(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113439120 B
(45)授权公告日 2025.02.14

(21)申请号 202080014583.7
(22)申请日 2020.01.20
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113439120 A
(43)申请公布日 2021.09.24
(30)优先权数据
10-2019-0008256 2019.01.22 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.08.13
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2020/000948 2020.01.20
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/153687 KO 2020.07.30
(73)专利权人 高丽大学校产学协力团
地址 韩国首尔特别市
(72)发明人 洪性会 张娥荣 崔京雅
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 陈桉
(51)Int.Cl.
*C12N 5/079*(2006.01)
(56)对比文件
KR 20150042670 A,2015.04.21
US 2005176141 A1,2005.08.11
Abinaya Chandrasekaran.Astrocyte Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells: New Tools for Neurological Disorder Research.Front Cell Neurosci.2016,第10卷第1-27页.
审查员 吕健

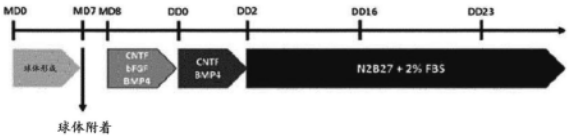
权利要求书1页 说明书10页 附图8页

(54)发明名称

用于将神经干细胞分化为星形胶质细胞的基于直接细胞转化的方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于将神经干细胞有效地分化为星形胶质细胞的方法,并且更具体地涉及一种用于将人神经干细胞在短时间内更有效地分化为展现出免疫应答抑制能力的星形胶质细胞的基于细胞转化的方法。不同于常规方法,根据本发明的通过使用含有若干种细胞因子的组合的分化培养基将神经干细胞分化为星形胶质细胞的方法涉及缩短的分化时间,并且具有优异的分化效率,并且分化的星形胶质细胞展现出免疫应答抑制能力,因此可以用作治疗各种脑疾病如退行性神经系统疾病的药剂。




CN 113439120 B

1.一种用于将神经干细胞分化为星形胶质细胞的方法,所述方法包括:

(a)在包括含有N2、B27、bFGF和EGF的DMEM/F12的培养基中传代培养所述神经干细胞;以及通过悬浮培养形成球体;

(b)在含有CNTF(睫状神经营养因子)、bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)和BMP4(骨形态发生蛋白4)的分化培养基中对神经干细胞进行初代培养进行2天;

(c)在不含有bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)但含有CNTF(睫状神经营养因子)和BMP4(骨形态发生蛋白4)的分化培养基中对所述初代培养的细胞进行二代培养进行2天;以及

(d)在不含有CNTF(睫状神经营养因子)、bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)和BMP4(骨形态发生蛋白4)但含有FBS(胎牛血清)的分化培养基中对所述二代培养的细胞进行三代培养,

其中所述分化培养基是含有N2和B27的DMEM/F12,且所述CNTF的浓度为5ng/ml,所述bFGF的浓度为8ng/ml,所述BMP4的浓度为10ng/ml,且所述FBS为1.5%至4.5%v/v。

2.根据权利要求1所述的方法,其中步骤(c)中的所述培养进行21至35天。

3.根据权利要求1所述的方法,其中所述球体的形成进行4至9天。

4.根据权利要求1所述的方法,其中所述星形胶质细胞表达GFAP或S100β标记物。

5.根据权利要求1所述的方法,其中所述星形胶质细胞表达水通道蛋白4(AQP4)、Kir4.1或Twik-1标记物。

6.根据权利要求1所述的方法,其中所述星形胶质细胞进行谷氨酸摄取。

7.根据权利要求1所述的方法,其中所述星形胶质细胞展现出降低的TNF-α表达。

# 用于将神经干细胞分化为星形胶质细胞的基于直接细胞转化的方法

## 技术领域

[0001] 本发明涉及一种将神经干细胞有效地分化为星形胶质细胞的方法,并且更具体地涉及一种用于基于细胞转化将人神经干细胞在短时间内更有效地分化为展现出免疫应答抑制能力的星形胶质细胞的方法。

## 背景技术

[0002] 长期以来,世界范围内都在积极研究可以治疗由神经元细胞死亡引起的疾病如神经退行性疾病(如亨廷顿病、帕金森病和阿尔茨海默病)的方法。代表性地,正在进行研究以研发一种将干细胞分化为神经元以替代受损神经元的方法。由于干细胞的固有特征而难以将干细胞分化为所需的细胞,因此该方法并未广泛使用。尚未研发出任何创新方法。

[0003] 大多数神经退行性疾病主要是由神经细胞(神经元)的功能障碍或损失引起的。然而,最近的研究已经表明,亨廷顿病和帕金森病不仅受到神经元的很大影响,而且受到位于其附近的星形胶质细胞的影响,因此对星形胶质细胞的关注迅速增加。

[0004] 星形胶质细胞是一种类型的神经元,已知其占据神经系统的最大部分(约40%或更多),并在中枢神经系统中发挥各种重要作用。已知星形胶质细胞通过适当去除神经元分泌的神经递质或调节脑中离子的浓度来支持神经元活动,并且参与神经元突触的形成或血脑屏障的形成或维持。此外,当脑受损时,星形胶质细胞转化为保护其他神经元并充当免疫细胞的反应性星形胶质细胞。

[0005] 迄今为止已经使用的将干细胞分化为星形胶质细胞的大多数方法使用将胚胎干细胞或诱导型多能干细胞分化为星形胶质细胞的技术(韩国专利号10-1793722、韩国专利号10-1636966)。人胚胎干细胞带来了由于使用人胚胎导致的伦理问题、免疫排斥问题和畸胎瘤的形成。诱导型多能干细胞的使用没有伦理问题,但问题在于未分化干细胞的植入可能导致畸胎瘤的形成,并且外来基因的引入可能导致突变。同时,直接转化(转分化)可以令人满意地用作细胞疗法,因为它可以诱导受试者的成纤维细胞分化为神经干细胞,从而避免了免疫排斥和伦理问题的风险。因此,本发明人使用通过使用小分子化合物的直接转化(转分化)构建的神经干细胞来分化为星形胶质细胞。

[0006] 由于通过常规方法分化的星形胶质细胞除了纯星形胶质细胞外还含有其他细胞,因此存在星形胶质细胞分化效率和纯度低的问题(韩国专利公开号10-2014-0071512)。此外,常规方法需要180天或更长的长分化时间并且效率低。正在研究使用其他细胞因子或小分子化合物进行的分化作为常规方法带来的这些问题的解决方案,但尚未建立明确的分化方法。

[0007] 因此,作为将通过直接转化(转分化)产生的神经干细胞分化为对于治疗神经疾病具有优异功效的星形胶质细胞的努力的结果,本发明人发现,当使用含有细胞因子睫状神经营养因子(CNTF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和骨形态发生蛋白4(BMP4)的组合的培养基将神经干细胞分化为星形胶质细胞时,不同于常规方法,分化时间缩短,分化效率优

异,并且分化的星形胶质细胞展现出免疫应答抑制能力,并以此为基础完成了本发明。

## 发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种使用用于有效地将神经干细胞分化为星形胶质细胞的含有细胞因子CNTF(睫状神经营养因子)、bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)和BMP4(骨形态发生蛋白4)的组合的分化培养基将神经干细胞分化为具有抑制免疫应答的能力的星形胶质细胞的方法。

[0009] 本发明的另一个目的是提供一种用于治疗炎性疾病或退行性脑疾病的组合物,所述组合物含有星形胶质细胞或在分化过程中获得的培养基(条件培养基)作为活性成分,所述星形胶质细胞是通过所述方法分化的并且可以用于抑制在各种脑疾病中发生的免疫应答。

[0010] 为实现上述目的,本发明提供了一种将神经干细胞分化为星形胶质细胞的方法,所述方法包括(a)在含有CNTF(睫状神经营养因子)、bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)和BMP4(骨形态发生蛋白4)的分化培养基中对神经干细胞进行初代培养,(b)在不含有bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)但含有CNTF(睫状神经营养因子)和BMP4(骨形态发生蛋白4)的分化培养基中对所述初代培养的细胞进行二代培养,以及(c)在不含有CNTF(睫状神经营养因子)、bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)和BMP4(骨形态发生蛋白4)但含有FBS(胎牛血清)的分化培养基中对所述二代培养的细胞进行三代培养。

[0011] 本发明还提供了一种用于预防或治疗炎性疾病的组合物,所述组合物含有通过将神经干细胞分化为星形胶质细胞的方法获得的培养基作为活性成分。

[0012] 本发明还提供了一种用于预防或治疗炎性疾病的方法,所述方法包括向受试者施用含有通过将神经干细胞分化为星形胶质细胞的方法获得的培养基作为活性成分的组合物。

[0013] 本发明还提供了含有通过将神经干细胞分化为星形胶质细胞的方法获得的培养基作为活性成分的组合物用于预防或治疗炎性疾病的用途。

[0014] 本发明还提供了含有通过将神经干细胞分化为星形胶质细胞的方法获得的培养基作为活性成分的组合物用于制备预防或治疗炎性疾病的药物的用途。

## 附图说明

[0015] 图1a显示了基于细胞转化将人神经干细胞分化为星形胶质细胞的过程。

[0016] 图1b显示了从神经干细胞分化为星形胶质细胞的细胞的形态变化。

[0017] 图1c是显示对于每个分化周期通过免疫细胞化学(ICC)检测的作为星形胶质细胞标记物的GFAP(胶质细胞原纤维酸性蛋白)的图像。

[0018] 图1d是显示基于图1c所示的ICC的结果计算的星形胶质细胞分化效率与对照hciNSC(人化学诱导型神经干细胞)的星形胶质细胞分化效率的比较的图。

[0019] 图1e是显示在使用常规分化方法(Zhou等人,Stem cell international,2016)和根据本发明的分化为星形胶质细胞的方法分化为星形胶质细胞之后,通过ICC(免疫细胞化学)检测的作为星形胶质细胞标记物的GFAP(胶质细胞原纤维酸性蛋白)的图像。

[0020] 图1f显示了使用常规分化方法(Zhou等人,Stem cell international,2016)和本

发明的分化方法进行的星形胶质细胞分化的效率。

[0021] 图1g显示了通过PCR检测的星形胶质细胞标记物GFAP(胶质细胞原纤维酸性蛋白)和S100β(S100钙结合蛋白β)。

[0022] 图1h和图1i显示了实时qPCR的结果,其显示星形胶质细胞标记物GFAP和S100β随着分化为星形胶质细胞而增加。

[0023] 图2a显示了通过PCR检测的存在于星形胶质细胞中的离子通道标记物水通道蛋白4(AQP4)、Kir4.1和Twik-1。

[0024] 图2b显示了实时qPCR的结果,其显示AQP4(星形胶质细胞离子通道标记物)随着分化为星形胶质细胞而增加。

[0025] 图2c是显示通过测量条件培养基的谷氨酸浓度检测的谷氨酸摄取的图,所述谷氨酸摄取是星形胶质细胞的成熟指数。

[0026] 图3a是显示通过实时qPCR检测的作为引起炎症的因子的TNF-α(肿瘤坏死因子α)的图。

[0027] 图3b是显示使用实时qPCR检测的促炎性细胞因子TNF-α的表达的图,并且显示在用星形胶质细胞条件培养基处理炎症诱导的角质形成细胞后,TNF-α的表达降低。

[0028] 图3c显示了使用蛋白质印迹检测的作为促炎性细胞因子的IL-1β和调节其诱导的p-NF-kB,并且显示在用星形胶质细胞条件培养基处理炎症诱导的角质形成细胞之后,IL-1β和p-NF-kB的表达减少。

[0029] 图3d是定量地显示图3c中检测的IL-1β的蛋白质印迹结果的图。

[0030] 图3e是定量地显示在图3c中检测的p-NF-kB的蛋白质印迹结果的图。

[0031] 图3f是显示当用人神经干细胞衍生的星形胶质细胞培养基处理作为负责免疫的细胞的巨噬细胞,然后用炎性因子(LPS)处理巨噬细胞时细胞形态的变化的图像。在仅用LPS处理的组中,细胞被激活,而所述细胞的形态与用培养基处理的组中的正常细胞的形态相似。

[0032] 图3g是显示使用实时qPCR检测的促炎性细胞因子IL-6的表达的图,其中用星形胶质细胞培养基处理的巨噬细胞展现出比未用其处理的细胞更低的IL-6表达。

[0033] 图3h是显示使用实时qPCR检测的促炎性趋化因子MCP-1的表达的图像,其中与未用星形胶质细胞培养基处理的细胞组相比,用所述培养基处理的炎症诱导的细胞组展现出更低的MCP-1表达。

[0034] 图3i显示了使用蛋白质印迹检测的作为促炎性细胞因子的IL-1β和作为调节其诱导的因子的p-NF-kB,并显示用星形胶质细胞培养基处理炎症诱导的巨噬细胞之后,IL-1β和p-NF-kB的表达减少。

[0035] 图3j是定量地显示如图3i所示检测的IL-1β的蛋白质印迹结果的图。

[0036] 图3k是定量地显示如图3i所示检测的p-NF-kB的蛋白质印迹结果的图。

## 具体实施方式

[0037] 除另有定义外,本发明所使用的所有技术和科学术语的含义与本发明所涉及领域的技术人员所理解的含义相同。总体上,本文所用的命名法是本领域熟知的并且是常用的。

[0038] 在本发明中,使用细胞因子睫状神经营养因子(CNTF)、碱性成纤维细胞生长因子

(bFGF)和骨形态发生蛋白4(BMP4)的组合,通过系列培养快速且有效地将人神经干细胞分化为星形胶质细胞。分化的星形胶质细胞是具有离子通道并能够进行谷氨酸摄取的成熟星形胶质细胞,并且作为炎症诱导因子的TNF-α的表达在所述星形胶质细胞中降低。因此,通过本发明的方法分化的星形胶质细胞具有抑制免疫应答的能力,因此可以用于治疗或减轻各种脑疾病,如退行性神经系统疾病。此外,发现通过分化过程获得的条件培养基具有减轻炎症诱导的细胞的炎症的作用。

[0039] 因此,在一个方面,本发明涉及一种将神经干细胞分化为星形胶质细胞的方法,所述方法包括(a)在含有CNTF(睫状神经营养因子)、bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)和BMP4(骨形态发生蛋白4)的分化培养基中对神经干细胞进行初代培养,(b)在不含有bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)但含有CNTF(睫状神经营养因子)和BMP4(骨形态发生蛋白4)的分化培养基中对所述初代培养的细胞进行二代培养,以及(c)在不含有CNTF(睫状神经营养因子)、bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)和BMP4(骨形态发生蛋白4)但含有FBS(胎牛血清)的分化培养基中对所述二代培养的细胞进行三代培养。

[0040] 在本发明的一个实施方案中,在基础neurobasal培养基中培养人神经干细胞之后,取出附着的细胞并再次悬浮培养以形成球体。

[0041] 所述基础neurobasal培养基优选地是含有N2、B27、bFGF和EGF的DMEM/F12,但不限于此。

[0042] 在本发明中,人神经元可以用作起始神经元。用于治疗疾病的诱导型神经干细胞优选地是从患者分离的体细胞,例如,参与所述疾病的体细胞或参与所述疾病的疗法的体细胞。所述体细胞优选地是成纤维细胞,但不限于此。

[0043] 本发明的神经干细胞优选地是通过直接转化方法由人体细胞产生的基于细胞转化的人神经干细胞,但不限于此。

[0044] 在本发明中,分化为星形胶质细胞的神经干细胞可以具有球体形状。

[0045] 在本发明的一个实施方案中,取出贴壁培养的人神经干细胞并在悬浮液中培养以形成球体,并且所述球体的形成优选地进行4至9天,但不限于此。

[0046] 将形成的球体放置在用PLO/FN包被的板上以分化为星形胶质细胞,然后在第二天用星形胶质细胞分化培养基替代所述培养基。

[0047] 在本发明中,所述星形胶质细胞分化培养基优选地是含有N2和B27的DMEM/F12,但不限于此。

[0048] 在本发明中,步骤(a)中的所述培养优选地在含有细胞因子CNTF(睫状神经营养因子)、bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)和BMP4(骨形态发生蛋白4)的星形胶质细胞分化培养基中进行2天,但不限于此。

[0049] 此外,步骤(b)中的所述培养优选地在仅含有CNTF(睫状神经营养因子)和BMP4(骨形态发生蛋白4)细胞因子而不包含bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)的星形胶质细胞分化培养基中进行2天,但不限于此。

[0050] 接下来,步骤(c)中的所述培养优选地在仅含有FBS(胎牛血清)而不包含细胞因子CNTF(睫状神经营养因子)、bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)和BMP4(骨形态发生蛋白4)的分化培养基中进行21至35天,但不限于此。

[0051] 在本发明中,所述FBS优选地为1.5%至4.5%(v/v),但不限于此。

[0052] 在本发明中,所述分化的星形胶质细胞可以表达GFAP或S100β标记物。

[0053] GFAP(胶质细胞原纤维酸性蛋白)和S100β(S100钙结合蛋白β)标记基因是星形胶质细胞标记物,并且其表达水平随着分化为星形胶质细胞而逐渐增加。

[0054] 在本发明的一个实施方案中,通过免疫细胞化学分析每个分化周期的GFAP和S100β的表达水平,并且分析结果显示分化效率从在DD26时的53.94%增加到在DD33时的94.33%。

[0055] 此外,在本发明的一个实施方案中,通过使用常规分化方法(Zhou等人,Stem cell international,2016)和本发明的方法分化为星形胶质细胞,鉴定星形胶质细胞标记物GFAP(胶质细胞原纤维酸性蛋白)。结果显示,GFAP信号在本发明的分化培养基中分化的细胞中表达更强,而在常规方法的分化培养基中分化的细胞中表达很弱。特别地,关于分化效率,常规方法具有34.35%的分化效率,而使用本发明的分化培养基的方法展现出94.33%的非常高的分化效率。

[0056] 在本发明中,分化的星形胶质细胞可以表达水通道蛋白4(AQP4)、Kir4.1或Twik-1标记物。

[0057] 水通道蛋白4(AQP4)、Kir4.1和Twik-1标记物是存在于星形胶质细胞中的离子通道标记物,并且可以通过检测星形胶质细胞膜中是否存在离子通道来确定分化的星形胶质细胞的成熟。

[0058] 为了使本发明的分化的星形胶质细胞适当地发挥其主要功能,如支持神经元功能的维持,星形胶质细胞的成熟是重要的。此外,成熟的星形胶质细胞应发挥良好的谷氨酸摄取功能,即去除由神经元释放的谷氨酸的功能。

[0059] 在本发明中,星形胶质细胞可以进行谷氨酸摄取。

[0060] 因此,可以看出,通过本发明方法分化的星形胶质细胞是成熟的星形胶质细胞。

[0061] 在本发明的一个实施方案中,可以看出本发明的分化的星形胶质细胞降低了作为炎症诱导因子的TNF-α的表达,并且可以证明分化的星形胶质细胞具有抑制炎性反应的功能。此外,当用在人神经干细胞分化为星形胶质细胞的过程中收集的培养基处理通过INF-γ和TNF-α处理而发炎的角质形成细胞时,与未用培养基处理的对照相比,在用培养基处理的细胞组中,TNF-α表达减少,炎性应答减轻,并且促炎性细胞因子IL-1β和p-NF-kB的表达也减少。

[0062] 在本发明的另一个实施方案中,当用在人神经干细胞分化为星形胶质细胞的过程中收集的培养基处理其中通过用LPS处理作为负责免疫的细胞的巨噬细胞诱导炎性反应的细胞时,在仅用LPS处理的组中,所述细胞被激活,而所述细胞的形态与正常细胞的形态相似,并且在用培养基处理的组中,IL-6表达和MCP-1表达减少,这表明人神经干细胞衍生的星形胶质细胞培养基起到减轻炎症诱导的细胞中炎性应答的作用。

[0063] 在另一个方面,本发明涉及一种用于预防、减轻或治疗炎性疾病的组合物,所述组合物含有通过将神经干细胞分化为星形胶质细胞的方法获得的培养基作为活性成分,所述方法包括(a)在含有CNTF(睫状神经营养因子)、bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)和BMP4(骨形态发生蛋白4)的分化培养基中对神经干细胞进行初代培养,(b)在不含有bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)但含有CNTF(睫状神经营养因子)和BMP4(骨形态发生蛋白4)的分化培养基中对所述初代培养的细胞进行二代培养,以及(c)在不含有CNTF(睫状神经营养因子)、

bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)和BMP4(骨形态发生蛋白4)但含有FBS(胎牛血清)的分化培养基中对所述二代培养的细胞进行三代培养。

[0064] 在本发明中,所述培养基可以是已从中去除细胞的条件培养基。

[0065] 在本发明的分化的星形胶质细胞中TNF-α的表达降低,并且在分化过程中获得的条件培养基也抑制炎性应答。

[0066] 如本文所用,术语“预防”意指通过施用本发明的药物组合物来预防疾病发作或抑制其进展的任何动作。

[0067] 如本文所使用的,术语“减轻”意指至少降低与需要治疗的病症相关的参数的严重程度(例如,症状的程度)的任何动作。

[0068] 如本文所用,术语“治疗”是指通过施用本发明的药物组合物来减轻或有利地改变疾病症状的任何动作。

[0069] 在另一个方面,本发明涉及一种用于预防或治疗炎性疾病的方法,所述方法包括向受试者施用含有通过将神经干细胞分化为星形胶质细胞的方法获得的培养基作为活性成分的组合物。

[0070] 在另一个方面,本发明涉及含有通过将神经干细胞分化为星形胶质细胞的方法获得的培养基作为活性成分的组合物用于预防或治疗炎性疾病的用途。

[0071] 在本发明中,所述培养基可以是已从中去除细胞的条件培养基。

[0072] 在另一个方面,本发明涉及含有通过将神经干细胞分化为星形胶质细胞的方法获得的培养基作为活性成分的组合物用于制备预防或治疗炎性疾病的药物的用途。

[0073] 在本发明中,所述培养基可以是已从中去除细胞的条件培养基。

[0074] 如本文所用,术语“受试者”是指患有或有风险患上疾病的任何动物,包括人,并且所述疾病可以通过向受试者施用根据本发明的组合物来有效地预防或治疗。

[0075] 如本文所用,术语“施用”是指通过任何适当的方法将根据本发明的药物组合物引入受试者中的动作,并且组合物的施用途径可以是任何一般途径,只要所述途径能够将组合物递送至靶组织。

[0076] 本发明的药物组合物的施用途径可以通过任何一般途径来施用,只要所述药物组合物能够到达靶组织即可。本发明的药物组合物可以根据需要通过腹膜内、静脉内、肌内、皮下、皮内、口服、鼻内、肺内或直肠施用,但不限于此。此外,所述组合物可以通过能够将活性物质递送至靶细胞的任何装置来施用。

[0077] 本发明的药物组合物可以以药学有效量来施用。如本文所用,术语“药学有效量”是指足以以适用于所有药物治疗或预防的合理益处/风险比治疗或预防疾病的量。有效剂量可以根据多种因素改变,所述多种因素包括待治疗的疾病的严重程度,药物活性,患者的年龄、体重、健康和性别,患者对药物的敏感性,根据本发明使用的组合物的施用时间、施用途径和排泄率,与本发明的组合物组合或结合使用的药物,以及医学领域熟知的其他因素。

[0078] 本发明的药物组合物可以作为单一治疗剂或与其他治疗剂组合施用。在这种情况下,本发明的组合物可以与常规治疗剂依序或同时施用。此外,所述组合物可以以单剂量或多剂量来施用。考虑到这些因素,重要的是施用足以达到最大功效而没有副作用的最小量。

[0079] 此外,根据本发明的药物组合物的剂量可以由本领域技术人员考虑使用目的,疾病的严重程度,患者的年龄、体重、性别和病史,用作活性成分的物质的类型等来决定。例

如,可以将本发明的药物组合物以10mg/kg至100mg/kg、更优选10mg/kg至30mg/kg的日剂量施用至包括人在内的哺乳动物。本发明的组合物的施用频率没有特别限制,并且可以将组合物一天施用一至三次,或者可以分成多剂量并全天施用。

[0080] 可以将本发明的药物组合物制备成用于治疗或预防炎性疾病的药物组合物的形式,所述药物组合物还含有通常用于制备药物组合物的适当载体、赋形剂或稀释剂,并且所述载体可以包括非天然存在的载体。

[0081] 特别地,可以将所述药物组合物根据常规方法配制成口服配制品,如粉末、颗粒、片剂、胶囊、悬浮液、乳液、糖浆或气雾剂、外用制剂、栓剂或无菌注射溶液。

[0082] 根据本发明的药物组合物中所包含的载体、赋形剂或稀释剂的例子包括乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、木糖醇、赤藓醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯树胶、藻酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石粉、硬脂酸镁、矿物油等。在配制品的情况下,所述药物组合物可以使用稀释剂或赋形剂如常用的填充剂、增量剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂或表面活性剂来制备。

[0083] 用于口服施用的固体配制品可以包括片剂、丸剂、粉末、颗粒、胶囊等,并且可以通过将至少一种赋形剂(例如,淀粉、碳酸钙、蔗糖、乳糖、明胶等)混合来制备。除了简单赋形剂以外,还使用润滑剂,例如硬脂酸镁和滑石粉。

[0084] 用于口服施用的液体配制品可以是悬浮液、口服液体和溶液、乳液、糖浆等,并且可以含有各种赋形剂,如润湿剂、甜味剂、香味剂、防腐剂等,以及水和液体石蜡(它们是常用的简单稀释剂)。用于肠胃外施用的配制品可以包括灭菌的水性溶液、非水性溶剂、悬浮液、乳液、冷冻干燥的制剂和栓剂。非水性溶剂和悬浮液包括丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油、可注射酯如油酸乙酯等。

[0085] 所述药物组合物可以是无菌可注射配制品,如无菌可注射水性或油性悬浮液。可以根据本领域已知的技术使用合适的分散剂或润湿剂(例如,Tween80)和悬浮剂来配制这种悬浮液。所述无菌可注射配制品也可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液(例如,1,3-丁二醇中的溶液)。可用的可接受的媒介物和溶剂可以包括甘露醇、水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。此外,通常可以使用无菌非挥发性油作为溶剂或悬浮介质。为此,也可以使用任何刺激性较小的含有合成单甘油酯或二甘油酯的非挥发性油。脂肪酸(如油酸)及其甘油酯衍生物可用于可注射制剂,像药学上可接受的天然油(例如,橄榄油或蓖麻油),特别是其聚氧乙基化形式。

[0086] 本发明的药物组合物也可以以用于直肠施用的栓剂形式来施用。这种组合物可以通过将本发明的化合物与合适的无刺激性赋形剂混合来制备,所述赋形剂在室温下为固体,但在直肠温度下为液体。这些材料包括但不限于可可脂、蜂蜡和聚乙二醇。

[0087] 当所需的治疗涉及局部施用易于接近的部位或器官时,根据本发明的药物组合物的肠胃外施用特别有用。当局部施用至皮肤时,应将药物组合物配制为含有悬浮或溶解在载体中的活性成分的合适的软膏形式。用于本发明化合物的局部施用的载体包括但不限于矿物油、液体石蜡、白凡士林、丙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。可替代地,可以将药物组合物配制为含有悬浮或溶解在载体中的活性化合物的合适洗剂或乳膏。合适的载体包括但不限于矿物油、脱水山梨醇单硬脂酸酯、聚山梨醇酯60、鲸蜡基酯蜡、鲸蜡硬脂醇、2-辛基十二烷醇、苯甲醇和水。本发明的药物组合物也可以以直肠栓剂或合适的灌肠

剂的形式局部施用至下肠道。局部施用的透皮贴剂也落入本发明的范围内。

[0088] 本发明的药物组合物可以作为鼻气溶胶或通过吸入施用。这种组合物是根据药物领域熟知的技术来制备的,并且使用苯甲醇或其他合适的防腐剂、增强生物利用度的吸收促进剂、碳氟化合物和/或本领域已知的其他增溶剂或分散剂制备成盐水溶液。

[0089] 本发明的药物组合物中的活性成分的含量并没有特别限制,并且基于最终组合物的总重量,可以是按重量计0.0001％至50％,更优选按重量计0.01％至10％。

[0090] [实施例]

[0091] 在下文中,将参考实施例更加详细地描述本发明。然而,对本领域技术人员而言将明显的是提供这些实施例仅仅是为了说明本发明,而不应解释为限制本发明的范围。

[0092] 实施例1:星形胶质细胞分化培养基

[0093] 在60mm培养皿中制备1x $10^5$个人神经干细胞(参见韩国专利号1816103),并在第二天在含有DMEM/F12、N2、B27、bFGF和EGF的neurobasal培养基中培养。然后,每2至3天更换一次培养溶液。在第5天,使用Accutase取出细胞,并在培养皿上接种1x $10^6$个细胞并进行悬浮培养。此时,接种的神经干细胞聚集在一起,而不是附着在板的底部,从而形成小球。每2天用新鲜培养基替代所述培养基,并且在大约7天之后,球体形成肉眼可以看到的大小。首先用PLO/FN包被所述板,然后将球体置于其上。

[0094] 第二天,使用用于分化为星形胶质细胞的培养基替代所述培养基。在含有DMEM/F12、N2和B27的基础培养基中还含有CNTF(5ng/ml)、bFGF(8ng/ml)和BMP4(10ng/ml)的培养基使用2天,并且含有CNTF和BMP4但不含bFGF的培养基用于接下来的2天。在含有细胞因子组合的培养基使用4天之后,用在含有DMEM/F12、N2和B27的基础培养基中还含有2％ FBS(胎牛血清)的培养基替代所述培养基。然后,观察形态变化,同时每2天更换一次培养基。

[0095] 图1a显示了将神经干细胞分化为星形胶质细胞的过程,包括制备神经干细胞,在3D培养物中将细胞培养7天,用适合每个阶段的细胞因子处理细胞4天,以及在新鲜培养基中培养细胞,以促进细胞因子消失后星形胶质细胞的活性。

[0096] 实施例2:分化的星形胶质细胞的表征的验证

[0097] 通过使用实施例1的分化培养基的方法将神经干细胞分化为星形胶质细胞,并且确定分化的星形胶质细胞是否展现出一般特征。

[0098] 首先,进行免疫细胞化学(ICC)以确定星形胶质细胞是否表达星形胶质细胞标记物。将分化的细胞在冰箱中4％多聚甲醛(PFA)中固定过夜。用PBS缓冲液洗涤细胞两次,然后将其用0.1％triton X-100处理10分钟,以产生用于有效染色(透化步骤)的环境。在用10％ NDS(正常驴血清)封闭一小时之后,在2％ NDS中以1:400稀释一抗GFAP抗体,以对细胞染色,并且用所得抗体将细胞在4℃下处理一天。第二天,在室温下将细胞与二抗反应一小时,并用DAPI染色试剂对细胞核染色,然后用荧光显微镜观察(图1b)。

[0099] 作为结果,通过免疫细胞化学(ICC)染色可以看出星形胶质细胞表达GFAP(图1c)。可以看出,随着分化的进行,在神经干细胞中未清晰观察到的GFAP信号逐渐变得更加清晰。

[0100] 此外,可以根据免疫细胞化学(ICC)染色的结果来测量星形胶质细胞的分化效率。与阴性对照hciNSC(人化学诱导型神经干细胞)相比,所述效率在分化的第26天(DD26)为53.94％,并在分化开始后的第33天(DD33)大大地增加到94.33％(图1d)。

[0101] 然后,在使用常规分化方法(Zhou等人,Stem cell international,2016)和根据

本发明的分化为星形胶质细胞的方法分化为星形胶质细胞之后,通过ICC(免疫细胞化学)检测作为星形胶质细胞标记物的GFAP(胶质细胞原纤维酸性蛋白)。结果显示,GFAP信号在本发明的分化培养基中分化的细胞中表达更强,而在常规方法的分化培养基中分化的细胞中表达非常弱(图1e)。此外,当基于所述结果比较分化效率时,发现常规方法展现出34.25%的效率,但是使用实施例1的分化培养基的方法展现出94.33%的非常高的效率(图1f)。

[0102] 最后,通过PCR和实时qPCR可以看出,星形胶质细胞标记物GFAP和S100β的基因表达出现在分化的人星形胶质细胞中(图1g)。在HDF(人真皮成纤维细胞)(其作为阴性对照)中未观察到GFAP和S100β,但在DD33时在分化的细胞中观察到GFAP和S100β。此外,观察到随着分化的进行,星形胶质细胞标记物GFAP和S100β的基因表达在D33时在mRNA水平上逐渐增加(图1h和图1i)。

[0103] 实施例3:分化的星形胶质细胞的成熟的验证

[0104] 星形胶质细胞必须成熟以能够发挥其主要功能,如支持神经元功能的维持。为了验证这种成熟,确定离子通道是否位于星形胶质细胞膜中,或者是否适当地进行谷氨酸摄取。

[0105] 3-1:离子通道标记物的检测

[0106] 将星形胶质细胞中离子通道的存在作为用于确定星形胶质细胞是否足够成熟以发挥各种功能的标准。因此,通过PCR检测作为存在于星形胶质细胞中的离子通道标记物的水通道蛋白4(AQP4)、Kir4.1和Twik-1。结果显示,在分化的星形胶质细胞中形成了可以交换离子的通道(图2a)。在阴性对照HDF(人真皮成纤维细胞)中未检测到AQP4、Kir4.1和Twik-1,但在DD33时在分化的细胞中检测到AQP4、Kir4.1和Twik-1的表达。

[0107] 此外,通过实时qPCR也可以看出,AQP4随着分化的进行而增加。特别地,与DD26相比,在DD33时AQP4 mRNA水平显著增加(图2b)。

[0108] 3-2:谷氨酸摄取

[0109] 星形胶质细胞去除由神经元释放的谷氨酸,以帮助维持神经元的功能。此时,可以通过测量条件培养基中谷氨酸的浓度来确定星形胶质细胞是否适当地摄取谷氨酸。

[0110] 使用谷氨酸测定试剂盒(Abcam)测量谷氨酸的浓度,并且发现与阴性对照hciNSC相比,分化的星形胶质细胞中的谷氨酸的量减少(图2c)。因此,可以看出,通过使用实施例1的分化培养基的方法分化的星形胶质细胞足够成熟以适当地进行谷氨酸摄取。

[0111] 将人神经干细胞分化为人星形胶质细胞并且使其成熟化为功能性星形胶质细胞对于用于治疗人类的退行性脑疾病的细胞疗法是高度潜在有用的,并且可以潜在地用作研究星形胶质细胞发育和脑疾病发病机制的最佳模型细胞。

[0112] 实施例4:分化的星形胶质细胞的免疫应答的抑制

[0113] 已知当脑受损时星形胶质细胞被激活并充当免疫细胞。为了确定分化的星形胶质细胞是否具有这种抑制炎性应答的功能,通过实时qPCR检测诱导炎症的因子TNF-α(肿瘤坏死因子α)的表达。

[0114] 结果显示,TNF-α含量是炎症严重程度的指标,其在未分化的人真皮成纤维细胞阴性对照中很高,随着分化为星形胶质细胞而减少,这表明分化的星形胶质细胞具有抑制炎性应答的功能(图3a)。

[0115] 此外,发现通过使用在人神经干细胞分化为星形胶质细胞的过程中收集的培养基(条件培养基)处理炎症诱导的细胞(患病细胞)减轻了炎性应答。

[0116] 首先,对人角质形成细胞进行实验。角质形成细胞分泌诱导炎性应答的细胞因子,并起到调节炎性应答的作用。用人神经干细胞衍生的星形胶质细胞培养基(分化23天)将人角质形成细胞(ATCC,美国)处理一天。第二天,观察到在用炎症诱导因子INF-γ(干扰素γ-100ng/ml)和TNF-α(100ng/ml)处理一小时的细胞中TNF-α的表达,并且与炎症诱导的细胞相比,发现用培养基处理的细胞展现出减少的TNF-α表达(图3b)。此外,通过蛋白质印迹可以看出,在培养基处理的细胞组中,促炎性细胞因子IL-1β(白介素-1β)和调节其的p-NF-kB(磷酸化核因子-κB)减少(图3c、图3d和图3e)。

[0117] 此外,在巨噬细胞(韩国细胞系库(Korea Cell Line Bank))上进行相同的实验,所述巨噬细胞是负责免疫的细胞。用人神经干细胞衍生的星形胶质细胞培养基(分化23天)将巨噬细胞处理一天,然后用作为引起免疫应答的物质的LPS(脂多糖-50ng/ml)处理一小时。用显微镜观察细胞形态的变化,并且结果显示在仅用LPS处理的组中细胞被激活,但细胞的形态与用培养基处理的组中的正常细胞的形态相似(图3f)。

[0118] 实时qPCR的结果显示在培养基处理的细胞组中IL-6(白介素-6)表达减少,并且MCP-1的促炎性趋化因子(单核细胞趋化蛋白-1)的表达也减少(图3g和3h)。此外,蛋白质印迹的结果显示在培养基处理的细胞组中促炎性细胞因子IL-1β和调节其的p-NF-kB减少(图3i)。该结果表明,人神经干细胞衍生的星形胶质细胞培养基减轻了炎症诱导的细胞中的炎性应答,并且分化的星形胶质细胞充当抗炎细胞。

[0119] 工业适用性

[0120] 不同于常规方法,根据本发明的使用含有若干种细胞因子的组合的分化培养基将神经干细胞分化为星形胶质细胞的方法能够缩短分化时间并获得优异的分化效率,并且分化的星形胶质细胞展现出免疫应答抑制能力,因此可用作各种脑疾病(如退行性神经系统疾病)的治疗剂。

[0121] 尽管已经详细描述了本发明的具体配置,但本领域技术人员应理解,出于说明目的提供本说明书以阐述优选实施方案,并且不应当解释为限制本发明的范围。因此,本发明的实质范围由所附权利要求及其等同物限定。


MD0
MD7 MD8
DD0
DD2
DD16
DD23
球体形成
CNTF
bFGF
BMP4
CNTF
BMP4
N2B27 + 2% FBS
球体附着

图1a

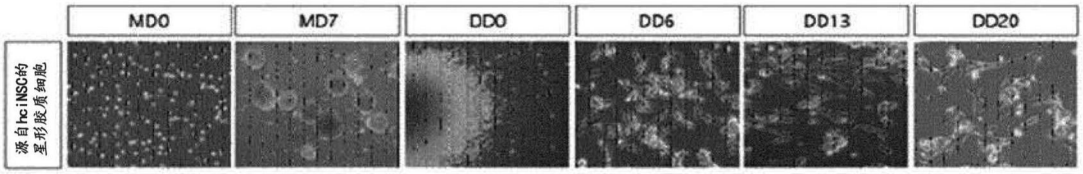

MD0
MD7
DD0
DD6
DD13
DD20
源自hciNSC的星形胶质细胞

图1b

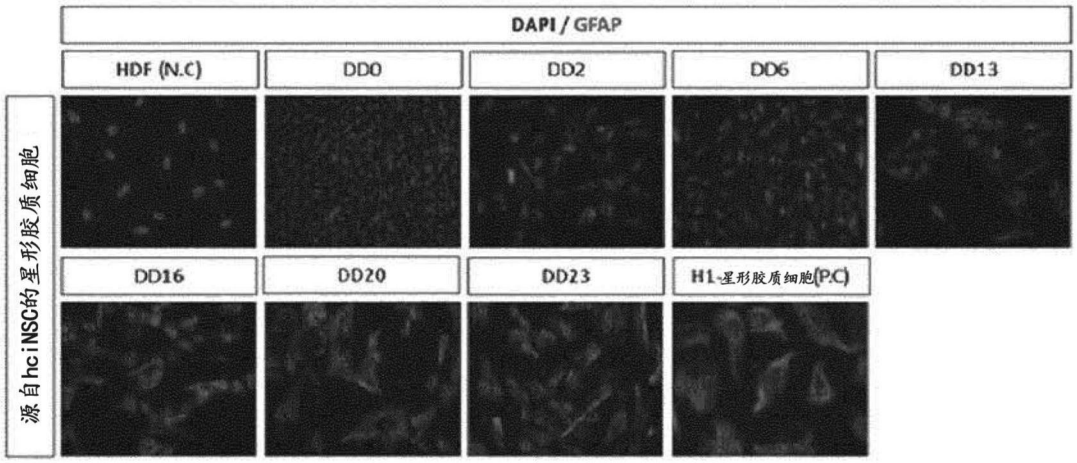

DAPI / GFAP
HDF (N.C)
DD0
DD2
DD6
DD13
DD16
DD20
DD23
H1-星形胶质细胞(P.C)
源自hciNSC的星形胶质细胞

图1c

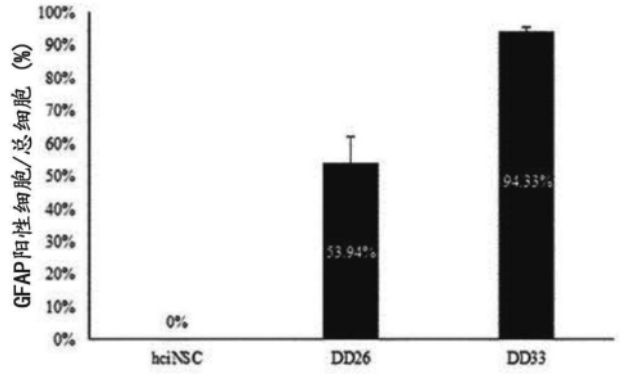

GFAP阳性细胞/总细胞（%）
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
0%
53.94%
94.33%
hciNSC
DD26
DD33

图1d

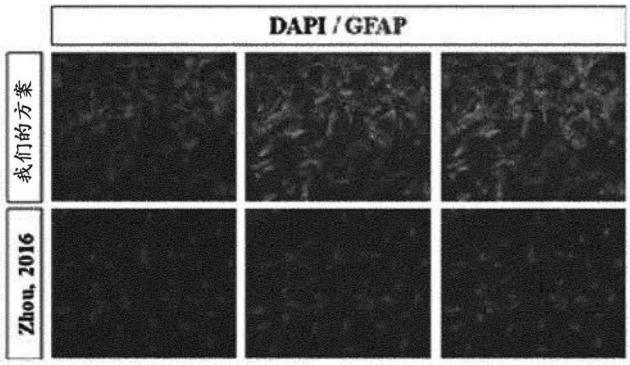

DAPI / GFAP
我们的方案
Zhou, 2016

图1e

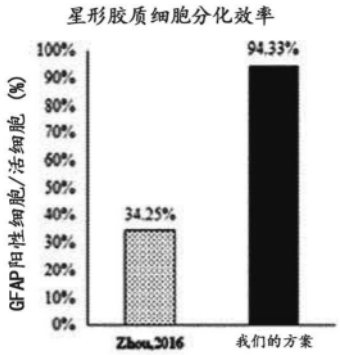

星形胶质细胞分化效率
GFAP阳性细胞/活细胞（%）
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
34.25%
94.33%
Zhou,2016
我们的方案

图1f

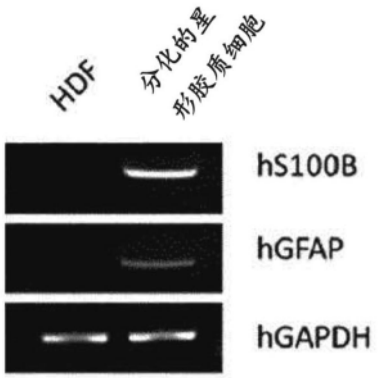

HDF
分化的星形胶质细胞
hS100B
hGFAP
hGAPDH

图1g

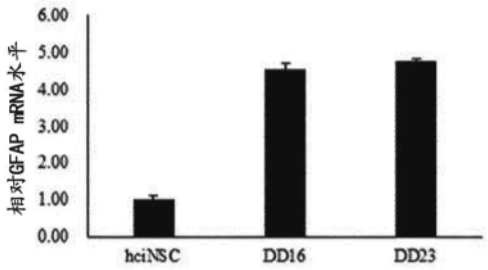

相对GFAP mRNA水平
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
hciNSC
DD16
DD23

图1h

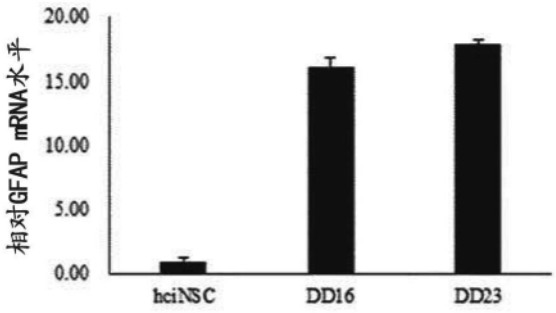

相对GFAP mRNA水平
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
hciNSC
DD16
DD23

图1i

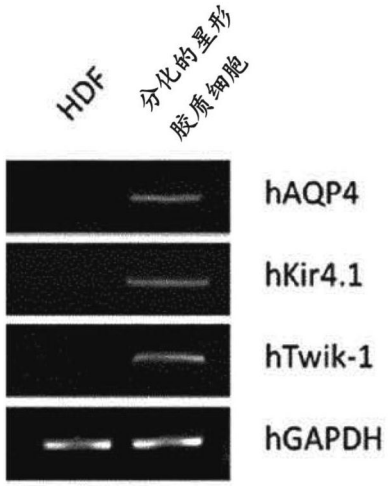

HDF
分化的星形胶质细胞
hAQP4
hKir4.1
hTwik-1
hGAPDH

图2a

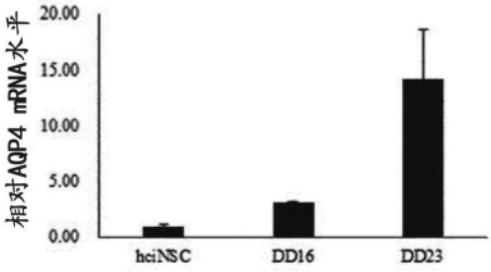

相对AQP4 mRNA水平
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
hciNSC
DD16
DD23

图2b

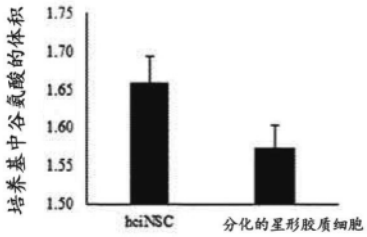

培养基中谷氨酸的体积
1.75
1.70
1.65
1.60
1.55
1.50
hciNSC
分化的星形胶质细胞

图2c

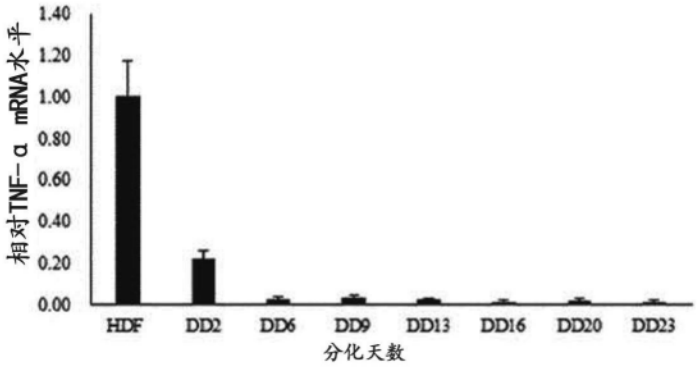

相对TNF-α mRNA水平
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
HDF
DD2
DD6
DD9
DD13
DD16
DD20
DD23
分化天数

图3a

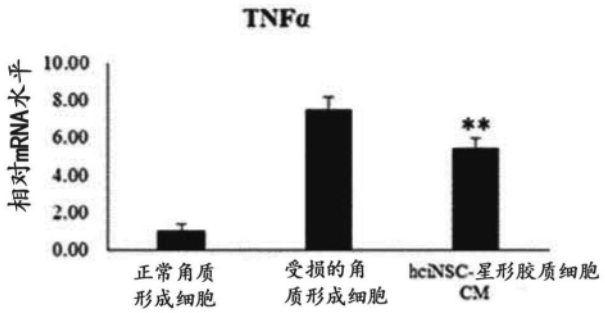

TNFα
相对mRNA水平
10.00
8.00
6.00
4.00
2.00
0.00
**
正常角质形成细胞
受损的角质形成细胞
hciNSC-星形胶质细胞CM

图3b

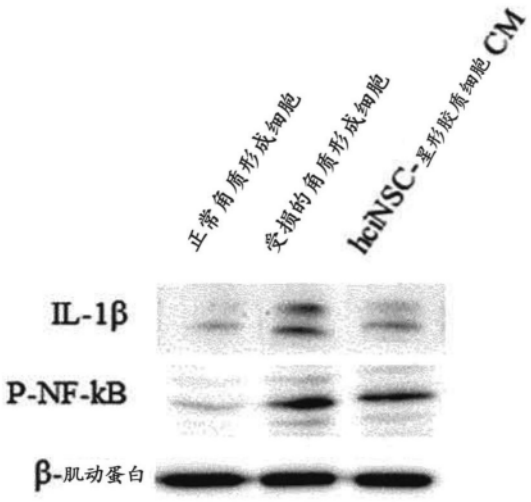

正常角质形成细胞
受损的角质形成细胞
hciNSC-星形胶质细胞 CM
IL-1β
P-NF-kB
β-肌动蛋白

图3c

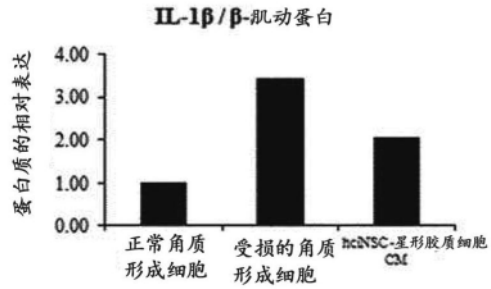



图3d

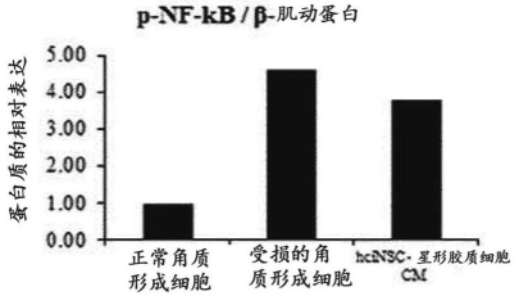



图3e

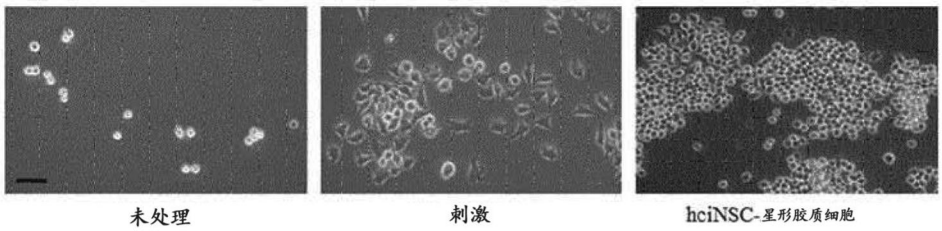



图3f

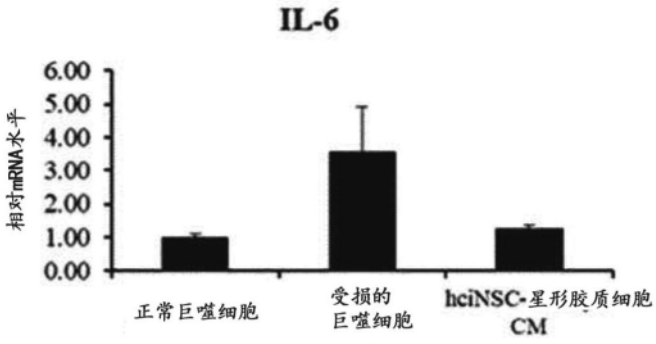



图3g

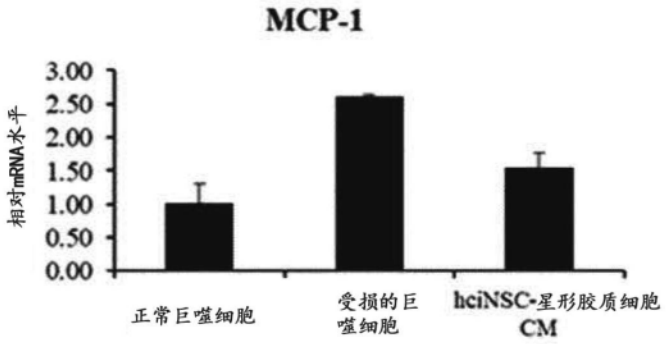

MCP-1
相对mRNA水平
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
正常巨噬细胞
受损的巨噬细胞
hciNSC-星形胶质细胞CM

图3h

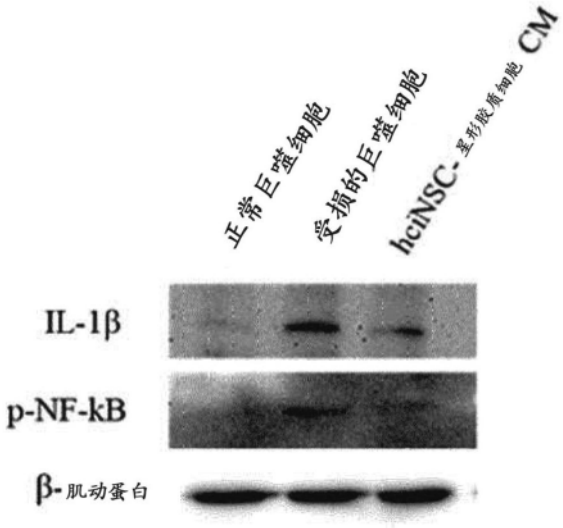

正常巨噬细胞
受损的巨噬细胞
hciNSC-星形胶质细胞 CM
IL-1β
p-NF-kB
β-肌动蛋白

图3i

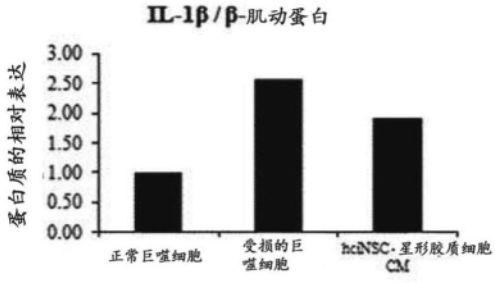

IL-1β/β-肌动蛋白
蛋白质的相对表达
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
正常巨噬细胞
受损的巨噬细胞
hciNSC-星形胶质细胞CM

图3j

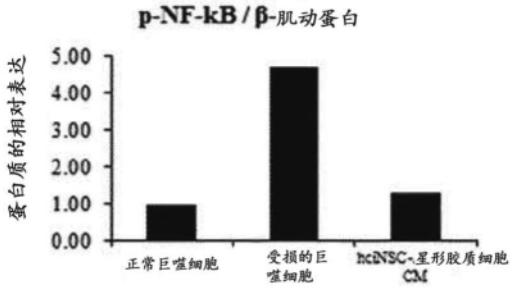

p-NF-kB / β-肌动蛋白
蛋白质的相对表达
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
正常巨噬细胞
受损的巨噬细胞
hcNSC-星形胶质细胞CM

图3k