



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117321191 A

(43) 申请公布日 2023.12.29

(21) 申请号 202280024768.5

(22) 申请日 2022.01.28

(30) 优先权数据

63/168,065 2021.03.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.09.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/014306 2022.01.28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/211893 EN 2022.10.06

(71) 申请人 特雷尔赫德生物系统股份有限公司

地址 美国俄亥俄州

(72) 发明人 N·阿米尼

(74) 专利代理机构 北京彩和律师事务所 11688

专利代理师 张红春

(51) Int.Cl.

C12N 5/079 (2006.01)

权利要求书3页 说明书13页 附图12页

(54) 发明名称

用于生成少突胶质细胞祖细胞的方法和组合物

(57) 摘要

提供了使用化学成分确定的培养基从人多能干细胞产生人前少突胶质细胞祖细胞 (pre-OPC) 和少突胶质细胞祖细胞 (OPC) 的方法,其允许在短短三天的培养中产生pre-OPC和OPC。还提供了培养基、分离的细胞群和试剂盒。

1. 一种产生人前少突胶质细胞祖细胞 (pre-OPC) 或少突胶质细胞祖细胞 (OPC) 的方法, 其包括:

在缺乏外源添加的生长因子并包含视黄酸 (RA) 通路激动剂、Akt通路激动剂和mTOR通路激动剂的培养基中培养人多能干细胞, 使得产生表达OLIG2的pre-OPC或OPC。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述人多能干细胞是诱导性多能干细胞 (iPSC)。

3. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述人多能干细胞是胚胎干细胞。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法, 其中在所述培养基中开始培养所述人多能干细胞72小时内产生表达OLIG2的pre-OPC或OPC。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法, 其中所述pre-OPC或OPC还表达NKX2-2。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法, 其中所述人多能干细胞在培养期间附着至玻连蛋白包被的板上。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法, 其中所述RA通路激动剂选自: TTNPB、AM 580、CD 1530、CD 2314、Ch 55、BMS 753、他扎罗汀、异维A酸、AC 261066、视黄酸 (RA)、Sr11237、阿达帕林、EC23、9-顺式视黄酸、13-顺式视黄酸、4-氧代视黄酸、全反式视黄酸 (ATRA) 及其组合。

8. 根据权利要求7所述的方法, 其中所述RA通路激动剂以10-100nM的浓度存在于所述培养基中。

9. 根据权利要求8所述的方法, 其中所述RA通路激动剂是TTNPB, 其以50nM的浓度存在于所述培养基中。

10. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法, 其中所述Akt通路激动剂是SC79。

11. 根据权利要求10所述的方法, 其中SC79以0.1-10 μ M的浓度存在于所述培养基中。

12. 根据权利要求10所述的方法, 其中SC79以1 μ M的浓度存在于所述培养基中。

13. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法, 其中所述mTOR通路激动剂选自: MHY1485、3BD0、红景天苷、L-亮氨酸、NV-5138及其组合。

14. 根据权利要求13所述的方法, 其中所述mTOR通路激动剂以0.1-10 μ M的浓度存在于所述培养基中。

15. 根据权利要求14所述的方法, 其中所述mTOR通路激动剂是MHY1485, 其以1 μ M的浓度存在于所述培养基中。

16. 根据权利要求1-15中任一项所述的方法, 其中所述培养基还包含WNT通路拮抗剂和SHH通路激动剂。

17. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述WNT通路拮抗剂选自: XAV939、ICG001、卡马替尼、endo-IWR-1、IWP-2、IWP-4、MSAB、CCT251545、KY02111、NCB-0846、FH535、LF3、WIKI4、雷公藤内酯酮、KYA1797K、JW55、JW 67、JW74、Cardiogen 1、NLS-StAx-h、TAK715、PNU 74654、iCRT3、WIF-1、DKK1及其组合。

18. 根据权利要求17所述的方法, 其中所述WNT通路拮抗剂以50-150nM的浓度存在于所述培养基中。

19. 根据权利要求18所述的方法, 其中所述WNT通路拮抗剂是XAV939, 其以100nM的浓度存在于所述培养基中。

20. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述SHH通路激动剂选自: 嘌吗啡胺、GSA10、SAG

及其组合。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述SHH通路激动剂以250-750nM的浓度存在于所述培养基中。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述SHH通路拮抗剂是嘌呤咖啡胺,其以500nM的浓度存在于所述培养基中。

23. 根据权利要求1-22中任一项所述的方法,其中所述培养基还包含BMP通路拮抗剂。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述BMP通路拮抗剂选自:LDN193189、DMH1、DMH2、多索吗啡、K02288、LDN214117、LDN212854、Folistatin、ML347、Noggin及其组合。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述BMP通路拮抗剂以100-500nM的浓度存在于所述培养基中。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中所述BMP通路拮抗剂是LDN193189,其以250nM的浓度存在于所述培养基中。

27. 根据权利要求1-26中任一项所述的方法,其中所述培养基还包含PKC通路拮抗剂。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述PKC通路拮抗剂选自:Go6983、索曲妥林、恩扎妥林、星形孢菌素、LY31615、Go 6976、GF 109203X、Ro 31-8220甲磺酸盐及其组合。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述PKC通路拮抗剂以50-150nM的浓度存在于所述培养基中。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述PKC通路拮抗剂是Go6983,其以110nM的浓度存在于所述培养基中。

31. 一种产生人前少突胶质细胞祖细胞(pre-OPC)或少突胶质细胞祖细胞(OPC)的方法,其包括:

在缺乏外源添加的生长因子并包含视黄酸(RA)通路激动剂、Akt通路激动剂、mTOR通路激动剂、WNT通路拮抗剂、SHH通路激动剂、BMP通路拮抗剂和PKC通路拮抗剂的培养基中培养人多能干细胞,使得产生表达OLIG2的pre-OPC或OPC。

32. 一种用于获得前少突胶质细胞祖细胞(pre-OPC)或少突胶质细胞祖细胞(OPC)的培养基,其包含视黄酸(RA)通路激动剂、Akt通路激动剂和mTOR通路激动剂并且缺乏外源添加的生长因子。

33. 根据权利要求32所述的培养基,其还包含WNT通路拮抗剂和SHH通路激动剂。

34. 根据权利要求33所述的培养基,其还包含BMP通路拮抗剂和PKC通路拮抗剂。

35. 前少突胶质细胞祖细胞(pre-OPC)或少突胶质细胞祖细胞(OPC)的分离的细胞培养物,所述培养物包含:在培养基中培养的表达式OLIG2的pre-OPC或OPC,所述培养基包含视黄酸(RA)通路激动剂、Akt通路激动剂和mTOR通路激动剂并且缺乏外源添加的生长因子。

36. 根据权利要求35所述的分离的细胞培养物,其中所述培养基还包含WNT通路拮抗剂和SHH通路激动剂,并且其中所述pre-OPC或OPC还表达OTX2和FEZF2。

37. 根据权利要求35或36所述的分离的细胞培养物,其中所述培养基还包含BMP通路拮抗剂和PKC通路拮抗剂。

38. 根据权利要求35-37中任一项所述的分离的细胞培养物,其中所述pre-OPC或OPC附着至玻连蛋白包被的板上。

39. 前少突胶质祖细胞(pre-OPC)或少突胶质祖细胞(OPC),其通过权利要求1-32中任

一项所述的方法产生。

40. 一种包含非天然前少突胶质细胞祖细胞 (pre-OPC) 或少突胶质细胞祖细胞 (OPC) 的组合物, 其中所述pre-OPC或OPC表达OLIG2、NKX2-2、OTX2和FEZF2并且缺乏巢蛋白的表达。

41. 前少突胶质细胞祖细胞 (pre-OPC) 或少突胶质细胞祖细胞 (OPC) 的分离的细胞群, 其包含至少 1×10^6 个表达OLIG2的pre-OPC或OPC, 其中所述细胞群缺乏表达巢蛋白的神经干细胞。

42. 根据权利要求41所述的分离的细胞群, 其中所述pre-OPC或OPC还表达NKX2-2、OTX2和FEZF2。

43. 根据权利要求41或42所述的分离的细胞群, 其中所述pre-OPC或OPC与至少一种抗体结合, 所述抗体结合由所述pre-OPC或OPC表达的至少一种标志物。

用于生成少突胶质细胞祖细胞的方法和组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2021年3月30日提交的美国临时申请US63/168,065的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 政府许可权利

[0004] 本发明是在美国陆军ACC-AGP-RTP授予的资助金编号:W911NF-17-3-0003的政府支持下完成的。政府对本发明享有一定的权利。

[0005] 发明背景

[0006] 少突胶质细胞(OL)是一种神经胶质细胞,其可在轴突周围合成髓鞘。因此,它们对于中枢神经系统(CNS)的神经传导至关重要。更好地了解少突胶质细胞生物学对于开发治疗神经退行性疾病的疗法非常重要,所述神经退行性疾病包括脱髓鞘疾病,如多发性硬化症和脑白质营养不良,以及肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS),其可能涉及疾病后期的脱髓鞘。此外,大脑放射治疗可与少突胶质细胞耗竭的副作用有关,导致认知能力下降和/或运动协调受损。

[0007] 由于成熟的人少突胶质细胞不易从人类受试者中分离出来,因此开发了人少突胶质细胞系以允许对该细胞进行研究。然而,永生化细胞系可能无法模拟天然细胞的完整生物学特性,并且不适合治疗用途。因此,非常需要在体外(如从干细胞)产生人类少突胶质细胞的能力。已报道了用于从人类多能干细胞中分化少突胶质细胞的各种方案。然而,这些方案在少突胶质细胞产量方面仍然低效且可变,并且需要很长的分化时间才能产生髓鞘碱性蛋白(MBP)阳性的少突胶质细胞。

[0008] 早期的方案使用四步工艺(Hu et al. (2009) Nature Protocols 4:1614-1622;也参见Wang et al. (2013) Cell Stem Cell 12:252-264)。该方案首先涉及诱导人胚胎干细胞(hESC)分化为神经上皮细胞历时两周,形成神经管样玫瑰花环,然后用视黄酸(RA)和音猬因子(sonic hedgehog) (SHH)处理10天,产生表达OLIG2的祖细胞。再用成纤维细胞生长因子(FGF2)处理10天,转化为表达OLIG2和NKX2.2的pre-OPC。最后,在没有FGF2的情况下将pre-OPC再培养8-9周以分化为OPC,表达如血小板衍生的生长因子受体 α (PDGFR α)、SOX10和NG2等标志物。因此,使用该方案,需要约24天来生成表达OLIG2的祖细胞,约需要34天来生成表达OLIG2和NKX2.2的pre-OPC,需要约100天获得成熟的少突胶质细胞。Douvaras等人(Stem Cell Reports (2014) 3:250-259)报告了该方案的一个变化版本(variant),但仍需约20天获得pre-OPC,约50天获得OPC,该方案包括用外源添加的生长因子PDGF、IGF-1和HGF培养。

[0009] 随后,报道了替代方案,但这些方案仍然利用约一周的神经诱导和模式化阶段(也称为神经化),然后使用包含外源添加的生长因子诱导表达pre-OPC和OPC标志物的细胞,所述生长因子如FGF2、PDGF、IGF-1和/或HGF,这具体取决于该方案(参见例如,Piao等人(2015) Cell Stem Cell 16:198-210; Douvaras&Fossati (2015) Nature Protocols 10:1143-1154; Livesey等人(2016) Stem Cells 34:1040-1053;和Yamashita等人(2017) PLOS One 12:e0171947)。

[0010] 最近,报道了一个方案,其中hESC首先经过神经诱导产生神经祖细胞(NPC),然后在NPC中过度表达SOX10转录因子(通过病毒转导)并在bFGF存在下进行扩增,从而仅需约20天即可产生MBP阳性少突胶质细胞(Garcia-Leon等人(2018)Stem Cell Reports 10:655-672)。此外,发现小分子抑制剂GANT61对神经干细胞(通过神经化产生)中的SHH通路转录因子GLI1进行短暂和部分抑制,可产生更具迁移性的OPC,并且可以更早地分化为产生髓鞘的少突胶质细胞(Namchaiw等人(2019)Stem Cell Res&Therapy 10:272)。

[0011] 因此,虽然已经取得了一些进展,但仍然需要用于从人多能干细胞中产生少突胶质细胞祖细胞的有效且稳健的方法和组合物。

[0012] 发明概述

[0013] 本公开提供了使用化学成分确定的培养基从多能干细胞产生人pre-OPC和OPC的方法,其允许在短短三天的培养中产生OLIG2和NKX2.2阳性pre-OPC和OPC。所述培养基缺乏血清或其他外源添加的生长因子,并且包含小分子试剂,所述小分子试剂激动或拮抗多能干细胞中的特定信号转导通路活性,从而促进沿OPC谱系的分化,引起细胞成熟和OPC相关的生物标志物的表达。本公开的方法具有以下优点:它们绕过现有技术方案的神经过导步骤并允许多能干细胞直接分化为pre-OPC和OPC,从而显著缩短产生pre-OPC和OPC所需的时间。此外,在培养基中使用小分子试剂可以精确控制培养成分。

[0014] 因此,在一个方面,本公开涉及产生人前少突胶质细胞祖细胞(pre-OPC)或少突胶质细胞祖细胞(OPC)的方法,其包括:

[0015] 在缺乏外源添加的生长因子并包含视黄酸(RA)通路激动剂、Akt通路激动剂和mTOR通路激动剂的培养基中培养人多能干细胞,使得产生表达OLIG2的pre-OPC或OPC。

[0016] 在一个实施方案中,在所述培养基中开始培养人多能干细胞72小时内产生表达OLIG2的pre-OPC或OPC。在一个实施方案中,所述pre-OPC或OPC还表达NKX2-2。

[0017] 在另一个实施方案中,培养基还包含WNT通路拮抗剂。在另一个实施方案中,培养基还包含SHH通路激动剂。在另一个实施方案中,培养基还包含BMP通路拮抗剂。在另一个实施方案中,培养基还包含PKC通路拮抗剂。在各种实施方案中,pre-OPC或OPC还表达OTX2和/或FEZF2。

[0018] 因此,在另一个方面,本公开涉及产生人前少突胶质细胞祖细胞(pre-OPC)或少突胶质细胞祖细胞(OPC)的方法,其包括:

[0019] 在缺乏外源添加的生长因子并包含视黄酸(RA)通路激动剂、Akt通路激动剂、mTOR通路激动剂、WNT通路拮抗剂、SHH通路激动剂、BMP通路拮抗剂和PKC通路拮抗剂的培养基中培养人多能干细胞,使得产生表达OLIG2的pre-OPC或OPC。在其他实施方案中,pre-OPC或OPC还表达NKX2-2、OTX2和/或FEZF2。

[0020] 本文进一步详细描述了合适的激动剂和拮抗剂及其浓度的非限制性实例。

[0021] 在一个实施方案中,人多能干细胞是诱导性多能干细胞(iPSC)。在另一个实施方案中,人多能干细胞是胚胎干细胞。

[0022] 在一个实施方案中,在培养期间人多能干细胞附着至玻连蛋白包被的板上。

[0023] 在另一个方面,本公开涉及用于获得前少突胶质细胞祖细胞(pre-OPC)或少突胶质细胞祖细胞(OPC)的培养基,其包含视黄酸(RA)通路激动剂、Akt通路激动剂和mTOR通路激动剂并且缺乏外源添加的生长因子。在一个实施方案中,培养基还包含WNT通路拮抗剂。

在一个实施方案中,培养基还包含SHH通路激动剂。在一个实施方案中,培养基还包含BMP通路拮抗剂。在一个实施方案中,培养基还包含PKC通路拮抗剂。

[0024] 在另一个方面,本公开涉及前少突胶质细胞祖细胞(pre-OPC)或少突胶质细胞祖细胞(OPC)的分离的细胞培养物,该培养物包含:在培养基中培养的表达式OLIG2的pre-OPC或OPC,所述培养基包含视黄酸(RA)通路激动剂、Akt通路激动剂和mTOR通路激动剂并且缺乏外源添加的生长因子。在一个实施方案中,培养基还包含WNT通路拮抗剂。在一个实施方案中,培养基还包含SHH通路激动剂。在一个实施方案中,培养基还包含BMP通路拮抗剂。在一个实施方案中,培养基还包含PKC通路拮抗剂。在其他实施方案中,pre-OPC或OPC还表达NKX2-2、OTX2和/或FEZF2。在细胞培养物的一个实施方案中,pre-OPC或OPC附着至玻连蛋白包被的板上。

[0025] 在另一个方面,本公开涉及例如通过本公开的方法产生的前少突胶质细胞祖细胞(pre-OPC)或少突胶质细胞祖细胞(OPC)。在一个实施方案中,本公开提供了一种包含非天然前少突胶质细胞祖细胞(pre-OPC)或少突胶质细胞祖细胞(OPC)的组合物,其中所述pre-OPC或OPC表达OLIG2、NKX2-2、OTX2和FEZF2,并且缺乏巢蛋白的表达。

[0026] 在又一个方面,本公开涉及前少突胶质细胞祖细胞(pre-OPC)或少突胶质细胞祖细胞(OPC)的分离的细胞群,其包含至少 1×10^6 个表达式OLIG2的pre-OPC或OPC,其中所述细胞群缺乏表达巢蛋白的神经干细胞。在其他实施方案中,pre-OPC或OPC还表达NKX2-2、OTX2和/或FEZF2。在分离的细胞群的一个实施方案中,pre-OPC或OPC与至少一种抗体结合,所述抗体结合由pre-OPC或OPC表达的至少一种细胞表面标志物。

[0027] 在又一个方面,本公开涉及分离前少突胶质祖细胞(pre-OPC)或少突胶质祖细胞(OPC)的方法,该方法包括:

[0028] 将通过本公开的方法产生的表达式OLIG2的pre-OPC或OPC与至少一种结合剂接触,所述结合剂与由表达式OLIG2的pre-OPC或OPC表达的细胞表面标志物结合;和

[0029] 分离与结合剂结合的细胞,从而分离OPC。

[0030] 在一个实施方案中,结合剂是抗体。

[0031] 从下面的详细描述和所附权利要求中,本发明的其他特征和优点将变得显而易见。

附图说明

[0032] 图1显示了针对NKX2-2的最大表达而优化的8因子实验的HD-DoE模型的结果。模型的上半部分显示了针对NKX2-2优化时预选的53个基因的表达水平的预测。模型的下半部分显示了在此模型中测试的效应物及其对NKX2-2最大表达的贡献。值列是指模拟模型所需的每个效应物的浓度。

[0033] 图2显示了针对PDGFRA的最大表达而优化的8因子实验的HD-DoE模型的结果。上半部分和下半部分如图1所示。这种条件突出了因子贡献为30.05的效应物PD0325901作为PDGFRA高表达的重要输入。

[0034] 图3显示了NKX2-2、OLIG1、OLIG2和PDGFRA基因的表达水平相对于所测试的8个效应物的浓度的动态概况。TTNPB、MHY1485和PD0325901对PDGFRA表达及其因子贡献的正向影响,通过每个效应物的曲线图的斜率显示。虚线框突出与PDGFRA相比,PD0325901对NKX2-2

和OLIG2的相反影响。

[0035] 图4显示了针对OTX2的最大表达而优化的13因子实验的HD-DoE模型的结果。该模型引入了MK2206、PD0325901、CHIR99021、LDN193189、Go6983和PD173074作为OTX2表达的正效应物。

[0036] 图5显示了针对FEZF2的最大表达而优化的13因子实验的HD-DoE模型的结果。该模型证实了LDN193189、MK2206和PD0325901对细胞模式化的正向作用,并引入了其他三个因子,包括SC79、XAV939和噻吗啡胺-500nM。

[0037] 图6显示了OTX2和FEZF2的表达水平相对于该模型中测试的13个因子的浓度的动态概况。XAV939和噻吗啡胺-500nM对FEZF2的表达有显著的正向影响,而对OTX2的表达没有显著的负向影响。

[0038] 图7A-D显示了8因子建模实验中消除过程的动态概况分析及其对NKX2-2、OLIG2和PDGFRA表达的影响。

[0039] 图8A-D显示13因子建模实验中消除过程的动态概况分析及其对FEZF2和OTX2表达的影响。

[0040] 图9显示了在优化的OPC分化培养基中培养三天后的细胞的图像照片。细胞用少突胶质细胞和神经生物标志物染色。细胞表达前神经外胚层生物标志物,包括OTX2和NKX2-2以及OPC特异性生物标志物OLIG2。不存在分别作为神经元和晚期OPC生物标志物的巢蛋白和PDGFRa。KI67的表达显示前体细胞的增殖状态。

[0041] 图10A-B显示了在优化的OPC分化培养基中培养三天后细胞的RNA-seq数据。干细胞基因NANOG和POU5F1的表达水平减少,而参与大脑区域和少突胶质细胞谱系早期发育的基因则升高。

[0042] 发明详述

[0043] 本文描述的是允许使用基于小分子的方法在化学成分确定的培养条件下从人多能干细胞产生pre-OPC和OPC的方法和组合物。本公开的方法具有起始多能干细胞不经历许多现有技术方案所使用的神经诱导的优点。这允许在短短三天内生成pre-OPC和OPC,这比当前方案(平均需要10天生成pre-OPC)要显著更短。

[0044] 如实施例1中所述,使用高维实验设计(High-Dimensional Design of Experiments) (HD-DoE)方法来同时测试多个过程输入(例如,小分子激动剂或拮抗剂)对输出响应(例如基因表达)的影响。这些实验允许鉴定化学成分确定的培养基,其包含特定信号转导通路的激动剂和/或拮抗剂,其足以在非常短的时间内产生pre-OPC或OPC。通过因子关键性分析进一步验证优化的培养基,该分析检查消除单独激动剂或拮抗剂的效果,如实施例2中所述。免疫组织化学进一步证实了通过分化方案产生的细胞的表型,如实施例3中所述。

[0045] 在以下小节中进一步详细描述本发明的各个方面。

[0046] I. 细胞

[0047] 本公开的培养物中使用的起始细胞是人多能干细胞。如本文所用,术语“人多能干细胞”(缩写为hPSC)是指具有分化成多种不同细胞类型的能力的人干细胞。如本文所用,术语“多能”是指在不同条件下具有分化为所有三个胚细胞层(内胚层、中胚层和外胚层)的细胞类型特征的能力的细胞。多能细胞的主要特征在于其分化为所有三个胚层的能力,例如,

使用裸鼠和畸胎瘤形成测定。多能性也可以通过胚胎干 (ES) 细胞标志物的表达来证明, 尽管多能性的首选测试是证明分化为三个胚层中每层细胞的能力。

[0048] 人多能干细胞包括例如诱导性多能干细胞 (iPSC) 和人胚胎干细胞, 例如ES细胞系。诱导性多能干细胞 (iPSC) 的非限制性实例包括19-11-1、19-9-7或6-9-9细胞 (例如, 如 Yu, J. 等人 (2009) Science 324:797-801中所述)。人胚胎干细胞系的非限制性实例包括ES03细胞 (WiCell Research Institute) 和H9细胞 (Thomson, J. A. 等人 (1998) Science 282:1145-1147)。人多能干细胞 (PSC) 表达可用于鉴定细胞是否为PSC的细胞标志物。多能干细胞标志物的非限制性实例包括TRA-1-60、TRA-1-81、TRA-2-54、SSEA1、SSEA3、SSEA4、CD9、CD24、OCT3、OCT4、NANOG和/或SOX2。由于产生本公开的pre-OPC和/或OPC的方法用于分化 (成熟) 起始多能干细胞群, 因此在各个实施方案中, 通过本公开的方法产生的pre-OPC和/或OPC细胞群缺乏选自下组的一个或多个干细胞标志物: TRA-1-60、TRA-1-81、TRA-2-54、SSEA、SSEA3、SSEA4、CD9、CD24、OCT3、OCT4、NANOG和/或SOX2。

[0049] 将多能干细胞置于如本文所述的诱导细胞分化的培养条件下。如本文所用, 术语“分化”是指细胞从更原始阶段向更成熟 (即较不原始) 细胞的发育, 通常表现出定型为特定细胞谱系的表型特征。可通过神经诱导 (神经化) 从人PSC衍生的早期祖细胞是神经前体细胞 (NPC)。如本文所用, “神经前体细胞”或“NPC”是指表达VI型中间丝蛋白巢蛋白的干细胞衍生的祖细胞。由于本公开的产生pre-OPC和/或OPC的方法避免了神经诱导的使用, 因此不产生NPC, 因此在各个实施方案中, 通过本公开的方法产生的细胞群缺乏巢蛋白阳性细胞。

[0050] 在一个实施方案中, 通过本公开的方法产生的细胞是前少突胶质细胞祖细胞 (pre-OPC)。如本文所用, “前少突胶质细胞祖细胞”或“pre-OPC”是指表达细胞标志物OLIG2和NKX2.2的干细胞衍生的祖细胞。pre-OPC可表达其他标志物, 包括但不限于: OTX2 (前神经外胚层生物标志物)、FEZF2 (前外胚层生物标志物) 和/或OLIG1。

[0051] 在一个实施方案中, 通过本公开的方法产生的细胞是少突胶质祖细胞 (OPC), 其是比pre-OPC更加分化 (更加成熟) 的细胞。如本文所用, “少突胶质祖细胞”或“OPC”是指表达细胞标志物OLIG2和NKX2.2以及PDGFRa的干细胞衍生的祖细胞。OPC可以表达其他标志物, 其非限制性实例包括: SOX10 (神经嵴标志物)、OTX2 (前神经外胚层生物标志物)、FEZF2 (前外胚层生物标志物) 和/或OLIG1。

[0052] 通过本公开的方法产生的pre-OPC和OPC可以进一步在体外培养以产生成熟的少突胶质细胞 (OL)。成熟OL的标志物包括但不限于髓鞘碱性蛋白 (MBP) 和O4。

[0053] II. 培养基组分

[0054] 本公开的用于产生pre-OPC或OPC的方法包括在缺乏外源添加的生长因子并且包含细胞信号转导通路的特异性激动剂和/或拮抗剂的培养基中培养人多能干细胞。

[0055] 如实施例1中所述, 包含视黄酸 (RA) 通路激动剂、Akt通路激动剂和mTOR通路激动剂的培养基, 足以在短短三天内产生表达OLIG2和NKX2.2的pre-OPC。包含针对其他标志物的表达进行优化的其他试剂, 包括作为OPC分化标志物的PDGFRa。在其他实施方案中, 培养基还包含至少一种选自下组的其他试剂: WNT通路拮抗剂、SHH通路激动剂、BMP通路拮抗剂和PKC通路拮抗剂。在一个实施方案中, 培养基还包含WNT通路拮抗剂。在一个实施方案中, 培养基还包含SHH通路激动剂。在一个实施方案中, 培养基还包含BMP通路拮抗剂。在一个实施方案中, 培养基还包含PKC通路拮抗剂。在一个实施方案中, 培养基还包含WNT通路拮抗剂。

和SHH通路激动剂,其中分化细胞除了表达OLIG2和NKX2.2之外,还表达OTX2和FEZF2。

[0056] 在一个实施方案中,培养基包含视黄酸(RA)通路激动剂、Akt通路激动剂、mTOR通路激动剂、WNT通路拮抗剂、SHH通路激动剂、BMP通路拮抗剂和PKC通路拮抗剂。在一个实施方案中,分化细胞是至少表达OLIG2、NKX2.2和PDGFRa(并且可以表达另外的标志物,如OTX2、FEZF2和/或OFIG1)的OPC。

[0057] 如本文所用,细胞信号转导通路的“激动剂”意指刺激(上调)细胞信号转导通路的药剂。细胞信号转导通路的刺激可以,例如通过使用激活参与信号转导通路的细胞表面受体的激动剂(例如,激动剂可以是受体配体),在细胞外启动。另外或替代地,细胞信号转导的刺激可以,例如通过使用在细胞内与信号转导通路的组分(一种或多种)相互作用的小分子激动剂,在细胞内启动。

[0058] 如本文所用,细胞信号转导通路的“拮抗剂”意指抑制(下调)细胞信号转导通路的药剂。细胞信号转导通路的抑制可以,例如通过使用阻断参与信号转导通路的细胞表面受体的拮抗剂,在细胞外启动。另外或替代地,细胞信号转导的抑制可以,例如通过使用在细胞内与信号转导通路的组分(一种或多种)相互作用的小分子拮抗剂,在细胞内启动。

[0059] 视黄酸(RA)通路激动剂、Akt通路激动剂、mTOR通路激动剂、WNT通路拮抗剂、SHH通路激动剂、BMP通路拮抗剂和PKC通路拮抗剂是本领域已知的,并且是可商购的。它们以有效达到预期结果(例如产生表达目标标志物的pre-OPC和/或OPC)的浓度用于培养基中。合适的激动剂和拮抗剂的非限制性实例以及有效浓度范围在下文进一步描述。

[0060] RA通路的激动剂包括能够刺激由全反式视黄酸和9-顺式视黄酸二者激活的视黄酸受体(RAR)的试剂、分子、化合物或物质。共有三种RAR:RAR- α 、RAR- β 和RAR- γ ,分别由RARA、RARB、RARG基因编码。已经合成了可以激活视黄酸通路的不同视黄酸类似物。此类化合物的非限制性实例包括:TTNPB(RAR- α 、 β 和 γ 的激动剂)、AM 580(RAR α 激动剂)、CD 1530(有效且选择性的RAR γ 激动剂)、CD 2314(选择性RAR β 激动剂)、Ch 55(有效RAR激动剂)、BMS 753(RAR α 选择性激动剂)、他扎罗汀(受体选择性类视黄醇;结合RAR- β 和RAR- γ)、异维A酸(视黄酸受体的内源性激动剂;神经元分化的诱导剂)和AC 261066(RAR β 2激动剂)。在一些实施方案中,RA信号转导通路激动剂选自:i)类视黄醇化合物,ii)类视黄醇X受体(RXR)激动剂,和iii)25视黄酸受体(RAR)激动剂。在具体实施方案中,RA通路激动剂选自:视黄酸、Sri 1237、阿达帕林、EC23、9-顺式视黄酸、13-顺式视黄酸、4-氧代视黄酸和全反式视黄酸(ATRA)。

[0061] 因此,在一个实施方案中,RA通路激动剂选自:TTNPB、AM 580、CD 1530、CD 2314、Ch 55、BMS 753、他扎罗汀、异维A酸、AC 261066、视黄酸(RA)、Sr11237、阿达帕林、EC23、9-顺式视黄酸、13-顺式视黄酸、4-氧代视黄酸和全反式视黄酸(ATRA)或其组合。在一个实施方案中,RA通路激动剂以5-500nM、或10-100nM、或25-75nM的浓度存在于培养基中。在一个实施方案中,RA通路激动剂是TTNPB。在一个实施方案中,RA通路激动剂是TTNPB,其以5-500nM、或10-100nM、或25-75nM的浓度存在于培养基中。在一个实施方案中,RA通路激动剂是TTNPB,其以50nM的浓度存在于培养基中。

[0062] Akt通路的激动剂包括能够刺激(激活)一个或多个丝氨酸/苏氨酸激酶Akt家族成员的信号转导通路的试剂、分子、化合物或物质,所述家族成员包括Akt1(也称为PKB或RacPK)、Akt2(也称为RKB β 或RacPK- β)和Akt3(也称为PKB γ 或胸腺瘤病毒原癌基因3)。在一

个实施方案中,Akt通路激动剂是泛Akt激活剂。在一个实施方案中,泛Akt激活剂是SC79。在一个实施方案中,Akt通路激动剂以0.1-10 μ M的浓度存在于培养基中。在一个实施方案中,Akt通路激动剂是SC79。在一个实施方案中,Akt通路激动剂是SC79,其以0.1-10 μ M、或0.5-5 μ M、或0.5-2.5 μ M、或0.5-1.5 μ M的浓度存在于培养基中。在一个实施方案中,Akt通路激动剂是SC79,其以1 μ M的浓度存在于培养基中。

[0063] mTOR (哺乳动物雷帕霉素靶标) 通路的激动剂包括能够通过mTOR (PI3K相关激酶家族成员,其是mTORC1和mTORC2复合物的核心成分) 刺激 (激活) 信号转导的试剂、分子、化合物或物质。在一个实施方案中,mTOR通路激动剂选自:MHY1485、3BD0、红景天苷、L-亮氨酸、NV-5138及其组合。在一个实施方案中,mTOR通路激动剂以0.1-10 μ M、或0.5-5 μ M、或0.5-2.5 μ M、或0.5-1.5 μ M的浓度存在于培养基中。在一个实施方案中,mTOR通路激动剂是MHY1485。在一个实施方案中,mTOR通路激动剂是MHY1485,其以0.1-10 μ M、或0.5-5 μ M、或0.5-2.5 μ M、或0.5-1.5 μ M的浓度存在于培养基中。在一个实施方案中,mTOR通路激动剂是MHY1485,其以1 μ M的浓度存在于培养基中。

[0064] WNT通路的拮抗剂包括能够抑制 (下调) 经典Wnt/ β -连环蛋白信号转导通路的试剂、分子、化合物或物质,该信号转导通路在生物学上通过Wnt-蛋白配体与卷曲家族受体的结合而被激活。在一个实施方案中,WNT通路拮抗剂选自:XAV939、ICG001、卡马替尼、endo-IWR-1、IWP-2、IWP-4、MSAB、CCT251545、KY02111、NCB-0846、FH535、LF3、WIKI4、雷公藤内酯酮、KYA1797K、JW55、JW 67、JW74、Cardiogen 1、NLS-StAx-h、TAK715、PNU 74654、iCRT3、WIF-1、DKK1及其组合。在一个实施方案中,WNT通路拮抗剂以10-500nM、50-250nM、或50-150nM的浓度存在于培养基中。在一个实施方案中,WNT通路拮抗剂是XAV939。在一个实施方案中,WNT通路拮抗剂是XAV939,其以10-500nM、50-250nM、或50-150nM的浓度存在于培养基中。在一个实施方案中,WNT通路拮抗剂是XAV939,其以100nM的浓度存在于培养基中。

[0065] SHH (音猬因子) 通路的激动剂包括能够通过SHH通路刺激 (激活) 信号转导的试剂、分子、化合物或物质,该SHH通路在生物学上涉及SHH与Patched-1 (PTCH1) 受体的结合以及通过Smoothed (SMO) 跨膜蛋白的转导。在一个实施方案中,SHH通路激动剂选自:嘌吗啡胺、GSA10、SAG及其组合。在一个实施方案中,SHH通路激动剂以100-1000nM、或250-750nM、或400-600nM的浓度存在于培养基中。在一个实施方案中,SHH通路拮抗剂是嘌吗啡胺。在一个实施方案中,SHH通路拮抗剂是嘌吗啡胺,其以100-1000nM、或250-750nM、或400-600nM浓度存在于培养基中。在一个实施方案中,SHH通路拮抗剂是嘌吗啡胺,其以500nM的浓度存在于培养基中。

[0066] BMP (骨形态发生蛋白) 通路的拮抗剂包括能够抑制 (下调) BMP信号转导通路的试剂、分子、化合物或物质,该BMP信号转导通路在生物学上通过BMP与BMP受体 (激活素受体样激酶) (ALK) (例如,I型BMP受体,包括但不限于ALK2和ALK3) 的结合而被激活。在一个实施方案中,BMP通路拮抗剂选自:LDN193189、DMH1、DMH2、多索吗啡、K02288、LDN214117、LDN212854、Folistatin、ML347、Noggin及其组合。在一个实施方案中,BMP通路拮抗剂以100-1000nM、150-750nM、100-500nM、或150-350nM的浓度存在于培养基中。在一个实施方案中,BMP通路拮抗剂是LDN193189。在一个实施方案中,BMP通路拮抗剂是LDN193189,其以100-1000nM、150-750nM、100-500nM、或150-350nM的浓度存在于培养基中。在一个实施方案中,BMP通路拮抗剂是LDN193189,其以250nM的浓度存在于培养基中。

[0067] PKC (蛋白激酶C) 通路的拮抗剂包括能够抑制(下调) PKC信号转导通路的试剂、分子、化合物或物质,该PKC信号转导通路在生物学上由PKC家族成员介导。丝氨酸/苏氨酸激酶的PKC家族包含十五种同工酶,包括“经典”PKC亚类,其包含亚型 α 、 β 1、 β 2和 γ 。在一个实施方案中,PKC通路拮抗剂抑制选自PKC α 、PKC β 1、PKC β 2和PKC γ 中的至少一个(并且在其他实施方案中,至少两个或三个)PKC酶的活性。在一个实施方案中,PKC通路拮抗剂选自:Go 6983、索曲妥林、恩扎妥林、星形孢菌素、LY31615、Go 6976、GF 109203X、Ro 31-8220甲磺酸盐及其组合。在一个实施方案中,PKC通路拮抗剂以10-500nM、50-300nM、50-150nM、或75-150nM的浓度存在于培养基中。在一个实施方案中,PKC通路拮抗剂是Go 6983。在一个实施方案中,PKC通路拮抗剂是Go 6983,其以10-500nM、50-300nM、50-150nM、或75-150nM的浓度存在于培养基中。在一个实施方案中,PKC通路拮抗剂是Go 6983,其以110nM的浓度存在于培养基中。

[0068] III. 培养条件

[0069] 与以上第II小节中描述的化学成分确定且优化的培养基相组合,本公开产生pre-OPC和OPC的方法利用本领域中建立的用于细胞培养的标准培养条件。例如,细胞可以在37 $^{\circ}$ C、5% O₂和5% CO₂条件下培养。细胞可以在标准培养容器或板(如96孔板)中培养。在某些实施方案中,起始多能干细胞粘附至板,优选地用细胞外基质材料(如玻连蛋白)包被的板上。在一个实施方案中,干细胞在玻连蛋白包被的培养物表面(例如,玻连蛋白包被的96孔板)上培养。

[0070] 多能干细胞可以在分化前在市售培养基中培养。例如,在启动分化方案之前,干细胞可以在Essential 8Flex培养基(Thermo Fisher#A2858501)中培养至少一天。在非限制性示例性实施方案中,干细胞以150,000个细胞/cm²的密度传代到玻连蛋白(Thermo Fisher#A14700)包被的96孔板上,并在分化前在Essential 8Flex培养基中培养一天。

[0071] 为了开始分化方案,将培养干细胞的培养基改为如上文第II小节中所述的补充有信号转导通路激动剂和/或拮抗剂的基础分化培养基。基础分化培养基可以包括例如补充有维持细胞活力和生长所需的其他标准培养基成分的市售基质,但该基质缺乏血清(基础分化培养基是无血清培养基)或任何其他外源添加的生长因子,如FGF2、PDGF、IGF或HGF。在非限制性示例性实施方案中,基础分化培养基含有1mg/ml的1x IMDM(Thermo Fisher#12440046)、1x F12(Thermo Fisher#11765047)、聚乙烯醇(Sigma#p8136)、1%化学成分确定的脂质浓缩液(Thermo Fisher#11905031)、450 μ M的1-硫代甘油(Sigma#M6145)、0.7 μ g/ml胰岛素(Sigma#11376497001)和15 μ g/ml转铁蛋白(Sigma#10652202001)。

[0072] 培养基通常定期更换为新鲜培养基。例如,在一个实施方案中,每24小时更换一次培养基。

[0073] 为了产生pre-OPC和/或OPC,将干细胞在优化的培养基中培养足够的时间,以进行细胞分化和表达pre-OPC或OPC相关的标志物。如实施例所述,已发现干细胞在优化培养基中培养短至72小时(3天)足以用于pre-OPC和OPC分化。因此,在一个实施方案中,将细胞培养至少72小时。在其他实施方案中,将细胞培养至少60、64、68、72、76、80、84、88、92或96小时。在其他实施方案中,将细胞培养至少2.5、3、3.5、4、4.5或5天。

[0074] IV. 用途

[0075] 本公开的用于产生pre-OPC和OPC的方法和组合物允许这些细胞群有效且稳健地

用于多种用途。例如,所述方法和组合物可用于少突胶质细胞发育和生物学的研究,以帮助理解少突胶质细胞相关的疾病和病症。例如,使用本公开的方法产生的pre-OPC和/或OPC,可以根据本领域建立的方法使用与在细胞上表达的表面标志物结合的试剂进一步纯化。因此,在一个实施方案中,本公开提供了一种分离前少突胶质细胞祖细胞(pre-OPC)或少突胶质细胞祖细胞(OPC)的方法,该方法包括:

[0076] 将通过本公开的方法产生的表达OLIG2的pre-OPC或OPC与至少一个与由pre-OPC或OPC表达的细胞表面标志物结合的结合剂接触;和

[0077] 分离与结合剂结合的细胞,从而分离pre-OPC或OPC。

[0078] 在一个实施方案中,结合剂是抗体,例如与细胞表面标志物结合的单克隆抗体(mAb)。合适的OPC细胞表面标志物的非限制性实例包括PDGFR α 、O4和A2B5。结合抗体的细胞可以通过本领域已知的方法,包括但不限于荧光激活细胞分选(FACS)和磁激活细胞分选(MACS)进行分离。

[0079] 还考虑了通过将细胞递送至患有疾病或病症的受试者,将少突胶质细胞谱系的祖细胞用于治疗各种少突胶质细胞相关的疾病和病症。少突胶质细胞相关的疾病和病症的实例,包括但不限于:多发性硬化症(MS)、进行性多灶性白质脑病、脑室周围白质软化、某些脑白质营养不良和肌萎缩侧索硬化症(ALS)。

[0080] V. 组合物

[0081] 在其他方面,本公开提供了与产生pre-OPC和OPC的方法相关的组合物(包括培养基和细胞培养物),以及分离的祖细胞和细胞群。

[0082] 在一方面,本公开提供了用于获得pre-OPC或OPC的培养基,所述培养基缺乏外源添加的生长因子并且包含视黄酸(RA)通路激动剂、Akt通路激动剂和mTOR通路激动剂。在一个实施方案中,培养基还包含WNT通路拮抗剂。在一个实施方案中,培养基还包含SHH通路激动剂。在一个实施方案中,培养基还包含WNT通路拮抗剂和SHH通路激动剂。在一个实施方案中,培养基还包含BMP通路拮抗剂。在一个实施方案中,培养基还包含PKC通路拮抗剂。在一个实施方案中,培养基还包含BMP通路拮抗剂和PKC通路拮抗剂。在一个实施方案中,培养基包含视黄酸(RA)通路激动剂、Akt通路激动剂、mTOR通路激动剂、WNT通路拮抗剂、SHH通路激动剂、BMP通路拮抗剂和PKC通路拮抗剂。

[0083] 在一方面,本公开提供了pre-OPC或OPC的分离的细胞培养物,该培养物包含:在包含视黄酸(RA)通路激动剂、Akt通路激动剂和mTOR通路激动剂并且缺乏外源添加的生长因子的培养基中培养的表达式OLIG2的pre-OPC或OPC。在各个实施方案中,培养基还可以包含WNT通路拮抗剂、SHH通路激动剂、BMP通路拮抗剂和/或PKC通路拮抗剂。在一个实施方案中,pre-OPC或OPC还表达NKX2.2。在其他实施方案中,pre-OPC或OPC还表达OTX2和FEZF2。在一个实施方案中,pre-OPC或OPC附着至玻连蛋白包被的板上。

[0084] 在另一个方面,本公开提供了通过本公开的分化方法产生的前少突胶质祖细胞(pre-OPC)或少突胶质祖细胞(OPC)。在一个实施方案中,本公开提供了一种组合物,其包含非天然的pre-OPC或OPC,其中pre-OPC或OPC表达OLIG2、NKX2-2、OTX2和FEZF2并且缺乏巢蛋白的表达。在另一个实施方案中,本公开提供了包含至少 1×10^6 个表达式OLIG2和NKX2.2的pre-OPC或OPC的分离的pre-OPC或OPC细胞群,其中所述细胞群缺乏表达巢蛋白的神经干细胞。在其他实施方案中,细胞群包含至少 5×10^6 个、 1×10^7 个、 5×10^7 个、 1×10^8 个、 5×10^8 个、或

1×10^9 个表达OLIG2和NKX2.2的pre-OPC或OPC。在分离的细胞群的一个实施方案中,pre-OPC或OPC与至少一个抗体结合,所述抗体结合由pre-OPC或OPC表达的至少一个细胞表面标志物。合适的OPC细胞表面标志物的非限制性实例包括PDGFRa、04和A2B5。

[0085] 本发明通过以下实施例进一步说明,但不应将其视为进一步限制。本申请通篇引用的附图以及所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容均明确地通过引用并入本文。

实施例

[0086] 实施例1:用于产生干细胞衍生的少突胶质细胞祖细胞的培养方案的开发

[0087] 在此实施例中,开发了一种用于生成少突胶质细胞祖细胞的培养基配方,其可以在培养3天后引导人多能干细胞分化为表达NKX2-2和OLIG2的少突胶质细胞祖细胞。这些细胞可以进一步分化为成熟的少突胶质细胞。

[0088] 此实施例采用高维实验设计(HD-DoE)方法,如Bukys等人(2020) *Iscience* 23:101346之前所述。该方法采用计算机化的设计几何结构来同时测试多个过程输入,并提供深层效应物/响应空间的数学建模。该方法允许找到控制复杂过程(如在细胞分化过程中)的组合信号转导输入。它允许测试多个看似合理的关键过程参数,因为这些参数会影响输出响应,如基因表达。由于基因表达提供了例如人类细胞表型的标志特征,因此该方法可用于鉴定和了解哪些信号转导通路控制细胞命运。在当前实施例中,应用HD-DOE方法的目的是寻找直接从多能干细胞状态诱导少突胶质细胞祖细胞表达基因的条件。

[0089] 具体来说,为了开发一种生成少突胶质细胞的新方法,在3天的治疗后,测试了多个信号转导通路的激动剂和拮抗剂(本文称为效应物)对两组53个预选基因的表达的影响。这些效应物是在干细胞逐步分化为特定细胞命运(fates)过程中常用的小分子。效应物的选择基于当前关于前外胚层神经诱导和干细胞向少突胶质细胞分化的文献。

[0090] HD-DoE#1

[0091] 为了测试效应物,设计了至少8个因子的实验,可以评估细胞对一定浓度范围内的48个或更多不同效应物组合的反应。为了分析模型,我们重点关注前神经外胚层和少突胶质细胞早期发育过程中表达的基因的表达,所述基因包括NKX2-2、OLIG2、OLIG1和PDGFRA。每个效应物对基因表达水平的影响由称为因子贡献的参数定义,该参数是在建模过程中为每个效应物计算的。

[0092] 如图1总结的结果所示,当针对NKX2-2最大表达量12480.6进行优化时,一个模型特别显示了NKX2-2和OLIG2基因上调的有希望的结果。该模型测试了8个因子:PD0325901、MK2206、TTNPB、SC79、MHY1485、ZM336372、AGN193109和AZD3147。

[0093] 在测试的8个因子中,其中TTNPB(视黄酸通路激动剂)、SC79(Akt信号通路激动剂)和MHY1485(mTOR信号通路激动剂)3个因子对靶基因的表达具有显著的正向作用,其中TTNPB的作用最大,因子贡献为31.3,MHY1485的因子贡献为13.8,SC79的因子贡献为1.47。这些因子均可显著上调NKX2-2和OLIG2的表达。OLIG1和PDGFRA的平均表达水平(分别为129.9和346.45)与少突胶质细胞分化过程中的基因表达模式相一致。

[0094] 如图2总结的结果所示,该模型中PDGFRA的归一化表达可以达到高至832.9,这是所有模型中最高的表达水平,因此,该模型也针对PDGFRA的最大表达量进行了优化。这个设置显示,TTNPB(视黄酸通路激动剂)和MHY 1485(mTOR信号转导通路激动剂)对PGFRA的上调

也有正向作用,因子贡献分别为49.01和13.4。还观察到PD0325901可以对该基因产生显著的正向作用,因子贡献为30.6。由于ZM336372的低因子贡献(<1),该因子未包含在配方中。在此条件下,OLIG1的平均表达水平为228.36,与NKX2-2的优化条件相似。该条件下的一个差异是OLIG2基因从先前条件下的1049.4下调至241.9。

[0095] 如图3总结的结果所示,在对NKX2-2、OLIG2或PDGFRA表达水平有正向贡献的效应物中,有两个因子对NKX2-2和OLIG2表达水平产生负向作用。因此,这两个因子PD0325901和ZM336372被从少突胶质细胞分化配方的候选物列表中删除。

[0096] 因此,该第一HD-DoE筛选鉴定出缺乏外源添加的生长因子并且包含视黄酸通路激动剂、Akt信号转导通路激动剂和mTOR信号转导通路激动剂的培养基,其足以在培养3天(72小时)后引起从多能干细胞产生表达OLIG2的OPC。

[0097] HD-DoE#2

[0098] 为了进一步增强少突胶质细胞多能性分化的条件,我们进行了额外的HD-DoE实验。我们获得了用于准备分化方案的额外基因调控模型。其基础是13因子HD-DoE实验,重点关注细胞向前神经外胚层分化的启动。在此模型中,我们重点关注FEZF2和OTX2的表达。

[0099] 如图4总结的结果所示,该模型针对OTX2的最高表达为12755.9进行了优化。根据OTX2高表达模型,包括MK2206、PD0325901、CHIR99021、LDN193189、Go6983、PD173074和BLU9931的7个效应物具有正向贡献,其中MK2206的因子贡献最高,因子贡献为22.2;PD173074和BLU9931的因子贡献最低,因子贡献为1.7。

[0100] 如图5总结的结果所示,该模型针对FEZF2的最高表达为4466进行了优化。当模型针对FEZF2的最大表达水平进行优化时,包括因子贡献为19.5的LDN193189、因子贡献为14.6的PD0325901和因子贡献为12.3的MK2206的三个效应物与之前的情况相同,并且引入了三个新的效应物,包括嘌呤吗啡胺-500nM、XAV939和SC79。

[0101] 如图6总结的结果所示,为了微调配方并找到OTX2和FEZF2二者高表达的最佳因子组合,进行了动态概况分析。根据该分析,XAV939(WNT信号转导通路的抑制剂)和嘌呤吗啡胺(SHF1信号转导通路的激动剂,因在大脑区域发育过程中使细胞腹侧化而闻名)对FEZF2的表达具有显著的正向作用,并且对OTX2的表达水平没有负向作用。因此,将这两个因子添加到优化的培养配方中。

[0102] 除了包含促进OPC相关表面标志物表达的因子外,优化的培养配方中还消除了某些抑制此类标志物表达的因子。WNT信号转导通路激动剂CHIR99021被消除。MK2206和PD0325901也被消除,因为根据8因子模型,它们对少突胶质细胞基因的表达有负向影响。PD173074和BLU9931也因因子贡献低(1.7)而被消除。

[0103] 总结

[0104] 考虑到这两种模型,使人类诱导性多能干细胞最大化分化为具有少突胶质细胞祖细胞(OPC)身份的细胞的培养条件,引起OTX2、FEZF2、NKX2-2和OLIG2表达升高,包括以下效应物输入:TTNPB(RA通路激动剂)、SC79(Akt通路激动剂)、MHY1485(mTOR通路激动剂)、嘌呤吗啡胺(SHH通路激动剂)、XAV939(WNT通路拮抗剂)、LDN193189(BMP通路拮抗剂)和Go6983(PKC通路拮抗剂)。

[0105] 实施例2:OPC诱导培养条件的因子关键性分析

[0106] 为了评估实施例1中描述的优化培养基中每个组分的因子关键性,我们在消除单

个效应物同时保留其他效应物存在的条件下,对结果进行了计算机模拟预测分析。为此,我们在设定点使用动态概况分析,同时比较在不存在每个因子的情况下目标基因的表达水平。由于目标基因的表达揭示了是否可以达到预期的结果,因此该因子关键性分析揭示了每个输入效应物的重要性程度。

[0107] 图7A-D总结了效应物TTNPB (RA通路激动剂)、SC79 (Akt通路激动剂)和MHY1485 (mTOR通路激动剂)的因子关键性分析的结果。图7A显示了当模型另外针对NKX2-2的最大表达进行优化时,在存在TTNPB、MHY1485和SC79的情况下目标OPC基因的表达水平。如图7B所示,去除TTNPB后,NKX2-2、OLIG2和PDGFRA的预测表达水平显著下降,其中NKX2-2从超过12000降至4500,OLIG2从1000降至400,以及PDGFRA从350降至低于100。这一结果表明当RA通路激动剂被去除时,对所有所需标志物的表达产生显著的有害影响。如图7C所示,当MHY1485被去除时,表达水平再次降低,但是没有先前条件那么剧烈。如图7D所示,当SC79被去除时,仅观察到图中的小变化,这表明对于获得最大OPC标志物诱导,该因子不如TTNPB和MHY1485那么重要。

[0108] 图8A-D总结了效应物嘌呤吗啡胺 (SHH通路激动剂)、XAV939 (WNT通路拮抗剂)、LDN193189 (BMP通路拮抗剂)和Go6983 (PKC通路拮抗剂)的因子关键性分析的结果。为了获得大脑前区少突胶质细胞群的所需模式,查询了这些额外的因子如FEZF2和OTX2的输入。当模型针对FEZF2的最大表达进行优化时,在不存在LDN193189、XAV、嘌呤吗啡胺或Go6983中任一种的情况下,检查FEZF2和OTX2的表达水平。最显著的变化是在不存在LDN193189的情况下观察到的,这导致FEZF2的表达减少了近50% (从4500减少到2500)。OTX2的表达也从9000减少到7000,这是所有四个消除过程中最低的。当XAV939和嘌呤吗啡胺被去除时,FEZF2的表达水平分别下降至3000和3500,而OTX2的表达在两种情况下仅稍高。当Go6983被去除时,我们没有观察到目标基因的表达水平有任何显著变化,因此表明Go6983是可选的,与FEZF2和OTX2的控制相关。

[0109] 实施例3:干细胞衍生的OPC的免疫细胞化学验证

[0110] 为了进一步验证实施例1中描述的优化培养基,将细胞在优化培养基中培养3天,并使用免疫细胞化学来评估前神经外胚层和少突胶质细胞祖细胞的生物标志物的表达。生物标志物包括OTX2和少突胶质细胞前体生物标志物,包括NKX2-2、OLIG2和PDGF。巢蛋白是一种早期神经元标志物,用于区分神经干细胞和少突胶质细胞祖细胞。Ki67还用于确认诱导后细胞的增殖。代表性的免疫组织化学结果示于图9中。这些免疫细胞化学图像证实大多数细胞表达OTX2。然而,没有检测到神经元生物标志物巢蛋白的痕迹,这证实了分化的OPC群缺乏神经干细胞。在超过90%的细胞中还观察到OLIG2和NKX2-2的表达,从而证实了细胞的少突胶质细胞谱系。没有细胞表达预期的PDGFR,因为该基因在少突胶质细胞分化的后期阶段表达。

[0111] 实施例4:干细胞衍生的Pre-OPC的RNA-seq验证

[0112] 使用RNA测序来获得在实施例1和2中详述的分化培养基中培养的细胞的基因谱。将hiPSC在培养基中培养3天,并通过标准RNA-seq分析对来自生成的细胞的RNA进行测序。结果如图10A所示,其显示了第0天和第3天的三个重复中,代表脑的各个区域、早期少突胶质细胞身份 (NKX2-2、OLIG2、PDGFRA)和干细胞状态 (NANOG、POU5F1)的选定基因的归一化表达水平。结果表明,pre-OPC细胞中干细胞基因水平下降,而少突胶质细胞基因水平增加,这

验证了使用分化培养基将hiPSC分化为少突胶质细胞谱系。结果如图10B所示,其显示了所选基因的差异表达和倍数变化,其中HOXA1处于最高水平(15),而OLIG2、NKX2-2和PDGFRa处于5。该数据证明了开发的配方作为第一阶段培养基在引导细胞朝向少突胶质细胞身份方面的能力。

[0113] 等同物

[0114] 本领域技术人员将认识到或能够仅仅使用常规实验来确定本文描述的本发明的具体实施方案的许多等同物。这些等同物旨在被所附权利要求涵盖。

目标	设定点(#19)	替代的设定点					
	响应	标准	值	图	log(D)	失败的概率	Cpk
24	MAFB	预测的	262.762	■			
25	MAF	预测的	1513.6	■			
26	MEF2C	预测的	32.2549	■			
27	MKI67	预测的	4271.5	■			
28	NETO1	预测的	84.0921	■			
29	NETO2	预测的	5207.9	■			
30	NEUROD6	预测的	61.0956	■			
31	NKX2-1	预测的	3594.47	■			
32	NKX2-2	最大化	12480.6	■	-1.34983	19%	0.29305
33	NPAS1	预测的	6.28653	■			
34	NPY	预测的	24.7324	■			
35	NR2F1	预测的	3138.48	■			
36	NR2F2	预测的	2196.53	■			
37	NKXPH1	预测的	-27.3136	■			
38	OLIG1	预测的	129.939	■			
39	OLIG2	预测的	1049.37	■			
40	PAX6	预测的	1248.23	■			
41	PDGFRA	预测的	346.458	■			
42	POU3F2	预测的	402.112	■			
43	PROX1	预测的	613.532	■			
44	PVALB	预测的	158.934	■			
45	RELN	预测的	1271.24	■			
46	RUNX1TI	预测的	261.165	■			
47	SATB1	预测的	3604.89	■			
48	SOX10	预测的	-6.22496	■			
49	SOX2	预测的	67561.9	■			
50	SP8	预测的	254.048	■			
51	SST	预测的	3239.19	■			
52	TUBB3	预测的	19466.2	■			
53	VIM	预测的	72202.5	■			
54	ZIC1	预测的	1526.61	■			

因子	作用	值	图	因子贡献
1	PD0325901	无	■	17.3982
2	ZM336372	无	■	16.8484
3	MK2206	无	■	8.96926
4	SC79	无	■	1.47518
5	AGN193109	无	■	1.7969
6	TTNBP	无	■	31.2673
7	AZD3147	无	■	8.46043
8	MHY1485	无	■	13.7844

图1

目标		设定点(#19)		替代的设定点				
	响应	标准	值	图	log(D)	失败的概率	Cpk	
24	MAFB	预测的	502.928	■				
25	MAF	预测的	1041.46	■				
26	MEF2C	预测的	292.265	■				
27	MKI67	预测的	6304.16	■				
28	NETO1	预测的	177.072	■				
29	NETO2	预测的	4452.29	■				
30	NEUROD6	预测的	122.783	■				
31	NKX2-1	预测的	2232.01	■				
32	NKX2-2	预测的	3335.38	■				
33	NPAS1	预测的	1.41842	■				
34	NPY	预测的	38.0745	■				
35	NR2F1	预测的	4260.34	■				
36	NR2F2	预测的	4398.83	■				
37	NKXPH1	预测的	-5.47688	■				
38	OLIG1	预测的	228.358	■				
39	OLIG2	预测的	241.971	■				
40	PAX6	预测的	7874.96	■				
41	PDGFRA	最大化	832.98	■	-0.60206	22%	0.247347	
42	POU3F2	预测的	239.865	■				
43	PROX1	预测的	777.062	■				
44	PVALB	预测的	63.8672	■				
45	RELN	预测的	920.133	■				
46	RUNX1TI	预测的	565.708	■				
47	SATB1	预测的	3654.04	■				
48	SOX10	预测的	-4.01141	■				
49	SOX2	预测的	56097.1	■				
50	SP8	预测的	434.992	■				
51	SST	预测的	1861.62	■				
52	TUBB3	预测的	13831	■				
53	VIM	预测的	26669.6	■				
54	ZIC1	预测的	404.143	■				

	因子	作用	值	图	因子贡献
1	PD0325901	无	100	■	30.0553
2	ZM336372	无	1	■	0.427593
3	MK2206	无	0	■	1.1434
4	SC79	无	0	■	0.835633
5	AGN193109	无	0	■	2.5985
6	TTNBP	无	50	■	49.0142
7	AZD3147	无	0	■	2.46744
8	MHY1485	无	2	■	13.4579

图2

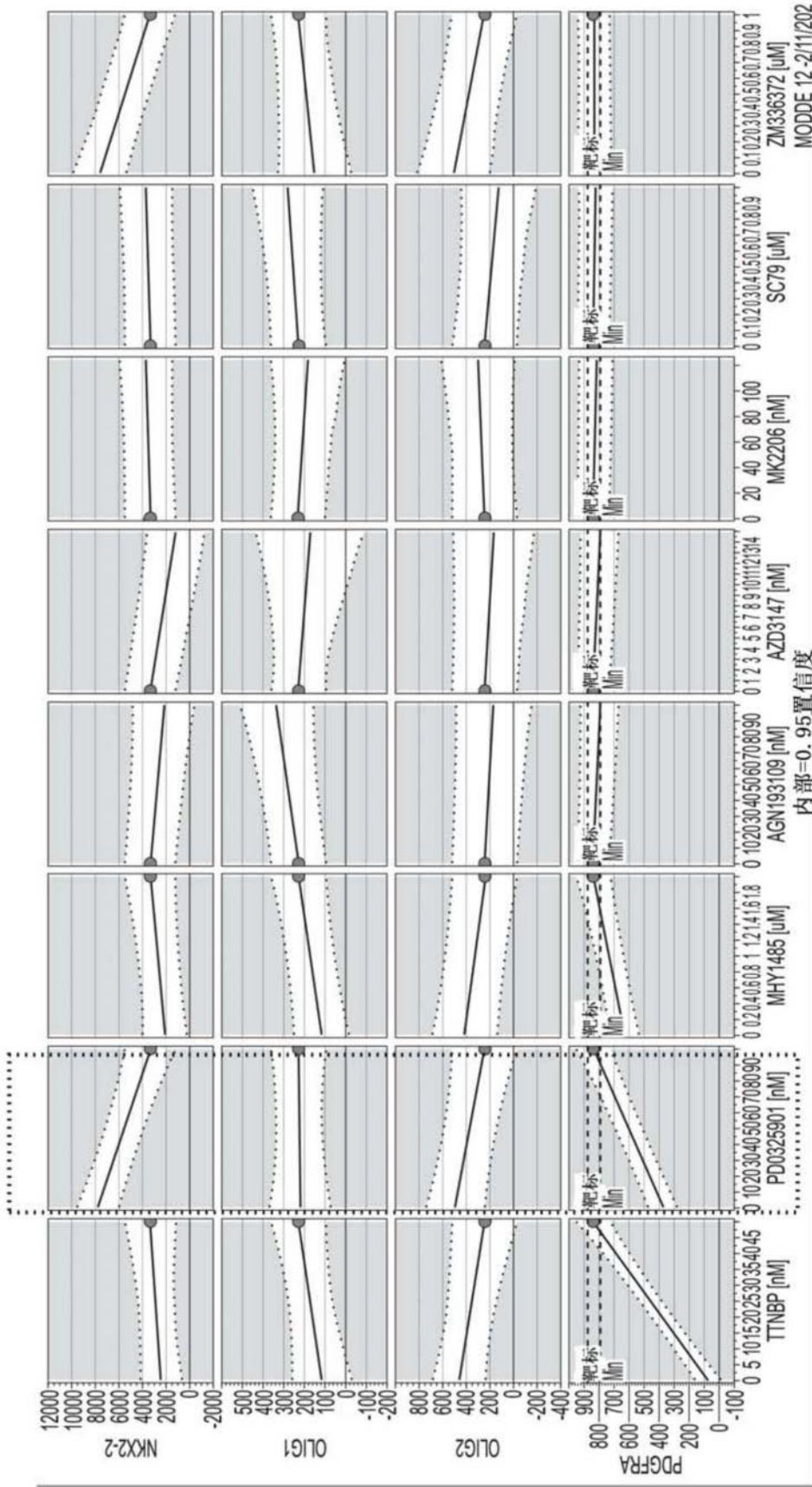


图3

目标	设定点(#19)	替代的设定点				log(D)	失败的概率	Cpk
	响应	标准	值	图				
19	HES1	预测的	330.554	■				
20	HMGB2	预测的	14870.5	■				
21	HMX2	预测的	-6.64705	■				
22	HOXB1	预测的	-0.378681	■				
23	IRX3	预测的	696.214	■				
24	ISL1	预测的	-26.1116	■				
25	ISL2	预测的	-17.4699	■				
26	LHX4	预测的	68.0646	■				
27	LMO1	预测的	905.208	■				
28	LMO3	预测的	305.228	■				
29	LMX1A	预测的	604.987	■				
30	LMX1B	预测的	-112.196	■				
31	MKI67	预测的	1461.79	■				
32	NEUROD1	预测的	0.550277	■				
33	NEUDOD6	预测的	22.9791	■				
34	NEUROG1	预测的	48.9105	■				
35	NEUROG2	预测的	57.2419	■				
36	NFE2L3	预测的	202.664	■				
37	NKX6-2	预测的	33.9382	■				
38	NR2F6	预测的	2901.11	■				
39	NR4A2	预测的	2.57416	■				
40	OLIG2	预测的	39.718	■				
41	OTX2	最大化	12755.9	■		-10	0.88%	0.777651
42	PITX2	预测的	-5.0266	■				
43	PITX3	预测的	5.75851	■				
44	POU4F1	预测的	14.1262	■				
45	SIX3	预测的	-2385.95	■				
46	TCF3	预测的	7666.44	■				
47	TERF2	预测的	1103.74	■				
48	TH	预测的	-0.189617	■				
49	VIM	预测的	10365.4	■				
50	WNT1	预测的	447.584	■				
51	WNT8B	预测的	157.511	■				
52	LHX3	预测的	-0.494643	■				

	因子	作用	值	图	因子贡献
1	LDN193189	无	248.736	■	11.9807
2	PD173074+BLU9931	无	49.994	■	1.79948
3	嘌呤吗啡胺 500	无	18.6918	■	2.03588
4	嘌呤吗啡胺 200	无	9.2549	■	0.38661
5	SC79	无	0.988981	■	5.75937
6	MK2206	无	124.722	■	22.2839
7	ZM336372	无	0.415081	■	3.84831
8	PD0325901	无	99.9991	■	18.0824
9	CHIR99021	无	0.99711	■	13.5337
10	XAV939	无	0.134963	■	1.98982
11	UCLA_GP130_2	无	0.0207014	■	3.64899
12	托法替尼	无	0.2591	■	12.0135
13	GO6983	无	95.5821	■	2.63741

图4

目标		设定点(#19)	替代的设定点					
	响应	标准	值	图	log(D)	失败的概率	Cpk	
1	RNA	预测的	240.061					
2	ALDH1A1	预测的	0.50181					
3	ASCL1	预测的	1.73552					
4	BARHL1	预测的	339.575					
5	DBX2	预测的	0.750382					
6	DDC	预测的	-0.676181					
7	DMBX1	预测的	613.121					
8	EN1	预测的	0.439595					
9	EN2	预测的	-0.0220256					
10	ETV4	预测的	50.9694					
11	FERD3L	预测的	51.6771					
12	FEV	预测的	-0.0817658					
13	FEZF2	最大化	4466		-10	0.02%	1.25582	
14	FOXA1	预测的	142.511					
15	FOXA2	预测的	1111.45					
16	FOXD2	预测的	24.5731					
17	GATA3	预测的	253.497					
18	GBX2	预测的	1.25974					
19	HES1	预测的	996.596					
20	HMGB2	预测的	17929.3					
21	HMX2	预测的	19.6778					
22	HOXB1	预测的	0.384939					
23	IRX3	预测的	181.478					
24	ISL1	预测的	26.9557					
25	ISL2	预测的	118.897					
26	LHX4	预测的	541.817					
27	LMO1	预测的	1135.94					
28	LMO3	预测的	138.926					
29	LMX1A	预测的	240.188					
30	LMX1B	预测的	5.61555					
31	MKI67	预测的	2490.26					
32	NEUROD1	预测的	1.62807					
33	NEUROD6	预测的	44.8253					
34	NEUROG1	预测的	57.8583					

	因子	作用	值	图	因子贡献
1	LDN193189	无	244.52		19.4571
2	PD173074+BLU9931	无	38.0259		5.11884
3	嘌呤吗啡胺 500	无	488.02		9.76177
4	嘌呤吗啡胺 200	无	47.0196		3.29792
5	SC79	无	0.999847		6.31136
6	MK2206	无	124.995		12.2943
7	ZM336372	无	0.0372426		9.80767
8	PD0325901	无	98.3146		14.5858
9	CHIR99021	无	0.809146		5.31386
10	XAV939	无	99.9993		12.5423
11	UCLA_GP130_2	无	0.564196		0.385926
12	托法替尼	无	72.4413		0
13	GO6983	无	34.9768		1.12322

图5

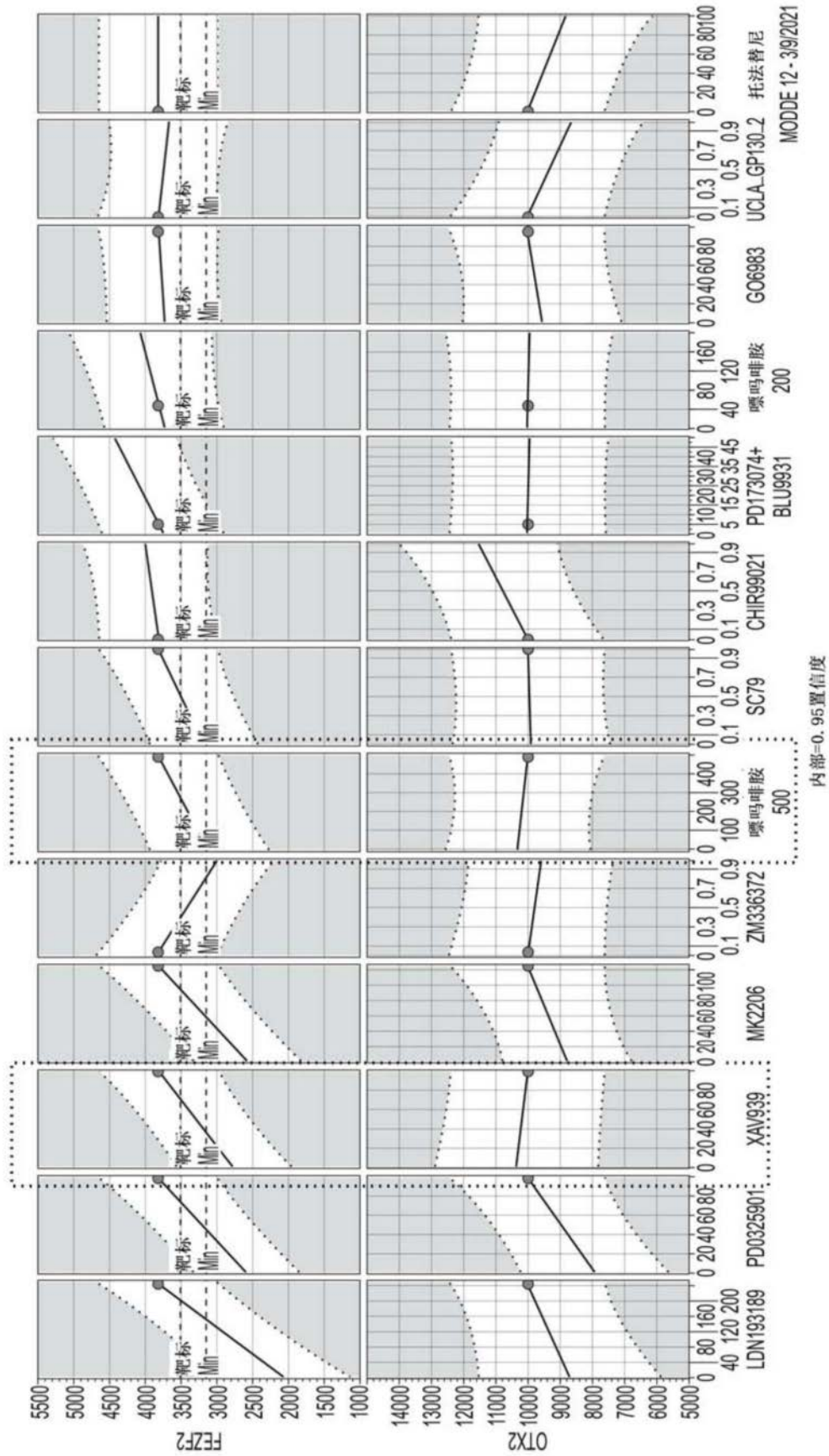


图6

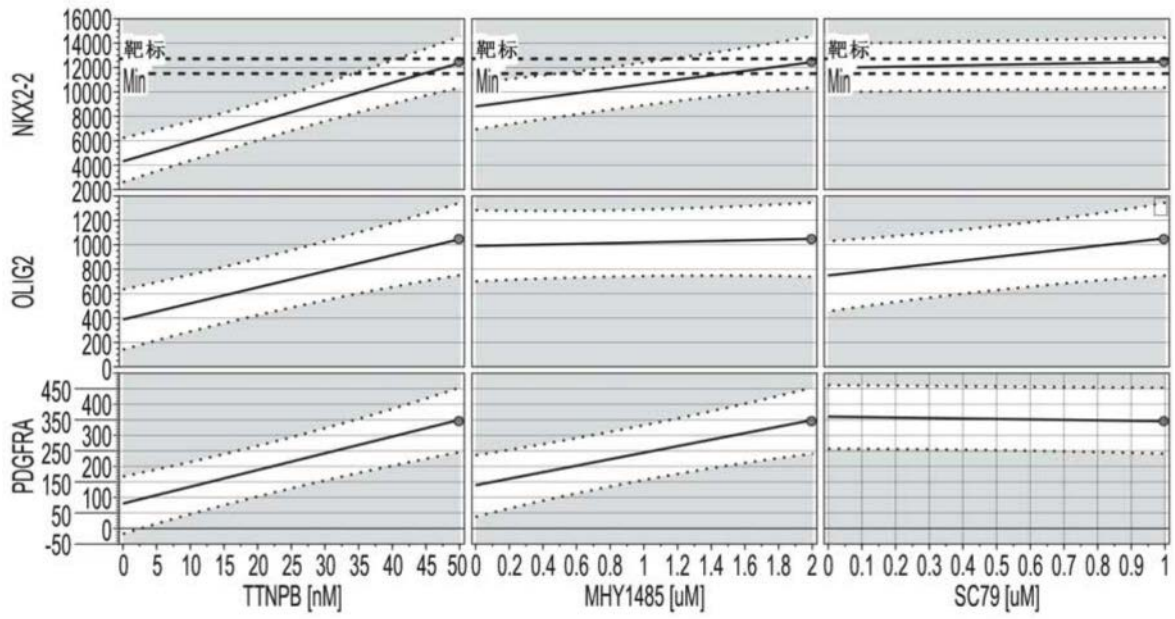


图7A

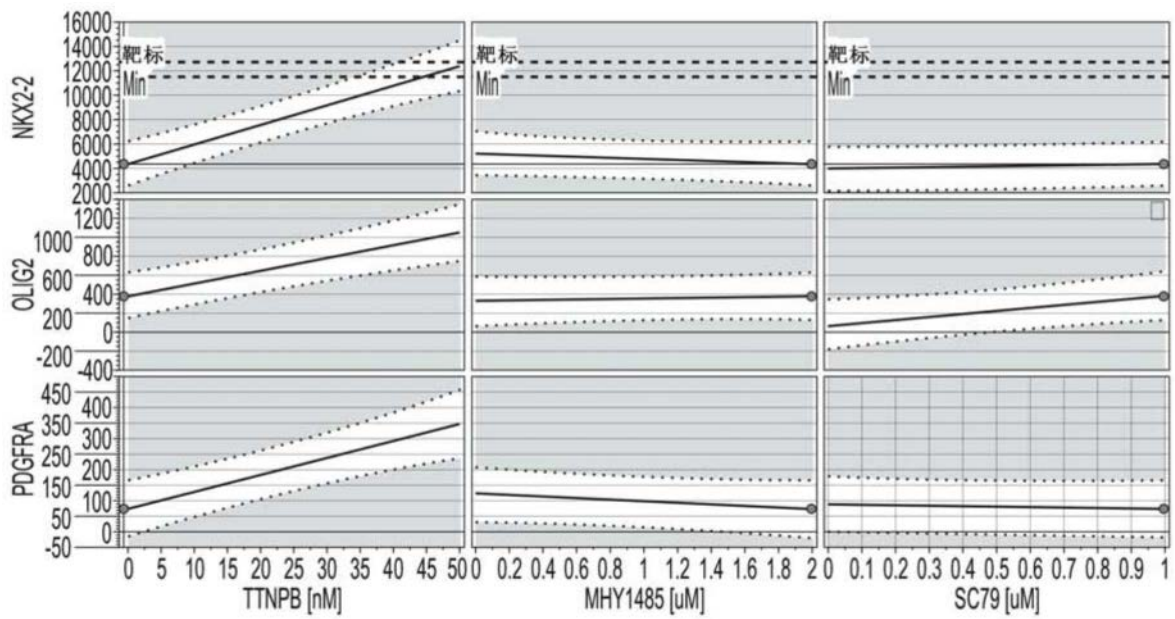


图7B

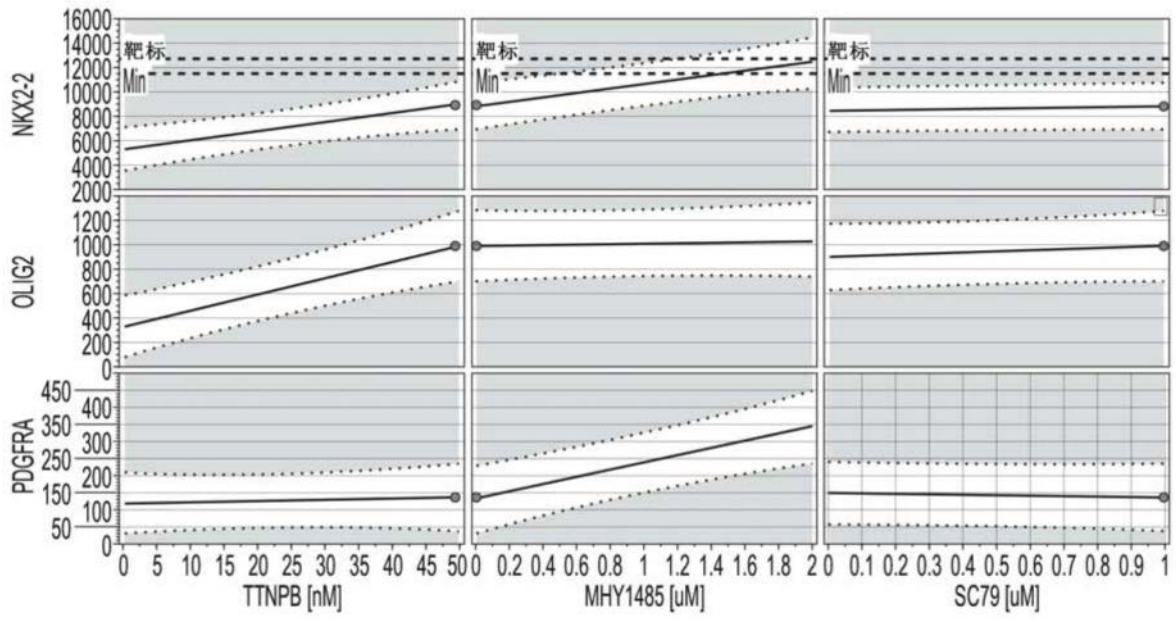


图7C

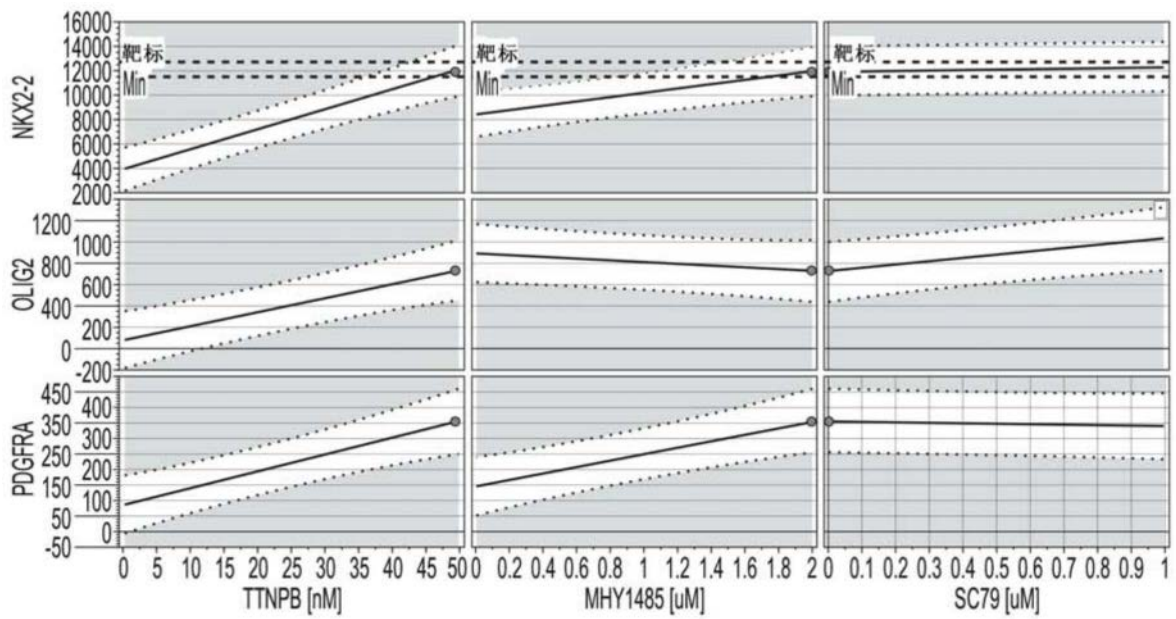


图7D

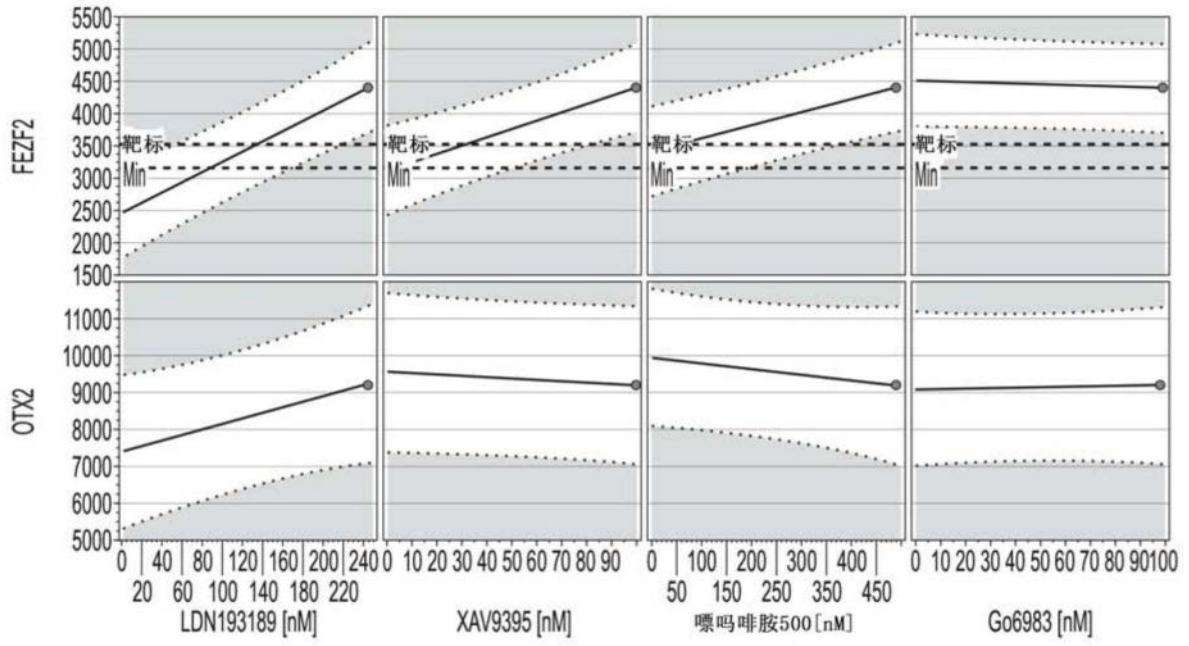


图8A

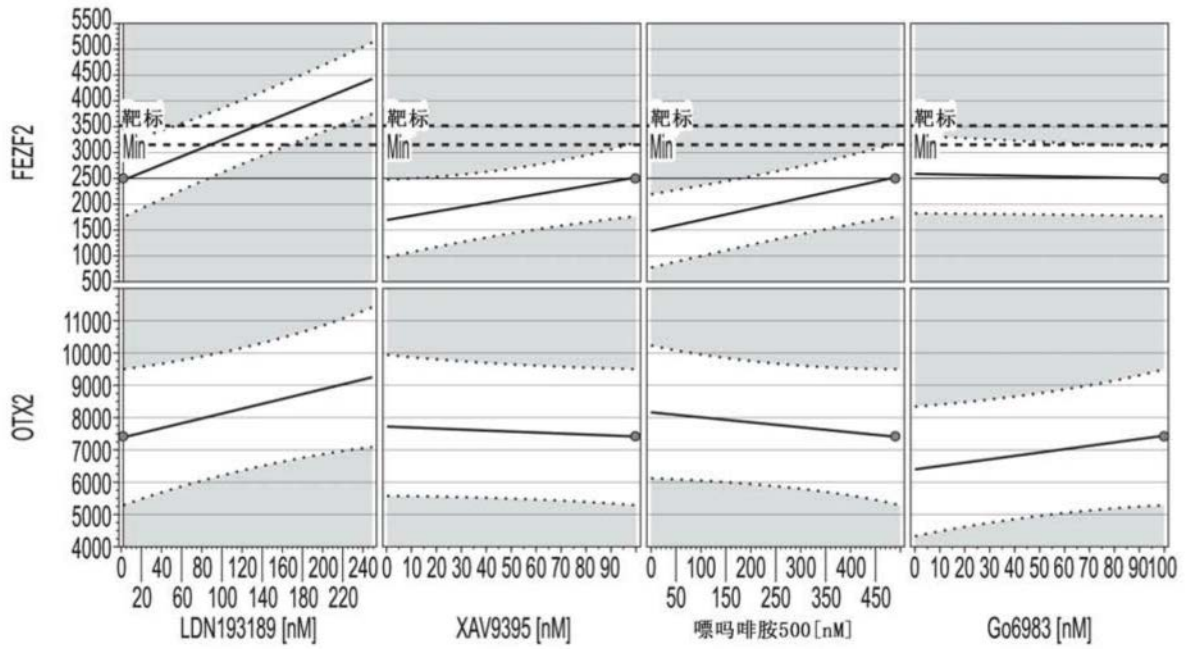


图8B

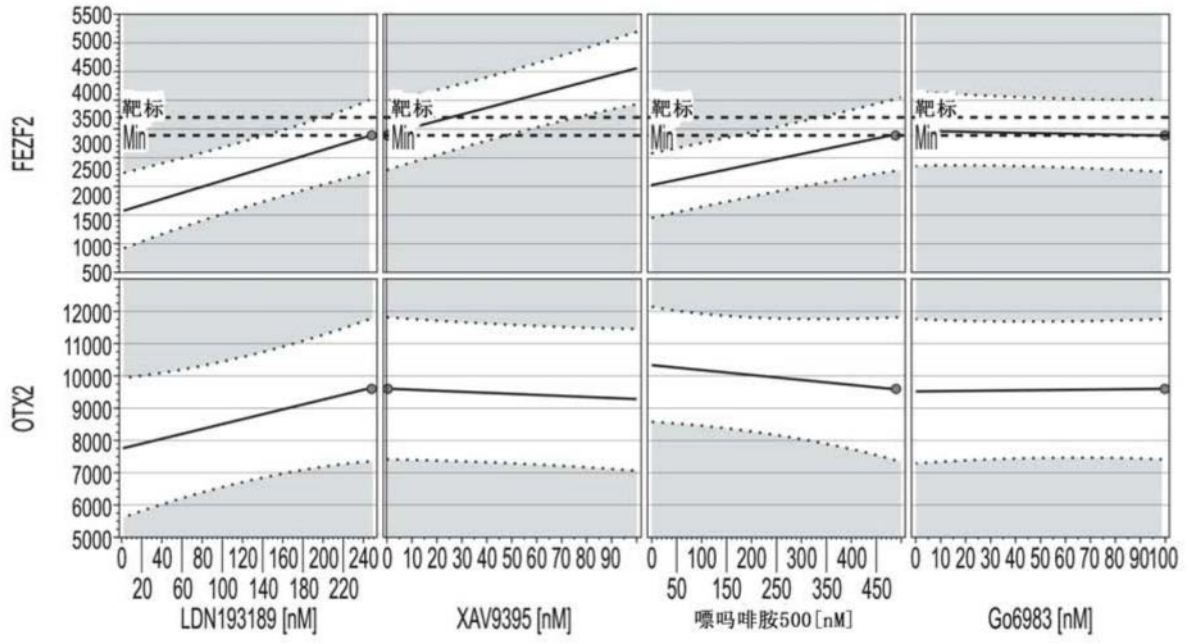


图8C

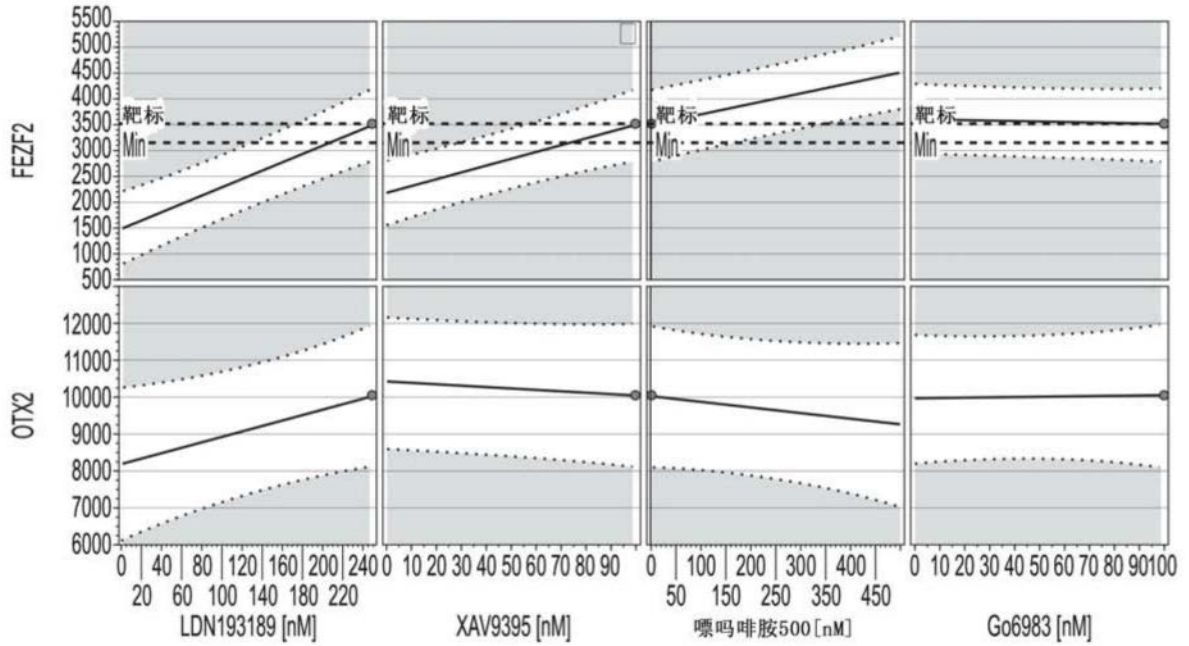


图8D

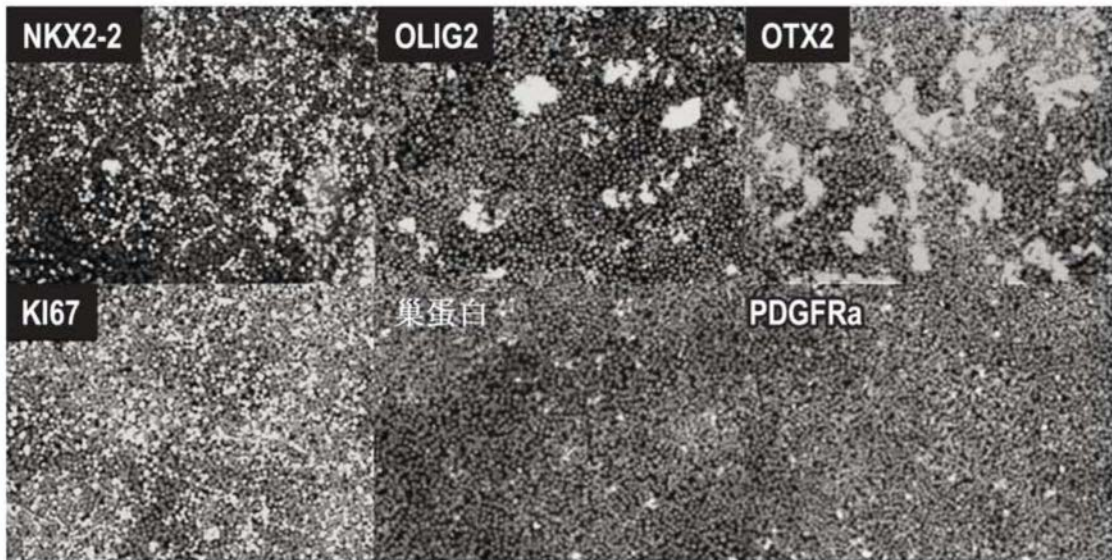


图9

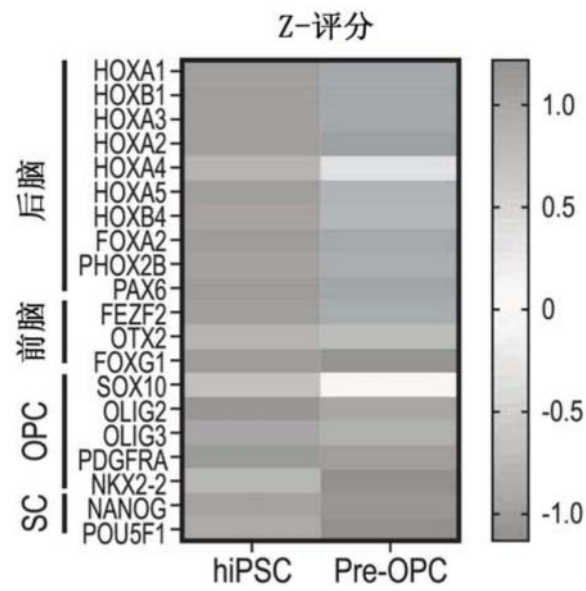


图10A

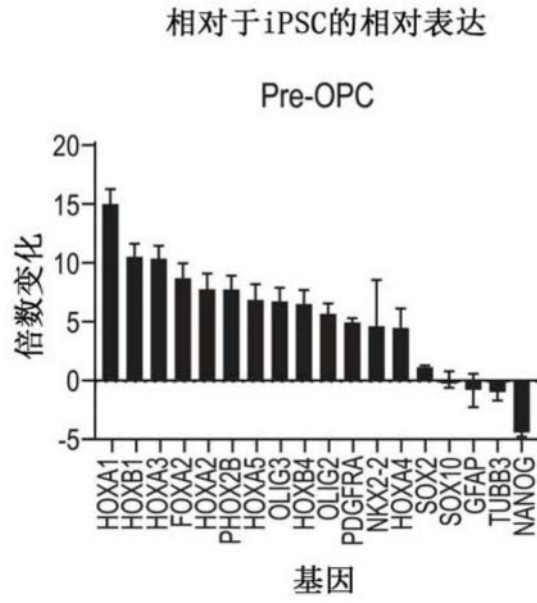


图10B