).

[0045] На **фигуре 16** показана карта плазмиды pZFN-AAVS1-R_KKR (SEQ ID NO: 69).

[0046] Используют следующие аббревиатуры: T2A: пептид T2A (сигнал пропуска рибосомы), ригоR: ген устойчивости к пурамицину, рА: сигнал полиаденилирования, CAG:

конститутивный промотор CAG, TRE3GV: Tet-чувствительный элемент, HA-R, HA-L: плечо гомологии (правое, левое), AmpR: ген устойчивости к ампициллину, ori: точка начала репликации, NeoR: ген устойчивости к неомицину, KanR: ген устойчивости к канамицину.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0047] Настоящее изобретение относится к способу получения микроглии из стволовых клеток, включающему стадии: а) направленной инсерции нуклеотидной последовательности, кодирующей белок-регулятор транскрипции, в первый сайт «безопасная гавань» генома; и б) направленной инсерции, кодирующей последовательности фактора транскрипции PU.1 (SEQ ID NO: 1), во второй сайт «безопасная гавань» генома, где ген функционально связан с индуцибельным промотором, который регулируется белком-регулятором транскрипции; экспрессии PU.1 (SEQ ID NO: 2); и в) культивирования стволовых клеток, полученных на этапах а) и б), с воздействием по меньшей мере одного фактора роста или малой молекулы, которая воспроизводит передачу сигналов во время по меньшей мере одной стадии эмбрионального развития микроглии или пролиферации, дифференцировки или поляризации взрослой микроглии.

[0048] В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к способу продуцирования микроглии из стволовых клеток, включающему стадии: а) направленной инсерции нуклеотидной последовательности, кодирующей белок-регулятор транскрипции, в первый сайт «безопасная гавань» генома; и б) направленной инсерции кодирующей последовательности фактора транскрипции PU.1 (SEQ ID NO: 1) во второй сайт «безопасная гавань» генома, где ген функционально связан с индуцибельным промотором, который регулируется белком-регулятором транскрипции; экспрессии PU.1 (SEQ ID NO: 2); и в) культивирования стволовых клеток, полученных на этапах а) и б), с воздействием по меньшей мере одного фактора роста или малой молекулы, которая воспроизводит передачу сигналов во время по меньшей мере одной стадии эмбрионального развития микроглии или пролиферации, дифференцировки или поляризации взрослой микроглии.

[0049] В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к способу продуцирования микроглии из стволовых клеток, включающему стадии: а) направленной инсерции нуклеотидной последовательности, кодирующей белок-регулятор транскрипции, в первый сайт «безопасная гавань» генома; и б) направленной инсерции кодирующей

последовательности фактора транскрипции PU.1 (SEQ ID NO: 1) во второй сайт «безопасная гавань» генома, где ген функционально связан с индуцибельным промотором, который регулируется белком-регулятором транскрипции; экспрессии PU.1 (SEQ ID NO: 2); и в) культивирования стволовых клеток, полученных на этапах а) и б), с воздействием по меньшей мере одного фактора роста или малой молекулы, которая воспроизводит передачу сигналов во время по меньшей мере одной стадии эмбрионального развития микроглии.

[0050] В одном варианте реализации настоящее изобретение относится к способу получения микроглии из стволовых клеток, включающему стадии: а) направленной инсерции нуклеотидной последовательности, кодирующей белок-регулятор транскрипции, в первый сайт «безопасная гавань» генома; и б) направленной инсерции кодирующей последовательности фактора транскрипции PU.1 (SEQ ID NO: 1) во второй сайт «безопасная гавань» генома, где ген функционально связан с индуцибельным промотором, который регулируется белком-регулятором транскрипции; экспрессии PU.1 (SEQ ID NO: 2); и в) культивирования стволовых клеток, полученных на этапах а) и б), с воздействием по меньшей мере одного фактора роста или малой молекулы, которая воспроизводит передачу сигналов во время по меньшей мере одной стадии эмбрионального развития микроглии.

[0051] В одном варианте реализации настоящее изобретение также относится к способу получения микроглии из стволовых клеток, включающему стадии: а) направленной инсерции нуклеотидной последовательности, кодирующей белок-регулятор транскрипции, в первый сайт «безопасная гавань» генома; и б) направленной инсерции кодирующей последовательности фактора транскрипции PU.1 (SEQ ID NO: 1) во второй сайт «безопасная гавань» генома, где ген функционально связан с индуцибельным промотором, который регулируется белком-регулятором транскрипции; экспрессии PU.1 (SEQ ID NO: 2); и в) культивирования стволовых клеток, полученных на этапах а) и б), с воздействием по меньшей мере одного фактора роста или малой молекулы, которая воспроизводит передачу сигналов во время по меньшей мере одной стадии дифференцировки взрослой микроглии.

[0052] В другом варианте реализации настоящее изобретение относится к способу получения микроглии из стволовых клеток, включающему стадии: а) направленной инсерции нуклеотидной последовательности, кодирующей белок-регулятор транскрипции,

в первый сайт «безопасная гавань» генома; и б) направленной инсерции кодирующей последовательности фактора транскрипции PU.1 (SEQ ID NO: 1) во второй сайт «безопасная гавань» генома, где ген функционально связан с индуцибельным промотором, который регулируется белком-регулятором транскрипции; экспрессии PU.1 (SEQ ID NO: 2); и в) культивирования стволовых клеток, полученных на этапах а) и б), с воздействием по меньшей мере одного фактора роста или малой молекулы, которая воспроизводит передачу сигналов во время по меньшей мере одной стадии поляризации взрослой микроглии.

[0053] В другом варианте реализации настоящее изобретение относится к способу получения микроглии из стволовых клеток, включающему стадии: а) направленной инсерции нуклеотидной последовательности, кодирующей белок-регулятор транскрипции, в первый сайт «безопасная гавань» генома; и б) направленной инсерции кодирующей последовательности фактора транскрипции PU.1 (SEQ ID NO: 1) во второй сайт «безопасная гавань» генома, где ген функционально связан с индуцибельным промотором, который регулируется белком-регулятором транскрипции; экспрессии PU.1 (SEQ ID NO: 2); и в) культивирования стволовых клеток, полученных на этапах а) и б), с воздействием по меньшей мере одного фактора роста или малой молекулы, которая воспроизводит эмбриональное развитие микроглии.

[0054] В другом варианте реализации настоящее изобретение относится к способу получения микроглии из стволовых клеток, включающему стадии: а) направленной инсерции нуклеотидной последовательности, кодирующей белок-регулятор транскрипции, в первый сайт «безопасная гавань» генома; и б) направленной инсерции кодирующей последовательности фактора транскрипции PU.1 (SEQ ID NO: 1) во второй сайт «безопасная гавань» генома, где ген функционально связан с индуцибельным промотором, который регулируется белком-регулятором транскрипции; экспрессии PU.1 (SEQ ID NO: 2); и в) культивирования стволовых клеток, полученных на этапах а) и б), с воздействием по меньшей мере одного фактора роста или малой молекулы, которая имитирует передачу сигнала во время по меньшей мере одной стадии эмбрионального развития микроглии или пролиферации, дифференцировки или поляризации взрослой микроглии.

[0055] В другом варианте реализации настоящее изобретение относится к способу получения микроглии из стволовых клеток, включающему стадии: а) направленной инсерции нуклеотидной последовательности, кодирующей белок-регулятор транскрипции,

в первый сайт «безопасная гавань» генома; и б) направленной инсерции кодирующей последовательности фактора транскрипции PU.1 (SEQ ID NO: 1) во второй сайт «безопасная гавань» генома, где ген функционально связан с индуцибельным промотором, который регулируется белком-регулятором транскрипции; экспрессии PU.1 (SEQ ID NO: 2); и в) культивирования стволовых клеток, полученных на этапах а) и б), с воздействием по меньшей мере одного фактора роста или малой молекулы, которая имитирует передачу сигнала во время по меньшей мере одной стадии эмбрионального развития микроглии.

[0056] В другом варианте реализации настоящее изобретение также относится к способу получения микроглии из стволовых клеток, включающему стадии: а) направленной инсерции нуклеотидной последовательности, кодирующей белок-регулятор транскрипции, в первый сайт «безопасная гавань» генома; и б) направленной инсерции кодирующей последовательности фактора транскрипции PU.1 (SEQ ID NO: 1) во второй сайт «безопасная гавань» генома, где ген функционально связан с индуцибельным промотором, который регулируется белком-регулятором транскрипции; экспрессии PU.1 (SEQ ID NO: 2); и в) культивирования стволовых клеток, полученных на этапах а) и б), с воздействием по меньшей мере одного фактора роста или малой молекулы, которая воспроизводит эмбриональное развитие микроглии *in vitro*.

[0057] В настоящем изобретении термин «микроглия» означает тип зрелой клетки, представляющий собой отдельную популяцию клетки центральной нервной системы. Как определено в *Сравнительная анатомия и гистология*, «Микроглия является резидентной клеткой гистиоцитарного типа и ключевым эффектором врожденного иммунитета ЦНС. Их часто описывают либо как покоящиеся (т.е. разветвленные), либо как активированные, но эти термины не могут передать динамическое ремоделирование их тонких процессов и конститутивную активность иммунологического надзора. (...) Данные свидетельствуют о том, что ранняя микроглия происходит от предшественников желточного мешка». (Nagan *et al.*, 2012). Это означает, что микроглия генерируется на ранних эмбриональных стадиях и находится в головном мозге на протяжении всей жизни взрослого человека.

[0058] Используемый в настоящем изобретении термин «получении микроглии» означает генерацию зрелой клетки (микроглии) из стволовой клетки, которую получают любым из способов согласно настоящему изобретению, как описано в данном документе.

[0059] Используемый в настоящем изобретении термин «стволовая клетка» означает тип клетки, которая способна делиться для продуцирования большего количества клеток или развиваться в клетку, имеющую конкретное назначение. В настоящем изобретении

используемая стволовая клетка может быть плюрипотентной стволовой клеткой. Плюрипотентные стволовые клетки обладают потенциалом дифференцироваться в практически в любую клетку организма. Существуют несколько источников плюрипотентных стволовых клеток. Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) являются плюрипотентными стволовыми клетками, полученными из внутренней клеточной массы бластоцисты, предимплантационного эмбриона на ранней стадии. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) являются взрослыми клетками, которые были генетически перепрограммированы до состояния, подобного эмбриональной стволовой клетки, путем принудительной экспрессии генов и факторов, важных для поддержания определяющих свойств эмбриональных стволовых клеток. В 2006 году было показано, что введение четырех специфических генов, кодирующих факторы транскрипции, может преобразовывать взрослые клетки в плюрипотентные стволовые клетки (Takahashi *et al.*, 2006), но в последующей работе уменьшили/изменили количество необходимых генов. Oct-3/4 (octamer binding transcription factor 3/4, связывающий октамер фактор транскрипции 3/4) и некоторые члены семейства генов Sox были идентифицированы как потенциально ключевые регуляторы транскрипции, участвующие в процессе индукции. Дополнительные гены, включая некоторые члены семейства Klf, семейства Myc, Nanog и LIN28, могут повышать эффективность индукции. Примеры генов, которые могут содержаться в факторах репрограммирования, включают в себя Oct3/4, Sox2, Sox1, Sox3, Sox15, Sox17, Klf4, Klf2, c-Myc, N-Myc, L-Myc, Nanog, Lin28, Fbx15 (F-box and leucine rich repeat protein 5, повторный белок 5 богатый лейцином и F-Box), ERas (embryonic stem cell-expressed RAS, экспрессируемый в ЭСК RAS), ECAT15-2 (embryonic stem cell (ESC)-associated transcript 15-2, транскрипт 15-2, ассоциированный с ЭСК), Tefl, бета-катенин, Lin28b (Lin-28 Homolog B, гомолог B Lin-28), Sall1, Sall4, Esrrb (estrogen related receptor beta, связанный с эстрогеном бета-рецептор), Nr5a2 (nuclear receptor subfamily 5 group A member 2, ядерный рецептор подсемейства 5 группы A, член 2), Tbx3 (t-box transcription factor 3, T-box транскрипционный фактор 2) и Glis1, и эти факторы репрограммирования можно использовать по отдельности или в комбинации двух или более их видов.

[0060] Если клетки, модифицированные путем инсерции индуцибельной кассеты, применяют у человека-пациента, может быть предпочтительным, чтобы клетка представляла собой иПСК, полученную от этого человека. Такое применение аутологических клеток устранило бы потребность в том, чтобы клетки подходили реципиенту. В качестве альтернативы, можно использовать коммерчески доступные иПСК, которые известны специалисту в данной области техники. В качестве альтернативы, клетки могут быть тканеспецифичными стволовыми клетками, которые также могут быть

аутологическими или донорскими. Подходящие клетки включают стволовые клетки эпибласта, индуцированные нейральные стволовые клетки и другие тканеспецифичные стволовые клетки.

[0061] В некоторых вариантах реализации способа согласно настоящему изобретению может быть предпочтительным, чтобы применяемая стволовая клетка представляла собой эмбриональную стволовую клетку или линию стволовой клетки. В настоящее время доступно большее количество линий эмбриональной стволовой клетки, например, WA01 (H1), WA09 (H9), KhES-1, KhES-2 и KhES-3. Доступны линии стволовых клеток, полученные без разрушения эмбриона. Настоящее изобретение не распространяется на какие-либо способы, которые включают уничтожение человеческих эмбрионов.

[0062] Используемый в настоящем изобретении термин «направленная инсерция» означает инсерцию в сайт «безопасная гавань» генома GSH (genomic safe harbour), который предпочтительно находится конкретно в последовательности GSH, как описано в другом месте данного документа. Может быть использован любой подходящий способ для инсерции полинуклеотида в конкретную последовательность, и некоторые из них описаны в данной области техники. Подходящие способы включают любой способ, известный специалисту в данной области техники, который предусматривает разрыв в необходимом месте и рекомбинацию вектора на месте разрыва. Таким образом, ключевым первым шагом для направленной сайт-специфической модификации генома является создание двухцепочечного разрыва ДНК ДЦР (double-strand DNA break, DSB) в геномном локусе, который должен быть модифицирован. Различные механизмы репарации клетки могут быть использованы для репарации ДЦР и введения необходимой последовательности, и этими способами являются и репарация путем негомологичного соединения концов НСК (non-homologous end joining, NHEJ), которая более подвержена ошибкам, и гомологичная рекомбинационная репарация HR (homologous recombination repair), опосредованная матрицей донорской ДНК, которую можно использовать для инсерции индуцибельных кассет.

[0063] Существует несколько способов, позволяющих индивидуально адаптировать сайт-специфичную генерацию ДЦР в геноме. Многие из них включают применение индивидуализированных эндонуклеаз, таких как нуклеазы цинкового пальца ZFNs (zinc finger nucleases), эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции TALENs (transcription activator-like effector nucleases) или кластерные короткие палиндромные повторы, разделённые регулярными промежутками/CRISPR-ассоциированный белок (CRISPR/Cas9) (Gaj *et al.*, 2013). Нуклеазы цинкового пальца представляют собой

искусственные ферменты, которые образуются путем слияния ДНК-связывающего домена «цинковый палец» с нуклеазным доменом рестрикционного фермента FokI. Последний имеет неспецифический домен расщепления, который должен димеризоваться, чтобы расщепить ДНК. Это означает, что требуются два мономера ZFN для димеризации доменов FokI и расщепления ДНК. ДНК-связывающий домен может быть сконструирован для нацеливания на любую интересующую геномную последовательность, может представлять собой тандемный повтор цинкового пальца Cys2His2, каждый из которых распознает три смежных нуклеотида в целевой последовательности. Два сайта связывания разделены 5-7 п.н., чтобы обеспечить оптимальную димеризацию доменов FokI. Таким образом, фермент способен расщеплять ДНК в конкретном сайте, а увеличение специфичности нацеливания обеспечивается за счет того, что для достижения двухцепочечного разрыва должны произойти два проксимальных события связывания ДНК. Эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции, или TALEN представляют собой димер фактора транскрипции/нуклеазы. Их получают путем слияния эффекторного ДНК-связывающего домена TAL с доменом расщепления ДНК (нуклеазы). Эффекторы, подобные активаторам транскрипции (TALEN) могут быть сконструированы так, чтобы связывать практически любую необходимую последовательность ДНК, поэтому в комбинации с нуклеазой ДНК можно разрезать в конкретных местах. Эффекторы TAL представляют собой белки, которые секретируются бактериями *Xanthomonas*, ДНК-связывающий домен которых содержит повторяющуюся высококонсервативную аминокислотную последовательность из 33-34 аминокислот, с расходящимися 12 и 13 аминокислотами. Эти два положения сильно варьируются и показывают сильную корреляцию со специфическим распознаванием нуклеотидов. Эта прямая взаимосвязь между аминокислотной последовательностью и распознаванием ДНК позволила сконструировать специфические ДНК-связывающие домены путем выбора комбинации повторяющихся сегментов, содержащих соответствующие остатки в двух переменных положениях. Таким образом, TALEN построены из повторов из аминокислотных модулей, состоящих из 33-35 аминокислот, каждый из которых нацелен на отдельный нуклеотид. Выбирая повтор модулей, можно нацелиться практически на любую последовательность. Используемая нуклеаза может представлять собой FokI или его производное.

[0064] Было идентифицировано три типа механизмов CRISPR, из которых тип II изучен лучше всего. В системе CRISPR/Cas9 (система типа II) используется нуклеаза Cas9 для создания двухцепочечного разрыва ДНК в сайте, определяемом короткой направляющей РНК. Система CRISPR/Cas представляет собой прокариотическую иммунную систему, которая придает устойчивость к чужеродным генетическим элементам. CRISPR

представляет собой сегменты прокариотической ДНК, содержащие короткие повторы последовательностей оснований. За каждым повторением следуют короткие сегменты «протоспейсерной ДНК» от предыдущих контактов с чужеродными генетическими элементами. Спейсеры CRISPR распознают и разрезают экзогенные генетические элементы с помощью РНК-интерференции. Иммунный ответ CRISPR происходит в два этапа: биогенез CRISPR-РНК (крРНК) и интерференция, управляемая крРНК. Молекулы крРНК состоят из вариабельной последовательности, транскрибируемой с ДНК протоспейсера, и повтора CRISPR. Каждая молекула крРНК затем гибридизуется со второй РНК, известной как транс-активирующая CRISPR РНК (tracrРНК), и вместе эти две молекулы в итоге образуют комплекс с нуклеазой Cas9. Протоспейсерная ДНК, кодируемая секцией крРНК, направляет Cas9 расщеплять комплементарные последовательности целевой ДНК, если они прилегают к коротким последовательностям, известным как мотивы, смежные с протоспейсером PAM (protospacer adjacent motif). Эта естественная система была разработана и использована для введения разрывов ДЦР в конкретных сайтах геномной ДНК, среди многих других вариантов применения. В частности, можно использовать систему CRISPR типа II из *Streptococcus pyogenes*. В простейшем случае система CRISPR/Cas9 содержит два компонента, которые доставляются в клетку для редактирования генома: сама нуклеаза Cas9 и малая направляющая РНК гРНК (guide RNA). гРНК представляет собой слияние индивидуализированной сайт-специфической крРНК (направленной на целевую последовательность) и стандартизированной tracrРНК.

[0065] После создания ДЦР поставляется матрица донора, гомологичная целевому локусу. ДЦР может быть восстановлен за счет пути гомологически направленной репарации HDR (homology directed repair), позволяющего производить точные инсерции. Производные от этой системы также возможны. Доступны мутантные формы Cas9, такие как Cas9D10A, только с никазной активностью. Это означает, что он расщепляет только одну цепь ДНК и не активирует НСК. Вместо этого, при наличии матрицы гомологичной репарации, репарации ДНК проводятся только через высокоточный путь HDR. Cas9D10A можно использовать в парных комплексах Cas9, предназначенных для создания смежных разрывов ДНК, вместе с двумя едиными направляющими РНК sgРНК (single guide RNA), комплементарными смежному участку на противоположных цепях сайта-мишени, что может быть особенно выгодным. Элементы для создания двухцепочечного разрыва ДНК могут быть введены в один или больше векторов, таких как плазмиды, для экспрессии в клетке. Таким образом, любой способ создания специфических, нацеленных двухцепочечных разрывов в геноме для того, чтобы ввести инсерцию нуклеотидной последовательности/гена/индуцибельной кассеты может быть использован в способе

согласно настоящему изобретению. Может быть предпочтительным, чтобы в способе согласно настоящему изобретению для инсерции гена/индуцибельной кассеты применяли любую одну или более систем ZFN, TALEN и/или CRISPR/Cas9 или любое их производное.

[0066] После того, как ДЦР был получен любыми подходящими способами, ген/индуцибельная кассета для инсерции могут быть предоставлены любым подходящим способом, как описано ниже. Ген/индуцибельная кассета и ассоциированный генетический материал образуют ДНК-донор для репарации ДНК в ДЦР и встраиваются с помощью стандартных механизмов/путей клеточной репарации. От того, как инициируется разрыв, будет зависеть какой путь используется для устранения повреждения, как отмечалось выше. Однако это является также известным специалисту в данной области техники.

[0067] Используемый в настоящем изобретении термин «ген» означает основную физическую единицу наследственности, линейную последовательность нуклеотидов вдоль сегмента ДНК, которая обеспечивает закодированные инструкции для синтеза РНК, которая при трансляции в белок приводит к экспрессии наследственного признака.

[0068] Используемый в настоящем изобретении термин «нуклеотидная последовательность» относится к последовательности оснований в сегменте ДНК, образующей ген, как определено выше.

[0069] Используемый в настоящем изобретении термин «белок-регулятор транскрипции» означает белок, который связывается с ДНК, предпочтительно специфично для последовательности с сайтом ДНК, расположенным в промоторе или рядом с ним, и либо способствует связыванию аппарата транскрипции с промотором, и, таким образом, транскрипции последовательности ДНК (активатор транскрипции), либо блокирует этот процесс (репрессор транскрипции). Такие объекты также известны как факторы транскрипции. Последовательность ДНК, с которой связывается белок-регулятор транскрипции, называется сайтом связывания фактора транскрипции или элементом ответа, и они находятся в промоторе регулируемой последовательности ДНК или рядом с ним. Элемент ответа является частью настоящего изобретения. Белки-активаторы транскрипции связываются с элементом ответа и способствуют экспрессии гена. Такие белки предпочтительны в способе согласно настоящему изобретению для контроля экспрессии индуцибельной кассеты. Белки-репрессоры транскрипции связываются с элементом ответа и препятствуют экспрессии гена. Белки-регуляторы транскрипции могут быть активированы или деактивированы с помощью ряда механизмов, включая связывание вещества, взаимодействие с другими факторами транскрипции (например, гомо- или

гетеродимеризацию) или корегулирующими белками, фосфорилирование и/или метилирование. Регулятор транскрипции можно контролировать путем активации или деактивации. Если белок-регулятор транскрипции представляет собой белок-активатор транскрипции, предпочтительно для белка-активатора транскрипции необходима активация. Эта активация может происходить с помощью любых подходящих способов, но предпочтительно, чтобы белок регулятора транскрипции активировался путем добавления экзогенного вещества к стволовой клетке. Подачу экзогенного вещества к стволовой клетке можно контролировать, и, таким образом, можно контролировать активацию белка-регулятора транскрипции. Такие белки-регуляторы транскрипции также называют индуцибельными белками-регуляторами транскрипции.

[0070] Используемый в настоящем изобретении термин «фактор транскрипции» означает белок, который связывается с ДНК, предпочтительно специфично для последовательности с сайтом ДНК, расположенным в промоторе или рядом с ним, и либо способствует связыванию аппарата транскрипции с промотором, и таким образом транскрипции последовательности ДНК (активатор транскрипции), либо блокирует этот процесс (репрессор транскрипции). В рамках настоящего изобретения фактор транскрипции представляет собой необходимую генетическую последовательность, предпочтительно последовательность ДНК, которая должна быть перенесена в клетку вместе с индуцибельной кассетой. Введение индуцибельной кассеты в геном может изменить фенотип этой клетки путем добавления генетической последовательности, которая обеспечивает экспрессию гена. Способ согласно настоящему изобретению обеспечивает контролируемую транскрипцию генетической последовательности(ей) набора факторов транскрипции в индуцибельной кассете в клетке.

[0071] Главные регуляторы могут представлять собой один или больше факторов транскрипции, регуляторов транскрипции, рецепторов цитокинов или сигнальных молекул и т.п. Главным регулятором является экспрессируемый ген, который влияет на линию экспрессирующей его клетки. Возможно, что для определения линии требуется сеть главных регуляторов. В контексте данного документа главный регуляторный ген, который экспрессируется в начале развития линии или типа клетки, участвует в спецификации этой линии, регулируя несколько нижестоящих генов либо напрямую, либо через каскад изменений экспрессии гена. Если главный регулятор экспрессируется, он имеет способность переопределить судьбу клеток, предназначенных для образования других линий. Факторы транскрипции, которые можно применять в способе согласно настоящему

изобретению, включают PU.1 (SEQ ID NO: 2) (ген SPI1, SEQ ID NO: 1), CEBPB (SEQ ID NO: 3), RUNX1 (SEQ ID NO: 4), IRF8 (SEQ ID NO: 5) и SALL1 (SEQ ID NO: 6).

[0072] Используемый в настоящем изобретении термин «PU.1» (SEQ ID NO: 2) означает фактор транскрипции, также известный как *гемопоэтический транскрипционный фактор PU.1*, протоонкоген Spi-1, 31 кДа трансформирующий белок, фактор транскрипции PU.1, онкоген провирусной интеграции вируса некроза селезенки SFFV (spleen focus forming virus) Spi 1, онкоген провирусной интеграции вируса некроза селезенки (SFFV), или 31 кДа-трансформирующий белок, SFPI1, SPI-1, SPI-A, PU.1 или OF, где «SPI1» относится к гену (SEQ ID NO: 1) (протоонкоген Spi-1), который кодирует фактор транскрипции ETS-домена, который активирует экспрессию гена во время развития миелоидной и В-лимфоидной клетки.

[0073] Используемый в настоящем изобретении термин «сайт «безопасная гавань» генома» означает генетический сайт, который позволяет встраивать генетический материал без пагубных воздействий для клетки и позволяет транскрибировать встроенный генетический материал. Специалисты в данной области техники могут использовать эти упрощенные критерии для определения подходящего GSH и/или более формальных критериев. Инсерции конкретно в сайты «безопасная гавань» генома (GSH) предпочтительнее случайной интеграции генома, поскольку ожидается, что это будет более безопасная модификация генома и с меньшей вероятностью приведет к нежелательным побочным эффектам, таким как подавление естественной экспрессии генов или возникновение мутаций, которые приводят к типам раковой клетки. Таким образом, сайт «безопасная гавань» генома представляет собой локус в геноме, в который может быть вставлен ген или другой генетический материал без каких-либо пагубных воздействий на клетку или вставленный генетический материал. Наиболее выгодным является сайт GSH, в котором экспрессия вставленной генной последовательности не нарушается какой-либо экспрессией сквозного прочитывания от соседних генов, и экспрессия индуцибельной кассеты сводит к минимуму вмешательство в программу эндогенной транскрипции. Были предложены более формальные критерии, которые помогают определить, является ли конкретный локус сайтом GSH (Pellenz *et al.*, 2019). Эти критерии включают в себя сайт, который (i)> 300 т.п.н. от любого гена, связанного с раком, во всем списке онкогенов, (ii)> 300 т.п.н. от любой микроРНК/других функциональных малых РНК, (iii)> 50 т.п.н. от любого 5'-конца гена, (iv)>50 т.п.н. от любой точки начала репликации, (v)>50 т.п.н. от любого ультраконсервативного элемента, (vi) низкая транскрипционная активность (отсутствует

мРНК ± 25 т.п.н.), (vii) отсутствует в области вариаций числа копий (viii) в открытом хроматине (сигнал DHS (DNase I hypersensitive sites, сайты гиперчувствительности к ДНКазе I) ± 1 т.п.н.) и (ix) уникальный (1 копия в геноме человека). Возможно нет необходимости удовлетворять всем этим предложенным критериям, поскольку уже идентифицированные GSH не удовлетворяют всем этим критериям. Предпочтительно, чтобы подходящий GSH мог удовлетворять по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7 или 8 и наиболее предпочтительно всем девяти из этих критериев.

[0074] В способах согласно настоящему изобретению инсерции происходят в разных GSH. По меньшей мере необходимы два GSH. Первый GSH модифицируется путем инсерции белка-регулятора транскрипции. Второй GSH модифицируется путем инсерции индуцибельной кассеты, которая содержит кодирующую последовательность, функционально связанную с индуцибельным промотором. Другой генетический материал также может быть вставлен с одним или обоими этими элементами. Генетическая последовательность, функционально связанная с индуцибельным промотором в индуцибельной кассете, предпочтительно представляет собой последовательность ДНК. Генетическая(ие) последовательность(и) индуцибельной кассеты предпочтительно кодирует(ют) молекулу РНК и, таким образом, могут быть транскрибированы. Транскрипция контролируется с помощью индуцибельного промотора. Молекула РНК может быть любой последовательности, но предпочтительно представляет собой мРНК, кодирующую белок, кшРНК (короткая шпилечная РНК, small hairpin RNA, shRNA) или гРНК.

[0075] Первым GSH может быть любой подходящий сайт GSH. При необходимости этим GSH является GSH с эндогенным промотором, который конститутивно экспрессируется, что приведет к конститутивной экспрессии вставленного белка-регулятора транскрипции. Подходящим GSH является сайт hROSA26 для клеток человека. В другом варианте реализации настоящего изобретения вставленный белок-регулятор транскрипции, функционально связанный с промотором, является конститутивным промотором. Например, конститутивный промотор можно использовать вместе с инсерцией в сайт hROSA26.

[0076] Используемый в настоящем изобретении термин «индуцибельный промотор» означает нуклеотидную последовательность, которая инициирует и регулирует транскрипцию полинуклеотида. «Индукцибельный промотор» представляет собой нуклеотидную последовательность, где экспрессия генетической последовательности, функционально связанной с промотором, контролируется анализируемым веществом,

кофактором, регуляторным белком и т.д. В одном варианте реализации способа согласно настоящему изобретению на контроль влияет белок-регулятор транскрипции. Предполагается, что термин «промотор» или «контрольный элемент» включает в себя полноразмерные области промоторов и функциональные (например, контролируют транскрипцию или трансляцию) сегменты этих областей. Предпочтительно, чтобы ген, кодирующий белок-регулятор транскрипции, был функционально связан с конститутивным промотором. В качестве альтернативы, первый GSH может быть выбран так, чтобы он уже имел конститутивный промотор, который может также управлять экспрессией гена белка-регулятора транскрипции и любого связанного с ним генетического материала. Конститутивные промоторы обеспечивают устойчивую и высокоуровневую экспрессию генов. Обычно используемые конститутивные промоторы включают промотор человеческого β -актина (β -actin, ACTB), цитомегаловирус ЦМВ (cytomegalovirus, CMV), фактор элонгации-1 α (EFla), фосфоглицераткиназу ФГК (phosphoglycerate kinase, PGK) и убиквитин С (UbC). Промотор CAG является сильным синтетическим промотором, часто используемый для управления высокими уровнями экспрессии генов.

[0077] Используемый в настоящем изобретении термин «культивирование» означает рост микроорганизмов, таких как бактерии и дрожжи, или клетки человека, растений или животных в подходящих условиях, обеспечивающих рост, которые известны специалисту в данной области техники.

[0078] Используемый в настоящем изобретении термин «фактор роста» означает сигнальную молекулу, которая контролирует активность клетки аутокринным, паракринным или эндокринным способами. Используемый здесь в контексте настоящего изобретения термин «фактор роста» может использоваться взаимозаменяемо с «цитокин». Факторы роста или цитокины продуцируются различными типами клетки организма и осуществляют свои биологические функции путем связывания со специфическими рецепторами и активации связанных нижестоящих сигнальных путей, которые, в свою очередь, регулируют транскрипцию гена в ядре и в конечном итоге стимулируют биологический ответ, включая регуляторные клеточные процессы, такие как деление клетки, выживание клетки, дифференцировка клетки, адгезия и миграция.

[0079] Используемый в настоящем изобретении термин «малая молекула» означает биоактивную молекулу, которая продуцируется естественным или искусственным путем, способна диффундировать через клеточную мембрану и способна регулировать сигнальные пути. Малые молекулы, которые предпочтительно используются в рамках настоящего

изобретения, могут ингибировать фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K) и киназу гликогенсинтазы 3, соответственно, как LY294002 и SHIR99021.

[0080] Используемый в настоящем изобретении термин «воспроизводит передачу сигналов» означает симулировать, имитировать или напоминать функции секретируемых молекул, таких как факторы роста и/или хемокины, влияющих на клетку в естественной среде и, таким образом, способных продуцировать микроглию этими действиями.

[0081] Используемый в настоящем изобретении термин «имитирует передачу сигналов» означает симулировать, имитировать, напоминать или воспроизводить функции секретируемых молекул, таких как факторы роста и/или хемокины, влияющих на клетку в естественной среде и, таким образом, способных продуцировать микроглию этими действиями.

[0082] Используемый в настоящем изобретении термин «эмбриональное развитие микроглии» означает поэтапный переход плюрипотентной стволовой клетки в зрелую клетку микроглии в соответствии с результатом дифференцировки развивающейся микроглии во время эмбрионального, фетального и постнатального развития человека, начиная с предимплантационного эмбриона на стадии бластоцисты до полностью сформировавшейся и самоподдерживающейся популяции микроглии.

[0083] Используемый в настоящем изобретении термин «пролиферация взрослой микроглии» означает любой процесс деления клетки, который приводит к образованию зрелой клетки микроглии.

[0084] Используемый в настоящем изобретении термин «дифференцировка взрослой микроглии» означает дифференцировку клетки, находящейся в состоянии предшественника микроглии, во взрослый тип клетки микроглии, который включает в себя типичные характеристики клетки микроглии в гомеостатическом/состоянии покоя.

[0085] Используемый в настоящем изобретении термин «поляризация взрослой микроглии» означает реакцию зрелой клетки микроглии на внеклеточные стимулы, обеспечиваемые внеклеточной средой, соответствующие сигналы от поврежденных нейронов, клеток глии или воздействие белков плазмы крови, вследствие дисфункции гематоэнцефалического барьера. Эта реакция микроглии включает в себя движение клетки микроглии к месту повреждения и может иметь нейропротекторный или нейротоксический эффект.

[0086] Кроме того, в одном варианте реализации способа согласно настоящему изобретению по меньшей мере один фактор роста или малая молекула выбраны из группы, состоящей из активина А (SEQ ID NO: 7), BMP4 (SEQ ID NO: 8), FGF (SEQ ID NO: 9),

VEGF-A (SEQ ID NO: 10), LY294002, CHIR99021, ФСК (SEQ ID NO: 11), ИЛ-3 (SEQ ID NO: 12), ИЛ-6 (SEQ ID NO: 13), ФСК1 (SEQ ID NO: 14), ИЛ-34 (SEQ ID NO: 15), ФСК2 (SEQ ID NO: 16), CD200 (SEQ ID NO: 17), CX3CL1 (SEQ ID NO: 18), TGF β 1 (SEQ ID NO: 19) и IDE1.

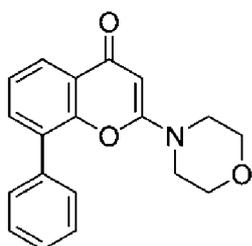
[0087] Активин А (SEQ ID NO: 7), используемый в настоящем изобретении, означает цепь активина бета-А, EDF (erythroid differentiation factor, фактор эритроидной дифференцировки), белок эритроидной дифференцировки, белок высвобождающий ФСГ (follicle stimulating hormone, фолликулостимулирующий гормон FSH) FRP (FSH-releasing protein), INHBA (Inhibin beta A, ингибин бета-А), цепь ингибина бета-А, ингибин бета-1. Белок, кодируемый этим геном, является членом семейства белков, трансформирующего фактора роста бета (TGF- β), продуцируемых плюрипотентными стволовыми клетками, энтодермой и мезодермой.

[0088] BMP4 (SEQ ID NO: 8), используемый в настоящем изобретении, означает *костный морфогенетический белок 4*, также известный как ZYME, BMP2B или BMP2B1. Белок, кодируемый этим геном, является членом семейства костных морфогенетических белков, которое является частью суперсемейства трансформирующего фактора роста бета.

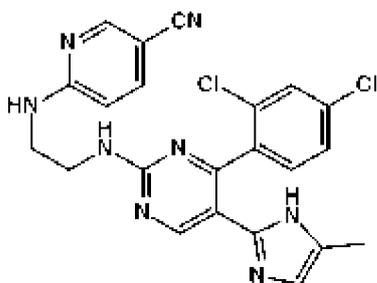
[0089] FGF (SEQ ID NO: 9), используемый в настоящем изобретении, означает *фактор роста фибробластов*. Белок, кодируемый этим геном, является членом семейства белков сигнализации клетки, как описано, например, в Hui *et al.*, 2018.

[0090] VEGF-A (SEQ ID NO: 10), используемый в настоящем изобретении, означает *фактор роста эндотелия сосудов А*, также известный как VPF (vascular permeability factor, фактор проницаемости сосудов), VEGF или MVCD1 (microvascular complications of diabetes type 1, микрососудистое осложнение сахарного диабета 1 типа). Белок, кодируемый этим геном, является членом семейства факторов роста PDGF/VEGF и гепарин-связывающим белком. Этот фактор роста индуцирует пролиферацию и миграцию эндотелиоцитов сосудистой стенки и является важным как для физиологического, так и для патологического ангиогенеза.

[0091] LY294002, используемый в настоящем изобретении, означает мощный, проницаемый для клеток ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), который действует на сайт связывания АТФ фермента (Vlahos *et al.*, 1994). Его химическая структура приведена ниже:



[0092] CHIR99021, используемый в настоящем изобретении, означает производное аминопиримидина, которое является чрезвычайно мощным ингибитором киназы гликогенсинтазы 3, ингибирующим GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 beta, киназа гликогенсинтазы 3 бета) (IC₅₀ = 6,7 нМ) и GSK3 α (IC₅₀ = 10 нМ), и функционирует в качестве активатора WNT. Его химическая структура приведена ниже:



[0093] SCF (SEQ ID NO: 11), используемый в настоящем изобретении, означает *фактор стволовых клеток*, также известный как Kit лиганд, фактор роста тучных клеток или стальной фактор. Белок, кодируемый этим геном, является цитокином раннего действия, который играет ключевую роль в регуляции гемопоэза эмбриона и взрослого человека.

[0094] ИЛ-3 (SEQ ID NO: 12), используемый в настоящем изобретении, означает *интерлейкин 3*, MCGF (mast cell growth factor, фактор роста тучных клеток), мульти-КСФ, HCGF (hodgkins cell growth factor, фактор роста клеток Ходжкина), фактор стимуляции Р-клеток, MGC79398 или MGC79399. Белок, кодируемый этим геном, является цитокином, способствующим росту.

[0095] ИЛ-6 (SEQ ID NO: 13), используемый в настоящем изобретении, означает *интерлейкин 6*, также известный как фактор стимуляции В-клеток 2, фактор дифференцировки CTL (cytotoxic T lymphocyte, цитотоксический Т-лимфоцит), фактор роста гибридомы, интерферон бета-2, интерлейкин-6, IFN-бета-2, IFNB2 (интерферон бета 2), BSF-2 (B cell stimulatory factor 2), CDF (complement factor D, фактор компонента D) интерферон, бета 2, фактор дифференцировки В-клеток, интерферон, бета 2, интерлейкин BSF-2, BSF2, HGF (hepatocyte growth factor, фактор роста гепатоцитов) или HSF (heat shock factor, фактор теплового шока). Белок, кодируемый этим геном, представляет собой цитокин, который участвует в воспалении и созревании В-клеток.

[0096] КСФ1 (SEQ ID NO: 14), используемый в настоящем изобретении, означает *стимулирующий колонии фактор 1*, также известный как стимулирующий колонии фактор 1 (макрофаг), макрофагальный колониестимулирующий фактор 1, стимулирующий колонии макрофагов фактор 1, ланимостим, КСФ-1, MCSF, M-CSF и белок, кодируемый этим геном, представляет собой цитокин, который контролирует продуцирование, дифференцировку и функционирование макрофагов.

[0097] ИЛ-34 (SEQ ID NO: 15), используемый в настоящем изобретении, означает *интерлейкин 34*, также известный как С16 или f77. Белок, кодируемый этим геном, представляет собой цитокин, который способствует дифференцировке и жизнеспособности моноцитов и макрофагов через рецептор колониестимулирующего фактора-1.

[0098] КСФ2 (SEQ ID NO: 16), используемый в настоящем изобретении, означает *стимулирующий колонии фактор 2*, также известный как сарграмостим, стимулирующий колонии фактор 2 (гранулоцит-макрофаг), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, молграмостин, молграмостим, GMCSF, КСФ, гранулоцитарный макрофаг-колониестимулирующий фактор, гранулоцитарно-макрофагальный стимулирующий колонии фактор, колониестимулирующий фактор, GM-CSF. Белок, кодируемый этим геном, представляет собой цитокин, который контролирует продуцирование, дифференцировку и функционирование гранулоцитов и макрофагов.

[0099] CD200 (SEQ ID NO: 17), используемый в настоящем изобретении, означает *ген CD200*, также известный как молекула CD200, антиген CD200, антиген, идентифицированный моноклональным антителом MRC OX-2, мембранный гликопротеин OX-2, MOX1, MOX2, OX -2 или MRC (mannose receptor C, рецептор маннозы C). Белок, кодируемый этим геном, представляет собой мембранный гликопротеин I типа, содержащий два внеклеточных домена иммуноглобулина, трансмембранный и цитоплазматический домены.

[00100] CX3CL1 (SEQ ID NO: 18), используемый в настоящем изобретении, означает *ген CX3CL1*, также известный как хемокиновый лиганд 1 с мотивом C-X3-C, подсемейство малых индуцибельных цитокинов D (Cys-X3-Cys), член 1 (фракталкин, нейротактин), хемокин (мотив C-X3-C) лиганд 1, хемокин, заякоренный на мембране CX3C, малый индуцибельный цитокин D1, хемокин 1 с мотивом C-X3-C, нейротактин, фракталкин или SCYD1, NTT, член-1, C3Xkine, ABCD-3, CX3C, CX3, NTN или FKN. Белок, кодируемый этим геном, принадлежит к подгруппе хемокинов CX3C, характеризующейся количеством аминокислот, расположенных между консервативными остатками цистеина.

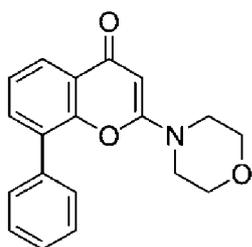
[00101] TGFβ1 (SEQ ID NO: 19), используемый в настоящем изобретении, означает *трансформирующий фактор роста бета 1*, также известный как трансформирующий фактора роста бета-1 пробелок, препро-трансформирующий фактор роста бета-1, TGFB, трансформирующий фактор роста, бета 1, трансформирующий фактор роста бета-1, ассоциированный с латентностью пептид, болезнь Камурати-Энгельманна, TGF-бета-1, IBDIMDE (inflammatory bowel disease, immunodeficiency, and encephalopathy, воспалительное заболевание кишечника, иммунодефицит и энцефалопатия), TGFбета,

DPD1, CED или LAP. Белок, кодируемый этим геном, является секретлируемым лигандом суперсемейства белков TGF-бета (трансформирующий фактор роста бета).

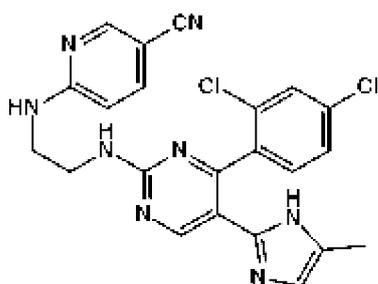
[00102] В другом варианте реализации способа согласно настоящему изобретению по меньшей мере один фактор роста представляет собой КСФ1 (SEQ ID NO: 14) или ИЛ-34 (SEQ ID NO: 15). В другом варианте реализации способа согласно настоящему изобретению по меньшей мере один фактор роста представляет собой КСФ1 (SEQ ID NO: 14). В другом варианте реализации способа согласно настоящему изобретению по меньшей мере один фактор роста представляет собой ИЛ-34 (SEQ ID NO: 15).

[00103] В дополнительном варианте реализации способа согласно настоящему изобретению по меньшей мере одна малая молекула представляет собой CHIR99021, LY294002 или IDE1.

[00104] LY294002, используемый в настоящем изобретении, означает мощный, проникаемый для клеток ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), который действует на сайт связывания АТФ фермента (Vlahos *et al.*, 1994). Его химическая структура приведена ниже:

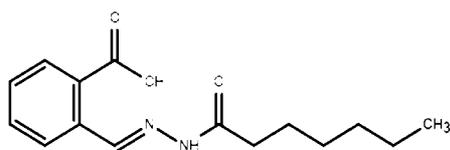


[00105] CHIR99021, используемый в настоящем изобретении, означает производное аминопиримидина, которое является мощным ингибитором киназы гликогенсинтазы 3, ингибирует GSK3 β (IC₅₀ = 6,7 нМ) и GSK3 α (IC₅₀ = 10 нМ) и функционирует в качестве активатора WNT. Его химическая структура приведена ниже:



[00106] IDE1, используемый в настоящем изобретении, означает *индуктор дефинитивной энтодермы*; малая молекула, которая активирует путь TGF-бета и могла бы

использоваться в качестве замены фактора роста TGF-бета. Его химическая структура приведена ниже:



[00107] В другом варианте реализации способа согласно настоящему изобретению первый и второй сайты «безопасная гавань» генома различаются.

[00108] В другом варианте реализации способа согласно настоящему изобретению способ дополнительно включает инсерцию кодирующей последовательности гена фактора транскрипции СЕВРВ (SEQ ID NO: 3) и его экспрессию.

[00109] СЕВРВ (SEQ ID NO: 3), используемый в настоящем изобретении, означает *ССААТ энхансер связывающий белок бета*, также известный как *ССААТ/энхансер связывающий белок (С/ЕВР), бета, интерлейкин 6-зависимый ДНК-связывающий белок, ССААТ/энхансер-связывающий белок бета, ядерный фактор интерлейкина 6, фактор транскрипции 5, ядерный фактор NF-IL6, TCF5, обогащенный печенью белок-активатор транскрипции, ССААТ/энхансер связывающий белок бета, обогащенный печенью белок-ингибитор, фактор транскрипции С/ЕВР бета, печеночный белок-активатор, С/ЕВР-бета, С/ЕВР бета, IL6DBP, NF-IL6, TCF-5, LAP или LIP*. Этот лишенный интронов ген кодирует фактор транскрипции, который содержит основной домен «лейциновая молния» bZIP (basic leucine zipper).

[00110] В другом варианте реализации способа согласно настоящему изобретению способ дополнительно включает инсерцию кодирующей последовательности гена фактора транскрипции RUNX1 (SEQ ID NO: 4) и его экспрессию.

[00111] RUNX1 (SEQ ID NO: 4), используемый в настоящем изобретении, означает *фактор транскрипции 1, связанный с Runt, Runt-связанный фактор транскрипции 1, альфа-В субъединица белка связывающего энхансер полиомавируса 2, альфа-В субъединица ядро-связывающего фактора SL3/AKV, субъединица альфа-В фактора 1 энхансера SL3-3, белок острого миелоидного лейкоза 1, онкоген AML-1, РЕВР2-альфа-В, РЕА2-альфа-В, СВФА2, AML1, альфа субъединица 2 Runt домена ядро-связывающего фактора, альфа-2 субъединица ядро-связывающего фактора, белок слияния AML1-EVI-1, острый миелоидный лейкоз, онкоген Aml1, СВФ-альфа-2, AML1-EVI-1, РЕВР2альфа, СВФ2альфа,*

PEBP2aB, AMLCR1 или EVI-1. Белок, кодируемый этим геном, является альфа субъединицей CBF и, как полагают, участвует в развитии нормального гомопоэза.

[00112] В другом варианте реализации способа согласно настоящему изобретению способ дополнительно включает инсерцию кодирующей последовательности гена фактора транскрипции IRF8 (SEQ ID NO: 5) и его экспрессию.

[00113] IRF8 (SEQ ID NO: 5), используемый в настоящем изобретении, означает *регуляторный фактор интерферона 8*, также известный как белок, связывающий консенсусную последовательность интерферона 1, H-ICSBP, ICSBP1, ICSBP, IRF-8, последовательно-связывающий белок консенсуса интерферона, IMD32A, IMD32B. Он является фактором транскрипции из семейства регуляторных факторов интерферона IFN (Interferon regulatory factor, IRF).

[00114] В другом варианте реализации способа согласно настоящему изобретению способ дополнительно включает инсерцию кодирующей последовательности гена фактора транскрипции SALL1 (SEQ ID NO: 6) и его экспрессию.

[00115] SALL1 (SEQ ID NO: 6), используемый в настоящем изобретении, означает *Spalt-подобный фактор транскрипции 1*, также известный как белок цинкового пальца Spalt-1, белок цинкового пальца SALL1, белок цинкового пальца 794, Sal-подобный белок 1, ZNF794, Sal-1, эпидидимальный секреторный белок Li 89, Spalt-подобный фактор транскрипции 1, Sal (дрозофила)-подобный 1, Sal-подобный 1 (дрозофила), HEL-S-89, HSAL1, HSal1, SAL1 или TBS (Townes-Brocks syndrome, синдром Таунса-Брокса). Белок, кодируемый этим геном, является репрессором транскрипции цинкового пальца и может быть частью гистондеацетилазного комплекса NuRD (histone deacetylase, HDAC).

[00116] В дополнительном варианте реализации способа настоящего изобретения белок-регулятор транскрипции представляет собой обратный трансактиватор тетрациклина (rtTA) (SEQ ID NO: 20), и его активность регулируется доксициклином или тетрациклином.

[00117] Используемый в настоящем изобретении термин «обратный трансактиватор тетрациклина (rtTA)» означает белок-активатор транскрипции, индуцированный тетрациклином или его производным. Контролируемая тетрациклином активация транскрипции представляет собой способ экспрессии индуцибельного гена, где транскрипция обратимо включается или выключается в присутствии антибиотика тетрациклина или одного из его производных (например, доксициклина, который является более стабильным). В этой системе белок-активатор транскрипции может быть *тетрациклин-чувствительным белком-активатором транскрипции (rtTA)* или его

производным. Белком-регулятором транскрипции настоящего изобретения может быть rtTA. Белок rtTA способен связываться с ДНК в конкретных последовательностях оператора TetO. Несколько повторов таких последовательностей TetO расположены выше минимального промотора (такого как промотор CMV), которые вместе образуют тетрациклин-чувствительный элемент TRE (SEQ ID NO: 21). Существует две формы этой системы, в зависимости от того, активирует ли добавление тетрациклина или его производного (Tet-On) или деактивирует (Tet-Off) белок rtTA. Систему Tet-ON, в которой доксициклин активирует белок rtTA, также можно применять в одном варианте реализации способа согласно настоящему изобретению.

[00118] Система Tet-On состоит из двух компонентов: (1) конститутивно экспрессируемый тетрациклин-чувствительный белок-активатор транскрипции (rtTA) и чувствительный к rtTA индуцибельный промотор (Tet-чувствительный элемент, TRE). Он может быть связан с тетрациклином или его более стабильными производными, включая доксициклин (dox), что приводит к активации rtTA, позволяет ему связываться с последовательностями TRE и индуцирует экспрессию TRE-контролируемых генов. Применение указанного может быть предпочтительным в способе согласно настоящему изобретению. Таким образом, белок-регулятор транскрипции способа согласно настоящему изобретению может быть тетрациклин-чувствительным белком-активатором транскрипции (rtTA), который может быть активирован или деактивирован антибиотиком тетрациклином или одним из его производных, которые поставляются извне. Если белок-регулятор транскрипции представляет собой rtTA, то индуцибельный промотор, вставленный во второй сайт GSH, включает в себя тетрациклин-чувствительный элемент (TRE). Извне поставляемое вещество может представлять собой антибиотик тетрациклин или одно из его производных, например, доксициклин, предпочтительно тетрациклин или доксициклин.

[00119] Разновидности и модифицированные белки rtTA могут использоваться в способе согласно настоящему изобретению. К ним могут относиться трансактиватор Tet-On Advanced (также известный как rtTA2S-M2) и Tet-On 3G (также известный как rtTA-V16, полученный из rtTA2S-S2).

[00120] В другом варианте реализации способа согласно настоящему изобретению индуцибельный промотор включает в себя тетрациклин-чувствительный элемент (TRE) (SEQ ID NO: 21).

[00121] Используемый в настоящем изобретении термин «тетрациклин-чувствительный элемент (TRE)» означает 7 повторов бактериальной последовательности TetO длиной 19 п.о., разделенных спейсерными последовательностями, вместе с

минимальным промотором. Возможны разновидности и модификации последовательности TRE, поскольку минимальным промотором может быть любой подходящий промотор. Предпочтительно минимальный промотор не показывал или показывал минимальные уровни экспрессии в отсутствие связывания rtTA. Таким образом, индуцибельный промотор, вставленный во второй GSH, может содержать TRE. Основной генетический принцип, лежащий в основе настоящего изобретения, также изображен на фигуре 2, где показаны различные сайты GSH (hROSA26 и AAVS1) и интегрированный rtTA (SEQ ID NO: 20) и TRE (SEQ ID NO: 21).

[00122] В другом варианте реализации способа согласно настоящему изобретению указанный первый и указанный второй сайты «безопасная гавань» генома выбирают из группы, состоящей из локуса hROSA26 (SEQ ID NO: 22), локуса AAVS1 (SEQ ID NO: 23), гена CLYBL (SEQ ID NO: 24), гена CCR5 (SEQ ID NO: 25), гена HPRT (SEQ ID NO: 26) или генов с сайтом ID 325 на хромосоме 8 (SEQ ID NO: 27), сайтом ID 227 на хромосоме 1 (SEQ ID NO: 28), сайтом ID 229 на хромосоме 2 (SEQ ID NO: 29), сайтом ID 255 на хромосоме 5 (SEQ ID NO: 30), сайтом ID 259 на хромосоме 14 (SEQ ID NO: 31), сайтом ID 263 на хромосоме X (SEQ ID NO: 32), сайтом ID 303 на хромосоме 2 (SEQ ID NO: 33), сайтом ID 231 на хромосоме 4 (SEQ ID NO: 34), сайтом ID 315 на хромосоме 5 (SEQ ID NO: 35), сайтом ID 307 на хромосоме 16 (SEQ ID NO: 36), сайтом ID 285 на хромосоме 6 (SEQ ID NO: 37), сайтом ID 233 на хромосоме 6 (SEQ ID NO: 38), сайтом ID 311 на хромосоме 134 (SEQ ID NO: 39), сайтом ID 301 на хромосоме 7 (SEQ ID NO: 40), сайтом ID 293 на хромосоме 8 (SEQ ID NO: 41), сайтом ID 319 на хромосоме 11 (SEQ ID NO: 42), сайтом ID 329 на хромосоме 12 (SEQ ID NO: 43), сайтом ID 313 на хромосоме X (SEQ ID NO: 44). Предпочтительно, чтобы в другом варианте реализации способа согласно настоящему изобретению указанный первый и указанный второй сайты «безопасная гавань» генома выбирают из группы, состоящей из локуса hROSA26 (SEQ ID NO: 22), локуса AAVS1 (SEQ ID NO: 23), гена CLYBL (SEQ ID NO: 24), гена CCR5 (SEQ ID NO: 25), гена HPRT (SEQ ID NO: 26). Более предпочтительно, чтобы указанный первый и указанный второй сайты «безопасная гавань» генома выбирают из группы, состоящей из локуса hROSA26 (SEQ ID NO: 22) и локуса AAVS1 (SEQ ID NO: 23).

[00123] Дополнительные сайты могут быть идентифицированы путем поиска сайтов, где вирусы естественным образом интегрируются без нарушения естественной экспрессии генов. Для способа согласно настоящему изобретению можно использовать несколько сайтов GSH, которые будут описаны более подробно ниже.

[00124] Локус сайта интеграции аденоассоциированного вируса 1 (AAVS1) (SEQ ID NO: 23) расположен внутри гена *регуляторной субъединицы 12С протеинфосфатазы 1* (PPP1R12C) на хромосоме 19 человека, который равномерно и повсеместно экспрессируется в тканях человеческого организма. Этот сайт служит в качестве специфического локуса интеграции для серотипа AAV 2 и, таким образом, был идентифицирован в качестве возможного GSH. Было показано, что AAVS1 является благоприятной средой для транскрипции, поскольку он содержит структуру открытого хроматина и нативные хромосомные инсуляторы, которые обеспечивают устойчивость индуцибельных кассет к сайленсингу. Не зарегистрировано каких-либо негативных последствий на клетку в результате разрушения гена PPP1R12C. Более того, индуцибельная кассета, вставленная в этот сайт, остается транскрипционно активной во многих различных типах клеток. Таким образом, AAVS1 считается GSH и широко используется для направленного трансгенеза в геноме человека.

[00125] Сайт hROSA26 (SEQ ID NO: 22) был идентифицирован на основе аналогии последовательности с GSH у мышей (ROSA26 является акцепторным сайтом обратного сплайсинга #26). Хотя ортологичный сайт был идентифицирован у людей, этот сайт обычно не используется для инсерции индуцибельной кассеты. Авторы настоящего изобретения использовали систему нацеливания специально для сайта hROSA26 и, таким образом, смогли вставить генетический материал в этот локус. Локус hROSA26 (SEQ ID NO: 22) находится на хромосоме 3 (3p25.3) и может быть найден в базе данных Ensembl (GenBank: CR624523). Точные геномные координаты сайта интеграции представляют собой 3: 9396280-9396303: Ensembl. Сайт интеграции находится внутри открытой рамки считывания ORF (open reading frame) длиной некодирующей РНК THUMPD3 (THUMP domain containing protein 3, содержащий домен THUMP белок 3) (обратная цепь). Поскольку сайт hROSA26 имеет эндогенный промотор, вставленный генетический материал может использовать преимущества этого эндогенного промотора или, в качестве альтернативы, может быть вставлен функционально связанным с промотором.

[00126] Интрон 2 гена *бета-подобной цитрат-лиазы* (CLYBL) (SEQ ID NO: 24) на длинном плече хромосомы 13 был идентифицирован в качестве подходящего GSH, поскольку он является одной из идентифицированных «горячих точек» интеграции интегразы, полученной из фага phiC31. Исследования показали, что случайно вставленные индуцибельные кассеты в этот локус являются стабильными и экспрессируемыми. Было показано, что инсерция индуцибельных кассет в этот GSH не нарушает локальную экспрессию генов (Cerbibi *et al.*, 2015). Таким образом, CLYBL обеспечивает GSH, который может быть использован в способе согласно настоящему изобретению.

[00127] CCR5 (SEQ ID NO: 25), который расположен на хромосоме 3 (положение 3p21.31), представляет собой ген, который кодирует главный корецептор ВИЧ-1. Интерес к использованию этого сайта в качестве GSH возник из-за нулевой мутации в этом гене, которая, по-видимому, не имеет негативных последствий, но предрасполагает к устойчивости к инфекции ВИЧ-1. Были разработаны нуклеазы цинкового пальца, которые нацелены на третий экзон, что позволяет осуществлять инсерцию генетического материала в этот локус. Учитывая, что естественная функция CCR5 еще не выяснена, сайт остается предполагаемым GSH, который может быть использован в способе согласно настоящему изобретению. Ген гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы ГГФТ (HRPT) кодирует фермент трансферазу, который играет центральную роль в генерации пуриновых нуклеотидов через путь реутилизации пуринов. Он обсуждался как сайт GSH. Инсерции в этом сайте могут быть в большей степени применимы для типов зрелой клетки, например, для модификации для генной терапии. GSH в других организмах были идентифицированы и включают в себя локусы ROSA26, HRPT и Hippl1 (Hil) у мышей.

[00128] Геномы млекопитающих могут включать в себя сайты GSH, основанные на сайтах псевдо attP. Для таких сайтов была разработана интеграза hiC31, полученная из фага *Streptomyces* рекомбиназа, в качестве невирусного инструмента инсерции, поскольку она обладает способностью интегрировать индуцибельную плазмиду, содержащую кассету, несущую сайт attB в сайты псевдо-attP. GSH также присутствует в геномах растений, и модификации растительных клеток могут быть использованы в способе согласно настоящему изобретению. GSH были идентифицированы в геномах риса (Cantos *et al.*, 2014).

[00129] Следующие сайты GSH могут быть использованы в любом из способов согласно настоящему изобретению. Они были опубликованы Pellenz *et al.*, 2019 и соответствуют пяти из девяти критериев, перечисленных дальше: сайт ID 325 на хромосоме 8: 68,720,172-68,720,191 (SEQ ID NO: 27); сайт ID 227 на хромосоме 1: 231 999 396-231 999 415 (SEQ ID NO: 28); сайт ID 229 на хромосоме 2: 45 708 354-45 708 373 (SEQ ID NO: 29); сайт ID 255 на хромосоме 5: 19 069 307-19 069 326 (SEQ ID NO: 30); сайт ID 259 на хромосоме 14: 92 099 558-92 099 577 (SEQ ID NO: 31); сайт ID 263 на хромосоме X: 12 590 812-12 590 831 (SEQ ID NO: 32); сайт ID 303 на хромосоме 2: 77 263 930-77 263 949 (SEQ ID NO: 33); сайт ID 317 на хромосоме 2: 77 263 930-77 263 949 (SEQ ID NO: 60); сайт ID 231 на хромосоме 4: 58 976 613-58 976 632 (SEQ ID NO: 34); сайт ID 315 на хромосоме 5: 7,577,728-7,577,747 (SEQ ID NO: 35); сайт ID 307 на хромосоме 16: 19 323 777-19 323 796 (SEQ ID NO: 36); сайт ID 285 на хромосоме 6: 89 574 320-89 574 339 (SEQ ID NO: 37); сайт ID 233 на хромосоме 6: 114 713 905-114 713 924 (SEQ ID NO: 38); сайт ID 311 на хромосоме

6: 134 385 946-134 385 965 (SEQ ID NO: 39); сайт ID 301 на хромосоме 7: 113 327 685-113 327 704 (SEQ ID NO: 40); сайт ID 293 на хромосоме 8: 40 727 927-40 727 946 (SEQ ID NO: 41); сайт ID 319 на хромосоме 11: 32 680 546-32 680 565 (SEQ ID NO: 42); сайт ID 329 на хромосоме 12: 126 152 581-126 152 600 (SEQ ID NO: 43); и сайт ID 313 на хромосоме X: 16 059 732-16 059 751 (SEQ ID NO: 44).

[00130] В другом варианте реализации способа согласно настоящему изобретению указанная стволовая клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку, индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (иПСК), нейральную клетку-предшественницу, гемопоэтическую стволовую клетку или эмбриональную стволовую клетку (ЭСК).

[00131] В рамках настоящего изобретения термин «плюрипотентная стволовая клетка» используется, как определено выше.

[00132] Используемый в настоящем изобретении термин «нейральная клетка-предшественница» означает состояние мультипотентной клетки между плюрипотентной стволовой клетки и зрелой соматической клеткой. Это состояние клетки обычно определяется как специализированный тип клеток, такой как нейроны, олигодендроциты и астроциты.

[00133] В рамках настоящего изобретения термин «индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК)» используется, как определено выше.

[00134] Используемый в настоящем изобретении термин «гемопоэтическая стволовая клетка» означает кроветворную стволовую клетку. Этот особый тип мультипотентной стволовой клетки способен образовывать клетку крови любого типа, но потерял способность образовывать другие типы клетки.

[00135] В рамках настоящего изобретения термин «эмбриональные стволовые клетки (ЭСК)» используется, как определено выше.

[00136] В другом варианте реализации способа согласно настоящему изобретению указанная стволовая клетка представляет собой стволовую клетку человека или мыши.

[00137] Используемый в настоящем изобретении термин «стволовая клетка человека или мыши» означает клетку, полученную из человека или мыши. Однако стволовая клетка, используемая в способе согласно настоящему изобретению, может быть любой клеткой человека или животного. Предпочтительно эта клетка представляет собой клетку млекопитающего, такую как клетка из грызуна, такого как мыши и крысы; сумчатых, таких как кенгуру и коалы; приматов, не относящихся к человеку, таких как бонобо, шимпанзе,

лемуры, гиббоны и обезьяны; верблюдовых, таких как верблюды и ламы; домашнего скота, такого как лошади, свиньи, крупный рогатый скот, буйволы, бизоны, козы, овцы, олени, северные олени, ослы, бантенги, яки, куры, утки и индейки; домашних животных, таких как кошки, собаки, кролики и морские свинки. Клетка предпочтительно представляет собой клетку человека. В отдельных случаях клетка предпочтительно представляет собой клетку домашнего скота. Тип клетки, используемый в способе согласно настоящему изобретению, будет зависеть от применения клетки после завершения инсерции генетического материала в сайты GSH.

[00138] Настоящее изобретение также относится к клетке микроглии, полученной любым из способов согласно настоящему изобретению, предпочтительно где микроглия экспрессирует по меньшей мере один поверхностный белок микроглии, выбранный из группы, состоящей из ITGAM (CD11B) (SEQ ID NO: 45), ITGAX (CD11C) (SEQ ID NO: 46), CD14 (SEQ ID NO: 47), CD16 (SEQ ID NO: 48), ENTPD1 (CD39) (SEQ ID NO: 49), PTPRC (CD45) (SEQ ID NO : 50), CD68 (SEQ ID NO: 51), CSF1R (CD115) (SEQ ID NO: 52), CD163 (SEQ ID NO: 53), CX3CR1 (SEQ ID NO: 54), TREM2 (SEQ ID NO: 55), P2RY12 (SEQ ID NO: 56), TMEM119 (SEQ ID NO: 57) и HLA-DR (SEQ ID NO: 58).

[00139] Таким образом, микроглия дополнительно определяется экспрессией по меньшей мере одного из следующих поверхностных белков ITGAM (CD11B) (SEQ ID NO: 45), ITGAX (CD11C) (SEQ ID NO: 46), CD14 (SEQ ID NO: 47), CD16 (SEQ ID NO: 48), ENTPD1 (CD39) (SEQ ID NO: 49), PTPRC (CD45) (SEQ ID NO: 50), CD68 (SEQ ID NO: 51), CSF1R (CD115) (SEQ ID NO: 52), CD163 (SEQ ID NO: 53), CX3CR1 (SEQ ID NO: 54), TREM2 (SEQ ID NO: 55), P2RY12 (SEQ ID NO: 56), TMEM119 (SEQ ID NO: 57) и HLA-DR (SEQ ID NO: 58). Эти белки определены следующим образом.

[00140] ITGAM (CD11B), используемый в настоящем изобретении, означает *альфа-М субъединица интегрина*, ген, который кодирует цепь интегрина альфа-М. Интегрины представляют собой гетеродимерные интегральные мембранные белки, состоящие из альфа-цепи и бета-цепи. Последовательность белка приведена в SEQ ID NO: 45.

[00141] ITGAX (CD11C), используемый в настоящем изобретении, означает *альфа-Х субъединица интегрина*, и ген кодирует белок цепи интегрина альфа-Х. Последовательность белка приведена в SEQ ID NO: 46.

[00142] CD14, используемый в настоящем изобретении, означает *антиген дифференцировки моноцитов CD14*, и белок, кодируемый этим геном, представляет собой

поверхностный антиген, который предпочтительно экспрессируется на моноцитах/макрофагах. Последовательность белка приведена в SEQ ID NO: 47.

[00143] CD16, используемый в настоящем изобретении, означает *Fc-фрагмент FCGR3A рецептора IgG IIIa*, и этот ген кодирует рецептор для Fc-части иммуноглобулина G, и он участвует в удалении комплексов антиген-антитело из кровотока и других антителозависимых иммунных ответов. Последовательность белка приведена в SEQ ID NO: 48.

[00144] ENTPD1 (CD39), используемый в настоящем изобретении, означает *эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза 1*, и белок, кодируемый этим геном, представляет собой белок плазматической мембраны, который гидролизует внеклеточный АТФ и АДФ до АМФ. Последовательность белка приведена в SEQ ID NO: 49.

[00145] PTPRC (CD45), используемый в настоящем изобретении, означает *протеинтирозинфосфатаза C рецепторного типа*, и белок, кодируемый этим геном, является членом семейства протеинтирозинфосфатаз (PTP). Последовательность белка приведена в SEQ ID NO: 50.

[00146] CD68, используемый в настоящем изобретении, означает *антиген CD68*, и этот ген кодирует 110-кДа трансмембранный гликопротеин, который высоко экспрессируется человеческими моноцитами и тканевыми макрофагами. Последовательность белка приведена в SEQ ID NO: 51.

[00147] CSF1R (CD115), используемый в настоящем изобретении, означает *рецептор колониестимулирующего фактора 1*, и белок, кодируемый этим геном, является рецептором колониестимулирующего фактора 1, цитокином, который контролирует продуцирование, дифференцировку и функционирование макрофагов. Последовательность белка приведена в SEQ ID NO: 52.

[00148] CD163, используемый в настоящем изобретении, означает *антиген CD163*, и белок, кодируемый этим геном, является членом суперсемейства фагоцитарных рецепторов, богатых цистеином (scavenger receptor cysteine-rich, SRCR) и экспрессируется исключительно в моноцитах и макрофагах. Последовательность белка приведена в SEQ ID NO: 53.

[00149] CX3CR1, используемый в настоящем изобретении, означает *хемокиновый рецептор с мотивом C-X3-C 1*, и белок, кодируемый этим геном, является рецептором для фракталкина. Последовательность белка приведена в SEQ ID NO: 54. Фракталкин представляет собой трансмембранный белок и хемокин, участвующий в адгезии и миграции лейкоцитов.

[00150] TREM2, используемый в настоящем изобретении, означает *триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках 2*, и этот ген кодирует мембранный белок, который образует рецепторный сигнальный комплекс с белком, связывающим тирозинкиназу белка TYRO. Последовательность белка приведена в SEQ ID NO: 55.

[00151] P2RY12, используемый в настоящем изобретении, означает *пуринергический рецептор P2Y12*, и продукт этого гена принадлежит к семейству рецепторов, связанных с G-белком. Последовательность белка приведена в SEQ ID NO: 56.

[00152] TMEM119, используемый в настоящем изобретении, означает *трансмембранный белок 119*, который является геном, кодирующим белок. Среди связанных с ним путей существует активация микроглии во время нейровоспаления. Последовательность белка приведена в SEQ ID NO: 57.

[00153] HLA-DR, используемый в настоящем изобретении, означает *главный комплекс гистосовместимости, класс II, DR альфа и бета*, и оба HLA-DRA и HLA-DRB1 являются паралогами альфа-цепи HLA класса II. Последовательность белка приведена в SEQ ID NO: 58.

[00154] В другом варианте реализации настоящее изобретение также включает клетку микроглии согласно настоящему изобретению для применения в терапии.

[00155] Используемый в настоящем изобретении термин «терапия» означает любую форму лечения заболеваний или нежелательного состояния здоровья организмов, животных или людей. Он также может включать в себя генную терапию. Она может быть определена как намеренная инсерция чужеродной ДНК в ядро клетки с терапевтическими целями. Такое определение включает в себя предоставление гена или генов клетке для обеспечения дефектным геном дикого типа, добавление генов для молекул РНК, которые мешают экспрессии целевого гена (который может быть дефектным), предоставление генов «самоубийца» (такие как ферменты вируса простого герпеса, тимидинкиназа (HSV-tk) и цитозиндезаминаза (CD), которые превращают безвредное пролекарство ганцикловир (GCV) в цитотоксическое средство)), ДНК-вакцины для иммунизации или терапии рака (включая клеточную адоптивную иммунотерапию) и любое другое предоставление генов клетке для терапевтических целей. Кроме того, зрелую микроглию можно использовать непосредственно для трансплантации в тело человека или животного. В качестве альтернативы, микроглия может образовывать тестовый материал для исследования, включая эффекты лекарственных средств на экспрессию генов и взаимодействие лекарственных средств с конкретным геном. Микроглия для исследования может включать применение индуцибельной кассеты с генетической последовательностью неизвестной

функции для того, чтобы изучить контролируемую экспрессию этой генетической последовательности. Кроме того, это может позволить использовать микроглию для продуцирования больших количеств необходимых материалов, таких как факторы роста или цитокины.

[00156] Кроме того, в одном варианте реализации настоящее изобретение также направлено на применение такой клетки микроглии согласно настоящему изобретению для диагностики заболевания *in vitro*. Предпочтительно заболевание выбирают из группы, состоящей из заболеваний центральной нервной системы, предпочтительно нейродегенеративных заболеваний; более предпочтительно болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, лобно-височная деменция или боковой амиотрофический склероз; нейровоспалительные или аутоиммунные заболевания, предпочтительно рассеянный склероз, опосредованный аутоантителами энцефалит или инфекционные заболевания, нейроваскулярные заболевания; предпочтительно, васкулит; черепно-мозговая травма и рак.

[00157] Кроме того, настоящее изобретение направлено на применение такой клетки микроглии согласно настоящему изобретению для культивирования *in vitro* с органоидами мозга.

[00158] Используемый в настоящем изобретении термин «органOID» означает 3D модели органов *in vitro*, полученные из клетки (в основном стволовая), и представляет в комбинации с микроглией, полученной в соответствии с настоящим изобретением, мощный инструмент медицинской диагностики для изучения участия и взаимодействия микроглии с другими клетками головного мозга.

* * *

[00159] Следует отметить, что используемые в данном документе формы единственного числа включают в себя ссылки на множественное число, если контекст четко не указывает иное. Таким образом, например, ссылка на «реагент» включает в себя один или более таких различных реагентов, и ссылка на «способ» включает в себя ссылку на эквивалентные этапы и способы, известные специалистам в данной области техники, которые могут быть изменены или заменены на способы, описанные в данном документе.

[00160] Если не указано иное, термин «по меньшей мере», предшествующий серии элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в серии. Термин «по меньшей мере один» относится, если конкретно не определено иначе, к одному или

нескольким, таким как два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более. Специалисты в данной области техники распознают или смогут установить, используя не более чем рутинное экспериментирование, многие эквиваленты конкретных вариантов реализации изобретения, описанных в данном документе. Предполагается, что такие эквиваленты охвачены настоящим изобретением.

[00161] Термин «и/или», где бы он ни использовался в данном документе, включает в себя значение «и», «или» и «все или любая другая комбинация элементов, связанных указанным термином».

[00162] Термин «меньше чем» или, в свою очередь, «больше чем» не включает в себя конкретное число.

[00163] Например, меньше 20 означает меньше указанного числа. Аналогичным образом, «больше чем» или «выше чем» означает больше или выше указанного числа, например, более 80% означает больше или выше указанного числа 80%.

[00164] В данном описании и формуле изобретения, которая следует ниже, если контекст не требует иного, слово «содержать» и варианты, такие как «содержит» и «содержащий», будут пониматься как подразумевающие включение указанного целого числа, или шага, или группы целых чисел или шагов, но не исключение любого другого целого числа, или шага, или группы чисел или шагов. При использовании в данном документе термин «содержащий» может быть заменен термином «содержащий в себе» или «включающий», а иногда при использовании в данном документе термином «имеющий». При использовании в данном документе «состоящий из» исключает любой неуказанный элемент, стадию или ингредиент.

[00165] Термин «включая» означает «включая, но не ограничиваясь этим». «Включая» и «включая, но не ограничиваясь» используются как взаимозаменяемые.

[00166] Термин «примерно» означает плюс или минус 10%, предпочтительно плюс или минус 5%, более предпочтительно плюс или минус 2%, наиболее предпочтительно плюс или минус 1%.

[00167] В данном описании и формуле изобретения единственное число охватывает множественное число, если контекст не требует иного. В частности, если объект не конкретизирован, описание следует понимать как предполагающее множественность и единственность, если контекст не требует иного.

[00168] Следует понимать, что это изобретение не ограничивается конкретной методологией, протоколами, материалом, реагентами и веществами и т.д., описанными в данном документе, и поэтому могут варьироваться. Терминология, используемая в данном документе, предназначена только для описания конкретных вариантов реализации и не

предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который определяется исключительно формулой изобретения.

[00169] Все публикации, цитируемые в тексте данного описания (включая все патенты, заявки на патенты, научные публикации, инструкции и т.д.), как выше, так и ниже, включены в данный документ с помощью ссылки в полном объеме. Ничто в данном документе не должно рассматриваться как признание того, что настоящее изобретение не имеет права датировать более поздним числом такое раскрытие изобретения в силу предшествующего изобретения. В той степени, в которой материал, включенный посредством ссылки, противоречит или не согласуется с данным описанием, данное описание заменит любой такой материал.

[00170] Содержание всех документов и патентных документов, цитируемых в данном документе, включено в качестве ссылки в полном объеме.

[00171] Лучшее понимание настоящего изобретения и его преимуществ будет получено из следующих примеров, предлагаемых только для иллюстративных целей. Примеры никоим образом не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00172] Следующие примеры иллюстрируют настоящее изобретение, но не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

[00173] Пример 1

[00174] Материалы и способы

Для начальных скрининговых экспериментов сначала создали линию чиПСК hROSA-CAG-rtTA (нуклеофекция трех плазмид, экспрессирующих CAS9-никазу, две hROSA26-специфические направляющие РНК (SEQ ID NO: 66 и SEQ ID NO: 67) и донорной плазмиды с экспрессионной кассетой CAG-rtTA, как показано на фигуре 2А и фигуре 4А; селекция антибиотиком, клональная экспансия и характеристика отдельных клональных колоний чиПСК), и провели последующую транзистную трансфекцию четырех векторов, нацеленных на AAVS1 (SEQ ID NO: 61 - SEQ ID NO: 64) (см. также фигуры 4В-Е), что позволило осуществить быструю сверхэкспрессию PU.1 (SEQ ID NO: 2) либо отдельно, либо в комбинации с любым из трех других факторов транскрипции RUNX1 (SEQ ID NO: 4), СЕВРВ (SEQ ID NO: 3) или IRF8 (SEQ ID NO: 5) в форме бицистронной экспрессионной кассеты (фигуры 4В-Е) (от SEQ ID NO: 61 до SEQ ID NO: 64). Для целей скрининга клетки мишени не размножали клонально, что приводило к сверхэкспрессии только в субпопуляции клеток.

Удивительно, что первоначальные скрининговые эксперименты продемонстрировали быструю индукцию маркера линии миелоидной клетки и микроглии во всех трех клеточных линиях, экспрессирующих PU.1 (SEQ ID NO: 2) плюс любой из трех других потенциальных репрограммирующих факторов, но не в контроле чиПСК дикого типа или в клетках, экспрессирующих один PU.1 (SEQ ID NO: 2).

[00175] Описание

Чтобы разработать прототип протокола и установить подходящие параметры считывания, авторы настоящего изобретения решили сосредоточиться на комбинаторной сверхэкспрессии PU.1 (SEQ ID NO: 2) и СЕВРВ (SEQ ID NO: 3). Таким образом, они создали и клонально размножили полностью верифицированные двойные нацеленные на GSH индуцибельные чиПСК PU.1 + СЕВРВ.

[00176] Наблюдение

Добавление доксициклина приводило к быстрой потере экспрессии маркеров плюрипотентности OCT4 (SEQ ID NO: 78) и NANOG (SEQ ID NO: 79) и индукции обоих трансгенов во всех клетках (см. фигуру 6).

[00177] Пример 2

[00178] Материалы и способы

Вкратце, чиПСК высевали в виде отдельных клеток на матригель в питательную среду для поддержания плюрипотентности. Через два дня эту питательную среду поменяли на модифицированную по способу Дульбекко среду Игла (DMEM)/F12, с добавлением дох (доксциклина) для индукции трансгена плюс малых молекул и факторов роста, имитирующих последовательность эмбриональных событий, описанных выше. После трех дней индукции прикрепленные клетки начали отслаиваться от планшета для культуры ткани, и их обнаружили в качестве плавающих одиночных клеток в супернатанте.

[00179] Описание

Впоследствии авторы настоящего изобретения провели более длительные скрининговые эксперименты, в которых клетки индуцировали в течение до 20 дней для оптимизации составов сред. Многоцветная проточная цитометрия продемонстрировала удивительно надежную и быструю индукцию маркеров поверхности миелоидной клетки, которые были выбраны в качестве скрининговой панели для индукции примитивных макрофагов и/или микроглии (CD11b (SEQ ID NO: 45), CD14 (SEQ ID NO: 47)), CD45 (SEQ ID NO: 50), CD163 (SEQ ID NO: 53), CX3CR1 (SEQ ID NO: 54)). Авторы настоящего изобретения также отметили важные различия, зависящие от условий культивирования: индукция происходила наиболее быстро и эффективно, когда сверхэкспрессию фактора транскрипции проводили вместе с регулируемым по времени воздействием внеклеточных сигналов (малых молекул, факторов роста), имитирующих последовательность эмбрионального развития: (1) формирование структуры плюрипотентного эпибласта (чиПСК) в направлении (задняя первичная полоска) внеэмбриональной мезодермы и гемангиобласта, (2) индукция примитивного гематопоеза и ранних предшественников макрофагов, (3) дифференцировка в примитивные макрофаги желточного мешка, (4) дифференцировка в микроглию (см. фигуру 5).

[00180] Наблюдение

Клетки быстро начали экспрессировать типичные миелоидные поверхностные белки, включая CD45 (SEQ ID NO: 50) (также известный как PTPRC), CD11b (SEQ ID NO: 45) (также известный как ITGAM), CD14 (SEQ ID NO: 47) и CX3CR1 (SEQ ID NO: 54), как продемонстрировали с помощью проточной цитометрии (см. фигуры 5B-C). К 10 дню все клетки перешли в супернатант, и их высеяли на чашки для культивирования тканей, покрытые поли-L-лизином (PLL), в конечную питательную среду с химически определенным составом для дифференцировки и поддержания микроглии в соответствии с

Muffat *et al.*, 2016. Интересно, что дифференцировка в микроглию происходила даже более эффективно, когда добавление доксициклина прекратили после десятого дня протокола индукции, таким образом однозначно демонстрируя независимость клеточного фенотипа от продолжающейся экспрессии трансгена.

После 6-10 дней дифференцировки без трансгена и созревания в адгезионной культуре практически все клетки экспрессировали широкий спектр общих миелоидных и более специфичных для микроглии белков, включая CD39 (SEQ ID NO: 49), P2RY12 (SEQ ID NO: 56), TREM2 (SEQ ID NO: 55) и TMEM119 (SEQ ID NO: 57), как определили количественно с помощью проточной цитометрии (см. фигуру 5C) или продемонстрировали с помощью иммуноцитохимии (см. фигуру 5D). Затем провели эксперименты по совместному культивированию, в которых авторы настоящего изобретения высевали предшественники микроглии на чистую популяцию изогенных чиПСК-производных кортикальных нейронов, генерированных в соответствии с ранее опубликованным протоколом в соответствии с Zhang *et al.*, 2013, и Pawlowski *et al.*, 2017. Микроглиальные клетки приобрели более разветвленную (т.е. менее активированную) морфологию по сравнению с клетками в монокультуре (см. фигуру 5E). Анализ кПЦР в реальном времени чиПСК и микроглии в монокультуре продемонстрировал отрицательную регуляцию факторов плюрипотентности, независимость от МУВ (myeloblastosis, миелобластоз) (в соответствии с происхождением микроглии от примитивных макрофагов желточного мешка) и высокую экспрессию основных факторов транскрипции микроглии, классических поверхностных маркеров и недавно предложенных уникальных генов-сигнатур микроглии (см. фигуру 5F).

ССЫЛОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ:

Abud EM, Ramirez RN, Martinez ES, Healy LM, Nguyen CHH, Newman SA, Yeromin A V, Scarfone VM, Marsh SE, Fimbres C, et al.: iPSC-Derived Human Microglia-like Cells to Study Neurological Diseases. *Neuron*, 2017, 94:278-293.e9.

Butovsky O, Weiner HL: Microglial signatures and their role in health and disease. *Nat Rev Neurosci.*, 2018, 19.

Cantos C, Francisco P, Trijatmiko KR, Slamet-Loedin I and Chadha-Mohanty PK: Identification of “safe harbor” loci in indica rice genome by harnessing the property of zinc-finger nucleases to induce DNA damage and repair. *Frontier in Plant Science*, 2014, 5: 302, pp. 1-8.

Cerbini T, Funahashi R, Luo Y, Liu C, Park K, Rao M, Malik N, Zou J: Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN)-Mediated CLYBL Targeting Enables Enhanced Transgene Expression and One-Step Generation of Dual Reporter Human Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC) and Neural Stem Cell (NSC) Lines. *Plos One*, 2015.

Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Li T, Maserati M, Lu S, Zdravkovic T, ИJlic D, Genbacev O, Fisher S, Krtolica A, and Lanza R: Human Embryonic Stem Cell Lines Generated without Embryo Destruction. 2008, *Cell Stem Cell*, 2(2) pp. 113-117.

Cohen DE, Melton DA: Turning straw into gold: directing cell fate for regenerative medicine. *Nat Rev Genet* 2011, 12:243-52.

Douvaras P, Sun B, Wang M, Kruglikov I, Lалlos G, Zimmer M, Terrenoire C, Zhang B, Gandy S, Schadt E, et al.: Directed Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells to Microglia. *Stem cell reports*, 2017, 8:1516-1524.

Gaj, T, Gersbach, CA, Barbas, CF: ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering, *Trends Biotechnol.*, 2013, 31(7):397-405.

Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, et al.: Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, (80) 2010, 330:841-5.

Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz c, Busch K, Azzoni E, Crozet L, Garner H, Trouillet C, de Bruijn MF, Geissmann F, et al.: Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 2015, 518:547-51.

Haenseler W, Sansom SN, Buchrieser J, Newey SE, Moore CS, Nicholls FJ, Chintawar S, Schnell C, Antel JP, Allen ND, et al.: A Highly Efficient Human Pluripotent Stem Cell Microglia Model Displays a Neuronal-Co-culture-Specific Expression Profile and inflammatory Response. *Stem cell reports* 2017, 8:1727-1742.

Hagan CE, Bolon B and Keene CD, *Comparative Anatomy and Histology*, 2012, pages 339-394.

Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, David E, Baruch K, Lara-Astaiso D, Toth B, et al.: A unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell*, 2017, 169:1276-1290.e17.

Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A: Physiology of microglia. *Physiol Rev.*, 2011, 91:461-553.

Krasemann S, Madore C, Cialic R, Baufeld C, Calcagno N, El Fatimy R, Beckers L, O'Loughlin E, Xu Y, Fanek Z, et al.: The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity*, 2017, 17:566581.e9.

Ladewig J, Koch P, Brüstle O: Leveling Waddington: the emergence of direct programming and the loss of cell fate hierarchies. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14:225-36.

McGrath KE, Koniski AD, Malik J, Palis J: Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo. *Blood*, 2003, 101:1669-76.

Muffat J, Li Y, Yuan B, Mitalipova M, Omer A, Corcoran S, Bakiasi c, Tsai L-H, Aubourg P, Ransohoff RM, et al.: Efficient derivation of microglia-like cells from human pluripotent stem cells. *Nat Med*, 2016, 22:1355-1367.

Pandya H, Shen MJ, Ichikawa DM, Sedlock AB, Choi Y, Johnson KR, Kim G, Brown MA, Elkahlon AG, Maric D, et al.: Differentiation of human and murine induced pluripotent stem cells to microglia-like cells. *Nat Neurosci*, 2017, 20:753-759.

Pawlowski M, Ortmann D, Bertero A, Tavares JM, Pedersen RA, Vallier L, Kotter MRN: Inducible and Deterministic Forward Programming of Human Pluripotent Stem Cells into Neurons, Skeletal Myocytes, and Oligodendrocytes. *Stem cell reports*, 2017, 8:80H12.

Pellenz S, Phelps M, Tang W, Hovde TB, Sinit RB, Fu W, Li H, Chen E and Monnat, Jr. RJ: New human chromosomal sites with 'safe harbor' potential for targeted transgene insertion. *Human Gene Therapy*, 2019, 1-47.

Qi Hui, Zi Jin, Xiaokun Li, Changxiao Liu and Xiaojie Wang: FGF Family: From Drug Development to Clinical Application. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, 19(7), 1875.

Ransohoff RM: How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*, (80-) 2016, 353:777-83.

Réu P, Khosravi A, Bernard S, Mold JE, Salehpour M, Alkass K, Perl S, Tisdale J, Possnert G, Druid H, et al.: The Lifespan and Turnover of Microglia in the Human Brain. *Cell Rep*, 2017, 20:77V784.

Schafer DP, Stevens B: Microglia Function in Central Nervous System Development and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015, 7:a020545.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131:861-72.

Takata K, Kozaki T, Lee CZW, Thion MS, Otsuka M, Lim S, Utami KH, Fidan K, Park DS, Malleret B, et al.: Induced-Pluripotent-Stem-Cell-Derived Primitive Macrophages Provide a Platform for Modelling Tissue-Resident Macrophage Differentiation and Function. *Immunity*, 2017, 47: 1 83-1 98.e6.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, (80-) 1998, 282:1145-7.

Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, and Brown RF: A Specific Inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase, 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(7), pp. 5241-5248.

Zhang Y, Pak C, Han Y, Ahlenius H, Zhang Z, Chanda S, Marro S, Patzke C, Acuna c, Covy J, et al.: Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells. *Neuron*, 2013, 78:785-98.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения микроглии из стволовых клеток, включающий следующие этапы:
 - а. направленная инсерция нуклеотидной последовательности, кодирующей белок-регулятор транскрипции, в первый сайт «безопасная гавань» генома; и
 - б. направленная инсерция кодирующей последовательности фактора транскрипции PU.1 (SEQ ID NO: 1) во второй сайт «безопасная гавань» генома, где ген функционально связан с индуцибельным промотором, который регулируется белком-регулятором транскрипции; экспрессия PU.1 (SEQ ID NO: 2); и
 - в. культивирование стволовых клеток, полученных на этапах а) и б), с воздействием по меньшей мере одного фактора роста или малой молекулы, которая воспроизводит передачу сигналов во время по меньшей мере одной стадии эмбрионального развития микроглии или пролиферации, дифференцировки или поляризации взрослой микроглии.
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере один фактор роста или малая молекула выбраны из группы, состоящей из активина А (SEQ ID NO: 7), BMP4 (SEQ ID NO: 8), FGF (SEQ ID NO: 9), VEGF-A (SEQ ID NO: 10), LY294002, CHIR99021, SCF (SEQ ID NO: 11), ИЛ-3 (SEQ ID NO: 12), ИЛ-6 (SEQ ID NO: 13), CSF1 (SEQ ID NO: 14), ИЛ-34 (SEQ ID NO: 15), CSF2 (SEQ ID NO: 16), CD200 (SEQ ID NO: 17), CX3CL1 (SEQ ID NO: 18), TGF β 1 (SEQ ID NO: 19) и IDE1.
3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что по меньшей мере один фактор роста представляет собой CSF1 (SEQ ID NO: 14) или ИЛ-34 (SEQ ID NO: 15).
4. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что по меньшей мере одна малая молекула представляет собой CHIR99021, LY294002 или IDE1.
5. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что первый и второй сайты «безопасная гавань» генома различны.

6. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий инсерцию кодирующей последовательности гена фактора транскрипции СЕВРВ (SEQ ID NO: 3) и его экспрессию.
7. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий инсерцию кодирующей последовательности гена фактора транскрипции RUNX1 (SEQ ID NO: 4) и его экспрессию.
8. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий инсерцию кодирующей последовательности гена фактора транскрипции IRF8 (SEQ ID NO: 5) и его экспрессию.
9. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий инсерцию кодирующей последовательности гена фактора транскрипции SALL1 (SEQ ID NO: 6) и его экспрессию.
10. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что белок-регулятор транскрипции представляет собой обратный трансактиватор тетрациклина (rtTA) (SEQ ID NO: 20), и его активность контролируют доксициклином или тетрациклином.
11. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что индуцибельный промотор включает Tet-чувствительный элемент (TRE) (SEQ ID NO: 21).
12. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанный первый и указанный второй сайты «безопасная гавань» генома выбраны из группы, состоящей из локуса hROSA26 (SEQ ID NO: 22), локуса AAVS1 (SEQ ID NO: 23), гена CLYBL (SEQ ID NO: 24), гена CCR5 (SEQ ID NO: 25), гена HPRT (SEQ ID NO: 26) или генов с сайтом ID 325 на хромосоме 8 (SEQ ID NO: 27), сайта ID 227 на хромосоме 1 (SEQ ID NO: 28), сайта ID 229 на хромосоме 2 (SEQ ID NO: 29), сайта ID 255 на хромосоме 5 (SEQ ID NO: 30), сайта ID 259 на хромосоме 14 (SEQ ID NO: 31), сайта ID 263 на хромосоме X (SEQ ID NO: 32), сайта ID 303 на хромосоме 2 (SEQ ID NO: 33), сайта ID 231 на хромосоме 4 (SEQ ID NO: 34), сайта ID 315 на хромосоме 5 (SEQ ID NO: 35), сайта ID 307 на хромосоме 16 (SEQ ID NO: 36), сайта ID 285 на хромосоме 6 (SEQ ID NO: 37), сайта ID 233 на хромосоме 6 (SEQ ID NO: 38), сайта ID 311 на хромосоме 134 (SEQ ID NO: 39), сайта ID 301 на хромосоме 7 (SEQ ID NO: 40), сайта ID 293 на хромосоме 8 (SEQ ID NO: 41), сайта

ID 319 на хромосоме 11 (SEQ ID NO: 42), сайта ID 329 на хромосоме 12 (SEQ ID NO: 43) и сайта ID 313 на хромосоме X (SEQ ID NO: 44).

13. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанная стволовая клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку, индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (иПСК), нейральную клетку-предшественника, гемопоэтическую стволовую клетку или эмбриональную стволовую клетку (ЭСК).

14. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанная стволовая клетка представляет собой стволовую клетку человека или мыши.

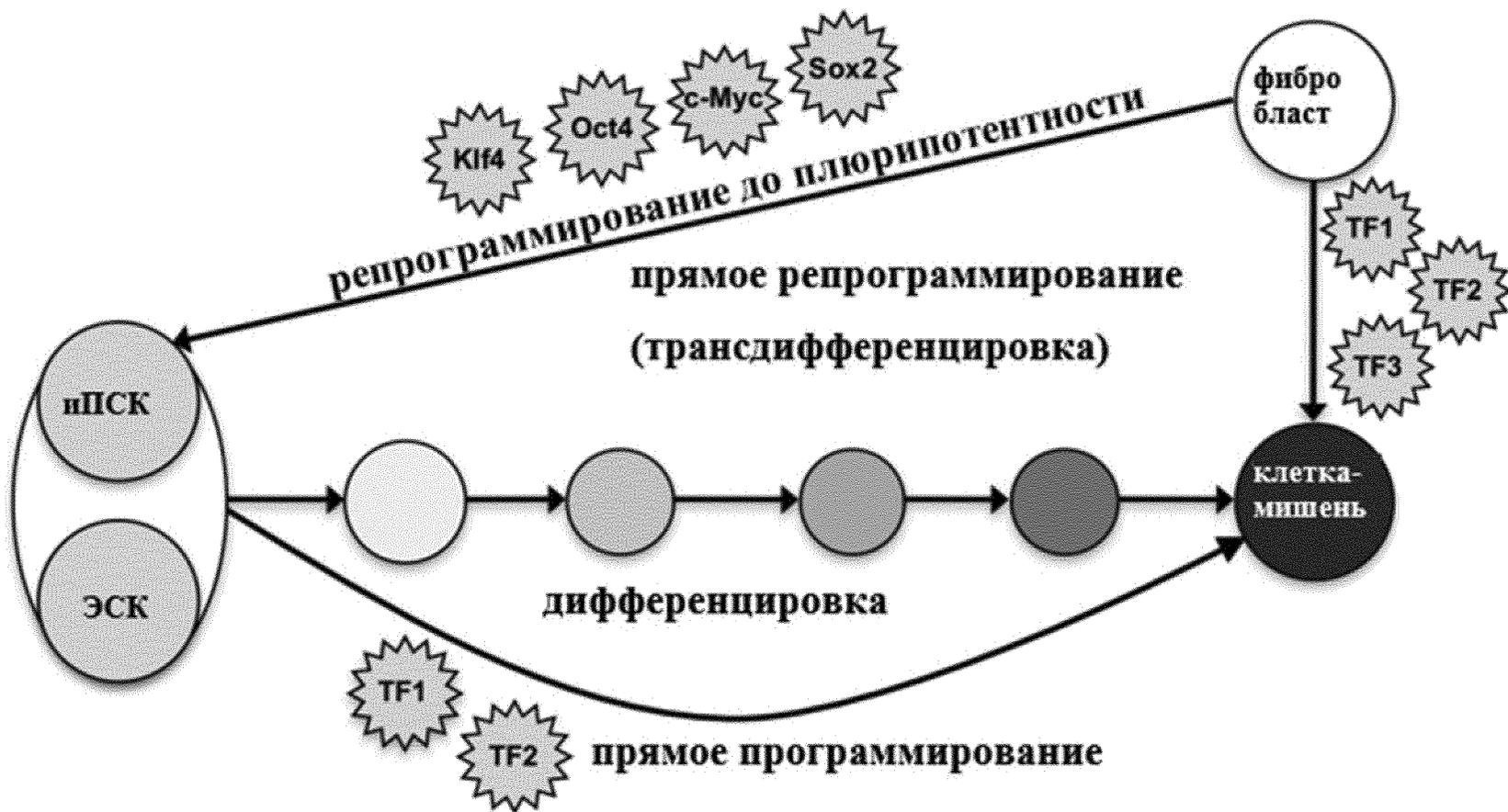
15. Микроглия, полученная любым из способов по пп. 1-14, причем, предпочтительно, микроглия экспрессирует по меньшей мере один поверхностный белок микроглии, выбранный из группы, состоящей из ITGAM (CD11B) (SEQ ID NO: 45), ITGAX (CD11C), (SEQ ID NO: 46), CD14 (SEQ ID NO: 47), CD16 (SEQ ID NO: 48), ENTPD1 (CD39) (SEQ ID NO: 49), PTPRC (CD45) (SEQ ID NO: 50), CD68 (SEQ ID NO: 51), CSF1R (CD115) (SEQ ID NO: 52), CD163 (SEQ ID NO: 53), CX3CR1 (SEQ ID NO: 54), TREM2 (SEQ ID NO: 55), P2RY12 (SEQ ID NO: 56), TMEM119 (SEQ ID NO: 57) и HLA-DR (SEQ ID NO: 58).

16. Микроглия по п.15 для применения в терапии.

17. Применение микроглии по п.15 или 16 для диагностики заболевания *in vitro*.

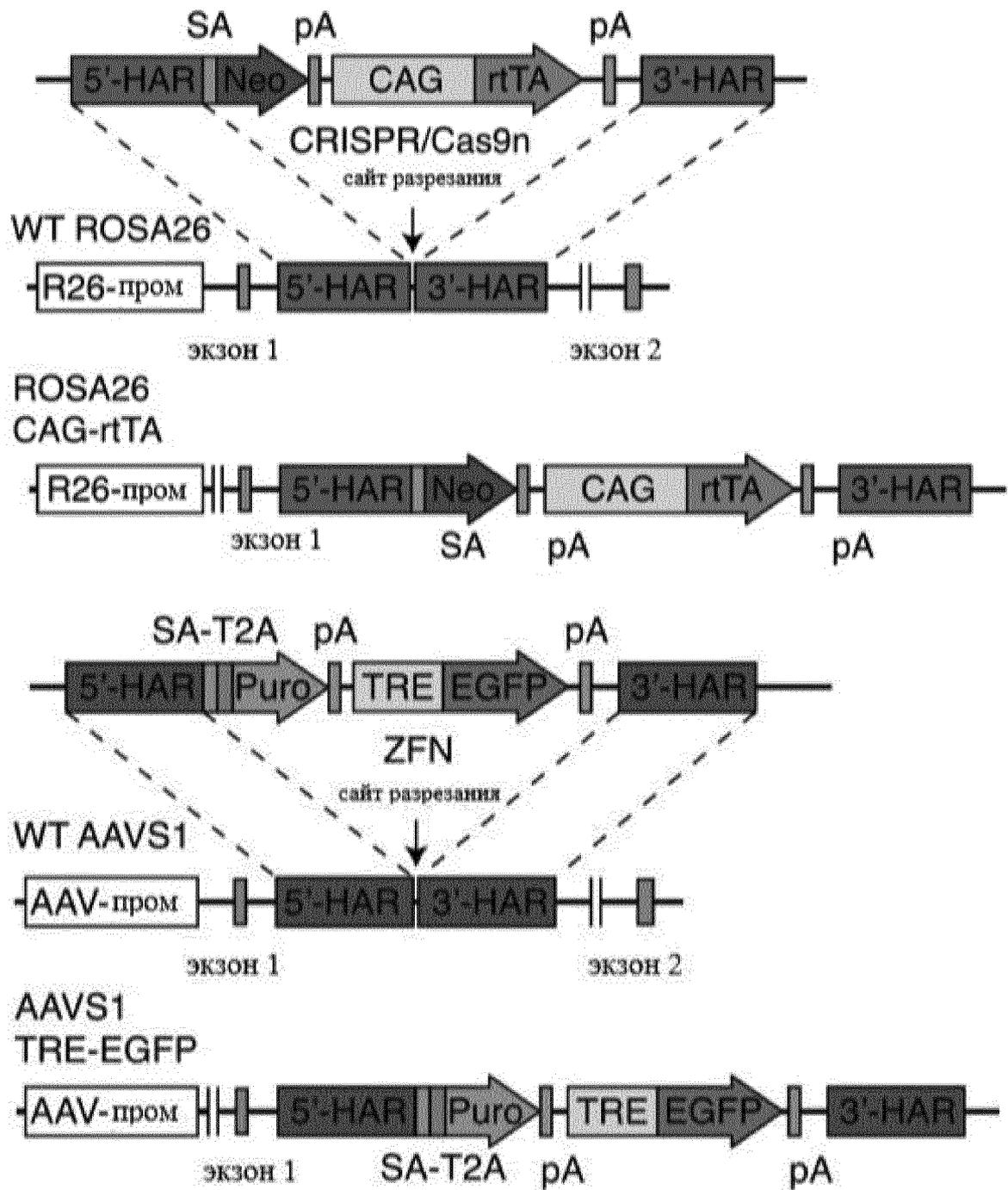
18. Применение микроглии по п.17, отличающееся тем, что заболевание выбрано из группы, состоящей из заболеваний центральной нервной системы, предпочтительно нейродегенеративных заболеваний; более предпочтительно болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, лобно-височной деменции или бокового амиотрофического склероза; нейровоспалительных или аутоиммунных заболеваний, предпочтительно рассеянного склероза, опосредованного аутоантителами энцефалита или инфекционных заболеваний, нейроваскулярных заболеваний; предпочтительно инсульта, васкулита; черепно-мозговой травмы и рака.

19. Применение микроглии по п.15 или 16 для культивирования *in vitro* с органоидами мозга.

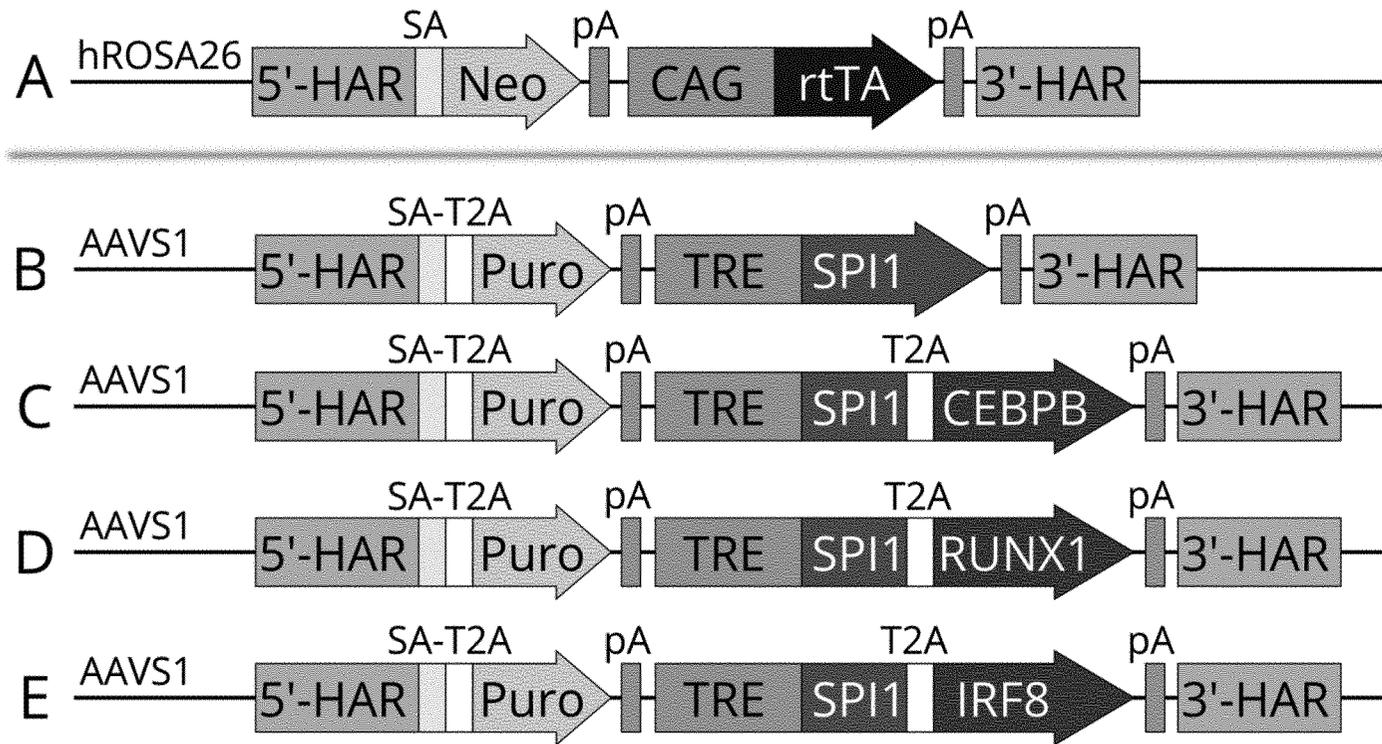


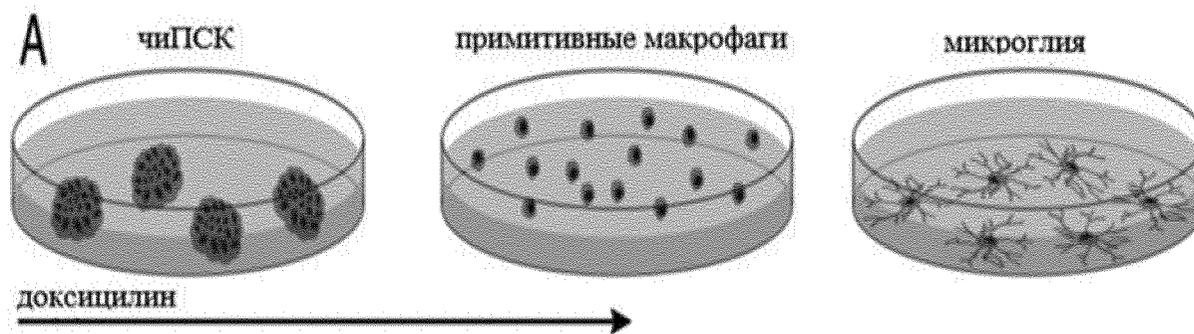
Фигура 1

2/20
Фигура 2

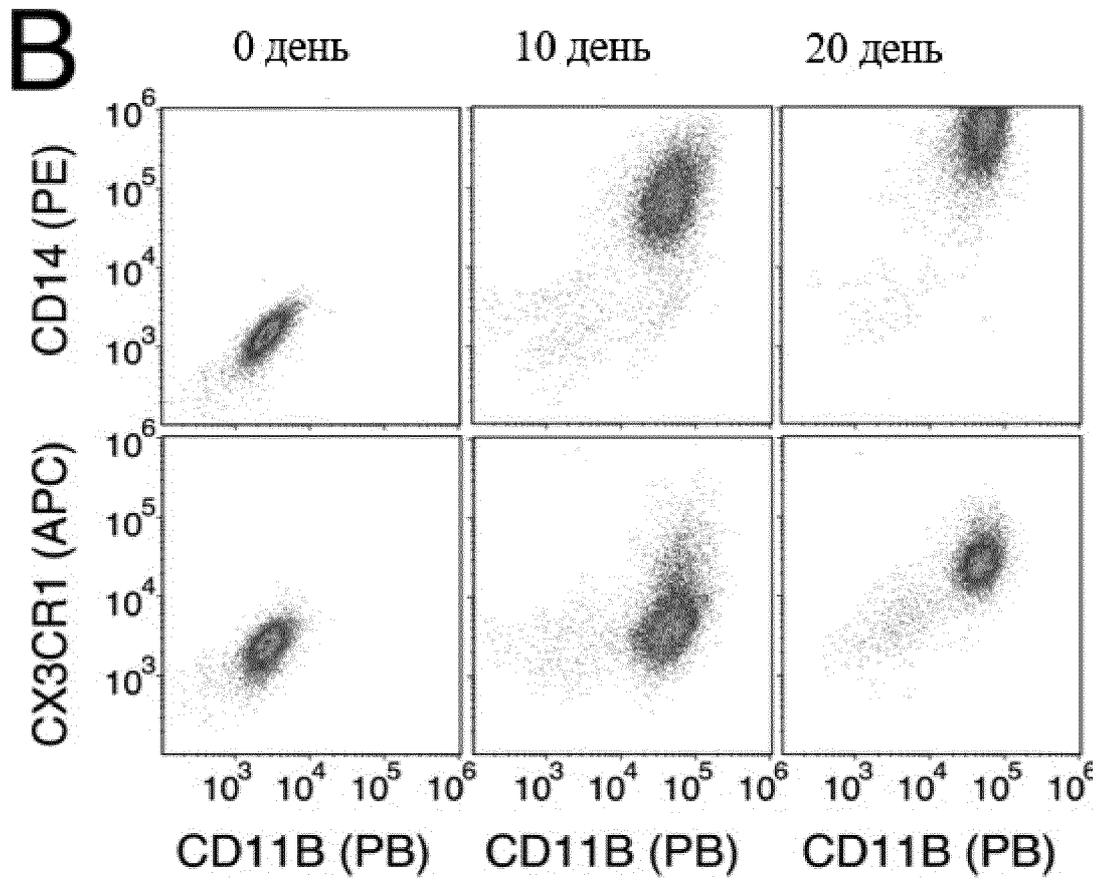


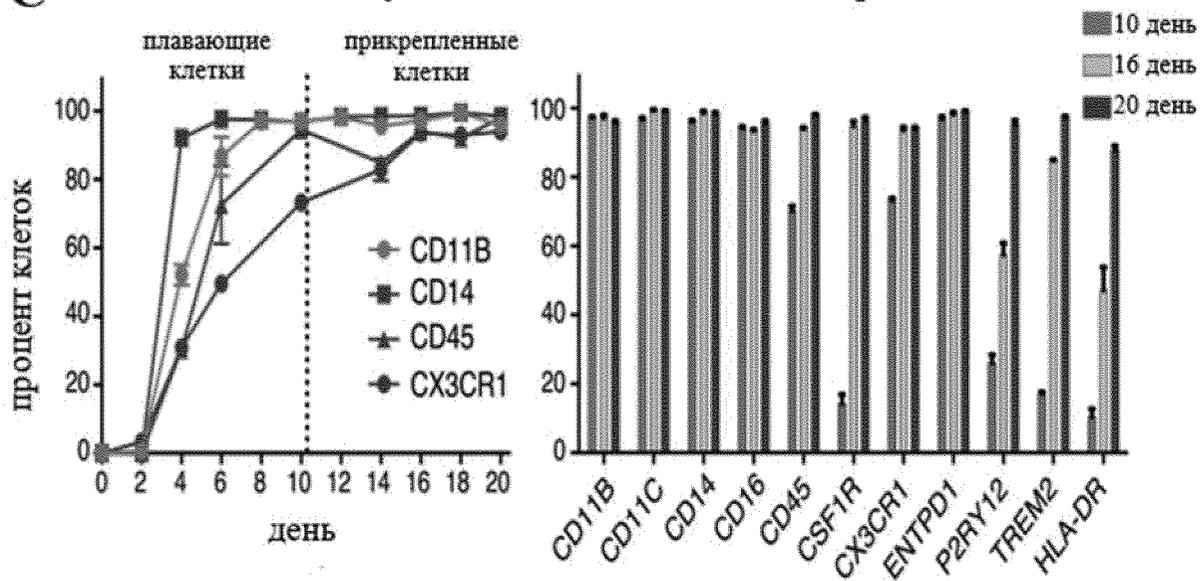
Обозначение	Название гена	CDS [п.о.]	Источник
CEBPB	ССААТ/энхансер связывающий белок бета	1281	Dharmacon, BC007538
IRF8	регуляторный фактор интерферона 8	1038	GenScript, NM_002163
RUNX1	фактор транскрипции 1, связанный с Runt	1443	GenScript, NM_001754
SPI1	протоонкоген Spi-1	813	подарен Thomas Moreau



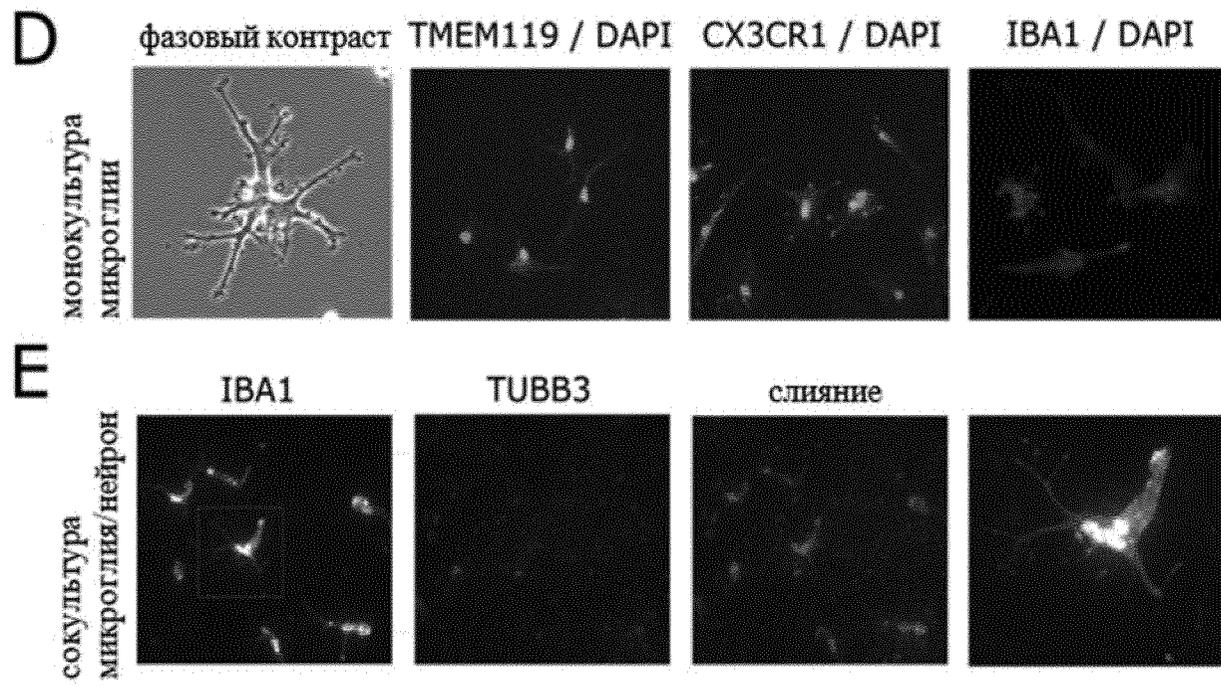


6/20
Фигура 5 (контр.)



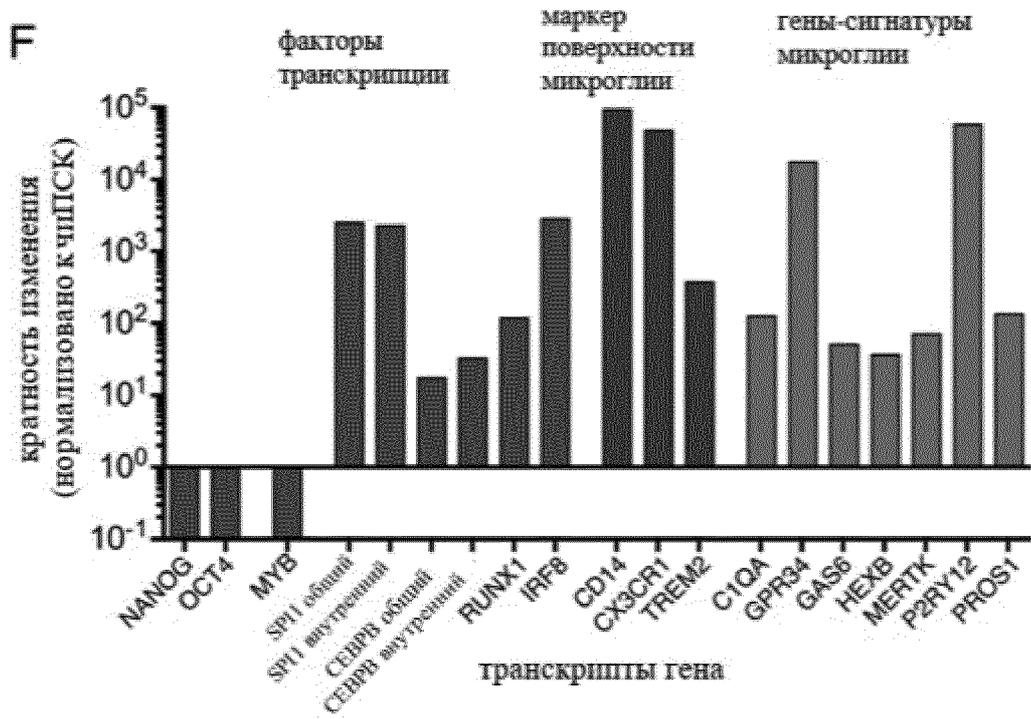
С**Индукция белков клеточной поверхности**

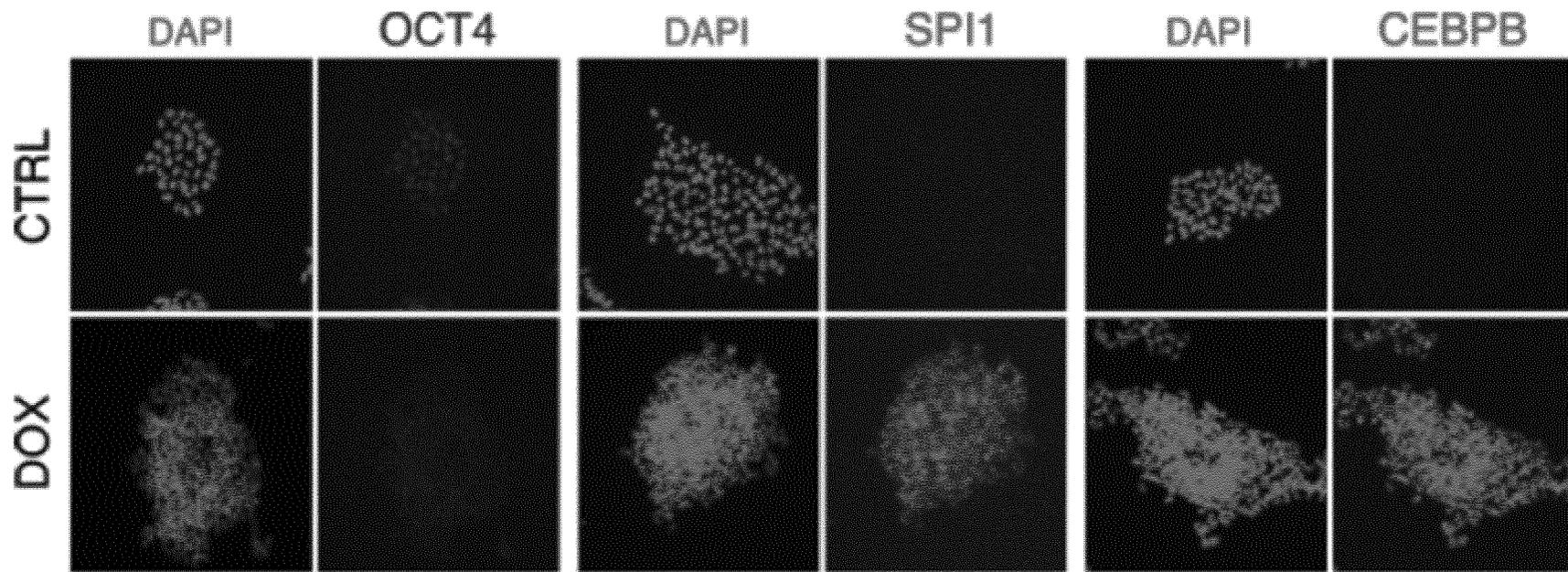
Фигура 5 (контр.)



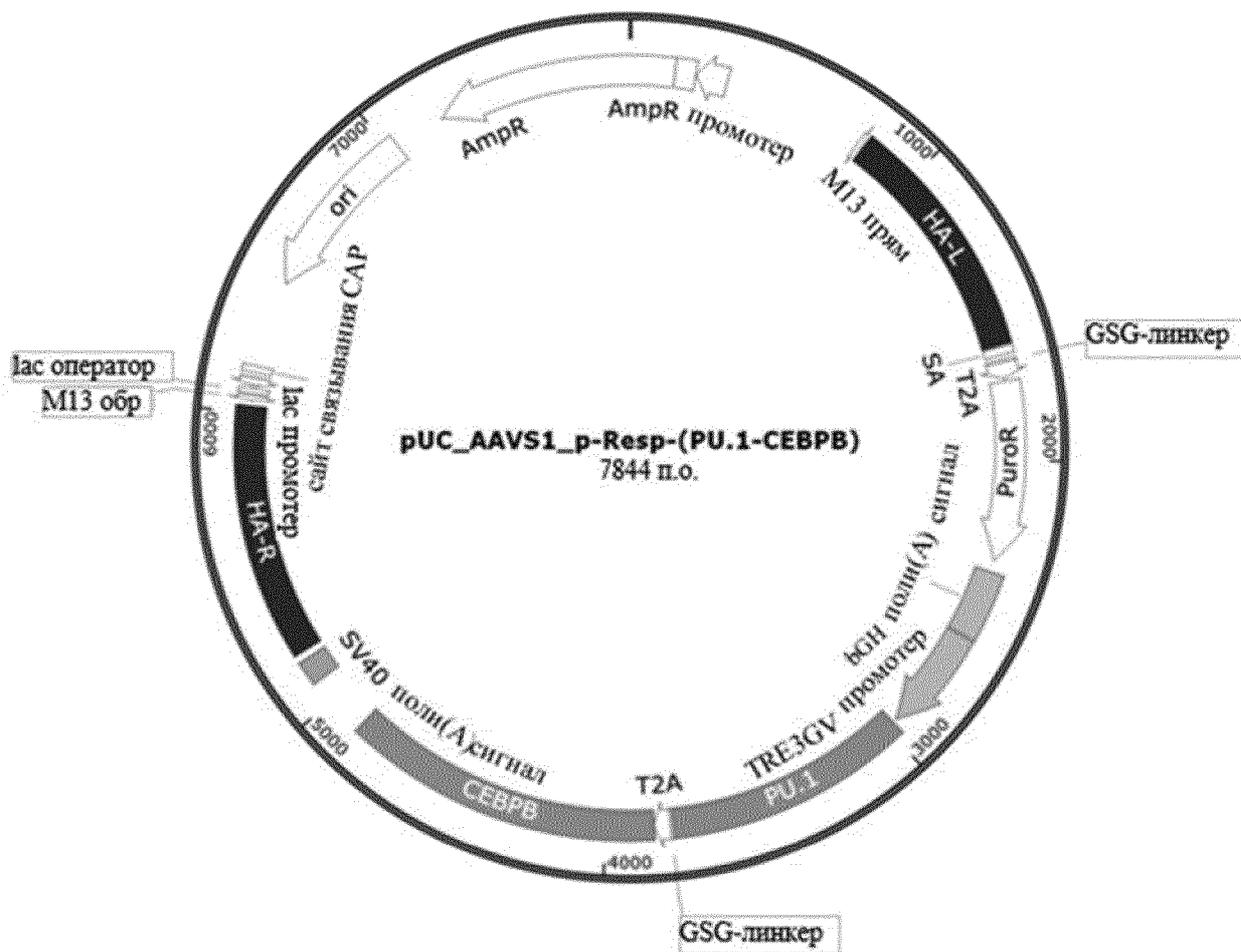
Фигура 5 (контр.)
8/20

Фигура 5 (контр.)

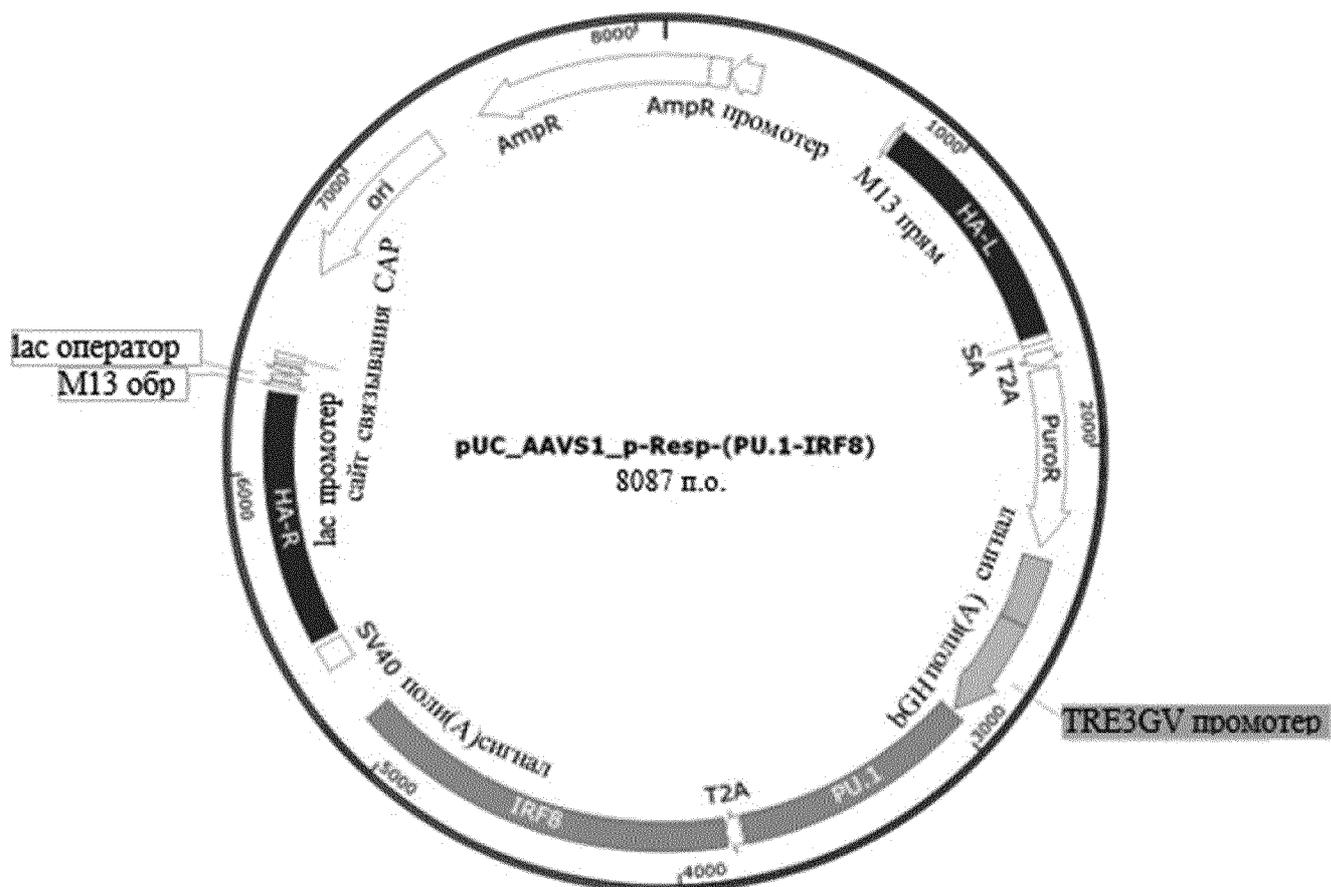




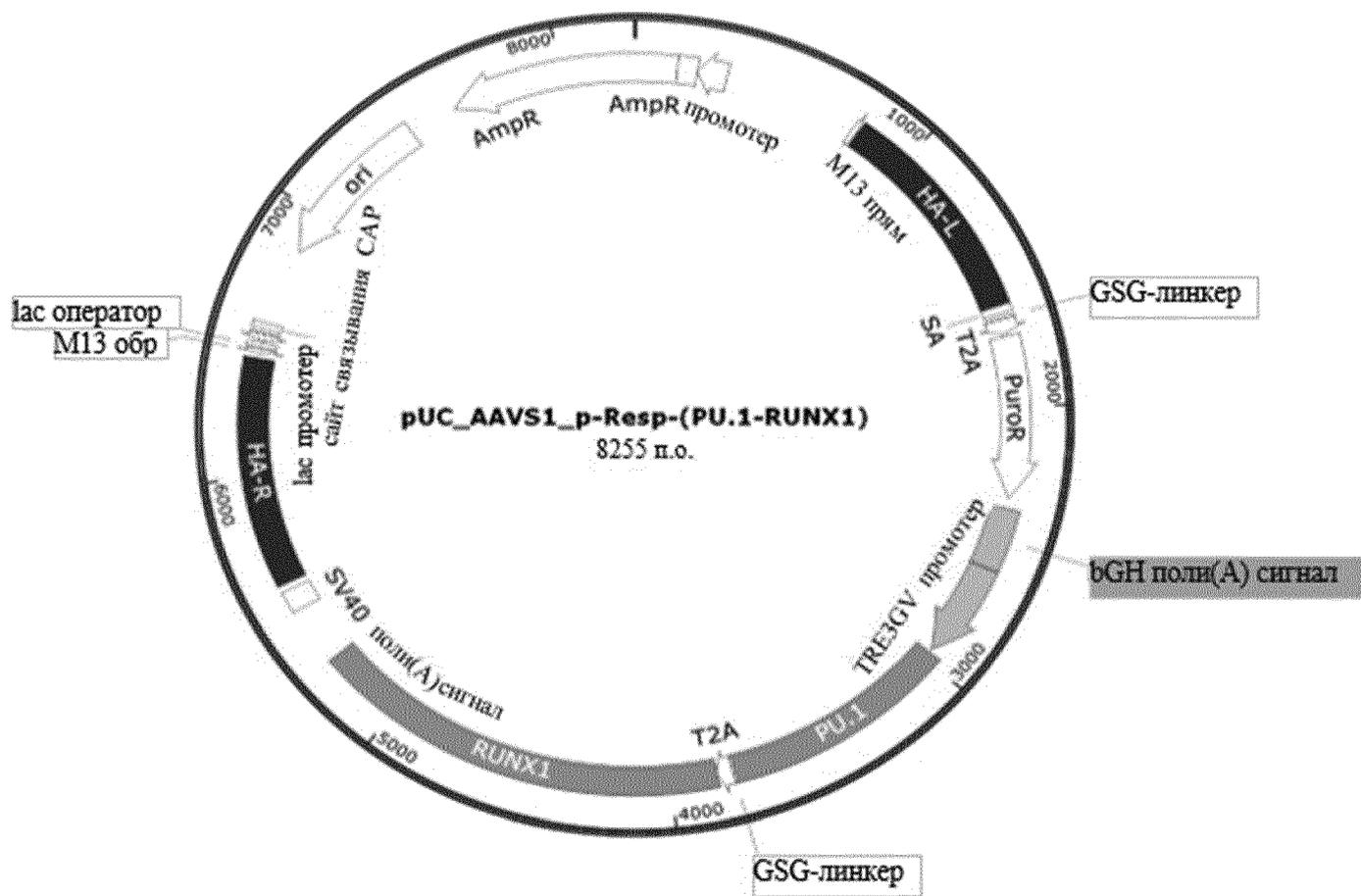
11/20
Фигура 7



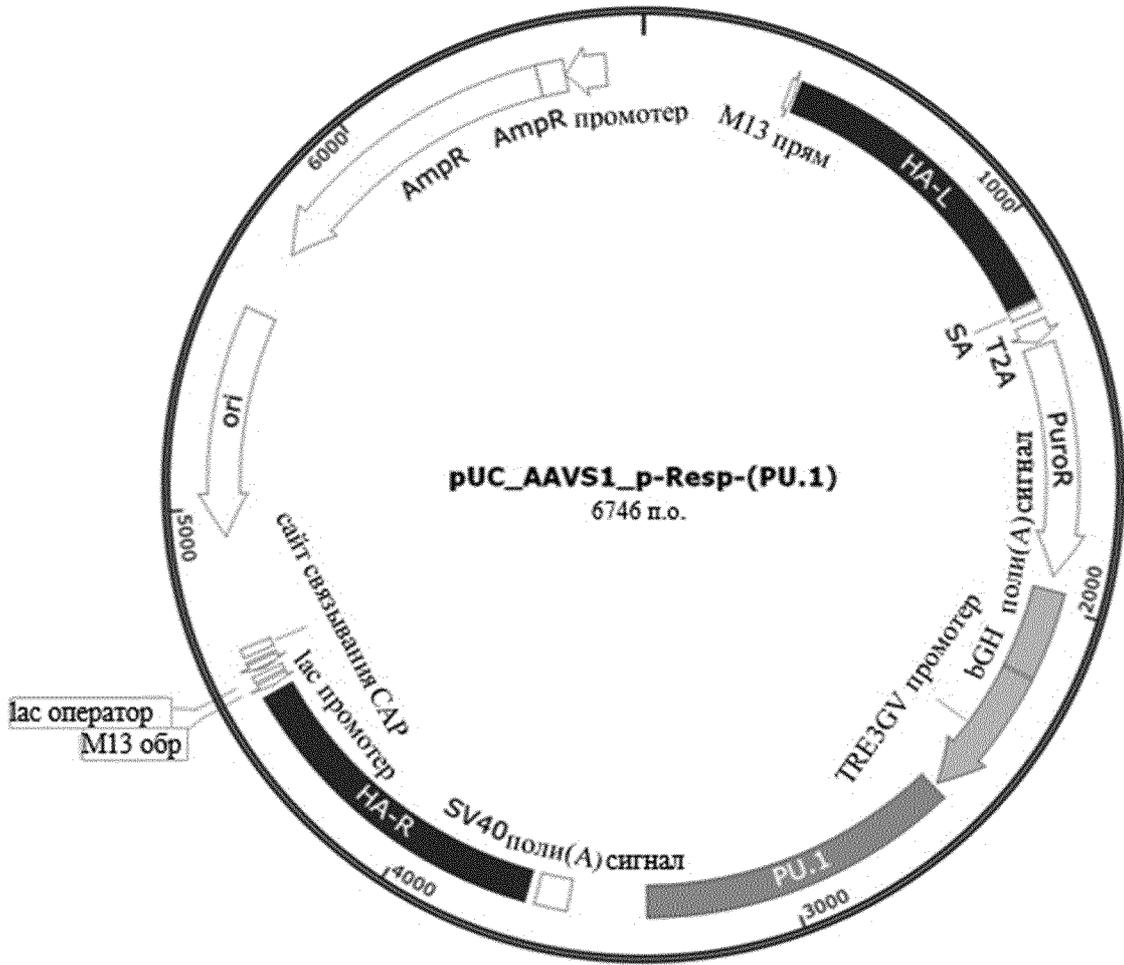
12/20
Фигура 8



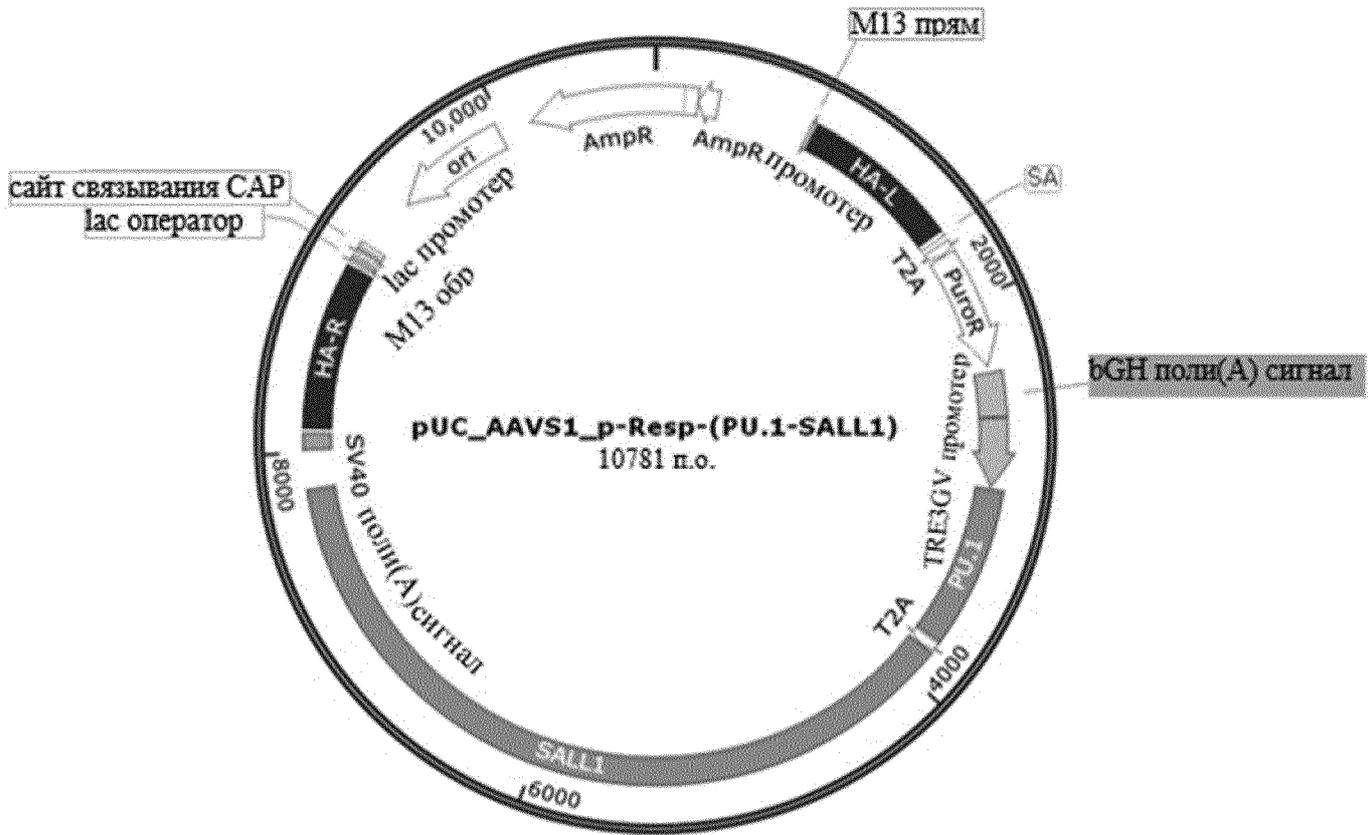
13/20
Фигура 9



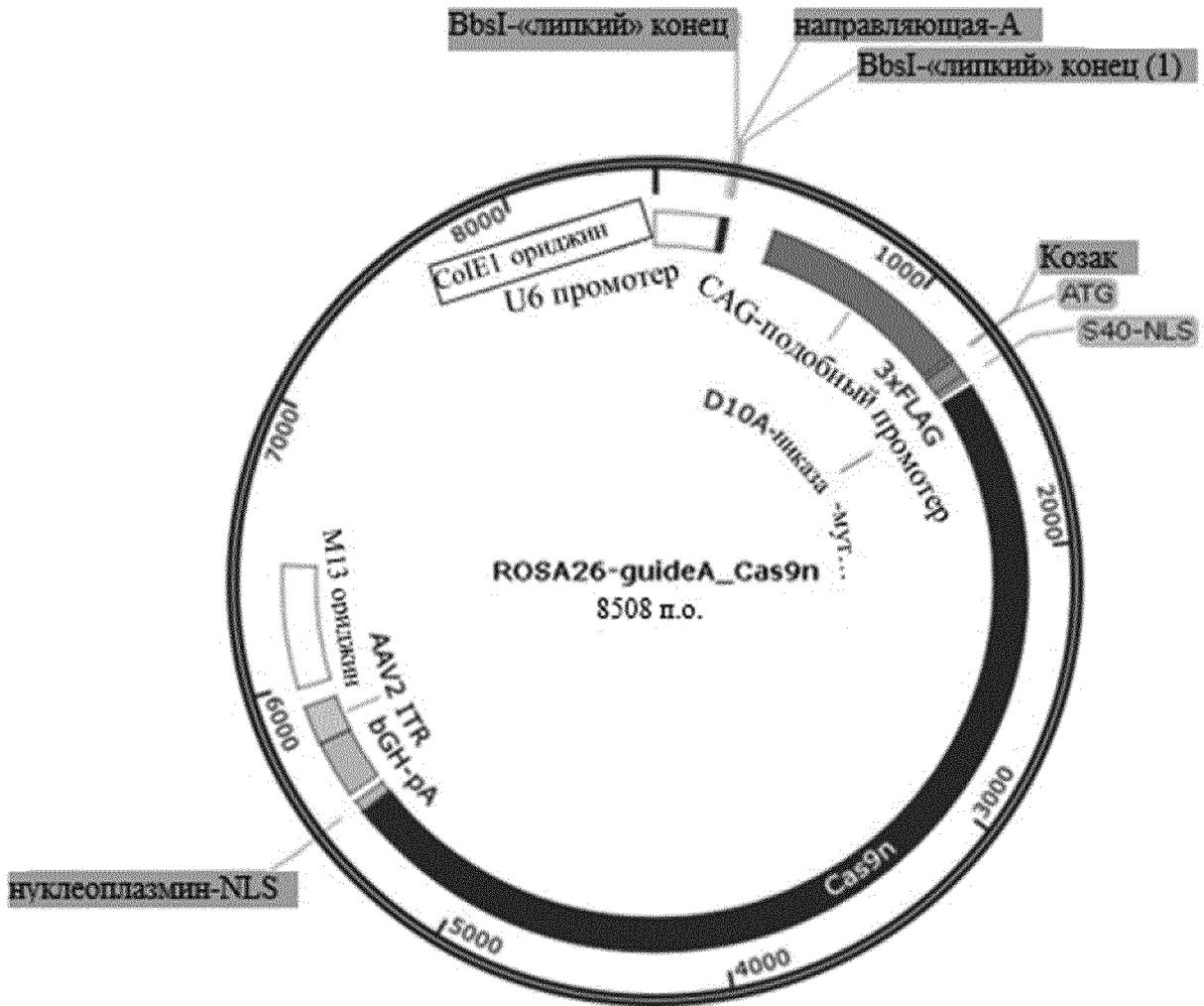
14/20
Фигура 10



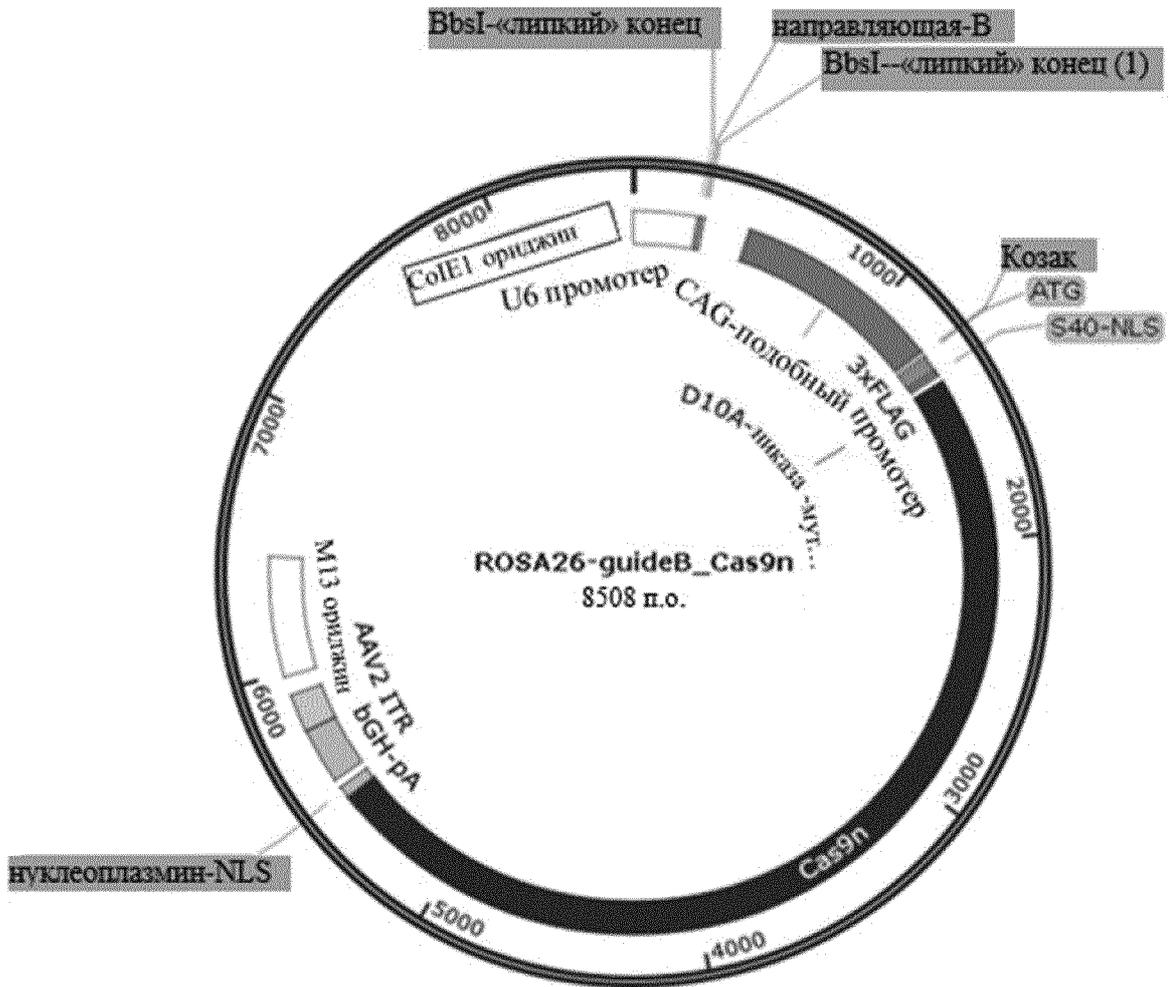
15/20
Фигура 11



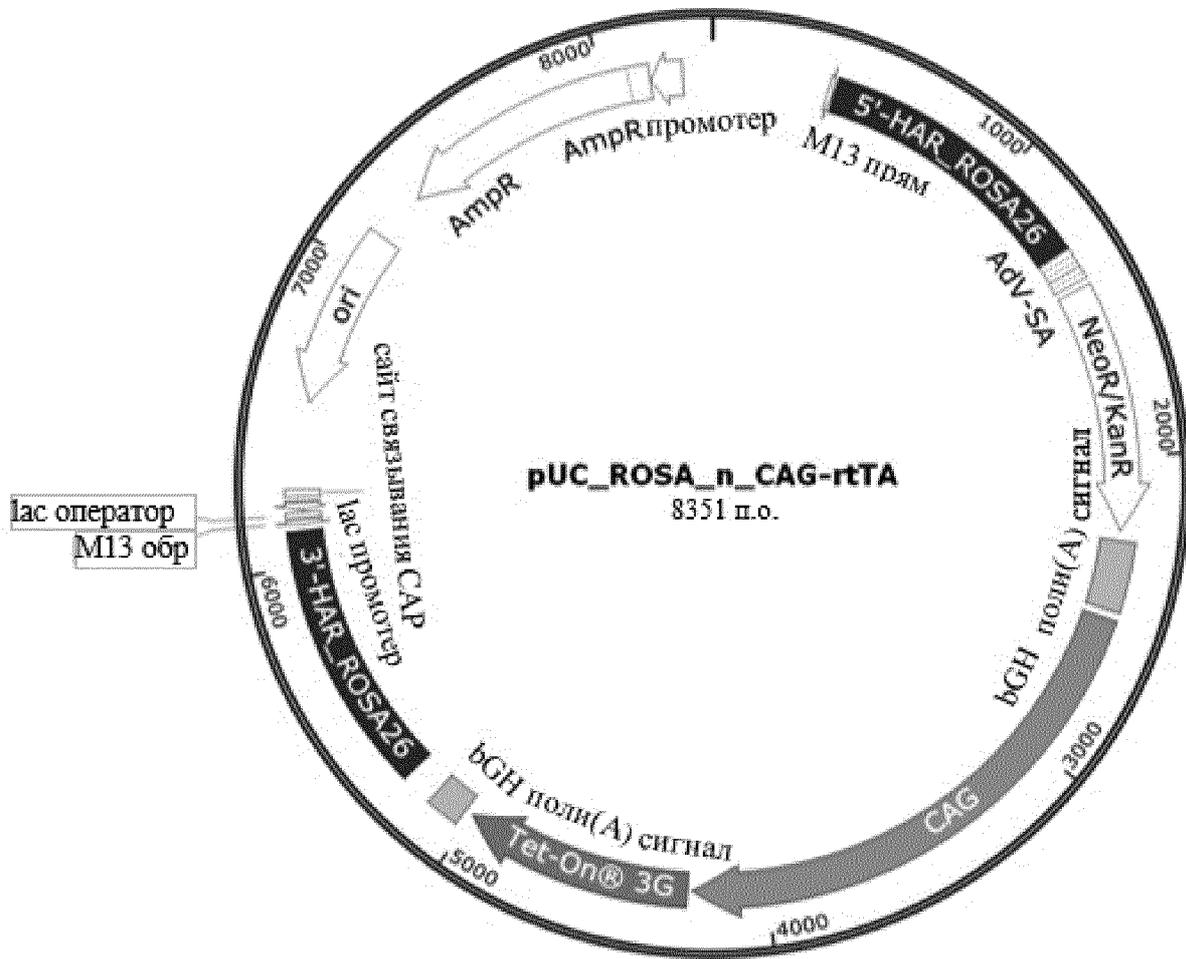
16/20
Фигура 12



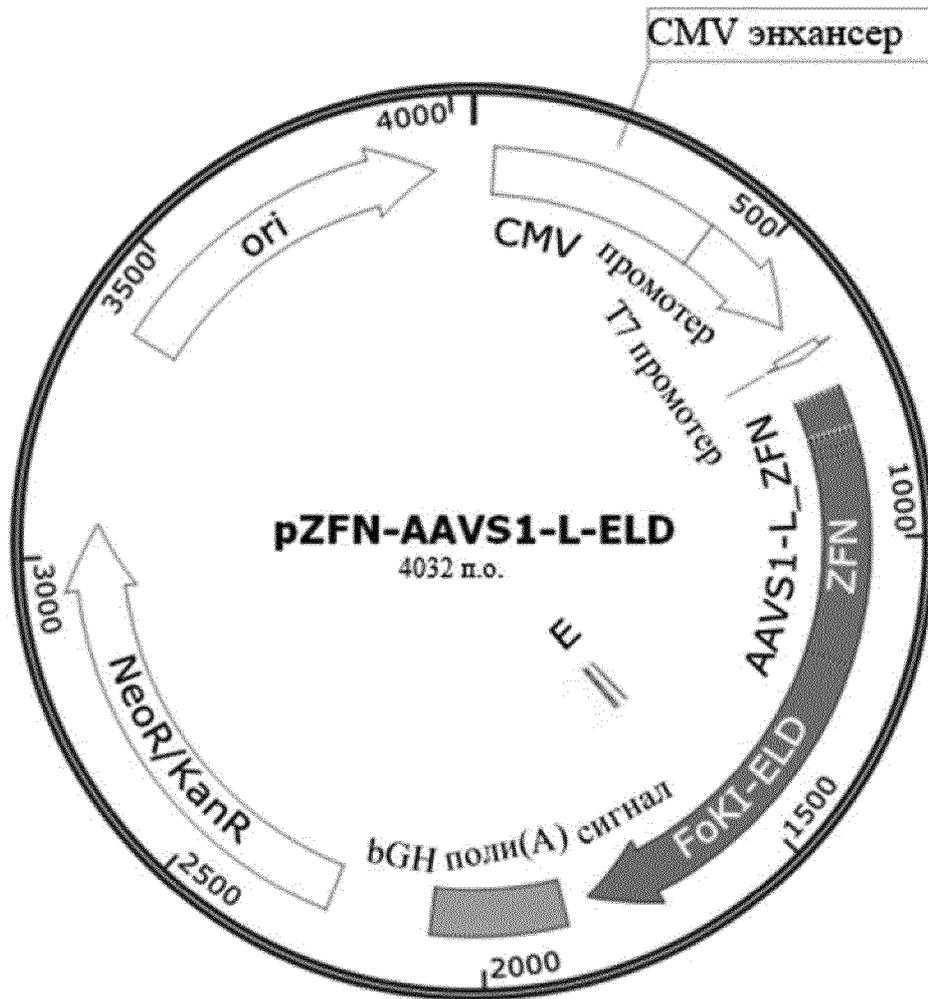
17/20
Фигура 13



Фигура 14



19/20
Фигура 15



20/20
Фигура 16

