



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110249047 A

(43)申请公布日 2019.09.17

(21)申请号 201780083272.4

(22)申请日 2017.11.14

(30)优先权数据

62/421,816 2016.11.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.07.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/061549 2017.11.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/090006 EN 2018.05.17

(71)申请人 纪念斯隆-凯特琳癌症中心

地址 美国纽约州

申请人 康奈尔大学

(72)发明人 L·施图德 F·法塔希

Z·加扎扎德 S·陈

(74)专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

代理人 龙淳

(51)Int.Cl.

G12N 5/079(2010.01)

A61K 35/28(2015.01)

A61K 35/30(2015.01)

A61P 19/00(2006.01)

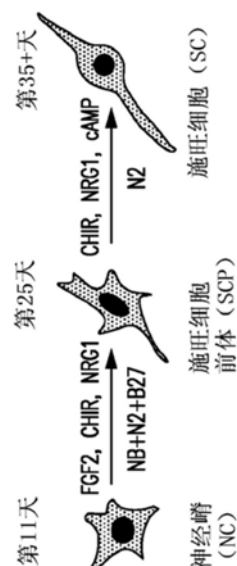
权利要求书5页 说明书56页 附图29页

(54)发明名称

使用源自干细胞的施旺细胞的药物发现方法

(57)摘要

本发明公开的主题涉及源自干细胞(例如人干细胞)的施旺细胞前体和施旺细胞用于周围神经系统(PNS)和/或中枢神经系统(CNS)的再生、髓鞘损伤的预防和/或修复、和/或施旺细胞相关疾病(例如周围神经病变糖尿病性周围神经病变)的预防和/或治疗的药物发现的用途。



1. 一种筛选化合物的体外方法,所述化合物适合用于周围神经系统 (PNS) 的再生、用于中枢神经系统 (CNS) 的再生、用于髓鞘损伤的预防和/或修复、和/或用于施旺细胞相关疾病的预防和/或治疗,所述方法包括:

(a) 使表达一种或多种施旺细胞前体标志物的细胞群体暴露于至少约30mM的葡萄糖浓度,其中所述细胞获自干细胞的体外分化;

(b) 在葡萄糖暴露之后,使所述细胞与测试化合物接触;

(c) 测量不经所述测试化合物处理的所述细胞的第一山梨糖醇水平、第一葡萄糖水平和第一细胞生存力中的一个或多个;

(d) 测量经所述测试化合物处理的所述细胞的第二山梨糖醇水平、第二葡萄糖水平和第二细胞生存力中的一个或多个;

(e) 对以下的一项或多项进行比较:

(i) 所述第二山梨糖醇水平与所述第一山梨糖醇水平,

(ii) 所述第二葡萄糖水平与所述第一葡萄糖水平,

(iii) 所述第二细胞生存力与所述第一细胞生存力;和

(f) 在以下的一项或多项存在时,识别出适合用于PNS和/或CNS的再生、用于髓鞘损伤的预防和/或修复、和/或用于施旺细胞相关疾病的预防和/或治疗的测试化合物:

(i) 所述第二山梨糖醇水平低于所述第一山梨糖醇水平,

(ii) 所述第二葡萄糖水平低于所述第一葡萄糖水平,和

(iii) 所述第二细胞生存力低于第一细胞生存力。

2. 一种筛选化合物的体外方法,所述化合物适合用于周围神经系统 (PNS) 的再生、用于中枢神经系统 (CNS) 的再生、用于髓鞘损伤的预防和/或修复、和/或用于施旺细胞相关疾病的预防和/或治疗,所述方法包括:

(a) 使表达一种或多种施旺细胞标志物的细胞群体暴露于至少约30mM的葡萄糖浓度,其中所述细胞获自干细胞的体外分化;

(b) 在葡萄糖暴露之后,使所述细胞与测试化合物接触;

(c) 测量不经所述测试化合物处理的所述细胞的第一山梨糖醇水平、第一葡萄糖水平和第一细胞生存力中的一个或多个;

(d) 测量经所述测试化合物处理的所述细胞的第二山梨糖醇水平、第二葡萄糖水平和第二细胞生存力中的一个或多个;

(e) 对以下的一项或多项进行比较:

(i) 所述第二山梨糖醇水平与所述第一山梨糖醇水平,

(ii) 所述第二葡萄糖水平与所述第一葡萄糖水平,

(iii) 所述第二细胞生存力与所述第一细胞生存力;和

(f) 在以下的一项或多项存在时,识别出适合用于PNS和/或CNS的再生、用于髓鞘损伤的预防和/或修复、和/或用于施旺细胞相关疾病的预防和/或治疗的测试化合物:

(i) 所述第二山梨糖醇水平低于所述第一山梨糖醇水平,

(ii) 所述第二葡萄糖水平低于所述第一葡萄糖水平,和

(iii) 所述第二细胞生存力低于第一细胞生存力。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述表达一种或多种施旺细胞前体标志物的细胞

通过包括以下步骤的方法获自干细胞的体外分化：使干细胞群体与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂接触和使所述细胞与一种或多种Wnt激活剂接触，以及进一步使所述细胞与一种或多种FGF激活剂接触至少约3天。

4. 根据权利要求3所述的方法，其中所述表达一种或多种施旺细胞标志物的细胞通过包括以下步骤的方法获自干细胞的体外分化：

使干细胞群体与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂接触和使所述细胞与一种或多种Wnt激活剂接触，

进一步使所述细胞与一种或多种FGF激活剂接触至少约3天，以产生表达一种或多种施旺细胞前体标志物的分化细胞群体，和

使所述表达一种或多种施旺细胞前体标志物的分化细胞群体经受有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件。

5. 根据权利要求3或4所述的方法，其中所述干细胞分化方法包括使所述细胞与所述一种或多种FGF激活剂接触约14天。

6. 根据权利要求3-5中任一项所述的方法，其中所述干细胞分化方法包括：不晚于从所述干细胞与所述一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触起约20天，使所述细胞与所述一种或多种FGF激活剂最初接触。

7. 根据权利要求6所述的方法，其中所述干细胞分化方法包括：在从所述干细胞与所述一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触起约10天至约15天，使所述细胞与所述一种或多种FGF激活剂最初接触。

8. 根据权利要求7所述的方法，其中所述干细胞分化方法包括：在从所述干细胞与所述一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触起约11天，使所述细胞与所述一种或多种FGF激活剂最初接触。

9. 根据权利要求3-8中任一项所述的方法，其还包括使所述细胞与一种或多种SC分化诱导剂接触，以产生表达一种或多种SC前体标志物的细胞群体。

10. 根据权利要求9所述的方法，其中所述干细胞分化方法包括使所述细胞与所述一种或多种SC分化诱导剂接触至少约3天，以产生表达一种或多种施旺细胞前体标志物的分化细胞群体。

11. 根据权利要求10所述的方法，其中所述干细胞分化方法包括使所述细胞与所述一种或多种SC分化诱导剂接触约14天。

12. 根据权利要求9-11中任一项所述的方法，其中所述干细胞分化方法包括：在从所述干细胞与所述一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触起约10天至约15天，使所述细胞与所述一种或多种SC分化诱导剂最初接触。

13. 根据权利要求9-12中任一项所述的方法，其中所述干细胞分化方法包括使所述细胞与所述一种或多种FGF激活剂和所述一种或多种SC分化诱导剂同时接触。

14. 根据权利要求3-13中任一项所述的方法，其中在从所述干细胞与所述一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触起约25天或之后，所述干细胞群体分化成表达一种或多种所述施旺细胞前体标志物的分化细胞群体。

15. 根据权利要求3-14中任一项所述的方法，其中所述干细胞分化方法还包括使所述干细胞与一种或多种SMAD抑制剂接触。

16. 根据权利要求15所述的方法, 其中所述干细胞分化方法包括使所述干细胞与所述一种或多种TGF β /激活素-Nodal信号传导抑制剂和所述一种或多种SMAD抑制剂同时接触。

17. 根据权利要求3-16中任一项所述的方法, 其中所述干细胞分化方法包括: 不晚于从所述干细胞与所述一种或多种TGF β /激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触起约4天, 使所述细胞与所述一种或多种Wnt激活剂最初接触。

18. 根据权利要求17所述的方法, 其中所述干细胞分化方法包括: 在从所述干细胞与所述一种或多种TGF β /激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触起约2天, 使所述细胞与所述一种或多种Wnt信号传导激活剂最初接触。

19. 根据权利要求17所述的方法, 其中所述干细胞分化方法包括: 在所述干细胞与所述一种或多种TGF β /激活素-Nodal信号传导抑制剂最初接触的同一天, 使所述细胞与所述一种或多种Wnt信号传导激活剂最初接触。

20. 根据权利要求3-19中任一项所述的方法, 其中所述一种或多种TGF β /激活素-Nodal信号传导抑制剂是选自SB431542、其衍生物及其混合物的小分子。

21. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述一种或多种TGF β /激活素-Nodal信号传导抑制剂是SB431542。

22. 根据权利要求15-21中任一项所述的方法, 其中所述一种或多种SMAD抑制剂是选自LDN193189、其衍生物及其混合物的小分子。

23. 根据权利要求22所述的方法, 其中所述一种或多种SMAD抑制剂是LDN193189。

24. 根据权利要求3-23中任一项所述的方法, 其中所述一种或多种Wnt激活剂减少糖原合成酶激酶3 β (GSK3 β) 以用于激活Wnt信号传导。

25. 根据权利要求24所述的方法, 其中所述一种或多种Wnt激活剂是选自CHIR99021、Wnt-1、WNT3A、Wnt4、Wnt5a、其衍生物及其混合物的小分子。

26. 根据权利要求25所述的方法, 其中所述一种或多种Wnt激活剂是CHIR99021。

27. 根据权利要求9-26中任一项所述的方法, 其中所述一种或多种SC分化诱导剂选自神经调节蛋白、LIF、CNTF、毛喉素、TGF β 和FBS。

28. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述一种或多种SC分化诱导剂是NRG1。

29. 根据权利要求4-28中任一项所述的方法, 其中所述一种或多种FGF激活剂选自FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF7、FGF8、FGF10、FGF18、其衍生物及其混合物。

30. 根据权利要求29所述的方法, 其中所述一种或多种FGF激活剂是FGF2。

31. 根据权利要求1、3-30中任一项所述的方法, 其中所述一种或多种施旺细胞前体标志物选自SOX10、GAP43、BLBP、MPZ、Dhh、P75NTR、CD49D、TFAP2、CDH19、CD44、ERBB3、POU3F1、GFAP、CALCB、GRP116、TSPYL5、ITPKA、SLC17A6、SYPL2、LOC100128252、ANGPTL7、LOC728978、ZNF502、SLC16A6、LPL、SLC30A2和SLC10A4。

32. 根据权利要求3-31中任一项所述的方法, 其中所述干细胞是人干细胞。

33. 根据权利要求32所述的方法, 其中所述人干细胞选自人胚胎干细胞、人诱导多能干细胞、人单性生殖干细胞、原始生殖细胞样多能干细胞、外胚层干细胞、F-class多能干细胞。

34. 根据权利要求4所述的方法, 其中所述有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件包括: 使所述细胞与一种或多种FGF激活剂和一种或多种施旺细胞分化诱导剂接触。

35. 根据权利要求34所述的方法, 其中所述有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件包括: 使所述细胞与所述一种或多种FGF激活剂和所述一种或多种施旺细胞分化诱导剂接触至少约3天。

36. 根据权利要求35所述的方法, 其中所述有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件包括: 使所述细胞与所述一种或多种FGF激活剂和所述一种或多种施旺细胞分化诱导剂接触约10天。

37. 根据权利要求35所述的方法, 其中所述有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件包括: 使所述细胞与所述一种或多种FGF激活剂和所述一种或多种施旺细胞分化诱导剂接触约35天。

38. 根据权利要求33-37中任一项所述的方法, 其中所述有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件包括: 进一步使所述细胞与一种或多种SC分化增强剂接触。

39. 根据权利要求38所述的方法, 其中所述有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件包括: 使所述细胞与所述一种或多种SC分化增强剂接触至少约3天。

40. 根据权利要求39所述的方法, 其中所述有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件包括: 使所述细胞与所述一种或多种SC分化增强剂接触约10天。

41. 根据权利要求39所述的方法, 其中所述有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件包括: 使所述细胞与所述一种或多种SC分化增强剂接触约35天。

42. 根据权利要求38-41中任一项所述的方法, 其中所述有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件包括: 使群体细胞与所述一种或多种FGF激活剂、所述一种或多种施旺细胞分化诱导剂和所述一种或多种SC分化增强剂同时接触。

43. 根据权利要求33-42中任一项所述的方法, 其中所述有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件包括: 进一步使所述细胞与一种或多种SC分化增强剂接触。

44. 根据权利要求38-43中任一项所述的方法, 其中所述一种或多种SC分化增强剂选自神经调节蛋白、环磷酸腺苷(cAMP)、毛喉素、LIF和CNTF。

45. 根据权利要求44所述的方法, 其中所述一种或多种SC分化增强剂是cAMP。

46. 根据权利要求3-45中任一项所述的方法, 其中所述有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件包括: 使所述细胞聚集为3D球状体; 和使所述3D球状体与所述一种或多种FGF激活剂和所述一种或多种施旺细胞分化诱导剂接触。

47. 根据权利要求46所述的方法, 其中所述有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件还包括在贴壁培养中培养所述3D球状体。

48. 根据权利要求4和34-37中任一项所述的方法, 其中所述一种或多种施旺细胞标志物选自LRRTM4、CDH1、FABP7、BDNF、UNC5B、SOSTDC1、OLIG1、PLAT、KCNJ10、SHH、NTN1、GDNF、ERBB3、GAP43、SOX10、S100、GFAP、POU3F1、PMP22、MBP、AQP4、MPZ、NGFR、NFATC4、MOG、IFNG、MAL、NTF3、TGFB1、CD9、CD81、CD44、CD98、CD49E、CD49D、TYRP1、ENTHD1、NT5E、HTR2B、NOV、IL8、SLC16A6、CDKN2A、PLP2、S100A6、AQP9和CDH19。

49. 根据权利要求1-48中任一项所述的方法, 其中所述葡萄糖浓度为至少约10mM。

50. 根据权利要求49所述的方法, 其中所述葡萄糖浓度为约30mM。

51. 根据权利要求1-50中任一项所述的方法, 其中所述测量在从所述细胞初始暴露于所述葡萄糖起至少约12小时进行。

52. 根据权利要求51所述的方法, 其中所述测量在从所述细胞初始暴露于所述葡萄糖起约72小时进行。

53. 根据权利要求1-52中任一项所述的方法, 其中所述施旺细胞相关疾病选自周围神经病变、神经鞘瘤、夏科-马里-图思病和格林巴利综合征。

54. 根据权利要求53所述的方法, 其中所述施旺细胞相关疾病是周围神经病变。

55. 根据权利要求54所述的方法, 其中所述周围神经病变是糖尿病性周围神经病变。

56. 一种受试者中周围神经系统 (PNS) 再生、用于中枢神经系统 (CNS) 再生、用于预防和/或修复髓鞘损伤、和/或用于预防和/或治疗施旺细胞相关疾病的方法, 其包括向患有所述施旺细胞相关疾病的受试者施用有效量的化合物或包括其的组合物, 其中所述化合物选自钾离子通道阻断剂、去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂、环戊噻嗪、卡托普利、伊拉地平、易混翠雀花碱、尼美舒利、曲安奈德、其盐、其溶剂化物、其水合物、其包合物、其前药及其组合。

57. 根据权利要求56所述的方法, 其中所述钾离子通道阻断剂是磺酰脲化合物。

58. 根据权利要求57所述的方法, 其中所述磺酰脲化合物选自甲苯磺丁脲、乙酰苯磺酰环己脲、氨磺丁脲、氯磺丙脲、格列环脲 (对甲苯磺酰环己脲)、美他己脲、妥拉磺脲、格列本脲 (优降糖)、格列波脲、格列齐特、格列吡嗪、格列喹酮、格列派特、格列吡脲、格列美脲、其盐、其溶剂化物、其水合物、其包合物及其前药。

59. 根据权利要求56-58中任一项所述的方法, 其中所述去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂选自安非他酮、咪奈丁、哌甲酯 (Ritalin®、

Concerta®、Metadate®、Methylin®、Rubifen®或Stimdate®)、托莫西汀、马普替林、desoxypipradrol、右哌甲酯、苯托雷司、二苯基脯氨酸、哌乙酯、芬坎法明、芬咖明、利非他明、亚甲二氧基吡咯戊酮、哌甲酯、诺米芬新、0-2172、恶喹酸、哌苯甲醇、苯咯戊烷、吡咯戊酮、他美曲林、WY-46824、其盐、其溶剂化物、其水合物、其前药及其包合物。

60. 根据权利要求56-59中任一项所述的方法, 其中所述施旺细胞相关疾病选自周围神经病变、神经鞘瘤、夏科-马里-图思病和格林巴利综合征。

61. 根据权利要求60所述的方法, 所述施旺细胞相关疾病是周围神经病变。

62. 根据权利要求61所述的方法, 所述周围神经病变是糖尿病性周围神经病变。

63. 根据权利要求56-62中任一项所述的方法, 所述化合物是安非他酮、其盐、溶剂化物、水合物、包合物或前药。

64. 根据权利要求56-62中任一项所述的方法, 所述化合物是盐酸安非他酮。

65. 根据权利要求56-62中任一项所述的方法, 所述化合物是安非他酮代谢物、其盐、溶剂化物、水合物、包合物或前药。

66. 根据权利要求65所述的方法, 所述安非他酮代谢物选自羟基安非他酮、苏氨酸氢化安非他酮和赤藓糖氢化安非他酮。

67. 根据权利要求56-66中任一项所述的方法, 所述钾离子通道阻断剂是甲苯磺丁脲、其盐、溶剂化物、水合物、包合物或前药。

68. 根据权利要求56-67中任一项所述的方法, 所述组合物是还包括药学可接受载体的药物组合物。

使用源自干细胞的施旺细胞的药物发现方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年11月14日提交的美国申请第62/421,816号的优先权,将其全部内容并入以供参考,并且对其要求优先权。

技术领域

[0003] 本发明公开的主题涉及源自干细胞(例如人干细胞)的施旺细胞前体和施旺细胞用于在周围神经系统(PNS)和/或中枢神经系统(CNS)的再生、髓鞘损伤的预防和/或修复、和/或施旺细胞相关疾病(例如周围神经病变糖尿病性周围神经病变)的预防和/或治疗中药物发现的用途。本发明还提供使用通过所述药物发现材料和方法识别的化合物治疗施旺细胞相关疾病的方法。

背景技术

[0004] 施旺细胞(SC)是周围神经系统(PNS)的神经胶质,并且对PNS功能必不可少。它们经由施旺细胞前体(SCP)中间体从神经嵴(NC)发展而来。SC在PNS的功能调节、维持和修复中起着关键的作用,并且表现出促进损伤后神经修复的显著能力(Jessen等,2015;Lavdas等,2008)。SC缺陷涉及广泛的人类疾病,比如神经鞘瘤(Schwannomatosis)、夏科-马里-图思病(Charcot Marie Tooth Disease)、格林巴利综合征(Guillain Barre Syndrome)和各种其它周围神经病变,包括糖尿病性周围神经病变(DPN)。

[0005] 糖尿病是周围神经病变的主要原因,影响30%(Callaghan等,2012)至60%(Zochodne,2007)的糖尿病患者。它代表主要的健康问题,导致生活质量下降,发病率和死亡率增加(La Fontaine等,2014)。2001年美国与DPN相关的医疗费用估计为每年46-137亿美元,并且继续增加(Gordois等,2003)。DPN的症状多种多样,但包括感觉功能障碍和疼痛以及自主和ENS并发症。

[0006] 除了通过仔细监测和调节葡萄糖水平来实现预防进一步损害的主要目标之外,目前没有有效的对DPN的治疗。症状治疗包括使用抗抑郁药、抗惊厥药和阿片类药物以应对神经性疼痛。

[0007] DPN的发病机制可能涉及几种导致细胞毒性和周围神经退化的复杂成因(Simmons和Feldman,2002)。有证据表明,糖尿病中的高血糖、缺氧和氧化应激导致SC的退化,特别是在感觉神经中(Eckersley,2002)。尽管最终症状是由神经元功能障碍引起,但尚不清楚是感觉神经元还是神经胶质在DPN的发病机制中起到关键作用(Eckersley,2002)。鉴于包括系统性血管异常的非细胞自主因素对疾病表型的复杂贡献,在当前的DPN动物模型中详细分析细胞类型特异性的机制是非常具有挑战性的。因此,对于DPN的体外疾病模型仍有需求。

发明内容

[0008] 本发明公开的主题涉及如下发现:通过体外分化源自干细胞(例如人干细胞)的施

旺细胞前体和施旺细胞可以用在用于筛选合适药物的疾病模型中,上述药物适用于周围神经系统(PNS)和/或中枢神经系统(CNS)的再生、髓鞘损伤的预防和/或修复、和/或施旺细胞相关疾病(例如,周围神经病变,例如,糖尿病性周围神经病变(“DPN”))的预防和/或治疗。本发明还涉及使用通过所述材料和方法识别的分子治疗施旺细胞相关疾病的方法。

[0009] 本发明公开的主题提供筛选适合用于周围神经系统(PNS)的再生、用于中枢神经系统(CNS)的再生、用于髓鞘损伤的预防和/或修复、和/或用于施旺细胞相关疾病的预防和/或治疗的化合物的体外方法。在某些实施方式中,该方法包括:

[0010] (a) 使表达一种或多种施旺细胞前体标志物的细胞群体暴露于至少约30mM的葡萄糖浓度,其中细胞获自干细胞的体外分化;

[0011] (b) 在葡萄糖暴露之后,使细胞与测试化合物接触;

[0012] (c) 测量不经测试化合物处理的细胞的第一山梨糖醇水平、第一葡萄糖水平和第一细胞生存力中的一个或多个;

[0013] (d) 测量经测试化合物处理的细胞的第二山梨糖醇水平、第二葡萄糖水平和第二细胞生存力中的一个或多个;

[0014] (e) 对以下的一项或多项进行比较:

[0015] (i) 第二山梨糖醇水平与第一山梨糖醇水平,

[0016] (ii) 第二葡萄糖水平与第一葡萄糖水平,

[0017] (iii) 第二细胞生存力与第一细胞生存力;和

[0018] (f) 在以下的一项或多项存在时,识别出适合用于PNS和/或CNS的再生、用于髓鞘损伤的预防和/或修复、和/或用于施旺细胞相关疾病的预防和/或治疗的测试化合物:

[0019] (i) 第二山梨糖醇水平低于第一山梨糖醇水平,

[0020] (ii) 第二葡萄糖水平低于第一葡萄糖水平,和

[0021] (iii) 第二细胞生存力低于第一细胞生存力。

[0022] 在某些实施方式中,该方法包括:(a) 使表达一种或多种施旺细胞标志物的细胞群体暴露于至少约30mM的葡萄糖浓度,其中细胞获自干细胞的体外分化;

[0023] (b) 在葡萄糖暴露之后,使细胞与测试化合物接触;

[0024] (c) 测量不经测试化合物处理的细胞的第一山梨糖醇水平、第一葡萄糖水平和第一细胞生存力中的一个或多个;

[0025] (d) 测量经测试化合物处理的细胞的第二山梨糖醇水平、第二葡萄糖水平和第二细胞生存力中的一个或多个;

[0026] (e) 对以下的一项或多项进行比较:

[0027] (i) 第二山梨糖醇水平与第一山梨糖醇水平,

[0028] (ii) 第二葡萄糖水平与第一葡萄糖水平,

[0029] (iii) 第二细胞生存力与第一细胞生存力;和

[0030] (f) 在以下的一项或多项存在时,识别出适合用于PNS和/或CNS的再生、用于髓鞘损伤的预防和/或修复、和/或用于施旺细胞相关疾病的预防和/或治疗的测试化合物:

[0031] (i) 第二山梨糖醇水平低于第一山梨糖醇水平,

[0032] (ii) 第二葡萄糖水平低于第一葡萄糖水平,和

[0033] (iii) 第二细胞生存力低于第一细胞生存力。

[0034] 在某些实施方式中,表达一种或多种施旺细胞前体标志物的细胞通过包括以下步骤的方法获自干细胞的体外分化:使干细胞群体与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂接触和使细胞与一种或多种Wnt激活剂接触,和进一步使细胞与一种或多种FGF激活剂接触至少约3天。

[0035] 在某些实施方式中,表达一种或多种施旺细胞标志物的细胞通过包括以下步骤的方法获自干细胞的体外分化:使干细胞群体与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂接触和使细胞与一种或多种Wnt激活剂接触,进一步使细胞与一种或多种FGF激活剂接触至少约3天,以产生表达一种或多种施旺细胞前体标志物的分化细胞群体,和使表达一种或多种施旺细胞前体标志物的分化细胞群体经受有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件。

[0036] 在某些实施方式中,干细胞分化方法包括使细胞与一种或多种FGF激活剂接触约14天。在某些实施方式中,干细胞分化方法包括:不晚于从干细胞与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触起约20天,使细胞与一种或多种FGF激活剂最初接触。在某些实施方式中,干细胞分化方法包括:在从干细胞与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触起约10天至约15天,使细胞与一种或多种FGF激活剂最初接触。在某些实施方式中,干细胞分化方法包括:在从干细胞与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触起约11天,使细胞与一种或多种FGF激活剂最初接触。

[0037] 在某些实施方式中,上述方法还包括使细胞与一种或多种SC分化诱导剂接触,以产生表达一种或多种SC前体标志物的细胞群体。在某些实施方式中,干细胞分化方法包括使细胞与一种或多种SC分化诱导剂接触至少约3天,以产生表达一种或多种施旺细胞前体标志物的分化细胞群体。在某些实施方式中,干细胞分化方法包括使细胞与一种或多种SC分化诱导剂接触约14天。在某些实施方式中,干细胞分化方法包括:在从干细胞与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触起约10天至约15天,使细胞与一种或多种SC分化诱导剂最初接触。在某些实施方式中,干细胞分化方法包括使细胞与一种或多种FGF激活剂和一种或多种SC分化诱导剂同时接触。

[0038] 在某些实施方式中,在从干细胞与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触起约25天或之后,干细胞群体分化成表达一种或多种施旺细胞前体标志物的分化细胞群体。

[0039] 在某些实施方式中,干细胞分化方法还包括使干细胞与一种或多种SMAD抑制剂接触。在某些实施方式中,干细胞分化方法包括使干细胞与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂和一种或多种SMAD抑制剂同时接触。

[0040] 在某些实施方式中,干细胞分化方法包括:不晚于从干细胞与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触起约4天,使细胞与所述一种或多种Wnt激活剂最初接触。在某些实施方式中,干细胞分化方法包括:在从干细胞与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触起约2天,使细胞与一种或多种Wnt信号传导激活剂最初接触。在某些实施方式中,干细胞分化方法包括:在干细胞与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂最初接触的同一天,使细胞与一种或多种Wnt信号传导激活剂最初接触。

[0041] 在某些实施方式中,一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂是选自

SB431542、其衍生物及其混合物的小分子。在某些实施方式中，一种或多种TGF β /激活素-Nodal信号传导抑制剂是SB431542。

[0042] 在某些实施方式中，一种或多种SMAD抑制剂是选自LDN193189、其衍生物及其混合物的小分子。在某些实施方式中，一种或多种SMAD抑制剂是LDN193189。

[0043] 在某些实施方式中，一种或多种Wnt激活剂减少糖原合成酶激酶3 β (GSK3 β) 以用于激活Wnt信号传导。在某些实施方式中，一种或多种Wnt激活剂是选自CHIR99021、Wnt-1、WNT3A、Wnt4、Wnt5a、其衍生物及其混合物的小分子。在某些实施方式中，一种或多种Wnt激活剂是CHIR99021。

[0044] 在某些实施方式中，一种或多种SC分化诱导剂选自神经调节蛋白、LIF、CNTF、毛喉素、TGF β 和FBS。在某些实施方式中，一种或多种SC分化诱导剂是NRG1。

[0045] 在某些实施方式中，一种或多种FGF激活剂选自FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF7、FGF8、FGF10、FGF18、其衍生物及其混合物。在某些实施方式中，一种或多种FGF激活剂是FGF2。

[0046] 在某些实施方式中，一种或多种施旺细胞前体标志物选自SOX10、GAP43、BLBP、MPZ、Dhh、P75NTR、CD49D、TFAP2、CDH19、CD44、ERBB3、POU3F1、GFAP、CALCB、GRP116、TSPYL5、ITPKA、SLC17A6、SYPL2、LOC100128252、ANGPTL7、LOC728978、ZNF502、SLC16A6、LPL、SLC30A2和SLC10A4。在某些实施方式中，一种或多种施旺细胞前体标志物选自表1-4所列的基因。在某些实施方式中，一种或多种施旺细胞前体标志物选自表1所列的基因。在某些实施方式中，一种或多种施旺细胞前体标志物选自CALCB、GRP116、TSPYL5、ITPKA、SLC17A6、SYPL2、LOC100128252、ANGPTL7、LOC728978和ZNF502。

[0047] 在某些实施方式中，干细胞是人干细胞。在某些实施方式中，人干细胞选自人胚胎干细胞、人诱导多能干细胞、人单性生殖干细胞、原始生殖细胞样多能干细胞、外胚层干细胞、F-class多能干细胞。

[0048] 在某些实施方式中，有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件包括：使细胞与一种或多种FGF激活剂和一种或多种施旺细胞分化诱导剂接触。在某些实施方式中，有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件包括：使细胞与一种或多种FGF激活剂和一种或多种施旺细胞分化诱导剂接触至少约3天。在某些实施方式中，有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件包括：使细胞与一种或多种FGF激活剂和一种或多种施旺细胞分化诱导剂接触约10天。在某些实施方式中，有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件包括：使细胞与一种或多种FGF激活剂和一种或多种施旺细胞分化诱导剂接触约35天。

[0049] 在某些实施方式中，有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件包括：进一步使细胞与一种或多种SC分化增强剂接触。在某些实施方式中，有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件包括：使细胞与一种或多种SC分化增强剂接触至少约3天。在某些实施方式中，有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件包括：使细胞与一种或多种SC分化增强剂接触约10天。在某些实施方式中，有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件包括：使细胞与一种或多种SC分化增强剂接触约35天。在某些实施方式中，有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件包括：使群体细胞与一种或多种FGF激活剂、一种或多种施旺细胞分化诱导剂和一种或多种SC分化增强剂同时接触。

[0050] 在某些实施方式中，有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件包括：进一

步使细胞与一种或多种SC分化增强剂接触。在某些实施方式中,一种或多种SC分化增强剂选自神经调节蛋白、环磷酸腺苷(cAMP)、毛喉素、LIF和CNTF。在某些实施方式中,一种或多种SC分化增强剂是cAMP。

[0051] 在某些实施方式中,有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件包括:使细胞聚集为3D球状体;和使3D球状体与一种或多种FGF激活剂和一种或多种施旺细胞分化诱导剂接触。在某些实施方式中,有利于施旺细胞前体细胞成熟为施旺细胞的条件还包括在贴壁培养中培养3D球状体。在某些实施方式中,一种或多种施旺细胞标志物选自LRRTM4、CDH1、FABP7、BDNF、UNCB5、SOSTDC1、OLIG1、PLAT、KCNJ10、SHH、NTN1、GDNF、ERBB3、GAP43、SOX10、S100、GFAP、POU3F1、PMP22、MBP、AQP4、MPZ、NGFR、NFATC4、MOG、IFNG、MAL、NTF3、TGFB1、CD9、CD81、CD44、CD98、CD49E、CD49D、TYRP1、ENTHD1、NT5E、HTR2B、NOV、IL8、SLC16A6、CDKN2A、PLP2、S100A6、AQP9和CDH19。在某些实施方式中,一种或多种SC标志物选自表1-4所列的基因。在某些实施方式中,一种或多种SC标志物选自表2-4所列的基因。在某些实施方式中,一种或多种SC标志物选自TYRP1、CD44、ENTHD1、NT5E、HTR2B、NOV、IL8、SLC16A6和CDKN2A。

[0052] 在某些实施方式中,葡萄糖浓度为至少约10mM。在某些实施方式中,葡萄糖浓度为约30mM。在某些实施方式中,在从细胞初始暴露于葡萄糖起至少约12小时进行测量。在某些实施方式中,在从细胞初始暴露于葡萄糖起约72小时进行测量。

[0053] 在某些实施方式中,施旺细胞相关疾病选自周围神经病变、神经鞘瘤、夏科-马里-图思病和格林巴利综合征。在某些实施方式中,施旺细胞相关疾病是周围神经病变。在某些实施方式中,周围神经病变是糖尿病性周围神经病变。

[0054] 在某些实施方式中,本发明公开的主题还提供受试者中周围神经系统(PNS)再生、用于中枢神经系统(CNS)再生、用于预防和/或修复髓鞘损伤、和/或预防和/或治疗施旺细胞相关疾病的方法,该方法包括向患有施旺细胞相关疾病的受试者施用有效量的化合物或包括其的组合物,其中化合物选自钾离子通道阻断剂、去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂、环戊噻嗪(cyclopenthiazide)、卡托普利(captopril)、伊拉地平(isradipine)、易混翠雀花碱(condelphine)、尼美舒利(nimesulide)、曲安奈德(triamcinolone)、其盐、其溶剂化物、其水合物、其包合物、其前药及其组合。

[0055] 在某些实施方式中,钾离子通道阻断剂是磺酰脲化合物。在某些实施方式中,磺酰脲化合物选自甲苯磺丁脲(tolbutamide)、乙酰苯磺酰环己脲(acetohexamide)、氨磺丁脲(carbutamide)、氯磺丙脲(chlorpropamide)、格列环脲(glycyclamide)(对甲苯磺酰环己脲(tolhexamide))、美他己脲(metahexamide)、妥拉磺脲(tolazamide)、格列本脲(glibenclamide)(优降糖(glyburide))、格列波脲(glibornuride)、格列齐特(gliclazide)、格列吡嗪(glipizide)、格列喹酮(gliquidone)、格列派特(glisoxepide)、格列吡脲(glyclopamide)、格列美脲(glimepiride)、其盐、其溶剂化物、其水合物、其包合物及其前药。

[0056] 在某些实施方式中,去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂选自安非他酮(bupropion)、咪奈丁(amineptine)、哌甲酯(methylphenidate)(Ritalin®、Concerta®、Metadate®、Methylin®、Rubifen®或Stimdate®)、托莫西汀(atomoxetine)、马普替林(maprotiline)、desoxypipradrol、右哌甲酯

(dexmethylphenidate)、苯托雷司(difemetorex)、二苯基脯氨酸(diphenylprolinol)、哌乙酯(ethylphenidate)、芬坎法明(fencamfamine)、芬咖明(fencamine)、利非他明(lefetamine)、亚甲二氧基吡咯戊酮(methylenedioxypyrovalerone)、哌甲酯(methylphenidate)、诺米芬新(nomifensine)、O-2172、恶唑酸(oxolinic acid)、哌苯甲醇(pipradrol)、苯咯戊烷(prolintane)、吡咯戊酮(pyrovalerone)、他美曲林(tametriline)、WY-46824、其盐、其溶剂化物、其水合物、其前药及其包合物。

[0057] 在某些实施方式中,施旺细胞相关疾病选自周围神经病变、神经鞘瘤、夏科-马里-图思病和格林巴利综合征。在某些实施方式中,施旺细胞相关疾病是周围神经病变。在某些实施方式中,周围神经病变是糖尿病性周围神经病变。

[0058] 在某些实施方式中,化合物是安非他酮、其盐、溶剂化物、水合物、包合物或前药。在某些实施方式中,化合物是盐酸安非他酮。在某些实施方式中,化合物是安非他酮代谢物、或其盐、溶剂化物、水合物、包合物或前药。在某些实施方式中,安非他酮代谢物选自羟基安非他酮、苏氨酸氢化安非他酮(threo-hydrobupropion)和赤藓糖氢化安非他酮(erythrohydrobupropion)。在某些实施方式中,钾离子通道阻断剂是甲苯磺丁脲、其盐、溶剂化物、水合物、包合物或前药。

[0059] 在某些实施方式中,组合物是还包括药学可接受载体的药物组合物。

附图说明

[0060] 图1A-1I:由hESC获得SC。(1A)用于获得施旺细胞前体和施旺细胞的方案(第11-35天)的示意图。(1B)分化第11、25和35天的SOX10::GFP表达。(1C、1D)用于参与施旺细胞分化和髓鞘化(1C)和神经相互作用和支持(1D)的一组施旺谱系标志物的qRT-PCR。未分选的和CD49D分选的分化NC细胞对于SOX10的免疫荧光。(1E)在第60天,源自hESC的SC的施旺谱系标志物的代表性免疫荧光图像。(1F) (1E)中标志物的定量。(1G)与CNS前体相比,在分化第50天和第100天,CD49d纯化的NC、CD49d纯化的SCP、人原代施旺细胞和CD98纯化的源自hESC的SC的主成分分析。(1H)在第25天SCP和第100天SC中前10位(正常字体)和选择的另外的(粗体字体)显著上调的基因。(1I) (1E)中标志物的定量。B的左图和中间图中比例尺=100 μ m, B右图和E中比例尺为25 μ m。

[0061] 图2A-2D:hESC-SC对高葡萄糖暴露的选择性易损性(vulnerability)。(2A)用于模拟源自hESC的细胞类型中糖尿病性神经损伤的实验范例示意图。(2B)使用LDH活性检定,对源自hESC的SC和感觉神经元响应于不同葡萄糖浓度暴露进行细胞死亡分析。(2C)未分化的hESC和源自hESC的施旺细胞和感觉神经元中醛糖还原酶(AR)和山梨糖醇脱氢酶(SDH)的qRT-PCR。(2D)源自hESC的SC和感觉神经元响应于不同葡萄糖浓度暴露的细胞内山梨糖醇测量。

[0062] 图3A-3F:安非他酮HCl(Bupropion HCl)保护hESC-SC免于糖毒性。(3A、3E)用于识别提高经高葡萄糖处理的hESC-SC的生存力的化合物的高通量药物筛选的示意图。(3B)显示活的经高葡萄糖处理的hESC-SC的总数的初步筛选数据以及1280个筛选出的化合物。(3C)选择的命中(hit)化合物“安非他酮HCl”对细胞死亡的作用的剂量反应分析。(3D)选择的命中化合物“安非他酮HCl”对山梨糖醇水平的作用的剂量反应分析。(3F)主要命中化合物列表(Z-分数>3)。p-值为:*p<0.05;**p<0.01。

[0063] 图4A-4D:安非他酮对葡萄糖代谢和多元醇通路的影响。安非他酮HCl通过增加糖酵解通量而降低山梨糖醇水平(4A-4C)。响应于安非他酮HCl的细胞内葡萄糖水平(4A)、葡萄糖再摄取(4B)和丙酮酸盐(4C)的测量。(4D)安非他酮对SC中葡萄糖代谢的影响的模型示意图。p-值为:*p<0.05;**p<0.01。

[0064] 图5A-5G:安非他酮处理防止小鼠中的糖尿病性神经损伤。(5A)模拟小鼠中糖尿病和安非他酮处理的示意图。(5B)正常小鼠和经STZ和安非他酮处理的小鼠中的血糖水平。(5C)测量正常小鼠和经STZ和安非他酮处理的小鼠中后爪撤回(withdrawal)延迟(latency)的热敏感度试验。(5D、5E)正常小鼠和经STZ和安非他酮处理的小鼠的坐骨神经中的TUNEL染色和定量。(5F、5G)正常小鼠和经STZ和安非他酮处理的小鼠的坐骨神经中损伤髓鞘结构的透射电子显微镜检和定量。p-值为:*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001;****p<0.000。D中比例尺=100 μ m,F中比例尺为5 μ m。BP,安非他酮HCL。

[0065] 图6A-6B:源自hESC的SCP和SC谱系的表征。(6A)在源自hESC的NC(第11天)和SCP(第25天)中SOX10::GFP的流式细胞术分析。(6B)体外分化过程中不同时间点源自hESC的SC中GFAP的流式细胞术分析。

[0066] 图7A-7C:抗体筛选识别出新的人SC表面标志物。(7A)抗体筛选范例的示意图。(7B)初步筛选识别出新的hESC-SC表面标志物。(7C)基于免疫细胞化学和流式细胞术,验证SC分化不同阶段的表面标志物表达。

具体实施方式

[0067] 本发明公开的主题涉及源自干细胞的施旺细胞前体和/或施旺细胞用于预防和/或治疗施旺细胞相关疾病(例如,周围神经病变,例如,糖尿病性周围神经病变)药物发现的用途。本发明公开的主题还涉及从该药物发现方法筛选出的化合物和这样的化合物的药物组合物用于预防和/或治疗施旺细胞相关疾病(例如,周围神经病变,例如,糖尿病性周围神经病变)的用途。

[0068] 出于清楚的公开而非限制的目的,具体实施方式分为以下小节:

[0069] 1.定义

[0070] 2.干细胞分化方法

[0071] 3.治疗性化合物筛选方法

[0072] 4.治疗方法

[0073] 5.试剂盒

[0074] 1.定义

[0075] 本说明书中使用的术语在本发明的上下文中和在使用每个术语的具体上下文中通常具有其在本领域中的通常含义。某些术语在下文或说明书中的其它地方讨论,以便向从业者提供对描述本发明的组合物和方法以及如何制备和使用它们的额外指导。

[0076] 术语“约”或“大约”是指在由本领域普通技术人员确定的特定值的可接受误差范围内,这将部分地取决于如何测量或确定该值,即测量系统的局限性。例如,根据本领域的惯例,“约”可以指在3个或更多于3个标准偏差内。或者,“约”可以表示给定值的至多20%例如至多10%、至多5%、或至多1%的范围。或者,特别是关于生物系统或过程,该术语可以表示在数值的一个数量级内、例如在5倍以内或2倍以内。

[0077] 如本文所用,涉及“信号转导蛋白”时术语“信号传导”是指通过配体结合膜受体蛋白质或一些其它刺激而得以激活或以其它方式影响的蛋白质。信号转导蛋白的实例包括,但不限于,成纤维细胞生长因子(FGF)、SMAD、无翼(Wnt)复合蛋白,包括 β -catenin、NOTCH、转化生长因子 β (TGF β)、激活素、Nodal和糖原合成酶激酶3 β (GSK3P)蛋白。对于许多细胞表面受体或内部受体蛋白质,配体-受体相互作用与细胞的应答没有直接联系。配体激活的受体可以首先与细胞内的其它蛋白质相互作用,然后产生配体对细胞行为的最终生理效应。通常,在受体激活或抑制后,一连串的数种相互作用的细胞蛋白质的行为发生改变。由受体激活诱导的整组细胞变化称为信号转导机制或信号传导通路。

[0078] 如本文所用,术语“信号”是指控制细胞结构和功能变化的内部和外部因素。它们本质上可以是化学的或物理的。

[0079] 如本文所用,术语“配体”是指与受体结合的分子和蛋白质,例如TGF β 、激活素、Nodal、骨形态发生蛋白(BMP)等。

[0080] 如本文所用的“抑制剂”是指干扰(例如,减少、降低、抑制、消除或阻断)分子或通路的信号传导功能的化合物或分子(例如,小分子、肽、拟肽(peptidomimetic)、天然化合物、siRNA、反义核酸、适体或抗体)。抑制剂可以是改变指定蛋白质(信号传导分子、与指定信号传导分子有关的任何分子、指定的相关分子,比如糖原合成酶激酶3 β (GSK3 β))(例如,包括但不限于本文所述的信号传导分子)的任何活性的任何化合物或分子,例如,经由直接接触SMAD信号传导、接触SMAD mRNA、引起SMAD的构象变化、降低SMAD蛋白质水平或干扰SMAD与信号传导配偶体的相互作用(例如,包括本文所述的那些)并且影响SMAD靶基因(例如本文所述的那些)的表达。抑制剂还包括通过拦阻上游信号传导分子(例如,在细胞外结构域内)间接调节SMAD生物活性的分子,信号传导分子和效果的例子包括:隔离骨形态发生蛋白的Noggin,其抑制ALK受体1、2、3和6的激活,从而阻止下游SMAD激活。同样,Chordin、Cerberus、Follistatin,类似地隔离SMAD信号传导的细胞外激活剂。Bambi是一种跨膜蛋白,也充当假受体来隔离细胞外TGF β 信号传导分子。阻断激活素、Nodal、TGF β 和BMP的抗体预期用于中和SMAD信号传导的细胞外激活剂等。除通过结合并影响指定信号传导分子上游的分子转而引起指定分子抑制而诱导的抑制以外,还就竞争性抑制(以排除或减少另一种已知结合化合物的结合的方式结合活性位点)和变构抑制(以干扰化合物与蛋白质活性位点结合的方式改变蛋白质构象的方式结合蛋白质)而言对抑制剂进行了描述。抑制剂可以通过实际接触信号传导靶标来抑制信号传导靶标或信号传导靶通路的“直接抑制剂”。

[0081] 如本文所用,术语“施旺细胞前体”是指表达一种或多种施旺细胞前体标志物(其包括但不限于本文公开的施旺细胞前体标志物)的细胞。在合适的成熟条件下,施旺细胞前体可以成为施旺细胞。

[0082] 如本文所用,术语“施旺细胞”是指表达一种或多种施旺细胞标志物(其包括但不限于本文公开的施旺细胞标志物)的细胞。施旺细胞可以是髓鞘化施旺细胞或非髓鞘化施旺细胞。在某些实施方式中,施旺细胞能够在周围神经系统中维持神经元的轴突和使其再生(例如健康轴突的维持)。在某些实施方式中,施旺细胞能够形成髓鞘。在某些实施方式中,施旺细胞能够形成Remak束。

[0083] 如本文所用,“激活剂”是指增加、诱导、刺激、激活、促进或增强分子或通路(例如Wnt信号传导或FGF信号传导)的信号传导功能的激活的化合物。

[0084] 如本文所用,术语“衍生物”是指具有类似核心结构的化合物。

[0085] 如本文所用,术语“细胞的群体”或“细胞群体”是指一组至少两个细胞。在非限制性实例中,细胞群体可以包括至少约10、至少约100、至少约200、至少约300、至少约400、至少约500、至少约600、至少约700、至少约800、至少约900、至少约1000个细胞。群体可以是包括一种细胞类型例如SC前体群体、SC群体或未分化干细胞群体的纯群体。或者,群体可以包括多于一种细胞类型,例如混合细胞群体,例如SC前体和SC的混合群体。

[0086] 如本文所用,术语“干细胞”是指能够在培养中无限期分裂并产生特化细胞的细胞。人干细胞是指来自人的干细胞。

[0087] 如本文所用,术语“胚胎干细胞”是指源自植入前阶段胚胎的原始(未分化)细胞,其能够在培养中长时期地分裂而不分化,并且已知会发育成三原胚层的细胞和组织。人胚胎干细胞是指来自人的胚胎干细胞。如本文所用,术语“人胚胎干细胞”或“hESC”是指源自早期人胚胎、直至并包括胚泡期的一类多能干细胞(“PSC”),其能够在培养中长时期地分裂而不分化,并且已知会发育成三原胚层的细胞和组织。

[0088] 如本文所用,术语“胚胎干细胞系”是指已经在体外条件下培养的胚胎干细胞群体,上述条件允许增殖而不分化长达数天、数月至数年。

[0089] 如本文所用,术语“全能(totipotent)”是指产生身体的所有细胞类型加上构成胚外组织(例如胎盘)的所有细胞类型的能力。

[0090] 如本文所用,术语“多潜能(multipotent)”是指发育成身体的多于一种细胞类型的能力。

[0091] 如本文所用,术语“多能(pluripotent)”是指发育成有机体的三个发育胚层(包括内胚层、中胚层和外胚层)的能力。

[0092] 如本文所用,术语“诱导多能干细胞”或“iPSC”是指一类与胚胎干细胞类似的多能干细胞,其通过将某些胚胎基因(例如OCT4、SOX2和KLF4转基因)(参见,例如,Takahashi和Yamanaka Cell 126,663-676(2006),在此并入以供参考)引入体细胞而形成,例如CI 4、C72等。

[0093] 如本文所用,术语“体细胞”是指配子(卵子或精子)以外的任何体内细胞;有时称为“成体”细胞。

[0094] 如本文所用,术语“体细胞(成体)干细胞”是指在许多器官和分化组织中发现的相对罕见的未分化细胞,其具有有限的自我更新(在实验室中)和分化的能力。这些细胞的分化能力各有不同,但通常限于起源器官中的细胞类型。

[0095] 如本文所用,术语“神经元”是指神经细胞,即神经系统的主要功能单元。神经元由细胞体及其突起——轴突和一个或多个树突组成。神经元通过在突触处释放神经递质将信息传递给其它神经元或细胞。

[0096] 如本文所用,术语“增殖”是指细胞数量的增加。

[0097] 如本文所用,术语“未分化”是指尚未发育成特化细胞类型的细胞。

[0098] 如本文所用,术语“分化”是指非特化的胚胎细胞获得特化细胞如心脏、肝脏或肌肉细胞的特征的过程。分化受细胞基因与细胞外部的物理和化学条件的相互作用控制,通常是通过涉及嵌入细胞表面的蛋白质的信号传导通路。

[0099] 如本文所用,术语“定向分化”是指操纵干细胞培养条件以诱导分化成特定(例如,

所要求的)细胞类型,比如SC前体。

[0100] 如本文所用,涉及干细胞时术语“定向分化”是指使用小分子、生长因子蛋白和其它生长条件来促进干细胞从多能状态转变成更成熟或特化的细胞命运(例如SC前体、SC等)。

[0101] 如本文所用,涉及细胞时术语“诱导分化”是指将默认细胞类型(基因型和/或表型)改变为非默认细胞类型(基因型和/或表型)。因此,“诱导干细胞分化”是指诱导干细胞(例如,人干细胞)分裂成具有与干细胞不同的特征的特征的子代细胞,上述特征例如基因型(例如,如通过遗传分析例如微阵列所确定的基因表达的变化)和/或表型(例如,蛋白质如SC前体标志物和SC标志物的表达的变化)。

[0102] 如本文所用,术语“细胞培养”是指在用于研究或医疗的人工培养基中细胞的体外生长。

[0103] 如本文所用,术语“培养基”是指覆盖培养容器如培养皿、多孔板等中的细胞、并含有滋养和支持细胞的营养物的液体。培养基还可以包括添加来在细胞中产生所需的变化的生长因子。

[0104] 如本文所用,术语使细胞与化合物(例如,一种或多种抑制剂、激活剂和/或诱导剂)“接触”是指将化合物置于允许其接触细胞的位置。接触可以使用任何合适的方法完成。例如,接触可以通过将化合物加入细胞的管中完成。接触也可以通过将化合物加入到包括细胞的培养基中完成。可以将每种化合物(例如,本文公开的抑制剂、激活剂和诱导剂)作为溶液(例如浓缩溶液)加入到包括细胞的培养基中。另外可选地或额外地,化合物(例如,本文公开的抑制剂、激活剂和诱导剂)以及细胞可以存在于配制的细胞培养基中。

[0105] 如本文所用,术语“体外”是指人造环境以及在人造环境中发生的过程或反应。体外环境例示但不限于试管和细胞培养物。

[0106] 如本文所用,术语“体内”是指天然环境(例如,动物或细胞)以及在天然环境中发生的过程或反应,如胚胎发育、细胞分化、神经管形成等。

[0107] 如本文所用,与基因或蛋白质相关的术语“表达”是指制备可以使用例如微阵列检定、抗体染色检定等的检定观察到的mRNA或蛋白质。

[0108] 如本文所用,术语“标志物”或“细胞标志物”是指识别特定细胞或细胞类型的基因或蛋白质。细胞的标志物可以不限于一种标志物,标志物可以指标志物的“模式(pattern)”,使得标志物的指定组可以使细胞或细胞类型从另一种细胞或细胞类型中识别出。

[0109] 如本文所用,当涉及本文公开的任何细胞时,术语“源自”或“建立自”或“分化自”是指使用任何操作从细胞系、组织(如解离的胚胎)或流体中的亲本细胞获得(例如,分离、纯化等)的细胞,上述操作例如但不限于,单细胞分离,体外培养,使用例如蛋白质、化学品、辐射、病毒感染、用DNA序列转染例如用形态发生素等的处理和/或诱变,选择(如通过连续培养)所培养亲本细胞中含有的任何细胞。产生的细胞可以借助对生长因子、细胞因子、细胞因子处理的选择进展、粘附性、粘附性的缺乏、分选程序等的应答从混合群体中选择出。

[0110] 本文的“个体”或“受试者”是脊椎动物,例如人或非人动物,例如哺乳动物。哺乳动物包括但不限于人、灵长类动物、家畜、运动动物(sport animal)、啮齿类动物和宠物。非人动物受试者的非限制性实例包括啮齿类动物,如小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠;兔;狗;猫;绵羊;

猪;山羊;牛;马;和非人灵长类动物,如猿和猴。

[0111] 如本文所用,术语“疾病”是指损害或干扰细胞、组织或器官的正常功能的任何症状或病症。

[0112] 如本文所用,术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指试图改变所治疗的个体或细胞的疾病进程的临床干预,并且可以用于预防或在临床病理过程中进行。治疗的治疗性效果包括,但不限于,预防疾病的发生或复发、症状的缓解、疾病的任何直接或间接病理后果的减少、预防转移、降低疾病进展的速度、改善或缓解疾病状态以及缓和或改善预后。通过预防疾病或病症的进展,治疗可以防止由于受影响或所诊断的受试者或疑似患有该病症的受试者的病症导致的恶化,但是治疗也可以防止处于该病症风险或疑似患有该病症的受试者中病症的发作或病症的症状。

[0113] 2. 干细胞分化成施旺细胞的方法

[0114] 施旺细胞可以自干细胞(例如人干细胞)的体外分化获得。在某些实施方式中,干细胞是人干细胞。人干细胞的非限制性实例包括人胚胎干细胞(hESC)、人多能干细胞(hPSC)、人诱导多能干细胞(hiPSC)、人单性生殖干细胞、原始生殖细胞样多能干细胞、外胚层干细胞、F-class多能干细胞、体干细胞、癌症干细胞或任何其它能够谱系特异性分化的细胞。在某些实施方式中,人干细胞是人多能干细胞。在某些实施方式中,人干细胞是人胚胎干细胞(hESC)。在某些实施方式中,人干细胞是人诱导多能干细胞(hiPSC)。在某些实施方式中,干细胞是非人干细胞,其包括但不限于哺乳动物干细胞、灵长类动物干细胞或者来自啮齿类动物、小鼠、大鼠、狗、猫、马、猪、牛、羊等的干细胞。

[0115] 双SMAD抑制的应用可以用于诱导干细胞(例如hPSC)分化成一种类型的神经谱系,例如,Chambers(2009),其全部内容并入以供参考。此外,通过相继抑制SMAD信号传导、然后激活Wnt信号传导,可以使干细胞分化成神经嵴谱系细胞(例如伤害感受器),例如,Chambers(2012);Mica(2013);W02011/149762;Fattahi(2016);和2015年12月23日提交的美国专利临时申请第62/387,468号,将其全部内容均并入以供参考。

[0116] 在某些实施方式中,干细胞分化成SC包括三个阶段:干细胞在体外分化成表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞(神经嵴谱系细胞),神经嵴谱系细胞在体外分化成SC前体,以及SC前体在体外分化或成熟为SC。在第一阶段可以使用任何使干细胞在体外分化成神经嵴谱系细胞的合适方法,其包括但不限于Chambers(2012);Mica(2013);W02011/149762;2015年12月23日提交的美国专利临时申请第62/387,468号;和Fattahi(2016)中公开的方法。在某些实施方式中,干细胞群体在体外分化成神经嵴谱系细胞群体,其在体外分化成SC前体群体,其进一步在体外诱导成SC群体。

[0117] 神经嵴谱系标志物的非限制性实例包括SOX10、p75、HNK1、CD49D、ERBB3、TFAP2、SNAIL和SLUG。

[0118] 在某些实施方式中,通过抑制SMAD信号传导和激活Wnt信号传导,使神经嵴谱系细胞从干细胞在体外分化。在某些实施方式中,该方法包括使干细胞(例如人干细胞)群体与一种或多种转化生长因子 β (TGF β)/激活素-Nodal信号传导抑制剂和一种或多种Wnt激活剂接触。

[0119] 在某些实施方式中,通过诱导SC分化,使SC前体从神经嵴谱系细胞在体外分化。在某些实施方式中,该方法包括使神经嵴谱系细胞(例如通过抑制SMAD信号传导和激活Wnt信

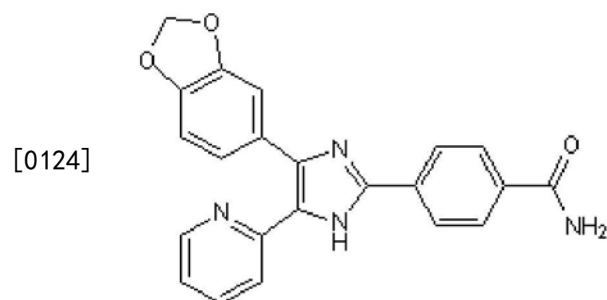
号传导而源自干细胞的神经嵴谱系细胞)群体与一种或多种Wnt激活剂和一种或多种FGF激活剂接触。在某些实施方式中,该方法包括使神经嵴谱系细胞(例如通过抑制SMAD信号传导和激活Wnt信号传导而源自干细胞的神经嵴谱系细胞)群体与一种或多种SC分化诱导剂接触。

[0120] 在某些实施方式中,通过增强SC分化,SC从SC前体在体外分化。在某些实施方式中,该方法包括使SC前体(例如通过诱导SC分化而源自神经嵴谱系细胞的SC前体细胞)群体与一种或多种FGF激活剂、一种或多种SC分化诱导剂接触。在某些实施方式中,该方法包括使SC前体(例如通过诱导SC分化而源自神经嵴谱系细胞的SC前体细胞)群体与一种或多种SC分化增强剂接触。

[0121] 1. 干细胞体外分化成神经嵴谱系细胞

[0122] 在某些实施方式中,体外诱导干细胞分化成表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞的方法包括:使干细胞(例如人干细胞)群体与一种或多种转化生长因子 β (TGF β)/激活素-Nodal信号传导抑制剂接触。在某些实施方式中,TGF β /激活素-Nodal信号传导抑制剂中和包括TGF β 、骨形态发生蛋白(BMP)、Nodal和激活素在内的配体,或通过阻断受体和下游效应子而阻断其信号通路。TGF β /激活素-Nodal信号传导抑制剂的非限制性实例公开于W02011/149762、Chambers (2009) 和Chambers (2012),其全部内容并入以供参考。在某些实施方式中,一种或多种TGF β /激活素-Nodal信号传导抑制剂是选自SB431542、其衍生物及其混合物的小分子。在某些实施方式中,一种或多种TGF β /激活素-Nodal信号传导抑制剂是SB431542。

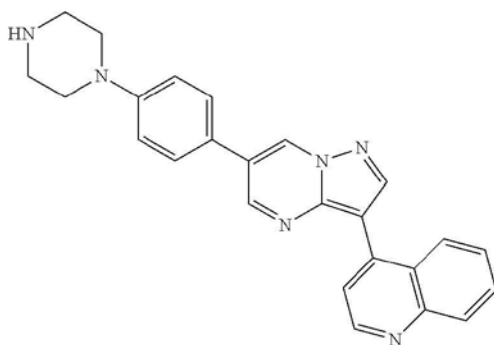
[0123] “SB431542”是指CAS号为301836-41-9的分子,分子式为C₂₂H₁₈N₄O₃,命名为4-[4-(1,3-苯并间二氧杂环戊烯-5-基)-5-(2-吡啶基)-1H-咪唑-2-基]-苯甲酰胺,例如,参见下文结构:



[0125] 在某些实施方式中,体外诱导干细胞分化成表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞的方法还包括:使干细胞与一种或多种Small Mothers Against Decapentaplegic (SMAD) 信号传导抑制剂(“SMAD抑制剂”)接触。SMAD抑制剂的非限制性实例公开于W02011/149762、Chambers (2009) 和Chambers (2012),其全部内容并入以供参考。在某些实施方式中,一种或多种SMAD信号传导抑制剂是选自LDN193189、其衍生物及其混合物的小分子。在某些实施方式中,一种或多种SMAD抑制剂是LDN193189。

[0126] “LDN193189”是指小分子DM-3189,IUPAC名为4-(6-(4-(哌嗪-1-基)苯基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)喹啉,化学式为C₂₅H₂₂N₆,其具有下式。

[0127]



[0128] LDN193189能够起到SMAD信号传导抑制剂的作用。LDN193189也是ALK2、ALK3和ALK6、蛋白质酪氨酸激酶 (PTK) 的高度有效的小分子抑制剂,其抑制I型TGF β 受体的ALK1和ALK3家族成员的信号传导,导致多种生物信号传送的抑制,上述生物信号包括骨形态发生蛋白 (BMP) BMP2、BMP4、BMP6、BMP7和激活素细胞因子信号以及后续的Smad1、Smad5、和Smad8的SMAD磷酸化 (Yu等, (2008) Nat Med 14:1363-1369; Cuny等, (2008) Bioorg.Med.Chem.Lett.18:4388-4392,并入本文以供参考)。

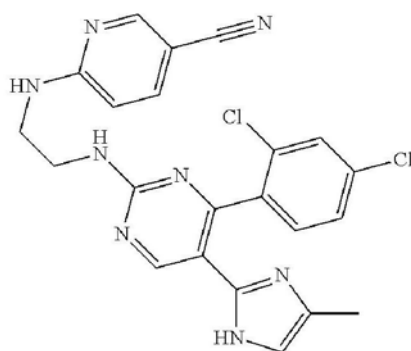
[0129] 在某些实施方式中,体外诱导干细胞分化成表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞的方法还包括:使细胞与一种或多种Wnt激活剂接触。如本文所用,涉及配体时术语“WNT”或“无翼”是指一组能够与WNT受体 (例如Frizzled和LRP Derailed/RYK受体家族中的受体) 相互作用的分泌蛋白 (即人的Int1 (integration 1))。如本文所用,涉及信号传导通路时术语“WNT”或“无翼”是指由Wnt家族配体和Wnt家族受体例如Frizzled和LRP Derailed/RYK受体组成的经由或不经 β -连环蛋白介导的信号通路。在某些实施方式中,WNT信号传导通路包括通过 β -连环蛋白介导,例如WNT/-连环蛋白。

[0130] 在某些实施方式中,一种或多种Wnt激活剂减少糖原合成酶激酶3 β (GSK3 β) 以用于激活Wnt信号传导。因此,Wnt激活剂可以是GSK3 β 抑制剂。GSK3 β 抑制剂能够激活WNT信号传导通路,参见例如Cadigan,等,J Cell Sci.2006;119:395-402;Kikuchi等,Cell Signaling.2007;19:659-671,其全部内容并入本文以供参考。如本文所用,术语“糖原合成酶激酶3 β 抑制剂”是指抑制糖原合成酶激酶3 β 酶的化合物,例如,参见Doble等,J Cell Sci.2003;116:1175-1186,其全部内容并入本文以供参考。

[0131] Wnt激活剂或GSK3 β 抑制剂的非限制性实例公开于W02011/149762、Chambers (2012) 和Calder等,J Neurosci.2015 Aug19;35 (33):11462-81,其全部内容并入以供参考。在某些实施方式中,一种或多种Wnt激活剂是选自CHIR99021、WNT3A、Wnt-1、Wnt4、Wnt5a、其衍生物及其混合物的小分子。在某些实施方式中,一种或多种Wnt激活剂是CHIR99021。

[0132] “CHIR99021” (也称为“氨基嘧啶”或“3-[3-(2-羧乙基)-4-甲基吡咯-2-亚甲基]-2-吡啶酮”) 是指IUPAC名为6-(2-(4-(2,4-二氯苯基)-5-(4-甲基-1H-咪唑-2-基) 嘧啶-2-基氨基) 乙基氨基) 烟腈,其具有下式。

[0133]



[0134] CHIR99021具有高度选择性,对一组相关和不相关的激酶显示出近千倍的选择性,针对人GSK3 β 的IC₅₀=6.7nM,针对啮齿类动物GSK3 β 同源物为纳摩尔IC₅₀值。

[0135] 对于干细胞在体外分化成表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞,干细胞可以与一种或多种TGF β /激活素-Nodal信号传导抑制剂接触至少约3天、至少约4天、至少约5天、至少约6天、至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少约10天、至少约11天、至少约12天、至少约13天、至少约14天、至少约15天、至少约16天、至少约17天、至少约18天、至少约19天、至少约20天、至少约21天、至少约22天、至少约23天、至少约24天、至少约25天、至少约26天、至少约27天、至少约28天、至少约29天或者至少约30天。在某些实施方式中,干细胞与一种或多种TGF β /激活素-Nodal信号传导抑制剂接触至多约3天、至多约4天、至多约5天、至多约6天、至多约7天、至多约8天、至多约9天、至多约10天、至多约11天、至多约12天、至多约13天、至多约14天、至多约15天、至多约16天、至多约17天、至多约18天、至多约19天、至多约20天、至多约21天、至多约22天、至多约23天、至多约24天、至多约25天、至多约26天、至多约27天、至多约28天、至多约29天或者至多约30天。在某些实施方式中,干细胞与一种或多种TGF β /激活素-Nodal信号传导抑制剂接触约4天至约30天、约4天至约27天、约4天至约26天、约4天至约25天、约4天至约24天、约4天至约20天、约4天至约15天、约4天至约10天、约5天至约15天、约5天至约10天、约10天至约15天、约15天至约20天、约10天至约20天、约20天至约25天或者约25天至约30天。在某些实施方式中,干细胞与一种或多种TGF β /激活素-Nodal信号传导抑制剂接触10天至约15天。在某些实施方式中,干细胞与一种或多种TGF β /激活素-Nodal信号传导抑制剂接触约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天、约10天、约11天、约12天、约13天、约14天、约15天、约16天、约17天、约18天、约19天、约20天、约21天、约22天、约23天、约24天、约25天、约26天、约27天、约28天、约29天或者约30天。在某些实施方式中,干细胞与一种或多种TGF β /激活素-Nodal信号传导抑制剂接触约10天。在某些实施方式中,干细胞与一种或多种TGF β /激活素-Nodal信号传导抑制剂接触约11天。

[0136] 对于干细胞在体外分化成表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞,干细胞可以与一种或多种SMAD信号传导抑制剂接触至少约3天、至少约4天、至少约5天、至少约6天、至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少约10天、至少约11天、至少约12、至少约13天、至少约14天、至少约15天、至少约16天、至少约17天、至少约18天、至少约19天、至少约20天、至少约21天、至少约22天、至少约23天、至少约24天、至少约25天、至少约26天、至少约27天、至少约28天、至少约29天或者至少约30天。在某些实施方式中,干细胞与一种或多种SMAD信号传导抑制剂接触至多约3天、至多约4天、至多约5天、至多约6天、至多约7天、至多约8天、至多约9天、至多约10天、至多约11天、至多约12天、至多约13天、至多约14天、至多约15天、至多约16

天、至多约17天、至多约18天、至多约19天、至多约20天、至多约21天、至多约22天、至多约23天、至多约24天、至多约25天、至多约26天、至多约27天、至多约28天、至多约29天或者至多约30天。在某些实施方式中,干细胞与一种或多种SMAD信号传导抑制剂接触约4天至约30天、约4天至约27天、约4天至约26天、约4天至约25天、约4天至约24天、约4天至约20天、约4天至约15天、约4天至约10天、约5天至约15天、约5天至约10天、约10天至约15天、约15天至约20天、约10天至约20天、约20天至约25天或者约25天至约30天。在某些实施方式中,干细胞与一种或多种SMAD信号传导抑制剂接触10天至约15天。在某些实施方式中,干细胞与一种或多种SMAD信号传导抑制剂接触约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天、约10天、约11天、约12天、约13天、约14天、约15天、约16天、约17天、约18天、约19天、约20天、约21天、约22天、约23天、约24天、约25天、约26天、约27天、约28天、约29天或者约30天。在某些实施方式中,干细胞与一种或多种SMAD信号传导抑制剂接触约10天。在某些实施方式中,干细胞与一种或多种SMAD信号传导抑制剂接触约11天。

[0137] 而且,细胞可以与一种或多种Wnt信号传导激活剂接触至少约4天、至少约5天、至少约6天、至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少约10天、至少约11天、至少约12天、至少约13天、至少约14天、至少约15天、至少约16天、至少约17天、至少约18天、至少约19天、至少约20天、至少约21天、至少约22天、至少约23天、至少约24天、至少约25天、至少约26天、至少约27天、至少约28天或者至少约29天、至少约30天。在某些实施方式中,细胞与一种或多种Wnt信号传导激活剂接触至多约4天、至多约5天、至多约6天、至多约7天、至多约8天、至多约9天、至多约10天、至多约11天、至多约12天、至多约13天、至多约14天、至多约15天、至多约16天、至多约17天、至多约18天、至多约19天、至多约20天、至多约21天、至多约22天、至多约23天、至多约24天、至多约25天、至多约26天、至多约27天、至多约28天、至多约29天或者至多约30天。在某些实施方式中,细胞与一种或多种Wnt信号传导激活剂接触约4天至约30天、约4天至约27天、约4天至约26天、约4天至约25天、约4天至约24天、约4天至约20天、约4天至约15天、约4天至约10天、约5天至约15天、约5天至约10天、约10天至约15天、约15天至约20天、约10天至约20天、约20天至约25天或者约25天至约30天。在某些实施方式中,细胞与一种或多种Wnt信号传导激活剂接触5天至约15天。在某些实施方式中,细胞与一种或多种Wnt信号传导激活剂接触约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天、约10天、约11天、约12天、约13天、约14天、约15天、约16天、约17天、约18天、约19天、约20天、约21天、约22天、约23天、约24天、约25天、约26天、约27天、约28天、约29天或者约30天。在某些实施方式中,细胞与一种或多种Wnt信号传导激活剂接触约11天。在某些实施方式中,细胞与一种或多种Wnt信号传导激活剂接触约10天。在某些实施方式中,细胞与一种或多种Wnt信号传导激活剂接触约9天。

[0138] 在某些实施方式中,干细胞与以下浓度的一种或多种TGF β /激活素-Nodal信号传导抑制剂接触:约1nM至约300nM、约5nM至约250nM、约10nM至约200nM、约10nM至约50nM、约50nM至约150nM、约80nM至约120nM、约90nM至约110nM、约50nM至约100nM、约100nM至约150nM、约150nM至约200nM、约200nM至约250nM或者约250nM至约300nM。在某些实施方式中,干细胞与浓度约80nM至约120nM的一种或多种TGF β /激活素-Nodal信号传导抑制剂接触。在某些实施方式中,干细胞与浓度约100nM的一种或多种TGF β /激活素-Nodal信号传导抑制剂接触。在某些实施方式中,干细胞与任一上述浓度的一种或多种TGF β /激活素-Nodal信号传导抑制剂每日、每隔一日或者每隔两日接触。在某些实施方式中,干细胞与浓度约100nM的

一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂每日接触。

[0139] 在某些实施方式中,干细胞与以下浓度的一种或多种SMAD信号传导抑制剂接触:约1μM至100μM、约1μM至20μM、约1μM至15μM、约1μM至10μM、约1μM至5μM、约5μM至10μM、约5μM至15μM、约15μM至20μM、约20μM至30μM、约30μM至40μM、约40μM至50μM、约50μM至60μM、约60μM至70μM、约70μM至80μM、约80μM至90μM或者约90μM至100μM。在某些实施方式中,干细胞与浓度约5μM至15μM的一种或多种SMAD信号传导抑制剂接触。在某些实施方式中,干细胞与浓度约10μM的一种或多种SMAD信号传导抑制剂接触。在某些实施方式中,干细胞与任一上述浓度的一种或多种SMAD信号传导抑制剂每日、每隔一日或者每隔两日接触。在某些实施方式中,干细胞与浓度约10μM的一种或多种SMAD信号传导抑制剂每日接触。

[0140] 在某些实施方式中,细胞与以下浓度的一种或多种Wnt信号传导激活剂接触:约1μM至100μM、约1μM至20μM、约1μM至15μM、约1μM至10μM、约1μM至5μM、约5μM至10μM、约5μM至15μM、约15μM至20μM、约20μM至30μM、约30μM至40μM、约40μM至50μM、约50μM至60μM、约60μM至70μM、约70μM至80μM、约80μM至90μM或者约90μM至100μM。在某些实施方式中,细胞与浓度约1μM至5μM的一种或多种Wnt信号传导激活剂接触。在某些实施方式中,细胞与浓度约3μM的一种或多种Wnt信号传导激活剂接触。在某些实施方式中,细胞与任一上述浓度的一种或多种Wnt信号传导激活剂每日、每隔一日或者每隔两日接触。在某些实施方式中,细胞与浓度约3μM的一种或多种Wnt信号传导激活剂每日接触。

[0141] 2. 神经嵴谱系细胞在体外分化成施旺细胞前体

[0142] 在某些实施方式中,神经嵴谱系细胞通过包括以下步骤的方法分化成施旺细胞前体:使细胞(例如表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞,例如在使干细胞群体与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导和任选地一种或多种SMAD抑制剂接触、并且进一步使细胞与一种或多种Wnt激活剂接触之后分化的细胞)与本文所述的一种或多种Wnt激活剂和一种或多种FGF信号传导激活剂(“FGF激活剂”)接触,以产生SC前体群体,例如表达一种或多种施旺细胞前体标志物的细胞。在某些实施方式中,该方法包括使细胞(例如表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞,例如在使干细胞群体与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导和任选地一种或多种SMAD抑制剂接触、并且进一步使细胞与一种或多种Wnt激活剂接触之后分化的细胞)与一种或多种诱导施旺细胞分化的分子(“SC分化诱导剂”)接触,以产生SC前体群体,例如表达一种或多种施旺细胞前体标志物的细胞。

[0143] SC分化诱导剂的非限制性实例包括神经调节蛋白、LIF、CNTF、毛喉素、TGFβ和FBS。在某些实施方式中,一种或多种SC分化诱导剂是神经调节蛋白1(NRG1)。

[0144] FGF信号传导激活剂的非限制性实例包括FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF7、FGF8、FGF10、FGF18、其衍生物及其混合物。在某些实施方式中,一种或多种FGF激活剂是FGF2。

[0145] 在某些实施方式中,细胞(例如表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞)与一种或多种Wnt激活剂和一种或多种FGF激活剂以及任选地一种或多种SC分化诱导剂同时接触。在某些实施方式中,细胞(例如表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞)与一种或多种Wnt激活剂、一种或多种FGF激活剂和一种或多种SC分化诱导剂同时接触。例如,一种或多种Wnt激活剂和一种或多种FGF激活剂以及任选地一种或多种SC分化诱导剂都存在于包括细胞(例如表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞)的细胞培养基中。在某些实施方式中,每日(或每隔一日或每隔两日)将一种或多种Wnt激活剂、一种或多种FGF激活剂以及任选地

一种或多种SC分化诱导剂一起加入包括细胞(例如表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞,例如在使干细胞群体与一种或多种TGF β /激活素-Nodal信号传导和任选地一种或多种SMAD抑制剂接触、并且进一步使细胞与一种或多种Wnt激活剂接触之后分化的细胞)的细胞培养基。

[0146] 表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞可以与一种或多种Wnt激活剂、一种或多种FGF激活剂以及任选地一种或多种SC分化诱导剂接触至少约3天、至少约4天、至少约5天、至少约6天、至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少约10天、至少约11天、至少约12天、至少约13天、至少约14天、至少约15天、至少约16天、至少约17天、至少约18天、至少约19天或者至少约20天,以产生SC前体。在某些实施方式中,表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞与一种或多种Wnt激活剂、一种或多种FGF激活剂以及任选地一种或多种SC分化诱导剂接触至少约10天,以产生SC前体。在某些实施方式中,表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞与一种或多种Wnt激活剂、一种或多种FGF激活剂以及任选地一种或多种SC分化诱导剂接触至多约15天、至多约16天、至多约17天、至多约18天、至多约19天、至多约20天、至多约21天、至多约22天、至多约23天、至多约24天、至多约25天、至多约26天、至多约27天、至多约28天、至多约29天或者至多约30天,以产生SC前体。在某些实施方式中,表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞与一种或多种Wnt激活剂、一种或多种FGF激活剂以及任选地一种或多种SC分化诱导剂接触约3天至约5天、约5天至约10天、约10天至约15天、约15天至约20天、约20天至约25天或者约25天至约30天,以产生SC前体。在某些实施方式中,表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞与一种或多种Wnt激活剂、一种或多种FGF激活剂以及任选地一种或多种SC分化诱导剂接触约10天至约15天,以产生SC前体。在某些实施方式中,表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞与一种或多种Wnt激活剂、一种或多种FGF激活剂以及任选地一种或多种SC分化诱导剂接触约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天、约10天、约11天、约12天、约13天、约14天、约15天、约16天、约17天、约18天、约19天、约20天、约21天、约22天、约23天、约24天、约25天、约26天、约27天、约28天、约29天或者约30天,以产生SC前体。在某些实施方式中,表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞与一种或多种Wnt激活剂、一种或多种FGF激活剂以及任选地一种或多种SC分化诱导剂接触约14天,以产生SC前体。在某些实施方式中,表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞与一种或多种Wnt激活剂、一种或多种FGF激活剂以及任选地一种或多种SC分化诱导剂接触约15天,以产生SC前体。

[0147] 在某些实施方式中,细胞与一种或多种Wnt激活剂接触,以产生表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞群体,神经嵴谱系细胞群体进一步与一种或多种Wnt激活剂接触。因此,细胞可以与一种或多种Wnt激活剂接触总计至少约14天、至少约15天、至少约16天、至少约17天、至少约18天、至少约19天、至少约20天、至少约21天、至少约22天、至少约23天、至少约24天、至少约25天、至少约26天、至少约27天、至少约28天、或至少约29天、至少约30天、至少约31天、至少约32天、至少约33天、至少约34天、至少约35天、至少约36天、至少约37天、至少约38天、至少约39天或者至少约40天。在某些实施方式中,细胞与一种或多种Wnt激活剂接触总计至多约15天、至多约16天、至多约17天、至多约18天、至多约19天、至多约20天、至多约21天、至多约22天、至多约23天、至多约24天、至多约25天、至多约26天、至多约27天、至多约28天、至多约29天、至多约30天、至多约31天、至多约32天、至多约33天、至多约34天、至多约35天、至多约36天、至多约37天、至多约38天、至多约39天、至多约40天、至多约41天、至

多约42天、至多约43天、至多约44天、至多约45天、至多约46天、至多约47天、至多约48天、至多约49天、至多约50天、至多约51天、至多约52天、至多约53天、至多约54天、至多约55天、至多约56天、至多约57天、至多约58天、至多约59天或者至多约60天。在某些实施方式中,细胞与一种或多种Wnt激活剂接触约14天至约20天、约20天至约25天、约25天至约30天、约30天至约35天、约35天至约40天、约40天至约45天、约45天至约50天、约50天至约55天或者约55天至约60天。在某些实施方式中,细胞与一种或多种Wnt激活剂接触总计20天至约30天。在某些实施方式中,细胞与一种或多种Wnt信号传导激活剂接触总计20天至约25天。在某些实施方式中,细胞与一种或多种Wnt激活剂接触总计25天至约30天。在某些实施方式中,细胞与一种或多种Wnt信号传导激活剂接触总计约14天、约15天、约16天、约17天、约18天、约19天、约20天、约21天、约22天、约23天、约24天、约25天、约26天、约27天、约28天、约29天、约30天、约31天、约32天、约33天、约34天、约35天、约36天、约37天、约38天、约39天、约40天、约41天、约42天、约43天、约44天、约45天、约46天、约47天、约48天、约49天、约50天、约51天、约52天、约53天、约54天、约55天、约56天、约57天、约58天、约59天或者约60天。在某些实施方式中,细胞与一种或多种Wnt激活剂接触总计约26天。在某些实施方式中,细胞与一种或多种Wnt信号传导激活剂接触总计约25天。在某些实施方式中,细胞与一种或多种Wnt激活剂接触总计约24天。在某些实施方式中,细胞与一种或多种Wnt激活剂接触总计约23天。

[0148] 在某些实施方式中,细胞(例如表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞)与以下浓度的一种或多种FGF信号传导激活剂接触:约1nM至100nM、约1nM至20nM、约1nM至15nM、约1nM至10nM、约1nM至5nM、约5nM至10nM、约5nM至15nM、约15nM至20nM、约20nM至30nM、约30nM至40nM、约40nM至50nM、约50nM至60nM、约60nM至70nM、约70nM至80nM、约80nM至90nM或者约90nM至100nM,以产生SC前体。在某些实施方式中,细胞(例如表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞)与浓度约5nM至15nM的一种或多种FGF信号传导激活剂接触,以产生SC前体。在某些实施方式中,细胞(例如表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞)与浓度约10nM的一种或多种FGF信号传导激活剂接触,以产生SC前体。在某些实施方式中,细胞(例如表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞)与任一上述浓度的一种或多种FGF信号传导激活剂每日、每隔一日或每隔两日接触,以产生SC前体。在某些实施方式中,细胞(例如表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞)与浓度约10nM的一种或多种FGF信号传导激活剂每日接触,以产生SC前体。

[0149] 在某些实施方式中,细胞(例如表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞)与以下浓度的一种或多种诱导施旺细胞分化的分子接触:约1ng/ml至100ng/ml、约1ng/ml至20ng/ml、约1ng/ml至15ng/ml、约1ng/ml至10ng/ml、约1ng/ml至5ng/ml、约5ng/ml至10ng/ml、约5ng/ml至15ng/ml、约15ng/ml至25ng/ml、约15ng/ml至20ng/ml、约20ng/ml至30ng/ml、约30ng/ml至40ng/ml、约40ng/ml至50ng/ml、约50ng/ml至60ng/ml、约60ng/ml至70ng/ml、约70ng/ml至80ng/ml、约80ng/ml至90ng/ml或者约90ng/ml至100ng/ml,以产生SC前体。在某些实施方式中,细胞(例如表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞)与浓度约5ng/ml至15ng/ml的一种或多种诱导施旺细胞分化的分子接触,以产生SC前体。在某些实施方式中,细胞(例如表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞)与浓度约10ng/ml的一种或多种诱导施旺细胞分化的分子接触,以产生SC前体。在某些实施方式中,细胞(例如表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞)与任一上述浓度的一种或多种诱导施旺细胞分化的分子每日、

每隔一日或每隔两日接触,以产生SC前体。在某些实施方式中,细胞(例如表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞)与浓度约10ng/ml的一种或多种诱导施旺细胞分化的分子每日接触,以产生SC前体。在某些实施方式中,细胞(例如表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞)与浓度约10ng/ml的一种或多种诱导施旺细胞分化的分子每日接触,以产生SC前体。

[0150] 在某些实施方式中,细胞(例如表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞)与以下浓度的一种或多种Wnt信号传导激活剂接触:约1 μ M至100 μ M、约1 μ M至20 μ M、约1 μ M至15 μ M、约1 μ M至10 μ M、约1 μ M至5 μ M、约5 μ M至10 μ M、约5 μ M至15 μ M、约15 μ M至20 μ M、约20 μ M至30 μ M、约30 μ M至40 μ M、约40 μ M至50 μ M、约50 μ M至60 μ M、约60 μ M至70 μ M、约70 μ M至80 μ M、约80 μ M至90 μ M或者约90 μ M至100 μ M,以产生SC前体。在某些实施方式中,细胞(例如表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞)与浓度约1 μ M至5 μ M的一种或多种Wnt信号传导激活剂接触,以产生SC前体。在某些实施方式中,细胞(例如表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞)与浓度约3 μ M的一种或多种Wnt信号传导激活剂接触,以产生SC前体。在某些实施方式中,细胞(例如表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞)与任一上述浓度的一种或多种Wnt信号传导激活剂每日、每隔一日或每隔两日接触。在某些实施方式中,细胞(例如表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞)与浓度约3 μ M的一种或多种Wnt信号传导激活剂每日接触。

[0151] 在某些实施方式中,包括至少约50%表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞的细胞群体分化成表达一种或多种施旺细胞前体标志物的细胞,其中细胞群体与一种Wnt激活剂(例如CHIR99021,例如3 μ MCHIR99021)、一种FGF激活剂(例如FGF2,例如10nM FGF2)和一种SC分化诱导剂(例如NRG1,例如10ng/ml NRG1)接触约15天(例如约14天或约15天)。

[0152] 在某些实施方式中,干细胞分化成表达一种或多种施旺细胞前体标志物的细胞,其中细胞与一种TGF β /激活素-Nodal信号传导抑制剂(例如SB431542,例如10 μ M SB431542)和任选地一种SMAD抑制剂(例如LDN193189,例如100nM LDN193189)接触约10天(例如约10天或约11天);与一种Wnt激活剂(例如CHIR99021,例如3 μ MCHIR99021)接触约23天(例如约23天或约24天);并且与一种FGF激活剂(例如FGF2,例如10nM FGF2)和一种SC分化诱导剂(例如NRG1,例如10ng/ml NRG1)接触约15天(例如约14或15天)。

[0153] 在某些实施方式中,细胞不暴露于音猬因子(Sonic Hedgehog) (SHH) 信号传导激活剂。SHH信号传导激活剂的非限制性实例包括音猬因子(SHH)、C25II、smoothened (SMO) 受体小分子激动剂(例如purmorphamine)、其衍生物及其混合物。在某些实施方式中,细胞不暴露于SHH。

[0154] 3. 施旺细胞前体体外诱导为施旺细胞

[0155] 施旺细胞前体可以进一步体外诱导为施旺细胞。分化的SC前体可以经受有利于SC前体成熟为施旺细胞群体的条件。施旺细胞可以是髓鞘化施旺细胞或非髓鞘化施旺细胞。

[0156] 在某些实施方式中,施旺细胞前体(SC前体)与本文所述的一种或多种FGF激活剂、本文所述的一种或多种施旺细胞分化诱导剂接触,以产生SC群体。在某些实施方式中,施旺细胞前体(SC前体)与一种或多种增强施旺细胞分化的分子(称为“SC分化增强剂”)接触。SC分化增强剂的非限制性实例包括神经调节蛋白、环磷酸腺苷(cAMP)、毛喉素、LIF和CNTF。在某些实施方式中,神经调节蛋白是NRG1。在某些实施方式中,一种或多种SC分化增强剂是cAMP。在某些实施方式中,施旺细胞前体(SC前体)与一种FGF激活剂和两种施旺细胞分化诱导剂接触,以产生SC群体。在某些实施方式中,两种施旺细胞分化诱导剂是cAMP和NRG1。

[0157] 在某些实施方式中,SC前体与一种或多种FGF激活剂和一种或多种施旺细胞分化诱导剂以及任选地一种或多种SC分化增强剂在细胞培养基中接触,以产生SC。在某些实施方式中,细胞培养基是补充有L-谷氨酰胺(例如来自Gibco,25030-164)、N2(例如来自Stem Cell Technologies,07156)和B27(例如来自Life Technologies,17504044)的NB培养基。

[0158] 在某些实施方式中,SC前体与以下浓度的一种或多种诱导施旺细胞分化的分子接触:约1ng/ml至100ng/ml、约1ng/ml至20ng/ml、约1ng/ml至15ng/ml、约1ng/ml至10ng/ml、约1ng/ml至5ng/ml、约5ng/ml至10ng/ml、约5ng/ml至15ng/ml、约15ng/ml至25ng/ml、约15ng/ml至20ng/ml、约20ng/ml至30ng/ml、约30ng/ml至40ng/ml、约40ng/ml至50ng/ml、约50ng/ml至60ng/ml、约60ng/ml至70ng/ml、约70ng/ml至80ng/ml、约80ng/ml至90ng/ml或者约90ng/ml至100ng/ml,以产生SC。在某些实施方式中,SC前体与浓度约15ng/ml至25ng/ml的一种或多种诱导施旺细胞分化的分子接触,以产生SC。在某些实施方式中,SC前体与浓度约20ng/ml的一种或多种诱导施旺细胞分化的分子接触,以产生SC。在某些实施方式中,SC前体与任一上述浓度的一种或多种诱导施旺细胞分化的分子每日、每隔一日、每隔两日接触,以产生SC。在某些实施方式中,SC前体与浓度约10ng/ml的一种或多种诱导施旺细胞分化的分子每日接触,以产生SC。

[0159] 在某些实施方式中,SC前体与一种或多种FGF激活剂和一种或多种施旺细胞分化诱导剂以及任选地一种或多种SC分化增强剂接触至少约3天、至少约4天、至少约5天、至少约6天、至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少约10天、至少约11天、至少约12天、至少约13天、至少约14天、或至少约15天,以产生SC。在某些实施方式中,SC前体与一种或多种FGF激活剂和一种或多种施旺细胞分化诱导剂以及任选地一种或多种SC分化增强剂接触约3天至约40天、约3天至约35天、约3天至约30天、约3天至约25天、约3天至约20天、约3天至约15天、约10天至约40天、约10天至约20天、约20天至约40天、约20天至约30天或者约30天至约40天,以产生SC。在某些实施方式中,SC前体与一种或多种FGF激活剂和一种或多种施旺细胞分化诱导剂以及任选地一种或多种SC分化增强剂接触约3天至约15天,以产生SC。在某些实施方式中,SC前体与一种或多种FGF激活剂和一种或多种施旺细胞分化诱导剂以及任选地一种或多种SC分化增强剂接触约30天至约40天,以产生SC。在某些实施方式中,SC前体与一种或多种FGF激活剂和一种或多种施旺细胞分化诱导剂以及任选地一种或多种SC分化增强剂接触约10天,以产生SC。在某些实施方式中,SC前体与一种或多种FGF激活剂和一种或多种施旺细胞分化诱导剂以及任选地一种或多种SC分化增强剂接触约11天,以产生SC。在某些实施方式中,SC前体与一种或多种FGF激活剂和一种或多种施旺细胞分化诱导剂以及任选地一种或多种SC分化增强剂接触约35天,以产生SC。

[0160] 在某些实施方式中,SC前体与以下浓度的一种或多种FGF信号传导激活剂接触:约1nM至100nM、约1nM至20nM、约1nM至15nM、约1nM至10nM、约1nM至5nM、约5nM至10nM、约5nM至15nM、约15nM至20nM、约20nM至30nM、约30nM至40nM、约40nM至50nM、约50nM至60nM、约60nM至70nM、约70nM至80nM、约80nM至90nM或者约90nM至100nM,以产生SC。在某些实施方式中,SC前体与浓度约5nM至15nM的一种或多种FGF信号传导激活剂接触,以产生SC前体。在某些实施方式中,干细胞与浓度约10nM的一种或多种FGF信号传导激活剂接触,以产生SC。在某些实施方式中,SC前体与任一上述浓度的一种或多种FGF信号传导激活剂每日、每隔一日或每隔两日接触,以产生SC。在某些实施方式中,SC前体与浓度为约10nM的一种或多种FGF信

号传导激活剂每日接触,以产生SC。

[0161] 在某些实施方式中,有利于SC前体成熟为SC的条件包括:使分化的SC前体细胞聚集为3D球状体,和进一步使所述3D球状体与一种或多种FGF激活剂和一种或多种施旺细胞分化诱导剂以及任选地一种或多种SC分化增强剂接触。在某些实施方式中,培养基是悬浮培养基。

[0162] 在某些实施方式中,包括至少约50%表达一种或多种施旺细胞前体标志物的细胞的细胞群体分化成表达一种或多种施旺细胞标志物的细胞,其中细胞群体与一种FGF激活剂(例如FGF2,例如10nMFGF2)、两种SC分化诱导剂(例如NRG1(例如10ng/ml NRG1)和cAMP(例如100mM cAMP))接触至少约10天。

[0163] 在某些实施方式中,细胞不暴露于音猬因子(SHH)信号传导激活剂。SHH信号传导激活剂的非限制性实例包括音猬因子(SHH)、C25II、smoothened(SMO)受体小分子激动剂(例如purmorphamine)、其衍生物及其混合物。在某些实施方式中,细胞不暴露于SHH。

[0164] 4. 细胞培养基

[0165] 在某些实施方式中,将上述抑制剂、激活剂、诱导剂和增强剂添加至包括细胞的细胞培养基中,上述细胞例如干细胞、表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞、表达一种或多种SC前体标志物的细胞、表达一种或多种SC标志物的细胞或其组合。合适的细胞培养基包括,但不限于,Knockout[®]血清替代物(“KSR”)培养基、N2培养基、Essential 8[®]/Essential 6[®](“E8/E6”)培养基和神经元基质(NB)培养基(例如补充有N2和B-27[®]补充剂的NB培养基)。KSR培养基、N2培养基、E8/E6培养基和NB培养基都是市售的。在某些实施方式中,用于干细胞体外分化成表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞的培养基是选自KSR培养基、N2培养基及其组合的培养基。在某些实施方式中,用于干细胞体外分化成表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞的培养基是E8/E6培养基。在某些实施方式中,用于将表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞体外诱导为表达一种或多种SC前体标志物的细胞的培养基是NB培养基。在某些实施方式中,用于将表达一种或多种SC前体标志物的细胞体外诱导为表达一种或多种SC标志物的细胞的培养基是NB培养基。

[0166] KSR培养基是一种明确的无血清制剂,经过优化以在培养中使未分化的hESC细胞生长和维持。KSR培养基的组分公开于W02011/149762。在某些实施方式中,KSR培养基包括KnockoutDMEM、Knockout血清替代物、L-谷氨酰胺、Pen/Strep、MEM和13-巯基乙醇。在某些实施方式中,1升KSR培养基可以包括820mL Knockout DMEM、150mL Knockout血清替代物、10mL 200mM L-谷氨酰胺、10mL Pen/Strep、10mL 10mM MEM和55μM 13-巯基乙醇。

[0167] E8/E6培养基是一种支持人多能干细胞的生长和扩增的无饲养层(feeder-free)和无异源(xeno-free)培养基。E8/E6培养基已经证明支持体细胞重排(reprogramming)。此外,E8/E6培养基可以用作配制PSC培养的定制培养基的基质。E8/E6培养基的一个实例描述于Chen等,Nat Methods.2011May;8(5):424-9,其全部内容并入以供参考。E8/E6培养基的一个实例公开于W015/077648,其全部内容并入以供参考。在某些实施方式中,E8/E6细胞培养基包括DMEM/F12、抗坏血酸、硒、胰岛素、NaHCO₃、转铁蛋白、FGF2和TGFβ。E8/E6培养基与KSR培养基的不同之处在于E8/E6培养基不包括活性BMP或Wnt成分。因此,在某些实施方式中,当E8/E6培养基用于培养干细胞时,不需要添加一种或多种SMAD抑制剂(例如抑制BMP的

那些)至E8/E6培养基。

[0168] N2补充剂是化学上明确的、不含动物成分的、用于在培养中扩增未分化神经干细胞和祖细胞的补充剂。N2补充剂适用于与DMEM/F12培养基一起使用。N2培养基的组分公开于W02011/149762。在某些实施方式中,N2培养基包括补充有葡萄糖、碳酸氢钠、腐胺、黄体酮、亚硒酸钠、转铁蛋白和胰岛素的DMEM/F12培养基。在某些实施方式中,1升N2培养基包括985ml具有DMEM/F12粉末的蒸馏H₂O、1.55g葡萄糖、2.00g碳酸氢钠、腐胺(1.61g溶于100mL蒸馏水中的100μL等分试样)、黄体酮(0.032g溶于100mL 100%乙醇中的20μL等分试样)、亚硒酸钠(0.5mM蒸馏水溶液的60μL等分试样)、100mg转铁蛋白和10mL 5mM NaOH中的25mg胰岛素。

[0169] 在某些实施方式中,干细胞最初在KSR培养基中培养,从干细胞与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触之后约1天、约2天、约3天、约4天、或约5天、约6天、约7天或约8天,用增加量的N2培养基逐渐替换KSR培养基,直至干细胞与SC分化诱导剂和FGF激活剂接触。在某些实施方式中,干细胞最初在KSR培养基中培养,从干细胞与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触之后第4天至第10天,用增加量的N2培养基逐渐替换KSR培养基。

[0170] 用于培养本发明公开的干细胞群体的细胞培养基不仅确定将要与细胞接触的抑制剂、激活剂、诱导剂和增强剂(例如,对于KSR培养基,需要一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂和一种或多种SMAD抑制剂;对于E8/E6培养基,仅需要一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂),而且确定着抑制剂、激活剂、诱导剂和增强剂添加至细胞培养基的顺序。

[0171] 在某些实施方式中,细胞与一种或多种Wnt激活剂的最初接触不晚于从干细胞与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触起约4天(例如同时(在同一天),或约1天至约4天,例如约1天、约2天、约3天或约4天)。

[0172] 在某些实施方式中,用于干细胞在体外分化成表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞的细胞培养基是KSR培养基,并且细胞与一种或多种Wnt激活剂的最初接触在从干细胞与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触起约2天。在某些实施方式中,干细胞与一种或多种SMAD抑制剂的最初接触在干细胞与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触的同一天,例如通过最初在同一天将SMAD抑制剂和TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂加入包括干细胞的细胞培养基。

[0173] 在某些实施方式中,用于干细胞在体外分化成表达一种或多种神经嵴谱系标志物的细胞的细胞培养基是E8/E6培养基,并且细胞与一种或多种Wnt激活剂的最初接触在干细胞与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触的同一天,例如通过最初在同一天将Wnt激活剂和TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂加入包括干细胞的细胞培养基。在某些实施方式中,将BMP活性试剂加入E8/E6培养基。在某些实施方式中,BMP活性试剂在培养约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天或约10天后从培养基中收回。在某些实施方式中,BMP活性试剂在培养约3天后从培养基中收回。在某些实施方式中,BMP活性试剂以约0.5至约20ng/mL、或约1至约15ng/mL、或约2至约10ng/mL、或约3至约5ng/mL的浓度存在于培养基中。在某些实施方式中,BMP活性试剂以约5ng/mL的浓度存在于培养基中。BMP活性试剂的非限制性实例包括BMP1、BMP2、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、

BMP8a、BMP8b、BMP10、BMP11、BMP15、其衍生物及其混合物。

[0174] 在某些实施方式中,一种或多种FGF激活剂以及任选地一种或多种SC分化诱导剂与细胞的最初接触不晚于从干细胞与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触起约20天。在某些实施方式中,一种或多种FGF激活剂以及任选地一种或多种SC分化诱导剂与细胞的最初接触在从干细胞与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触起至少约5天。在某些实施方式中,一种或多种FGF激活剂以及任选地一种或多种SC分化诱导剂与细胞的最初接触在从干细胞与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触起约5天至约20天之间(例如约5天、约6天、约7天、约8天、约9天、约10天、约11天、约12天、约13天、约14天、约15天、约16天、约17天、约18天、约19天或约20天)。在某些实施方式中,一种或多种FGF激活剂以及任选地一种或多种SC分化诱导剂与细胞的最初接触在从干细胞与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触起约10天。在某些实施方式中,一种或多种FGF激活剂以及任选地一种或多种SC分化诱导剂与细胞的最初接触在从干细胞与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触起约11天。

[0175] 在某些实施方式中,将Wnt激活剂、FGF激活剂以及任选地SC分化诱导剂(每日、每隔一日或每隔两日)加入补充有L-谷氨酰胺(例如来自Gibco,25030-164)、N2(例如来自Stem Cell Technologies,07156)和B27(例如来自Life Technologies,17504044)的NB培养基,以产生SC前体。

[0176] 在某些实施方式中,将SC分化诱导剂、FGF激活剂以及任选地SC分化增强剂(每日、每隔一日或每隔两日)加入补充有L-谷氨酰胺(例如来自Gibco,25030-164)、N2(例如来自Stem Cell Technologies,07156)和B27(例如来自Life Technologies,17504044)的NB培养基,以产生SC前体。

[0177] 在某些实施方式中,将TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂、SMAD抑制剂、Wnt激活剂、SC分化诱导剂、FGF激活剂以及任选地SC分化增强剂每日(或每隔一日或每隔两日)加入包含干细胞的细胞培养基。

[0178] 在某些实施方式中,干细胞与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂和一种或多种SMAD抑制剂的最初接触在第0天,细胞与一种或多种Wnt激活剂的最初接触在第2天,细胞与一种或多种FGF激活剂以及任选地一种或多种SC分化诱导剂的最初接触在第11天,细胞与一种或多种SC分化诱导剂和一种或多种FGF激活剂以及任选地一种或多种SC分化增强剂的最初接触在第25天。在某些实施方式中,用于第0天至第10天的细胞培养基是KSR培养基、N2培养基或其混合物。在某些实施方式中,用于第0天至第3天的细胞培养基是KSR培养基。在某些实施方式中,用于第4天至第10天的细胞培养基是KSR培养基和N2培养基的组合。在某些实施方式中,用于第10天的细胞培养基是N2培养基。在某些实施方式中,用于第11天和之后的细胞培养基是补充有L-谷氨酰胺、N2和B27的NB培养基。

[0179] 在某些实施方式中,干细胞与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂和一种或多种Wnt激活剂的最初接触在第0天,细胞与一种或多种FGF激活剂以及任选地一种或多种SC分化诱导剂的最初接触在第11天(或每隔一日或每隔两日),细胞与一种或多种SC分化诱导剂和一种或多种FGF激活剂以及任选地一种或多种SC分化增强剂的最初接触在第25天。在某些实施方式中,用于第0天至第10天的细胞培养基是E8/E6培养基、N2培养基或其

混合物。在某些实施方式中,用于第11天和之后的细胞培养基是补充有L-谷氨酰胺、N2和B27的NB培养基。

[0180] 在某些实施方式中,细胞与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂和一种或多种SMAD抑制剂接触约10天;与一种或多种Wnt激活剂接触约23天;与一种或多种FGF激活剂接触约14天,并且任选地与一种或多种SC分化诱导剂接触约14天,以产生SC前体。在某些实施方式中,SC前体与一种或多种SC分化诱导剂、一种或多种FGF激活剂以及任选地一种或多种SC分化增强剂接触至少8天(例如10天或35天),以产生SC。

[0181] 在某些实施方式中,细胞与一种或多种TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂接触约10天;与一种或多种Wnt信号传导激活剂接触约25天;与一种或多种FGF信号传导激活剂接触约14天,并且任选地与一种或多种SC分化诱导剂接触约14天,以产生SC前体。在某些实施方式中,SC前体与一种或多种SC分化诱导剂、一种或多种FGF激活剂以及任选地一种或多种SC分化增强剂接触至少8天(例如10天或35天),以产生SC。

[0182] 施旺细胞(SC)前体(例如表达一种或多种早期施旺细胞标志物的细胞)可以在从与TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触起小于约35天内、小于约34天内、小于约33天内、小于约32天内、小于约31天内、小于约30天内、小于约29天内、小于约28天内、小于约27天内、小于约26天内、小于约25天内、小于约24天内、小于约23天内、小于约22天内、小于约21天或小于约20天内,从干细胞分化出。在某些实施方式中,在从干细胞与TGFβ/激活素-Nodal信号传导抑制剂的最初接触起约25天或之后,SC前体从干细胞分化出。

[0183] 5. 标志物和报道物

[0184] 分化的SC前体表达一种或多种施旺细胞前体标志物。施旺细胞前体标志物的非限制性实例包括SOX10、GAP43、BLBP、髓鞘蛋白0(myelin protein zero)(MPZ)、Dhh、P75NTR、CD49D、TFAP2、CDH19、CD44、ERBB3、POU3F1、和神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、CALCB、GRP116、TSPYL5、ITPKA、SLC17A6、SYPL2、LOC100128252、ANGPTL7、LOC728978、ZNF502、SLC16A6、LPL、SLC30A2、SLC10A4、和表1-4中所列的基因。

[0185] SC表达一种或多种施旺细胞标志物。施旺细胞标志物的非限制性实例包括富亮氨酸重复跨膜神经元4(LRRTM4)、钙粘蛋白1(CDH1)、脂肪酸结合蛋白7(FABP7)、脑源性神经营养因子(BDNF)、UNCB5、含硬化蛋白域蛋白1(sclerostin domain containing 1)(SOSTDC1)、少突胶质细胞转录因子1(OLIG1)、纤维蛋白溶酶原激活剂(PLAT)、钾向内整流通道亚家族J成员10(KCNJ10)、音猬因子(SHH)、轴突生长趋向因子1(netrin 1)(NTN1)、神经胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)、Erb-b2受体酪氨酸激酶3(ERBB3)、生长相关蛋白43(GAP43)、SOX10、S100、GFAP、POU3F1、PMP22、髓鞘碱性蛋白(MBP)、水通道蛋白4(AQP4)、NGFR、NFATC4、MOG、IFNG、MAL、NTF3、TGFB1、MPZ、CD9、CD49D、CD49E、CD44、CD98和CD81、TYRP1、ENTHD1、NT5E、HTR2B、NOV、IL8、SLC16A6、CDKN2A、PLP2、S100A6、AQP9、CDH19和表1-4中所列的基因。

[0186] 分化的SC前体和进一步成熟的SC可以进一步表达一种或多种报道物(reporter)。报道物的非限制性实例包括荧光蛋白(如绿色荧光蛋白(GFP)、蓝色荧光蛋白(EBFP、EBFP2、Azurite、mKalamal)、青色荧光蛋白(ECFP、Cerulean、CyPet、mTurquoise2)和黄色荧光蛋白衍生物(YFP、Citrine、Venus、YPet、EYFP))、β-半乳糖苷酶(LacZ);氯霉素乙酰转移酶(cat);新霉素磷酸转移酶(neo);酶(如氧化酶和过氧化物酶);和抗原性分子。如本文所用,

术语“报道基因”或“报道构建体”是指包括编码易于检测或易于检定的蛋白质例如有色蛋白质、荧光蛋白如GFP或酶如 β -半乳糖苷酶(lacZ基因)的核酸的遗传构建体。

[0187] 分化的SC前体和进一步成熟的SC可以在分化之后纯化,例如在细胞培养基中。如本文所用,术语“纯化的(purified)”、“纯化(purify)”、“纯化(purification)”、“分离的(isolated)”、“分离(isolate)”和“分离(isolation)”是指从样品中减少至少一种污染物的量。例如,将所需的细胞类型纯化至少约10%、至少约30%、至少约50%、至少约75%并且至少约90%,相应地减少不需要的细胞类型的量。术语“纯化”可以指从样品中去除某些细胞(例如不期望的细胞)。去除或选择不期望的细胞导致样品中所需SC前体或SC的百分比增加。在某些实施方式中,通过将混合细胞群体分选成表达至少一种施旺细胞前体标志物的细胞来纯化SC前体。在某些实施方式中,一种或多种施旺细胞前体标志物选自SOX10、GAP43、BLBP、MPZ、Dhh、P75NTR、CD49D、TFAP2、CDH19、CD44、ERBB3、POU3F1、GFAP、CALCB、GRP116、TSPYL5、ITPKA、SLC17A6、SYPL2、LOC100128252、ANGPTL7、LOC728978、ZNF502、SLC16A6、LPL、SLC30A2和SLC10A4。在某些实施方式中,一种或多种施旺细胞前体标志物选自表1-4中所列的基因。在某些实施方式中,一种或多种施旺细胞前体标志物选自表1中所列的基因。在某些实施方式中,一种或多种施旺细胞前体标志物选自CALCB、GRP116、TSPYL5、ITPKA、SLC17A6、SYPL2、LOC100128252、ANGPTL7、LOC728978和ZNF502。

[0188] 本发明公开的主题还提供通过本文所述的体外方法产生的SC前体和SC的群体以及包括这些细胞的组合物。

[0189] 3. 治疗性化合物的筛选方法

[0190] 源自干细胞的SC前体或成熟SC可以成为确定促成神经病变(例如,周围神经病变,例如DPN)的细胞类型特异性机制的方法。在该方法中,可以将源自hESC的单独的细胞类型暴露于糖尿病中发生的高葡萄糖浓度。因此,可以在每个潜在起作用的细胞类型中评价这些治疗的代谢和功能结果。

[0191] 本发明公开的源自干细胞的SC前体或成熟SC可以用于模拟施旺细胞相关疾病(例如,周围神经病变,例如DPN),并充当筛选可以克服施旺细胞相关疾病中的疾病相关缺陷的候选化合物的平台。通过检定候选化合物挽救高葡萄糖毒性导致的生理或细胞缺陷(其导致施旺细胞相关疾病(例如,周围神经病变,例如DPN))的能力,可以确定候选化合物减轻施旺细胞相关疾病(例如,周围神经病变,例如DPN)的能力。在挽救经STZ处理的糖尿病小鼠中神经病变相关的组织学缺陷和行为缺陷方面,发明人识别出安非他酮,这代表着本发明公开的源自干细胞的SC前体或成熟SC在药物发现中的用途的概念验证。参见实施例1。

[0192] 本发明公开的主题提供一种筛选化合物的体外方法,上述化合物适合用于PNS和/或CNS的再生、用于髓鞘损伤的预防和/或治疗或修复、和/或用于施旺细胞相关疾病(例如,周围神经病变,例如DPN)的预防和/或治疗。在某些实施方式中,该方法包括识别化合物,该化合物能够在本发明公开的SC前体或成熟SC中挽救高血糖诱导的细胞毒性(例如,高葡萄糖诱导的毒性),例如,降低葡萄糖水平,降低山梨糖醇水平,和/或降低高葡萄糖暴露后这些细胞中的细胞生存力。

[0193] 在某些实施方式中,上述方法包括:(a)使如本文所公开的从干细胞的体外分化获得的SC前体和/或成熟SC的群体暴露于至少约10mM的葡萄糖浓度;和(b)在葡萄糖暴露之后,使细胞群体与测试化合物接触。在某些实施方式中,上述方法包括:(c)测量不经所述测

试化合物处理的细胞群体的第一山梨糖醇水平、第一葡萄糖水平和第一细胞生存力中的一个或多个；和(d)测量经所述测试化合物处理的细胞群体的第二山梨糖醇水平、第二葡萄糖水平和第二细胞生存力中的一个或多个。而且，该方法包括：(e)比较(i)第二山梨糖醇水平与第一山梨糖醇水平，(ii)第二葡萄糖水平与第一葡萄糖水平，和/或(iii)第二细胞生存力与第一细胞生存力。

[0194] 该方法还包括：(f)在第二山梨糖醇水平低于第一山梨糖醇水平、(ii)第二葡萄糖水平低于第一葡萄糖水平、和/或(iii)第二细胞生存力低于第一细胞生存力的情况下，识别出适合用于PNS和/或CNS的再生、用于髓鞘损伤的预防和/或治疗或修复、和/或用于预防和/或治疗施旺细胞相关疾病(例如，周围神经病变，例如DPN)的测试化合物。

[0195] 在某些实施方式中，葡萄糖浓度为至少约10mM，例如，10mM至100mM。在某些实施方式中，葡萄糖浓度为约30mM。在某些实施方式中，测量(包括第一和第二山梨糖醇水平、葡萄糖水平和细胞生存力的测量)在初始葡萄糖暴露之后至少约12小时、至少约24小时(1天)、约48小时(2天)、约72小时(3天)、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天或约10天时进行。在某些实施方式中，测量(包括第一和第二山梨糖醇水平、葡萄糖水平和细胞生存力的测量)在初始葡萄糖暴露之后至少约72小时(3天)进行。

[0196] 在某些实施方式中，通过本文公开的筛选方法识别出的化合物包括，但不限于，钾离子通道阻断剂、去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂、环戊噻嗪、卡托普利、伊拉地平、易混翠雀花碱、尼美舒利和曲安奈德。在某些实施方式中，钾离子通道阻断剂是磺酰脲化合物。磺酰脲化合物的非限定性例子包括甲苯磺丁脲、乙酰苯磺酰环己脲、氨磺丁脲、氯磺丙脲、格列环脲(对甲苯磺酰环己脲)、美他己脲、妥拉磺脲、格列本脲(优降糖)、格列波脲、格列齐特、格列吡嗪、格列喹酮、格列派特、格列吡脲、格列美脲、其盐、其溶剂化物、其水合物、其包合物及其前药。去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂的非限定性例子包括安非他酮、咪奈丁、哌甲酯(Ritalin®、Concerta®、Metadate®、Methylin®、Rubifen®或Stimdate®)、托莫西汀、马普替林、desoxypipradrol、右哌甲酯、苯托雷司、二苯基脯氨酸、哌乙酯、芬坎法明、芬咖明、利非他明、亚甲二氧基吡咯戊酮、哌甲酯、诺米芬新、0-2172、恶喹酸、哌苯甲醇、苯咯戊烷、吡咯戊酮、他美曲林、WY-46824、其盐、其溶剂化物、其水合物、其前药及其包合物。

[0197] 4. 用治疗性化合物治疗的方法

[0198] 本发明公开的药物发现方法中识别出的化合物或者包括这些化合物的组合物(例如，还包括药学可接受载体和/或额外的药理学活性成分的药物组合物)可以治疗性用于，例如，但不限于，促进例如周围神经系统(PNS)中的神经再生，预防或降低或修复髓鞘损伤，和/或预防和/或治疗施旺细胞相关病症(例如，周围神经病变，例如但不限于糖尿病性周围神经病变)。

[0199] 适合于用于上述治疗的化合物的非限定性例子包括钾离子通道阻断剂、去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂、环戊噻嗪、卡托普利、伊拉地平、易混翠雀花碱、尼美舒利和曲安奈德。在某些实施方式中，钾离子通道阻断剂是磺酰脲化合物。磺酰脲的非限定性例子包括甲苯磺丁脲、乙酰苯磺酰环己脲、氨磺丁脲、氯磺丙脲、格列环脲(对甲苯磺酰环己脲)、美他己脲、妥拉磺脲、格列本脲(优降糖)、格列波脲、格列齐特、格列吡嗪、格列喹酮、格列派

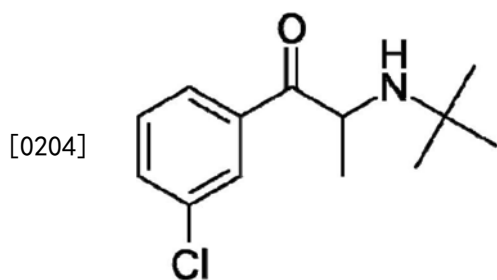
特、格列吡脲、格列美脲、其盐、其溶剂化物、其水合物、其包合物及其前药。

[0200] 在某些实施方式中,盐是药学可接受的盐,例如,由药学可接受的无毒无机或有机的酸或碱制备的盐。包括药理学可接受的阴离子的盐包括,但不限于,盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硝酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸性磷酸盐、甲酸盐、乙酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、酸性柠檬酸盐、富马酸盐、葡糖酸盐、异硫代硫酸盐、乳酸盐、苹果酸盐、粘酸盐(mucate)、龙胆酸盐、异烟酸盐、糖酸盐、酒石酸盐、酒石酸氢盐、对甲苯磺酸盐、乙醇酸盐、葡糖醛酸盐、马来酸盐、糠酸盐、谷氨酸盐、抗坏血酸盐、苯甲酸盐、邻氨基苯甲酸盐、水杨酸盐、苯乙酸盐(phentylacetate)、扁桃酸盐、双羟萘酸盐(pamoate)、甲磺酸盐、乙磺酸盐、泛酸盐、苯磺酸盐、硬脂酸盐、氨基苯磺酸盐、藻酸盐、对甲苯磺酸盐和半乳糖醛酸盐。在某些实施例中,阴离子为氢溴酸根、盐酸根、磷酸根、酸性磷酸根、马来酸根、硫酸根和酸性磷酸根。在某些实施例中,阴离子为盐酸根和马来酸根。

[0201] 包括药理学可接受的阳离子的盐包括,但不限于,碱金属盐或碱土金属盐,具体为钙盐、镁盐、钠盐或钾盐。合适的有机碱包括,但不限于,N,N-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、葡甲胺(N-甲基葡糖胺)、赖氨酸和普鲁卡因。

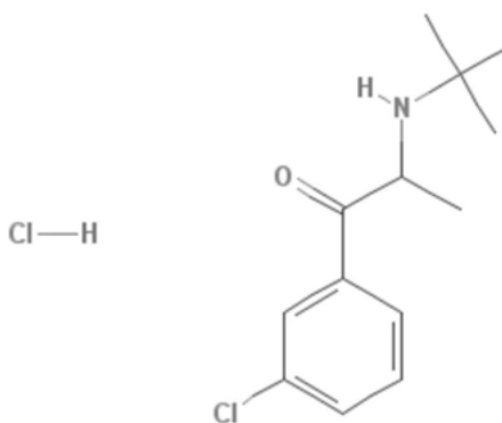
[0202] 在某些实施方式中,化合物是去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂(NDRI)。去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂是分别通过阻断去甲肾上腺素转运体和多巴胺转运体的作用而充当神经递质去甲肾上腺素和多巴胺的再摄取抑制剂的试剂。示例性的NDRI包括,但不限于安非他酮、咪奈丁、哌甲酯(Ritalin®、Concerta®、Metadate®、Methylin®、Rubifen®或Stimdate®)、托莫西汀、马普替林、desoxypipradrol、右哌甲酯、苯托雷司、二苯基脯氨酸、哌乙酯、芬坎法明、芬咖明、利非他明、亚甲二氧基吡咯戊酮、哌甲酯、诺米芬新、0-2172、恶喹酸、哌苯甲醇、苯咯戊烷、吡咯戊酮、他美曲林、WY-46824、其盐、其溶剂化物、其水合物、其前药及其包合物。

[0203] 在某些实施方式中,化合物是安非他酮或其药学可接受的盐、溶剂化物、水合物、包合物或前药。“安非他酮”是NDRI,并且还具有干扰钾通道的功能。它已经被批准作为抗抑郁药以及用于戒烟。安非他酮的商品名为Wellbutrin、Elontril和Zyban。它的IUPAC命名为3-氯-N-叔丁基-β-酮-α-甲基苯乙基胺,化学式为C₁₃H₁₈ClNO,分子式如下:



[0205] 在某些实施方式中,化合物是盐酸安非他酮。它是安非他酮的盐酸盐,是一种单环氨基酮抗抑郁药。它的IUPAC命名为2-(叔丁基氨基)-1-(3-氯苯基)丙-1-酮盐酸盐,化学式为C₁₃H₁₉Cl₂NO,分子式如下:

[0206]

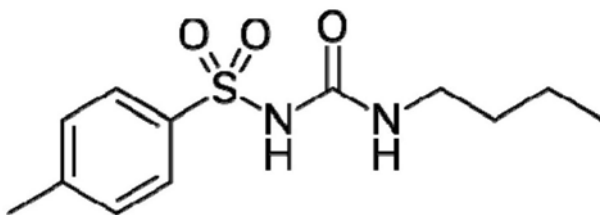


[0207] 在某些实施方式中,化合物是安非他酮代谢物或其药学可接受的盐、溶剂化物、水合物、包合物或前药。安非他酮代谢物包括,但不限于,外消旋和光学纯形式的2-(3-氯苯基)-2-羟基-3,5,5-三甲基-吗啉醇(也称作羟基安非他酮)、2-(叔丁基氨基)-1-(3-氯苯基)-丙-1-醇(也称作二氢安非他酮)和1-(3-氯苯基)-2-[(1,1-二甲基乙醇)氨基]-1-丙酮。如本文所使用,术语“光学纯安非他酮代谢物”包括,但不限于,光学纯的以下化合物:(R,R)-2-(3-氯苯基)-2-羟基-3,5,5-三甲基-吗啉醇(也称作(R,R)-羟基安非他酮);(S,S)-2-(3-氯苯基)-2-羟基-3,5,5-三甲基-吗啉醇(也称作(S,S)-羟基安非他酮);(R,R)-2-(叔丁基氨基)-1-(3-氯苯基)-丙-1-醇(也称作(R,R)-二氢安非他酮);(S,R)-2-(叔丁基氨基)-1-(3-氯苯基)-丙-1-醇(也称作(S,R)-二氢安非他酮);(S,S)-2-(叔丁基氨基)-1-(3-氯苯基)-丙-1-醇(也称作(S,S)-二氢安非他酮);(R,S)-2-(叔丁基氨基)-1-(3-氯苯基)-丙-1-醇(也称作(R,S)-二氢安非他酮);(R)-1-(3-氯苯基)-2-[(1,1-二甲基乙醇)氨基]-1-丙酮;和(S)-1-(3-氯苯基)-2-[(1,1-二甲基乙醇)氨基]-1-丙酮;羟基安非他酮;苏氨酸氢化安非他酮;和赤藓糖氢化安非他酮。

[0208] 在某些实施方式中,化合物是钾通道阻断剂。钾通道阻断剂是干扰通过钾通道的传导、并抑制通过细胞膜的钾外流的试剂。阻断钾通道可以延长动作电位的持续时间。示例性钾通道阻断剂包括但不限于胺碘酮、多非利特(dofetilide)、索他洛尔(sotalol)、伊布利特(ibutilide)、阿奇利特(azimilide)、溴苄胺(bretylum)、氯非铵(clofilium)、E-4031、尼非卡兰(nifekalant)、替地沙米(tedisamil)和思美利特(sematilide)、四乙铵Cl (TEA)、普鲁卡因、4-氨基吡啶(4AP)、奎尼丁(quinidine)、蜂毒明肽(apamin)、甲苯磺丁脲和格列本脲。

[0209] 在某些实施方式中,钾通道阻断剂是甲苯磺丁脲或其药学可接受的盐、溶剂化物、水合物、包合物或前药。甲苯磺丁脲是磺脲降血糖药。它的IUPAC命名为1-丁基-3-(4-甲基苯基)磺酰脲,化学式为C₁₂H₁₈N₂O₃S,分子式如下:

[0210]



[0211] 在某些实施方式中,化合物选自环戊噻嗪、卡托普利、伊拉地平、易混翠雀花碱、尼美舒利、曲安奈德及其药学可接受的盐、溶剂化物、水合物、包合物或前药。

[0212] 本发明公开的治疗方法包括经由局部注射、正交(orthotropic) (OT) 注射、全身注射、静脉内注射或肠胃外给药来施用化合物或包括其的药物组合物。

[0213] 本发明公开的化合物可以方便地作为无菌液体制剂提供,例如等渗水溶液、混悬液、乳液、分散体或粘性组合物,其可以缓冲至选定的pH。液体制剂通常比凝胶、其它粘性组合物和固体组合物更容易制备。此外,液体组合物在施用方面多少要更方便,尤其是通过注射。另一方面,粘性组合物可以配制在适当的粘度范围内,以提供与特定组织的更长的接触时间。液体或粘性组合物可以包括载体,其可以是溶剂或分散介质,其含有,例如,水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。通过将本发明公开的主题的组合物、例如包括本发明公开的化合物的组合物掺入所需量的适当溶剂以及根据需要具有的各种量的其它成分中,可以制备无菌可注射溶液。这些组合物可以与合适的载体、稀释剂或赋形剂混合,比如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖(dextrose)等。组合物也可以冻干。组合物可以含有助剂,例如润湿剂、分散剂或乳化剂(例如甲基纤维素)、pH缓冲剂、胶凝剂或粘度增强添加剂、防腐剂、芳香剂、着色剂等,这取决于给药途径和期望的制剂。可以翻阅标准文本,例如“REMINGTON'S PHARMACEUTICALSCIENCE”,第17版,1985,并入本文以供参考,以在无需过多实验的情况下制备合适的制剂。

[0214] 可以加入各种提高组合物稳定性和无菌性的添加剂,包括抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂。通过各种抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等,可以确保防止微生物的作用。通过使用延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可以延长可注射药物形式的吸收。然而,根据本发明公开的主题,使用的任何载体、稀释剂或添加剂必须与本发明公开的化合物或包括其的组合物相容。

[0215] 本领域技术人员将会认识到,药物组合物的组分应选择为化学惰性的,并且不会影响本发明公开的化合物的功效。这对于化学和药学原理方面的技术人员来说不产生问题,或者通过参考标准文本或通过简单实验(不涉及过度实验),从本公开和本文引用的文献中可以容易地避免问题。

[0216] “有效量”(或“治疗有效量”)是足以在治疗时实现有益或期望的临床结果的量。有效量可以以一个或多个剂量施用于受试者。就治疗而言,有效量是足以减轻、改善、稳定、逆转或减缓施旺细胞相关疾病(例如DPN)的进展,或以其它方式减少施旺细胞相关疾病(例如DPN)的病理后果的量。有效量通常由医生根据具体情况确定,并且在本领域技术人员的技能范围内。当确定合适的剂量以达到有效量时,通常考虑若干因素。这些因素包括受试者的年龄、性别和体重,所治疗的病症,病症的严重程度以及所施用细胞的形式和有效浓度。

[0217] 本发明公开的主题提供一种治疗对该治疗有需求的受试者中糖尿病性周围神经病变的方法,其包括向受试者施用有效量的去甲肾上腺素-多巴胺再摄取抑制剂(NDRI)(例如,选自以下者:安非他酮、咪奈丁、哌甲酯

(Ritalin®、Concerta®、Metadate®、Methylin®、Rubifen®或Stimdate®)、托莫西汀、马普替林、desoxypipradrol、右哌甲酯、苯托雷司、二苯基脯氨醇、哌乙酯、芬坎法明、芬咖明、利非他明、亚甲二氧基吡咯戊酮、哌甲酯、诺米芬新、0-2172、恶喹酸、哌苯甲醇、苯咯戊烷、吡咯戊酮、他美曲林、WY-46824、其盐、其溶剂化物、其水合物、其前药及其包合物),以减轻一种或多种糖尿病性周围神经病变的征兆或症状。在某些实施方式中,NDRI是安非他酮或其药学可接受的盐、溶剂化物、水合物、包合物或前药。例如,但不限于,糖尿病性周围

神经病变的症状和/或征兆包括：一个或多个肢端(extremity)的麻木、刺痛感和/或灼烧感；一个或多个肢端的疼痛和/或温度感知降低；一个或多个肢端的感觉过敏；一个或多个肢端的反射降低；一个或多个肢端的肌无力；一个或多个肢端的溃疡和/或感染。

[0218] 5. 试剂盒

[0219] 本发明公开的主题提供用于筛选适合用于PNS和/或CNS的再生、髓鞘损伤的预防和/或修复、和/或用于治疗、和/或预防施旺细胞相关疾病(例如周围神经病变,例如DPN)的化合物的试剂盒。在某些实施方式中,试剂盒包括有效量的通过本文公开的分化方法从干细胞的体外分化获得的SC前体和/或成熟SC的群体。在某些实施方式中,试剂盒包括含有细胞的无菌容器;这些容器可以是盒、安瓿、瓶、小瓶、管子、袋子、小袋(pouch)、泡罩包装或者本领域已知的其它合适容器形式。这些容器可以由塑料、玻璃、层压纸、金属箔或其它适用于保持药物的材料制成。

[0220] 在某些实施方式中,试剂盒还包括用于识别能够从高葡萄糖诱导的毒性挽救SC前体和/或成熟SC的化合物的说明书。在某些实施方式中,说明书包括:(a)使获得的SC前体和/或成熟SC暴露于至少约10mM的葡萄糖浓度;和(b)在葡萄糖暴露之后,使细胞群体与测试化合物接触。在某些实施方式中,说明书包括:(c)测量不经所述测试化合物处理的细胞的第一山梨糖醇水平、第一葡萄糖水平和第一细胞生存力中的一个或多个;和(d)测量经所述测试化合物处理的细胞的第二山梨糖醇水平、第二葡萄糖水平和第二细胞生存力中的一个或多个。而且,说明书包括:(e)比较(i)第二山梨糖醇水平与第一山梨糖醇水平,(ii)第二葡萄糖水平与第一葡萄糖水平,和/或(iii)第二细胞生存力与第一细胞生存力。

[0221] 说明书还包括:(f)识别出适合用于PNS和/或CNS的再生、用于预防和/或治疗或修复髓鞘损伤、和/或用于预防和/或治疗施旺细胞相关疾病(例如,周围神经病变,例如DPN)的测试化合物,其中第二山梨糖醇水平低于第一山梨糖醇水平,(ii)第二葡萄糖水平低于第一葡萄糖水平,和/或(iii)第二细胞生存力低于第一细胞生存力。

[0222] 在某些实施方式中,葡萄糖浓度为至少约10mM,例如,10mM至100mM。在某些实施方式中,葡萄糖浓度为约30mM。在某些实施方式中,测量(包括第一和第二山梨糖醇水平、葡萄糖水平和细胞生存力的测量)在初始葡萄糖暴露之后至少约12小时、至少约24小时(1天)、约48小时(2天)、约72小时(3天)、约4天、约5天、约6天、约7天、约8天、约9天或约10天时进行。在某些实施方式中,测量(包括第一和第二山梨糖醇水平、葡萄糖水平和细胞生存力的测量)在初始葡萄糖暴露之后至少约72小时(3天)进行。

[0223] 而且,本发明公开的主题提供用于PNS和/或CNS的再生、髓鞘损伤的预防和/或修复、和/或用于治疗、和/或预防施旺细胞相关疾病(例如周围神经病变,例如DPN)的试剂盒。在某些实施方式中,试剂盒包括有效量的通过本文公开的筛选方法识别出的化合物。在某些实施方式中,试剂盒包括含有治疗性组合物的无菌容器;这些容器可以是盒、安瓿、瓶、小瓶、管子、袋子、小袋(pouch)、泡罩包装或者本领域已知的其它合适容器形式。这些容器可以由塑料、玻璃、层压纸、金属箔或其它适用于保持药物的材料制成。

[0224] 在某些实施方式中,试剂盒包括用于将识别出的化合物或包括其的组合物施用于受试者例如患有施旺细胞相关疾病(例如周围神经病变,例如DPN)的受试者的说明书。说明书可以包括关于使用化合物或组合物用于PNS和/或CNS的再生、髓鞘损伤的预防和/或修复、和/或用于治疗、和/或预防施旺细胞相关疾病(例如周围神经病变,例如DPN)的信息。在

某些实施方式中,说明书包括以下的至少一种:化合物的说明;用于PNS和/或CNS的再生、髓鞘损伤的预防和/或修复、和/或用于治疗、和/或预防施旺细胞相关疾病(例如周围神经病变,例如DPN)或其症状的剂量方案和给药;注意事项;警告;适应症;禁忌症;过剂量信息;不良反应;动物药理学;临床研究;和/或参考资料。说明书可以直接打印在容器(如果存在的话)上,或者作为贴于容器的标签,或者作为容器中或与容器一起提供的单独的纸、册、卡或折叠印刷品。

[0225] 实施例

[0226] 通过参照以下实施例将更好地理解本发明公开的主题,实施例作为本发明公开的主题的示例提供,而不是作为限制。

[0227] 实施例1

[0228] 概要

[0229] 施旺细胞前体和施旺细胞源自人干细胞(例如hPSC)。发明人建立了基于hESC的体外DPN模型,其反映了人SC对高血糖诱导的细胞毒性和多元醇通路的激活的选择性易损性。发明人进一步使用该模型进行了高通量药物筛选,并识别出安非他酮作为治疗DPN的化合物。安非他酮在体外可以抵消SC中高葡萄糖诱导的细胞毒性,并挽救经STZ处理的糖尿病小鼠中神经病变相关的组织学缺陷和行为缺陷。

[0230] 方法和材料

[0231] 未分化人胚胎干细胞(hESC)的培养

[0232] hESC系H9(WA-09)和衍生物(SOX10::GFP;SYN::ChR2-YFP;SYN::YFP;PHOX2B:GFP;EF1::RFP EDNRB-/-)以及2个独立的hiPSC系(健康,和家族性自主神经功能障碍症,基于仙台,OMSK(Cytotune))维持在含有hESC培养基的KSR(Life Technologies,10828-028)中的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF,Global Stem,Rockville,MD)上(Chambers等,2009)。以每月间隔对细胞进行支原体检测,并对STR进行分析以确认研究开始时的细胞身份。

[0233] 神经嵴诱导和从hESC诱导和扩增施旺细胞

[0234] 将hESC铺于含有10nM FGF2(R&D Systems,233-FB-001MG/CF)的hESC培养基中的基质胶(BD Biosciences,354234)包被的培养皿(10^5 细胞/ cm^2)上。在含有LDN193189(100nM,Stemgent,Cambridge,MA)和SB431542(10 μ M,Tocris,Ellisville,MI)的敲除血清替代(KSR)培养基(KO DMEM+15%KSR,L-谷氨酰胺(Life Technologies,25030-081),NEAA(Life Technologies,11140-050)中开始分化。从第4天至第10天,KSR培养基逐渐用增加量的N2培养基替换,如前所述(Chambers等,2009)。对于颅NC(CNC)诱导,从第2天至第11天,除了LDN和SB之外,还将细胞用3 μ M CHIR99021(Tocris Bioscience,4423)处理。通过从第0天至第11天用LDN和SB处理,产生CNS前体对照细胞,如前所述(Chambers等,2009)。在整个该实施例中,第0天是培养基从hESC培养基转换为含有LDN和SB的培养基的那天。文字和图中的分化天数是指自多能阶段(第0天)以来的天数。

[0235] 在第11天,NC细胞在Ultra Low Attachment 6孔培养板(Fisher Scientific,3471)中聚集为3D球状体(5百万细胞/孔),并在补充有L-谷氨酰胺(Gibco,25030-164)、N2(Stem Cell Technologies,07156)和B27(Life Technologies,17504044)、含有CHIR(3 μ M,Tocris Bioscience,4423)和FGF2(10nM,R&D Systems,233-FB-001MG/CF)和NRG1(10ng/ml,R&D 378-SM-025)的神经元基质(NB)培养基中培养。在14天的悬浮培养后,将球状体铺

于补充有L-谷氨酰胺(Gibco,25030-164)、N2(Stem Cell Technologies,07156)和B27(Life Technologies,17504044)、含有NRG1(20ng/ml,R&D 378-SM-025)、FGF2(10nM,R&D Systems,233-FB-001MG/CF)和cAMP(100mM,Sigma,D0260)的神经元基质(NB)培养基中的聚鸟氨酸/层粘连蛋白/纤连蛋白(P0/LM/FN)包被的培养皿(如前所述制备)上(Lee G等,2007)。SC前体从所铺球状体中迁移出来并在10天内分化成SC。对于长期扩增,细胞在P0/LM/FN包被的培养皿上在施旺细胞培养基(Sciencell,1701)中培养。在分化的第25天、第35天、第50天、第60天和第100天,将细胞固定用于免疫染色或收获用于基因表达分析。

[0236] FACS和免疫荧光(IF)分析

[0237] 对于IF,将细胞用4%多聚甲醛(PFA,Affymetrix-USB,19943)固定20分钟,然后使用1%牛血清白蛋白(BSA,Thermo Scientific,23209)和0.3%triton X-100(Sigma,T8787)封闭并透化。然后在4℃(摄氏度)下将细胞在一抗溶液中温育过夜,并在室温(RT)下用荧光团缀合的二抗染色1小时,然后将染色的细胞与DAPI(1ng/ml,Sigma,D9542-5MG)一起孵育,并在成像前洗涤几次。对于流式细胞术分析,将细胞用Accutase(Innovative Cell Technologies,AT104)解离,并使用BD Cytofix/Cytoperm(BD Bioscience,554722)溶液固定和透化,然后使用BD Perm/Wash缓冲液(BD Bioscience,554723)根据制造商的说明书进行洗涤、封闭和透化。然后将细胞用一抗(在4℃过夜)和二抗(在室温下30min)染色,并使用流式细胞仪(FlowJo软件)分析。一抗和稀释液的列表在表5提供。

[0238] 表面标志物筛选

[0239] 在分化的第80天,在hESC-SC上使用BD Lyoplate 文库[®](BD,560747)进行特异性表面抗原的筛选。将细胞铺于96孔板(10,000细胞/孔)中,并根据制造商的说明用一抗和二抗染色。对染色的细胞进行固定,用于全板成像和定量。对于每种抗体,对总GFAP中双阳性细胞的百分比进行定量。进一步使用流式细胞术验证高命中者(top hits)(>60%双阳性)。

[0240] 基因表达分析

[0241] 对于RNA测序,使用RNeasy RNA纯化试剂盒(Qiagen,74106)提取总RNA。对于qRT-PCR检定,使用Superscript II逆转录酶(Life Technologies,18064-014)将总RNA样品逆转录成cDNA。qRT-PCR反应使用QuantiTect SYBR Green PCR mix(Qiagen,204148)建立。每个数据点代表三次独立的生物学重复。使用TopHat v2.0将RNA-seq读数映射至人参考基因组(hg19)。TopHat使用默认参数运行,但覆盖范围搜索除外。然后使用HTSeq对比对进行定量,并使用标准化为神经嵴样品的DESeq计算差异基因表达。

[0242] 生存力检定

[0243] 为了监测SC的生存力,使用CytoTox 96细胞毒性检定试剂盒(Promega,G1780)检定细胞的LDH活性。简言之,将细胞以30,000细胞/cm²铺在96孔板中。24小时后收获上清液和细胞裂解物,并使用酶标仪(490nm吸光度)检定LDH活性。通过将裂解物的LDH信号除以总LDH信号(来自裂解物加上清液)来计算生存力。在检定过程中,在P0/LM/FN包被的培养皿上在施旺细胞培养基(Sciencell,1701)中培养细胞。

[0244] 代谢物测量

[0245] 根据制造商说明书,对经高葡萄糖、低葡萄糖和药物处理的SC和感觉神经元进行山梨糖醇(abcam,ab118968)、葡萄糖(abcam,ab65333)、丙酮酸盐(abcam,ab65342)和2DG摄

取 (abcam, ab136955) 测量的生化检定。数据根据细胞数量进行标准化,并在3-6次生物学重复上进行平均。

[0246] 逆转葡萄糖介导的SC细胞毒性的药物的高含量筛选检定

[0247] 化合物筛选使用Prestwick Chemical Library[®]进行。将RFP-标记的hESC-SC铺于384孔板(1,000/孔)中,在加入化合物之前即刻用30mM葡萄糖处理。化合物以1 μ M浓度加入。72小时之后,将板用DAPI处理10分钟,洗涤两次,并固定,用于全板成像。通过对DAPI阴性、RFP阳性的细胞进行计数,对每个孔的活细胞数量进行定量。通过将DAPI阳性细胞数除以总RFP阳性细胞,计算每个孔的死亡细胞百分比。

[0248] 为了对所选的命中化合物(安非他酮HCL, Sigma, B102)加以验证,将细胞用不同浓度的化合物处理以进行剂量反应分析。后续实验中使用最高无毒性剂量(0.7 μ M-基于最优的山梨糖醇降低和生存力)。

[0249] 糖尿病小鼠的药物治疗

[0250] 所有程序均遵循NIH指南进行,并获得当地机构动物护理和使用委员会(IACUC)的批准。将3-8周龄雄性C57BL6小鼠用一剂链脲菌素(180mg/kg, sigma, 85882) IP注射处理,以诱导胰腺 β 细胞死亡。通过自尾端采一滴血,在处理一周开始每周使用标准血糖仪(Freestyle Lite)测量血糖水平。链脲菌素处理一周,开始BP处理。将BP与标准饲料以1.63mg/克饲料混合,每日以 \sim 300mg/kg口服给药。剂量基于平均日食物摄取量(5.5克/天)和初始体重(30g)计算。小鼠热敏感度试验

[0251] 使用热板试验对热伤害性感受(thermal nociception)进行评价。热板(Ugo Basile 35100)由具有透明树脂玻璃柱体的金属表面(55 $^{\circ}$ C)组成,以容纳小鼠。受试者置于恒温的热板上,通过舔舐/摇晃后爪或跳起评估,确定表现出不适所需的延迟。典型的基线延迟为5-10秒,最大延迟为30秒。在最大延迟30秒之后任何没有表现出不适行为的动物将被取出,以避免组织损伤。

[0252] 统计分析

[0253] 数据表示为平均值 \pm SEM,并且来自至少3次独立实验。重复数据(n)在图例中给出。统计分析使用Student t-检验(比较2组)或具有Dunnett检验的ANOVA(相对于对照比较多组)进行。原始数据的分布近似于具有足够重复次数的数据的正态分布(Kolmogorov Smirnov正态性检验)以测试正态性。存活分析使用时序(Mantel-Cox)检验进行。主要命中物(hit)的Z-分数计算为 $Z = (x - \mu) / \sigma$ 。X是迁移分数值,对于所有命中化合物均为3。 μ 是平均迁移分数值, σ 是所有化合物和DMSO对照的标准偏差。

[0254] 结果

[0255] 从hESC获得和预期分离SC谱系

[0256] 为仔细分析DPN中感觉神经损伤的细胞类型特异性机制,从hPSC产生人感觉神经元和SC。用于从hESC诱导感觉神经元的方法描述于Cai等,2016; Chambers等,2012,但是SC的获得仍然难以捉摸。因此,作为建立DPN的hESC模型的第一步,建立将hESC分化成SC的有效策略。

[0257] 更近的研究报道了由hPSC获得SC-样细胞,但未显示关键谱系标志物如SOX10的表达,并且未能证明功能性髓鞘化(Liu等,2012; Ziegler等,2011)。在胚胎发育期间,认为SC以逐步过程从SOX10⁺ NC细胞产生。基于小鼠和鸡胚的研究,NC首先产生SC前体,其与发育

中的神经中的神经束相关联。相关联的神经元表达NRG1,并通过激活其ERBB3受体促进SC前体的存活和进一步分化(Newbern和Birchmeier,2010)。通过小鼠发育的E13.5,SC前体产生不成熟的SC,其在维持SOX10表达的同时上调谱系标志物如GFAP、S100和POU3F1。SC最终分化成髓鞘化和非髓鞘化命运持续到出生后(Jessen等,2015)。

[0258] 最初的基于hESC的NC分化方案依赖于假定的NC细胞从神经上皮谱系的分层并结合p75+和/或HNK1+NC前体的预期分离(Bajpai等,2010;Lee等,2007)。虽然这些方案产生各种源自NC的谱系,但SOX10表达水平通常较低。相比之下,基于定时暴露于WNT信号传导激活剂的更加定向的NC诱导方案显示出,到分化的第11天,在大多数细胞中有强健的SOX10的诱导(Fattahi等,2016;Menendez等,2011;Mica等,2013)。进一步培养后,那些源自hESC的NC细胞可以被导向成SOX10+黑素细胞(Mica等,2013),但也可产生SOX10-间充质和神经元前体(Mica等,2013)。由于SOX10的表达是整个发育过程中保留在SC谱系中的关键标志物,首先着重的是在指导其朝向神经胶质命运之前在培养中建立维持SOX10⁺前体的条件。测定了存在EGF、FGF、WNT、Notch、TGFβ、BMP、NRG和内皮素3信号传导调节剂的情况下2D或3D NC培养物中SOX10⁺细胞的百分比。3D聚集步骤和除了FGF2和NRG1处理之外还通过CHIR99021激活WNT信号传导的组合导致直到第25天,SOX10表达得以维持(图6A),并且S100和其它早期SC标志物得以诱导(图1A-1C)。在此阶段,用FGF2、NRG1和cAMP处理第25天培养物前体另外10天,促进几种SC标志物如GFAP、POU3F1、PMP22、MBP、AQP4、MPZ的强健诱导以及参与神经元相互作用和支持的基因(包括GDNF、ERBB3和GAP43等)的上调(图1A-1D)。基于S100、MBP和GFAP的表达(图1E、1F和1I),长期培养导致GFAP+细胞的富集,到第60-90天产生几乎同质的SC群体(图6B)。这些源自hESC的群体可以增殖另外数周,同时保持高百分比的表达S100、MBP和GFAP的SC(图1E、1F和1I)。

[0259] 为了能够在分化期间预期分离hESC-SC,筛选了对于特异性标记GFAP+SC的表面抗原的242种抗体的文库(图7A)。经确定,CD44、CD49e、CD81和CD98标记GFAP+细胞群体(图7B)。进一步的验证显示,CD98是第60天SC中特异性表达的唯一标志物,但在第11天NC或第25天SCP细胞(其表达之前显示为标记早期SOX10+NC谱系的标志物CD49D(Fattahi等,2016))中不表达(图7C)。纯化细胞的RNA测序证明,第25天源自hESC的SCP与早期NC细胞密切相关,而第50天、特别是第100天SC显示出与原代成人SC密切匹配的基因表达模式(图1G)。通过比较第25天和第100天细胞与第11天NC,基因表达数据也产生了新的候选SCP和SC标志物(图1H)。每个谱系的前200个富集转录物的列表在表1-4中提供。

[0260] hESC-SC对糖毒性具有选择性易损性

[0261] 上述结果建立起获得功能性SC的高效方案。为了识别介导DPN的特定细胞类型,通过评价对糖尿病中发生的高葡萄糖暴露的反应,考察糖尿病对源自hESC的SC以及感觉神经元的影响(图2A)。为了评价细胞类型特异性易损性,将源自hESC的感觉神经元和SC的培养物用一系列葡萄糖浓度处理。在至多45mM的葡萄糖水平下,感觉神经元没有表现出毒性。但是,源自hPSC的SC对温和增加的葡萄糖水平敏感(图2B、2E)。

[0262] 糖尿病中葡萄糖水平升高可以激活某些细胞类型中的多元醇通路(Oates,2002)。多元醇通路经由分别由醛糖还原酶(AR)和山梨糖醇脱氢酶(SDH)催化的两个酶促步骤将过量葡萄糖代谢成山梨糖醇,并随后代谢成果糖。在大鼠中关于葡萄糖诱导的晶状白内障(lenscataract)的研究中,多元醇通路和山梨糖醇介导的渗透和氧化应力可能是因高葡萄

糖引起的组织损伤的潜在中介 (Van Heyningen, 1959)。山梨糖醇积累在动物模型中也参与糖尿病诱导的周围神经损伤 (Mizisin, 2014; Oates, 2002)。鉴于葡萄糖对hESC-SC的毒性作用, 对于它们是否响应于高葡萄糖暴露而显示出山梨糖醇的堆积 (buildup) 进行了评价, 这将表明其选择性易损性的可能机制。与之前的报道 (Maekawa等, 2001; Mizisin和Powell, 1993) 一致, 相比于感觉神经元, 源自hESC的SC中观察到AR/SDH比例的增加 (图2C)。这一点进一步得到以下观察结果的支持: 当暴露于高葡萄糖时, SC表现出山梨糖醇水平的增加, 但感觉神经元则没有 (图2D)。

[0263] 高含量筛选识别出抵消hESC-SC中糖毒性的药物

[0264] 这些数据表明了SC对高葡萄糖的易损性, 将其降低展现出新的DPN治疗机会。重现hESC-SC中这种细胞损伤的能力, 为可以抵消这种毒性的药物的高通量筛选 (HTS) 提供了平台。因此, 建立起在30mM葡萄糖的存在下测量源自hPSC的SC的生存力的HTS系统 (图3A和3E)。发明人对含有1,280个经批准 (FDA、EMA或其他管理机构) 的药物小分子的Prestwick文库进行了筛选。在提高经高葡萄糖处理的hESC-SC的生存力方面最有潜力的化合物是抗抑郁药安非他酮 (BP), 商品名为 **Wellbutrin[®]** (图3B)。验证研究显示了BP在挽救SC生存力和降低山梨糖醇水平的剂量-反应, IC₅₀为263nM (图3C、3D), 在0.7μM下效果最大, 在所有进一步的研究中使用该剂量。2μM以上的BP水平诱导逐渐的依赖于剂量的毒性。我们接下来探讨BP是否通过调节细胞内葡萄糖水平来发挥作用。鉴于BP对山梨糖醇水平的影响, 发明人考察了BP处理是否改变SC中的葡萄糖水平。BP在不影响葡萄糖摄取的情况下降低了hESC-SC中的细胞内葡萄糖水平 (图4A、4B)。因此, 推测BP通过增加糖酵解通量并使平衡远离山梨糖醇的生成来降低葡萄糖水平。丙酮酸盐的水平增加支持了这一推测, 丙酮酸盐是经BP处理的hESC-SC中的糖酵解终产物 (图4C)。总之, 这些研究阐明, hESC-SC中暴露于高葡萄糖导致细胞内葡萄糖和山梨糖醇的升高, 其可以通过用BP处理标准化 (图4D)。

[0265] 安非他酮挽救DPN小鼠模型中的疾病表型

[0266] 鉴于BP在体外挽救经高葡萄糖处理的hESC-SC的生存力的显著能力, 对BP处理在DPN小鼠模型中的治疗效果进行了研究。将野生型C57BL6小鼠用导致β细胞死亡、胰岛素生成受损和高血糖的胰腺β细胞特异性毒素链脲菌素 (STZ) 处理, 作为1型糖尿病小鼠模型 (Wu和Huan, 2008)。这一方法广泛应用于在啮齿类动物中模拟1型糖尿病 (Akbarzadeh等, 2007; Wu和Huan, 2001)。在DPN患者和动物模型中, 感觉神经损伤常常导致肢端感觉的丧失。使用热感觉试验作为功能性读出来评价BP处理对经STZ处理的小鼠中的DPN表型的影响, 并通过坐骨神经的组织学分析评估结构损伤 (图5A)。与无糖尿病的对照动物相比, 经STZ处理的小鼠表现出不依赖于BP处理的血糖水平的显著增加 (图5B), 说明BP处理不影响葡萄糖水平。在STZ处理后7周和8周时, 未经BP处理的糖尿病小鼠显示出对热刺激的反应延迟。经BP处理的糖尿病小鼠则显示出显著改善的反应时间, 与正常的无糖尿病动物相当 (图5C)。组织学分析显示, STZ小鼠的坐骨神经中TUNEL+凋亡细胞的百分比增加。相比于未经处理的组中的动物, 经BP处理的动物显示出显著更少的凋亡细胞 (图5D、5E)。接下来, 使用透射电子显微镜评价了STZ和BP处理对周围髓鞘的影响。在经STZ处理的动物的坐骨神经中观察到了百分比很大的深度髓鞘损伤, 但是, 在经BP处理的STZ小鼠中该百分比得以显著降低 (图5F-5G)。这些研究表明BP在DPN STZ-模型中具有强健的治疗效果。

[0267] 讨论

[0268] SC在周围神经发育、功能和修复中发挥重要作用。然而,由于从原发组织以可行的数量获得它们受到限制,人们不太理解它们的发育和功能。其他人先前报道了在长期维持P75+/HNK1+NC前体后来自hPSC的施旺样细胞(Lee等,2007),然而,这些研究具有诱导效率低和体外培养数月、分化旷日持久、SC成熟有限以及髓鞘化数据缺乏的局限性(Lee等,2007;Liu等,2012;Ziegler等,2011)。试图通过其它来获得人SC也导致了产量低、表型特征有限以及体外或体内髓鞘化的缺乏(Li等,2015;Mica等,2013)。建立了用于产生良好表征且纯的人SC群体的高效方法,为未来的深度发育研究和转化应用如疾病建模和细胞治疗奠定了基础。

[0269] 我们基于hESC的平台的一个重要特征在于所得的SC的可扩展性(scalability)和纯度,以及长时间培养细胞而不会失去SC特性的能力。相比之下,原代SC在长期培养时倾向于迅速丧失其性质,这导致施旺细胞培养物被成纤维细胞样细胞污染增加。现在可以使用这种新的分化技术获得的重要发育问题包括:控制从多潜能NC干细胞向定型SC转变的机制,以及鉴于最近在小鼠中表明黑素细胞和副交感神经元均可以源自早期SC谱系的数据而对人SC可塑性的研究(Adameyko等,2009;Espinosa-Medina等,2014)。将CD98识别为用于预期分离定型SC的表面标志物代表着用于这些研究的有力工具。PNS病理学的建模可能特别令人感兴趣。培养的源自hESC的施旺细胞的一个令人惊讶的特征在于其基因表达模式,其不仅证实了施旺细胞的身份,而且表明多能衍生的细胞与成人施旺细胞的表达模式匹配。这与大多数其它体外获得的hPSC谱系(例如表达胎儿期标志物的神经元)(Studer等,2015)相反。

[0270] 生成髓鞘化SC的能力使得能够模拟遗传性髓鞘化疾病,例如夏科-马里-图思(CMT)病。目前模拟CMT的尝试受限于限定SC前体中的早期分子事件,而没有捕获实际的疾病表型。CMT是最常见的PNS遗传疾病,但是,大多数周围神经病变都因作为最常见原因的糖尿病获得(所有糖尿病患者中有15-60%受影响(Martyn和Hughes,1997))。

[0271] 发明人提出了基于hESC的DPN模型,其显示SC对糖尿病相关的高血糖具有选择性易损性。尽管大多数数据是响应于高葡萄糖暴露而取得的,但发明人在即使非常温和的葡萄糖增加水平下也观察到SC生存力的降低。BP抵消葡萄糖介导的施旺细胞毒性的能力与细胞内葡萄糖和蔗糖水平的降低、但是丙酮酸盐水平的增加(表明氧消耗的增加)相关。有趣的是,BP似乎是唯一常常与患者的适度体重减少而不是体重增加相关的抗抑郁药物,因此,葡萄糖代谢中BP介导的变化可能与这些全身效果有关。体内研究阐明,BP处理可以挽救DPN相关的行为缺陷和神经损伤。BP已经在患有神经性疼痛的患者的治疗中显示出一些益处(Semenchuk等,2001),这提出了如下问题:药物对于另外的适应症的这些效果是否也可以通过其对SC易损性的作用来介导。除BP以外,发明人还识别了若干其他的能够挽救施旺细胞易损性的化合物。确定这些化合物是否经由共同的还是不同的机制发挥作用,以及它们在STZ小鼠中是否显示出与BP相当的体内活性,将会非常有趣。

[0272] 本项研究可以导致其他获得性周围神经病变的建模方面的进步。癌症患者在用化疗药物例如顺铂治疗之后常常观察到医源性神经病变(Quasthoff和Hartung;Thompson等,1984)。使用源自hPSC的谱系进行的体外细胞毒性试验和HTS的结合,可以充当识别潜在药物的平台,该潜在药物逆转这些化疗药的细胞类型特异性副作用。

[0273] 总之,本研究提供了一个获取人SC谱系的有效框架,用于探索其在健康和疾病中

的生物学,并且开发新的DPN疗法。hPSC的定向分化代表了人SC大规模获得的有效方法,在基础和转化研究中具有广泛的意义。该框架为深入研究神经胶质在PNS生物学和疾病中的作用提供了新的可能性,并有助于未来开发新的周围神经病变疗法。该工作进一步表明了DPN发病机制中的SC缺陷,并且提出BP作为获FDA批准的药物可以在体内和体外治疗DPN-相关损伤。

[0274] 表1. 相比于源自hESC的NC (第11天), 在源自hESC的施旺细胞前体 (第25天) 中的前200个上调基因

基因 ID	log2 倍数变化
<i>CALCB</i>	13.12
<i>GPR116</i>	9.29
<i>TSPYL5</i>	8.44
<i>ITPKA</i>	8.33
<i>SLC17A6</i>	8.28
<i>SYPL2</i>	8.12
<i>LOC100128252</i>	7.73
<i>ANGPTL7</i>	7.47
<i>LOC728978</i>	7.31
<i>ZNF502</i>	7.22
<i>ZNF229</i>	7.17
<i>XLOC_003498</i>	7.12
<i>STK32A</i>	7.08
<i>LOC100507341</i>	7.01
<i>EEF1A2</i>	6.98
<i>TRIM54</i>	6.95
<i>SEZ6L</i>	6.77
<i>SLC16A6</i>	6.66
<i>C20orf26</i>	6.64
<i>LPL</i>	6.58
<i>STMN4</i>	6.57
<i>CNGA3</i>	6.55
<i>QPCT</i>	6.54
<i>C12orf69</i>	6.42
<i>CACNG5</i>	6.33
<i>BAAT</i>	6.30
<i>AGBL4</i>	6.28
<i>COL12A1</i>	6.22
<i>SPOCK2</i>	6.21
<i>XLOC_000972</i>	6.20
<i>ABCB1</i>	6.18
<i>ANGPTL1</i>	6.14
<i>CHRNA1</i>	6.07
<i>DHRS2</i>	6.06
<i>MFAP4</i>	6.01
<i>ARHGDIG</i>	5.97
<i>XLOC_003411</i>	5.97
<i>ABLIM3</i>	5.97
<i>LINC00152</i>	5.97
<i>HLA-DOB</i>	5.95

[0275]

[0276]

<i>P2RX3</i>	5.93
<i>PLA2G4C</i>	5.87
<i>CAVI</i>	5.86
<i>CD44</i>	5.85
<i>FAM26E</i>	5.82
<i>SRPX2</i>	5.81
<i>LUM</i>	5.80
<i>CRHBP</i>	5.74
<i>HOXD9</i>	5.73
<i>ADAMTS8</i>	5.71
<i>SLC30A2</i>	5.66
<i>C7orf29</i>	5.65
<i>DSCAM</i>	5.65
<i>PHOX2A</i>	5.63
<i>KCNK9</i>	5.62
<i>GAL</i>	5.59
<i>SST</i>	5.58
<i>DMGDH</i>	5.53
<i>KCNH5</i>	5.52
<i>TRIM67</i>	5.52
<i>GPR64</i>	5.50
<i>GPR115</i>	5.49
<i>PTPRN</i>	5.48
<i>NKX6-2</i>	5.48
<i>PNPLA4</i>	5.48
<i>NOV</i>	5.47
<i>ABCG1</i>	5.42
<i>NELL1</i>	5.39
<i>SPARCL1</i>	5.37
<i>LOC375010</i>	5.37
<i>APLNR</i>	5.35
<i>DCN</i>	5.35
<i>SLC10A4</i>	5.35
<i>NCAN</i>	5.33
<i>PLEK2</i>	5.32
<i>HSPB7</i>	5.32
<i>CLCA2</i>	5.30
<i>FAIM2</i>	5.29
<i>CALB1</i>	5.28
<i>SLC6A15</i>	5.26
<i>LOC100132891</i>	5.24
<i>SCG2</i>	5.23
<i>NFIB</i>	5.22
<i>RUNDC3B</i>	5.21
<i>XLOC_010607</i>	5.21
<i>C5AR1</i>	5.21
<i>MICAL2</i>	5.20
<i>SGIP1</i>	5.17
<i>GNG3</i>	5.14
<i>LOC541471</i>	5.14
<i>KCNA2</i>	5.14
<i>FOXF2</i>	5.11
<i>IFI44L</i>	5.10
<i>HPCAL4</i>	5.10
<i>LOC100507043</i>	5.09
<i>TNFAIP6</i>	5.09

[0277]

<i>TMEMI32D</i>	5.07
<i>KLHDC7B</i>	5.04
<i>GMPR</i>	5.03
<i>CMKLR1</i>	5.02
<i>PPP1R27</i>	5.01
<i>REEP1</i>	5.01
<i>PALM3</i>	5.00
<i>PTPN5</i>	4.99
<i>GPRIN3</i>	4.99
<i>MGP</i>	4.97
<i>ATP8A2</i>	4.97
<i>SERPINB2</i>	4.95
<i>TCN1</i>	4.94
<i>IFI44</i>	4.94
<i>CLVS2</i>	4.94
<i>DGKI</i>	4.93
<i>FAM20C</i>	4.91
<i>TPH2</i>	4.91
<i>TGFA</i>	4.90
<i>ACTG2</i>	4.89
<i>ULBP2</i>	4.89
<i>RMRP</i>	4.89
<i>XLOC_011087</i>	4.88
<i>NPFFR2</i>	4.88
<i>GDAP1L1</i>	4.86
<i>INHBA</i>	4.85
<i>CHSY3</i>	4.85
<i>PPYR1</i>	4.84
<i>CD163L1</i>	4.83
<i>MIR7-3HG</i>	4.82
<i>ZNF542</i>	4.79
<i>CDH13</i>	4.78
<i>TM4SF1</i>	4.77
<i>TYRP1</i>	4.77
<i>SYT9</i>	4.77
<i>CACNG7</i>	4.76
<i>PDLIM3</i>	4.76
<i>FAM135B</i>	4.74
<i>NETO1</i>	4.74
<i>CD207</i>	4.73
<i>TNC</i>	4.73
<i>TNFRSF8</i>	4.73
<i>XLOC_013083</i>	4.73
<i>SYT5</i>	4.73
<i>PMP2</i>	4.72
<i>PTPRH</i>	4.72
<i>ZFP28</i>	4.71
<i>LHFPL4</i>	4.70
<i>TTBK1</i>	4.69
<i>HOXB7</i>	4.68
<i>HCST</i>	4.67
<i>SERPINB7</i>	4.67
<i>LOC653513</i>	4.67
<i>MSC</i>	4.66
<i>SYNGR3</i>	4.65
<i>POPDC3</i>	4.65

[0278]

<i>PENK</i>	4.62
<i>CFI</i>	4.59
<i>C3AR1</i>	4.59
<i>SERPINE1</i>	4.58
<i>NT5E</i>	4.57
<i>C4orf32</i>	4.57
<i>TMEM59L</i>	4.56
<i>RIPPLY2</i>	4.54
<i>STEAP3</i>	4.54
<i>SLC1A2</i>	4.54
<i>HECW1</i>	4.54
<i>IL8</i>	4.54
<i>FAM65B</i>	4.53
<i>TLR4</i>	4.53
<i>ADAMTS5</i>	4.52
<i>CDKN2B</i>	4.51
<i>LGI2</i>	4.51
<i>KCNMA1</i>	4.50
<i>ANKRD1</i>	4.50
<i>XLOC_009257</i>	4.50
<i>MXRA5</i>	4.49
<i>HIGD1B</i>	4.49
<i>ALX4</i>	4.47
<i>RUNX3</i>	4.46
<i>ETV4</i>	4.46
<i>HOXD8</i>	4.45
<i>FLNC</i>	4.45
<i>HRK</i>	4.45
<i>HRH3</i>	4.45
<i>LOC338651</i>	4.45
<i>CAV2</i>	4.44
<i>HCST</i>	4.67
<i>SERPINB7</i>	4.67
<i>LOC653513</i>	4.67
<i>MSC</i>	4.66
<i>SYNGR3</i>	4.65
<i>POPDC3</i>	4.65
<i>PENK</i>	4.62
<i>CFI</i>	4.59
<i>C3AR1</i>	4.59
<i>SERPINE1</i>	4.58
<i>NT5E</i>	4.57
<i>C4orf32</i>	4.57
<i>TMEM59L</i>	4.56
<i>RIPPLY2</i>	4.54
<i>STEAP3</i>	4.54
<i>SLC1A2</i>	4.54
<i>HECW1</i>	4.54
<i>IL8</i>	4.54
<i>FAM65B</i>	4.53
<i>TLR4</i>	4.53
<i>ADAMTS5</i>	4.52
<i>CDKN2B</i>	4.51
<i>LGI2</i>	4.51
<i>KCNMA1</i>	4.50
<i>ANKRD1</i>	4.50

[0279]

<i>XLOC_009257</i>	4.50
<i>MXRA5</i>	4.49
<i>HIGD1B</i>	4.49
<i>ALX4</i>	4.47
<i>RUNX3</i>	4.46
<i>ETV4</i>	4.46
<i>HOXD8</i>	4.45
<i>FLNC</i>	4.45
<i>HRK</i>	4.45
<i>HRH3</i>	4.45
<i>LOC338651</i>	4.45
<i>CAV2</i>	4.44

[0280] 表2. 相比于源自hESC的NC (第11天), 在源自hESC的施旺细胞 (第50天) 中的前200个上调基因

[0281]

基因 ID	log2 倍数变化
<i>STT3B</i>	11.85
<i>CTAGE5</i>	11.30
<i>KBTD6</i>	10.63
<i>B3GALT1</i>	10.46
<i>PAX9</i>	10.07
<i>APOO</i>	9.45
<i>XLOC_011326</i>	9.15
<i>HSPE1</i>	8.84
<i>TRIM3</i>	8.73
<i>RAP2B</i>	8.53
<i>TRAPPC9</i>	8.49
<i>TXNDC15</i>	8.35
<i>THBS2</i>	8.34
<i>GMPPB</i>	8.32
<i>PLP2</i>	8.20
<i>NCSI</i>	8.09
<i>ABL1</i>	7.92
<i>FMNL2</i>	7.77
<i>NDUFA12</i>	7.39
<i>XLOC_009725</i>	7.34
<i>PTRH2</i>	7.24
<i>CNBD1</i>	7.24
<i>XLOC_000576</i>	7.21
<i>ZNF224</i>	7.19
<i>PDXDC2P</i>	7.11
<i>GSTM3</i>	7.07
<i>CENPM</i>	7.06
<i>GCLM</i>	7.04
<i>NCAPH</i>	6.98
<i>C15orf37</i>	6.98
<i>JAK1</i>	6.97
<i>STARD3</i>	6.87
<i>TRIB3</i>	6.80
<i>DOPEY2</i>	6.77
<i>APAF1</i>	6.72
<i>NCOA4</i>	6.71
<i>PSMB6</i>	6.68

[0282]

<i>COX20</i>	6.64
<i>PIK3CB</i>	6.63
<i>HAX1</i>	6.58
<i>KITLG</i>	6.58
<i>CNTD1</i>	6.54
<i>ETNK2</i>	6.47
<i>LRRC57</i>	6.47
<i>CDK2</i>	6.43
<i>GOLGA7</i>	6.42
<i>CCDC90B</i>	6.38
<i>GSTP1</i>	6.31
<i>PPP1R8</i>	6.28
<i>C7orf50</i>	6.28
<i>POLR2L</i>	6.25
<i>ITGB1</i>	6.24
<i>TYRP1</i>	6.18
<i>DNAJC3</i>	6.14
<i>THY1</i>	6.14
<i>GOSR2</i>	6.12
<i>FAM123B</i>	6.12
<i>HIGD1A</i>	6.10
<i>ELMOD3</i>	6.10
<i>NME5</i>	6.04
<i>TUSC2</i>	6.02
<i>C11orf10</i>	5.93
<i>SIPA1</i>	5.93
<i>JUP</i>	5.92
<i>NCKAP5</i>	5.90
<i>THYN1</i>	5.90
<i>RUNX1</i>	5.81
<i>FLJ46906</i>	5.80
<i>XLOC_004725</i>	5.77
<i>MGC57346</i>	5.74
<i>RTP4</i>	5.72
<i>PLD3</i>	5.70
<i>NYAP1</i>	5.69
<i>TLN2</i>	5.65
<i>XLOC_009577</i>	5.62
<i>FBLN5</i>	5.57
<i>LRFN5</i>	5.56
<i>CDH7</i>	5.56
<i>XLOC_003471</i>	5.54
<i>BRWD3</i>	5.53
<i>RAX2</i>	5.49
<i>MRPS16</i>	5.38
<i>CUL4A</i>	5.36
<i>EPHA5</i>	5.36
<i>SPTBN2</i>	5.34
<i>SMYD5</i>	5.31
<i>CDKN2AIP</i>	5.30
<i>ZNF829</i>	5.28
<i>OLFM2</i>	5.27
<i>PNMA6C</i>	5.24
<i>DNAJB11</i>	5.23
<i>NIPAL2</i>	5.20
<i>ZNF622</i>	5.19

[0283]

<i>STRADA</i>	5.18
<i>CEP57L1</i>	5.17
<i>SHISA6</i>	5.16
<i>CKAP2</i>	5.15
<i>IGFBP7</i>	5.14
<i>GRSF1</i>	5.14
<i>GRWD1</i>	5.13
<i>CD101</i>	5.13
<i>PLIN2</i>	5.08
<i>LOC100129361</i>	5.04
<i>PRKG1</i>	5.04
<i>SERF2</i>	5.04
<i>RUNX3</i>	5.04
<i>FAM91A1</i>	5.02
<i>ALDH3B1</i>	5.01
<i>CCDC96</i>	5.00
<i>NNMT</i>	4.98
<i>C11orf71</i>	4.98
<i>ZNF804A</i>	4.98
<i>DNAJA1</i>	4.94
<i>CHCHD1</i>	4.93
<i>SRPX</i>	4.91
<i>XLOC_007995</i>	4.89
<i>C11orf61</i>	4.87
<i>TNFAIP8</i>	4.86
<i>CSPG4</i>	4.86
<i>ALX3</i>	4.86
<i>SSR4P1</i>	4.85
<i>CES4A</i>	4.84
<i>IFI44</i>	4.84
<i>PLCD3</i>	4.84
<i>XLOC_009509</i>	4.83
<i>PPP2R5E</i>	4.82
<i>C19orf53</i>	4.81
<i>SPARCL1</i>	4.79
<i>UBE3B</i>	4.78
<i>HPGD</i>	4.77
<i>ADM2</i>	4.74
<i>TLR1</i>	4.73
<i>NYNRIN</i>	4.73
<i>PHF8</i>	4.73
<i>IL2RB</i>	4.72
<i>TEX9</i>	4.72
<i>IGFBP1</i>	4.71
<i>PLAC8L1</i>	4.69
<i>DHX34</i>	4.68
<i>TOPBP1</i>	4.67
<i>BCAP31</i>	4.67
<i>RHBDF2</i>	4.66
<i>TP53BP2</i>	4.65
<i>DIRAS2</i>	4.63
<i>DNMT1</i>	4.63
<i>TMEM9B</i>	4.63
<i>OSGIN1</i>	4.63
<i>SWI5</i>	4.63
<i>CILP</i>	4.61

[0284]

<i>GLTPD2</i>	4.60
<i>LSMD1</i>	4.58
<i>SAMD11</i>	4.58
<i>BCAR1</i>	4.58
<i>ENTHD1</i>	4.57
<i>PTTG1IP</i>	4.54
<i>PAFAH1B1</i>	4.53
<i>SERPINB1</i>	4.50
<i>BPI</i>	4.49
<i>GNL3</i>	4.48
<i>APOE</i>	4.48
<i>DR1</i>	4.47
<i>TUBGCP3</i>	4.47
<i>C11orf82</i>	4.47
<i>ANTXR1</i>	4.45
<i>DLG5</i>	4.44
<i>PLK1S1</i>	4.41
<i>EGLN2</i>	4.40
<i>GTF2A1</i>	4.40
<i>COL6A2</i>	4.40
<i>CAPZA1</i>	4.39
<i>PRR24</i>	4.38
<i>SMUG1</i>	4.36
<i>ZNF626</i>	4.36
<i>MAGED2</i>	4.36
<i>EHBP1</i>	4.35
<i>LAMA5</i>	4.35
<i>XLOC_008024</i>	4.34
<i>RPS10</i>	4.33
<i>THTPA</i>	4.33
<i>PHF2</i>	4.32
<i>CCDC71L</i>	4.31
<i>KLHL18</i>	4.30
<i>FAM49A</i>	4.29
<i>TIMP4</i>	4.29
<i>ANAPC10</i>	4.28
<i>C19orf29-AS1</i>	4.28
<i>SKIV2L2</i>	4.27
<i>C15orf52</i>	4.26
<i>ATP6AP2</i>	4.25
<i>FASTKD5</i>	4.25
<i>WDR45</i>	4.24
<i>AP2S1</i>	4.24
<i>HS2ST1</i>	4.23
<i>G6PC3</i>	4.21
<i>ANKRD44</i>	4.17
<i>GIT2</i>	4.16
<i>MIR22HG</i>	4.16
<i>SH3TC2</i>	4.15
<i>ALPK1</i>	4.15
<i>POLE</i>	4.14

[0285] 表3. 相比于源自hESC的NC (第11天), 在源自hESC的施旺细胞 (第100天) 中的前200个上调基因

[0286]

基因 ID	Log2 倍数变化
<i>TYRP1</i>	15.79
<i>CD44</i>	13.21
<i>ENTHD1</i>	11.71
<i>NT5E</i>	11.69
<i>HTR2B</i>	11.48
<i>NOV</i>	10.78
<i>IL8</i>	10.49
<i>SLC16A6</i>	10.35
<i>CDKN2A</i>	9.92
<i>GPNMB</i>	9.90
<i>HSPB7</i>	9.46
<i>EMP1</i>	9.29
<i>RIT2</i>	9.29
<i>PAEP</i>	9.16
<i>TYR</i>	8.99
<i>SYNC</i>	8.98
<i>XLOC_008700</i>	8.83
<i>NLRC5</i>	8.71
<i>FAIM3</i>	8.68
<i>RGS20</i>	8.64
<i>CBR3</i>	8.63
<i>TMEM173</i>	8.63
<i>GJA3</i>	8.59
<i>SAMD9</i>	8.33
<i>EVI2B</i>	8.30
<i>FBXO32</i>	8.26
<i>TSPYL5</i>	8.25
<i>TLR4</i>	8.09
<i>SERPINE1</i>	7.90
<i>HOXD-AS1</i>	7.88
<i>CITED1</i>	7.87
<i>KCNA5</i>	7.81
<i>ATP10A</i>	7.75
<i>OCA2</i>	7.75
<i>IRF4</i>	7.73
<i>MMP8</i>	7.71
<i>GAL</i>	7.70
<i>CD109</i>	7.68
<i>LGI3</i>	7.57
<i>LGALS3</i>	7.53
<i>TRIM63</i>	7.51
<i>XLOC_003498</i>	7.46
<i>LOC285000</i>	7.45
<i>KLHL38</i>	7.39
<i>HOXB2</i>	7.35
<i>PTHLH</i>	7.30
<i>MBP</i>	7.29
<i>CARD16</i>	7.27
<i>TFF3</i>	7.23
<i>IL13RA2</i>	7.22
<i>LINC00152</i>	7.21
<i>ISM1</i>	7.21
<i>MLPH</i>	7.16
<i>ECM1</i>	7.12
<i>CHSY3</i>	7.11

[0287]

<i>CXCL1</i>	7.08
<i>KLF2</i>	7.08
<i>ASB11</i>	7.07
<i>KRTAP19-1</i>	7.02
<i>C10orf90</i>	7.01
<i>ITGA3</i>	6.99
<i>LOC646329</i>	6.98
<i>THBD</i>	6.96
<i>FLJ43663</i>	6.95
<i>HR</i>	6.92
<i>C1orf127</i>	6.89
<i>NFIX</i>	6.88
<i>LY96</i>	6.85
<i>LOC100128252</i>	6.85
<i>TRIM47</i>	6.79
<i>XLOC_002736</i>	6.77
<i>COL8A1</i>	6.76
<i>RUNX3</i>	6.74
<i>ZNF229</i>	6.72
<i>C15orf52</i>	6.71
<i>CABLES1</i>	6.69
<i>FOSL1</i>	6.67
<i>RASGRP3</i>	6.64
<i>TBX18</i>	6.63
<i>SPON2</i>	6.58
<i>THBS2</i>	6.58
<i>LOC541471</i>	6.53
<i>AHRR</i>	6.52
<i>SGCD</i>	6.50
<i>ZNF502</i>	6.47
<i>CSPG4</i>	6.45
<i>BARX2</i>	6.44
<i>MYC</i>	6.44
<i>SLC7A4</i>	6.43
<i>MLIP</i>	6.43
<i>VGF</i>	6.42
<i>DHRS2</i>	6.41
<i>HOXD3</i>	6.41
<i>SYPL2</i>	6.39
<i>SGK1</i>	6.39
<i>MLANA</i>	6.39
<i>DUSP10</i>	6.35
<i>ITGB3</i>	6.35
<i>KCNJ13</i>	6.32
<i>ST8SIA6</i>	6.32
<i>MME</i>	6.32
<i>PLXNC1</i>	6.32
<i>SUSD5</i>	6.26
<i>DLX1</i>	6.26
<i>MMP1</i>	6.22
<i>ANO4</i>	6.21
<i>C19orf71</i>	6.20
<i>STK32A</i>	6.19
<i>CAVI</i>	6.16
<i>PSMB8</i>	6.12
<i>PLP2</i>	6.12

[0288]

<i>BCL2A1</i>	6.11
<i>HOXD4</i>	6.11
<i>LOC100507463</i>	6.10
<i>TFPI2</i>	6.07
<i>NFIB</i>	6.06
<i>TNFRSF14</i>	6.05
<i>ANKRD1</i>	6.03
<i>IFI16</i>	6.01
<i>DDIT4L</i>	6.01
<i>KCNQ5</i>	6.01
<i>NR4A3</i>	6.00
<i>IFIT2</i>	6.00
<i>XLOC 013026</i>	6.00
<i>SH2D4B</i>	5.99
<i>XLOC 001215</i>	5.98
<i>FAM129A</i>	5.96
<i>GREM1</i>	5.96
<i>HSPA6</i>	5.92
<i>TM4SF1</i>	5.92
<i>HOXB7</i>	5.92
<i>MET</i>	5.91
<i>MFSD12</i>	5.90
<i>IL6R</i>	5.89
<i>RUNX1</i>	5.86
<i>CATSPER1</i>	5.83
<i>FAM20C</i>	5.83
<i>GMPR</i>	5.82
<i>GOLGA7B</i>	5.80
<i>PHLDA2</i>	5.80
<i>MIR612</i>	5.77
<i>GALNTL6</i>	5.77
<i>MGAT5B</i>	5.76
<i>HSF4</i>	5.75
<i>SLC1A4</i>	5.74
<i>CD97</i>	5.74
<i>SLC24A5</i>	5.74
<i>XLOC 004803</i>	5.74
<i>LOC375010</i>	5.73
<i>COL12A1</i>	5.68
<i>PNPLA4</i>	5.66
<i>LOC100133445</i>	5.66
<i>TSPAN10</i>	5.64
<i>OSGIN1</i>	5.63
<i>GIPC3</i>	5.62
<i>CPNE7</i>	5.59
<i>OAS3</i>	5.59
<i>GRIN2B</i>	5.59
<i>CD300LB</i>	5.59
<i>KDR</i>	5.58
<i>UPP1</i>	5.58
<i>S100A6</i>	5.58
<i>SH3TC2</i>	5.55
<i>WFDC1</i>	5.54
<i>AQP9</i>	5.53
<i>XLOC 001738</i>	5.52
<i>XLOC 007040</i>	5.51

[0289]

<i>LYL1</i>	5.51
<i>SLC6A15</i>	5.49
<i>SYK</i>	5.49
<i>C7orf29</i>	5.46
<i>XLOC_009274</i>	5.45
<i>RIPK3</i>	5.45
<i>S100A4</i>	5.41
<i>NFATC2</i>	5.40
<i>CEBPE</i>	5.39
<i>GEM</i>	5.37
<i>MYOT</i>	5.37
<i>ABCG2</i>	5.37
<i>XLOC_007085</i>	5.35
<i>ERG</i>	5.33
<i>ARID5B</i>	5.32
<i>TRPV2</i>	5.31
<i>LPL</i>	5.31
<i>XLOC_008985</i>	5.31
<i>SERPINB2</i>	5.31
<i>IFI35</i>	5.27
<i>MIR221</i>	5.27
<i>S100A2</i>	5.27
<i>BMPRI1B</i>	5.25
<i>SP100</i>	5.24
<i>LOC400643</i>	5.24
<i>PDGFB</i>	5.24
<i>XLOC_001228</i>	5.20
<i>HRK</i>	5.20
<i>BHLHE41</i>	5.19
<i>LDHAL6B</i>	5.18
<i>GPR65</i>	5.17
<i>XLOC_006252</i>	5.16
<i>LGALS1</i>	5.13
<i>XLOC_008985</i>	5.31
<i>LGALS1</i>	5.13

[0290]

表4. 相比于源自hESC的NC (第11天), 人原代施旺细胞中前200个上调基因

[0291]

基因ID	log2 倍数变化
<i>KBTD6</i>	12.13
<i>FAHD2B</i>	11.98
<i>CTAGE5</i>	11.64
<i>C19orf45</i>	11.30
<i>XLOC_003345</i>	10.85
<i>WDR90</i>	10.83
<i>B3GALT1</i>	10.55
<i>PAX9</i>	9.77
<i>GMPPB</i>	9.65
<i>HSPE1</i>	9.64
<i>XLOC_008617</i>	9.53
<i>TRIM3</i>	9.32
<i>SPINT2</i>	9.08
<i>PLP2</i>	9.05

[0292]

<i>ADAMTS20</i>	8.91
<i>CD8A</i>	8.84
<i>COX20</i>	8.84
<i>UNC5CL</i>	8.75
<i>DIRAS2</i>	8.45
<i>THBS2</i>	8.41
<i>RIMS3</i>	8.20
<i>ZNF273</i>	8.20
<i>GCLM</i>	8.20
<i>CLDN3</i>	8.16
<i>CCDC167</i>	8.15
<i>RAP2A</i>	8.10
<i>NCSI</i>	8.10
<i>TXNDC15</i>	8.08
<i>DSN1</i>	8.01
<i>ZNF224</i>	7.97
<i>NYAP1</i>	7.96
<i>SIPA1</i>	7.90
<i>XLOC_009279</i>	7.88
<i>JAK1</i>	7.83
<i>NDUFA12</i>	7.73
<i>XLOC_009509</i>	7.70
<i>EFNB3</i>	7.69
<i>SHISA6</i>	7.66
<i>XLOC_000734</i>	7.45
<i>APAF1</i>	7.45
<i>HAX1</i>	7.42
<i>PTRH2</i>	7.41
<i>TLN2</i>	7.40
<i>KLF12</i>	7.38
<i>STT3B</i>	7.33
<i>MESP2</i>	7.31
<i>RASGRP3</i>	7.25
<i>ZNF559</i>	7.25
<i>PRR11</i>	7.24
<i>FAM123B</i>	7.22
<i>MBD1</i>	7.18
<i>CNTN2</i>	7.18
<i>LRFN5</i>	7.16
<i>WBP4</i>	7.12
<i>CLCN5</i>	7.08
<i>ABL1</i>	7.05
<i>ORC6</i>	7.04
<i>CCL27</i>	7.02
<i>KAT7</i>	6.96
<i>KITLG</i>	6.95
<i>MIR4746</i>	6.92
<i>ARHGEF38</i>	6.92
<i>CCDC90B</i>	6.90
<i>MIR3176</i>	6.89
<i>PPP1R8</i>	6.88
<i>MCMBP</i>	6.84
<i>FAM199X</i>	6.81
<i>TRIB3</i>	6.78
<i>GNL3</i>	6.77
<i>BRWD3</i>	6.77

[0293]

<i>IRX2</i>	6.76
<i>SPTBN2</i>	6.75
<i>CTTNBP2</i>	6.74
<i>KIAA1609</i>	6.74
<i>ZC3H12B</i>	6.72
<i>TEX9</i>	6.70
<i>THYN1</i>	6.68
<i>DCC</i>	6.66
<i>UG0898H09</i>	6.64
<i>STARD3</i>	6.61
<i>ZNF804A</i>	6.61
<i>C11orf71</i>	6.60
<i>ITGB1</i>	6.57
<i>FLNB</i>	6.54
<i>NCOA4</i>	6.53
<i>INMT</i>	6.51
<i>CBY3</i>	6.51
<i>TAGLN3</i>	6.50
<i>ST6GALNAC3</i>	6.48
<i>POLR2L</i>	6.47
<i>XLOC_007995</i>	6.43
<i>MAGEE1</i>	6.40
<i>LOC400604</i>	6.39
<i>GOSR2</i>	6.39
<i>LOC285889</i>	6.39
<i>MGC57346</i>	6.37
<i>TIMP4</i>	6.27
<i>CNKSR1</i>	6.26
<i>GOLGA7</i>	6.26
<i>GLTPD2</i>	6.24
<i>XLOC_009224</i>	6.23
<i>PSMB6</i>	6.22
<i>RTDR1</i>	6.18
<i>MTL5</i>	6.17
<i>IGLON5</i>	6.17
<i>HIGD1A</i>	6.16
<i>PBK</i>	6.15
<i>SPATA5L1</i>	6.14
<i>XLOC_014081</i>	6.14
<i>CUL4A</i>	6.13
<i>MCM5</i>	6.10
<i>SMYD5</i>	6.10
<i>LIN28A</i>	6.06
<i>ANTXR2</i>	6.04
<i>LRRC57</i>	6.03
<i>RUNX1</i>	6.02
<i>XLOC_006828</i>	6.01
<i>FAM66C</i>	5.99
<i>RAX2</i>	5.99
<i>ERMN</i>	5.98
<i>RLBP1</i>	5.95
<i>TP73</i>	5.93
<i>PPOX</i>	5.88
<i>BRD9</i>	5.88
<i>TTC40</i>	5.87
<i>BCL7A</i>	5.83

[0294]

<i>PAEP</i>	5.83
<i>SWI5</i>	5.81
<i>SPTBN4</i>	5.80
<i>DNAJC3</i>	5.79
<i>MACROD2</i>	5.79
<i>FBLN5</i>	5.78
<i>ALX3</i>	5.78
<i>LAMA5</i>	5.77
<i>RBM28</i>	5.77
<i>GRWD1</i>	5.74
<i>XLOC_012069</i>	5.71
<i>LOC339874</i>	5.70
<i>AGAP8</i>	5.70
<i>NIPAL2</i>	5.70
<i>NNMT</i>	5.69
<i>EPHA5</i>	5.67
<i>CNTNAP3B</i>	5.67
<i>XLOC_010236</i>	5.64
<i>EHBP1</i>	5.64
<i>PLAC8L1</i>	5.64
<i>GPR162</i>	5.63
<i>MYEF2</i>	5.63
<i>CAPZA1</i>	5.60
<i>DIRC3</i>	5.60
<i>RHBDF2</i>	5.59
<i>ZNF610</i>	5.59
<i>XLOC_011568</i>	5.58
<i>GRHL3</i>	5.58
<i>SETDB2</i>	5.56
<i>UBE3B</i>	5.55
<i>CD97</i>	5.54
<i>XLOC_012905</i>	5.54
<i>XLOC_011507</i>	5.54
<i>MOB3B</i>	5.53
<i>NRARP</i>	5.53
<i>SRPX</i>	5.51
<i>LOC100506314</i>	5.51
<i>ZNF497</i>	5.50
<i>CALM2</i>	5.49
<i>XLOC_003249</i>	5.49
<i>PCSK9</i>	5.48
<i>CSPG4</i>	5.48
<i>XLOC_013922</i>	5.47
<i>C12orf76</i>	5.45
<i>CTAGE10P</i>	5.45
<i>ZNF622</i>	5.44
<i>XLOC_012288</i>	5.44
<i>LSMD1</i>	5.41
<i>XLOC_003726</i>	5.39
<i>ATRNL1</i>	5.37
<i>XLOC_007094</i>	5.37
<i>LOC100287036</i>	5.34
<i>ELMOD3</i>	5.34
<i>PLCD3</i>	5.34
<i>THY1</i>	5.33
<i>KCNH8</i>	5.33

[0295]	<i>XLOC 003433</i>	5.33
	<i>XLOC 011075</i>	5.33
	<i>MYEF2</i>	5.63
	<i>C15orf52</i>	5.33
	<i>ROBO2</i>	5.31
	<i>SDK1</i>	5.31
	<i>TSNARE1</i>	5.31
	<i>MTRR</i>	5.30
	<i>SDR9C7</i>	5.29
	<i>GSTM3</i>	5.29
	<i>ZNF829</i>	5.29
	<i>IFI44</i>	5.28
	<i>IRAK3</i>	5.28
	<i>CHCHD1</i>	5.27
	<i>LOC100506801</i>	5.27
	<i>COG1</i>	5.25
	<i>TMEM200C</i>	5.25
	<i>TBRG1</i>	5.24
	<i>PPFIA1</i>	5.23

[0296] 表5. 一抗和工作稀释液的列表

[0297]

抗体	来源	稀释
CD49D	Biologend	1:800
TUJ1	Covance	1:1000
CHAT	Millipore	1:1000
GFAP	Dako	1:1000
S100B	Dako	1:200
MBP	Millipore	1:200
MAG	Millipore	1:200
NFH	Encore	1:1000
PanNa	Joel Black	1:1000
Kv1.2	Joel Black	1:200
CASPR	Joel Black	1:1000
SC101	STEM Cell Tech	1:1000
抗体	来源	稀释

[0298] 7. 参考文献

[0299] Akbarzadeh, A., Norouzzian, D., Mehrabi, M.R., Jamshidi, S., Farhangi, A., Verdi, A.A., Mofidian, S.M.A., and Rad, B.L. (2007). Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian J. Clin. Biochem.* 22, 60-64.

[0300] Arthur-Farraj, P.J., Latouche, M., Wilton, D.K., Quintes, S., Chabrol, E., Banerjee, A., Woodhoo, A., Jenkins, B., Rahman, M., Turmaine, M., et al. (2012). c-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration. *Neuron* 75, 633-647.

[0301] Adameyko, I., Lallemand, F., Aquino, J.B., Pereira, J.A., Topilko, P., Muller, T., Fritz, N., Beljajeva, A., Mochii, M., Liste, I., et al. (2009). Schwann cell

precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell* 139,366-379.

[0302] Arterburn,D.,Sofer,T.,Boudreau,D.M.,Bogart,A.,Westbrook,E.O.,Theis,M.K.,Simon,G.,and Haneuse,S.(2016).Long-Term Weight Change after Initiating Second-Generation Antidepressants.*Journal of clinical medicine* 5.

[0303] Bajpai,R.,Chen,D.A.,Rada-Iglesias,A.,Zhang,J.,Xiong,Y.,Helms,J.,Chang,C.P.,Zhao,Y.,Swigut,T.,and Wysocka,J.(2010).CHD7 cooperates with PBAF to control multipotent neural crest formation.*Nature* 463,958-962.

[0304] Barreto-Chang,O.L.,and Dolmetsch,R.E.(2009).Calcium imaging of cortical neurons using Fura-2 AM.*Journal of visualized experiments:JoVE*.

[0305] Bunge,R.P.(1994).The role of the Schwann cell in trophic support and regeneration.*J.Neurol.*242,S19-21.

[0306] Cai,S.,Han,L.,Ao,Q.,Chan,Y.-S.,and Shum,D.K.-Y.(2016).Human Induced Pluripotent Cell-Derived Sensory Neurons for Fate Commitment of Bone Marrow-Derived Schwann Cells:Implications for Remyelination Therapy.*Stem Cells Transl.Med.sctm.*2015-0424.

[0307] Calder,E.L.,Tchieu,J.,Steinbeck,J.A.,Tu,E.,Keros,S.,Ying,S.-W.,Jaiswal,M.K.,Cornacchia,D.,Goldstein,P.A.,Tabar,V.,et al.(2015).Retinoic Acid-Mediated Regulation of GLI3 Enables Efficient Motoneuron Derivation from Human ESCs in the Absence of Extrinsic SHH Activation.*J.Neurosci.Off.J.Soc.Neurosci.*35,11462-11481.

[0308] Callaghan,B.C.,Cheng,H.T.,Stables,C.L.,Smith,A.L.,and Feldman,E.L.(2012).Diabetic neuropathy:clinical manifestations and current treatments.*Lancet Neurol.*11,521-534.

[0309] Chambers,S.M.,Fasano,C.A.,Papapetrou,E.P.,Tomishima,M.,Sadelain,M.,and Studer,L.(2009).Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling.*Nat.Biotechnol.*27,275-280.

[0310] Chambers,S.M.,Qi,Y.,Mica,Y.,Lee,G.,Zhang,X.-J.,Niu,L.,Bilsland,J.,Cao,L.,Stevens,E.,Whiting,P.,et al.(2012).Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors.*Nat.Biotechnol.*30,715-720.

[0311] Eckersley,L.(2002).Role of the Schwann cell in diabetic neuropathy.*Int.Rev.Neurobiol.*50,293-321.

[0312] Espinosa-Medina,I.,Outin,E.,Picard,C.A.,Chettouh,Z.,Dymecki,S.,Consalez,G.G.,Coppola,E.,and Brunet,J.F.(2014).Neurodevelopment.Parasympathetic ganglia derive from Schwann cell precursors.*Science (New York, NY)* 345,87-90.

[0313] Fattahi,F.,Steinbeck,J.A.,Kriks,S.,Tchieu,J.,Zimmer,B.,Kishinevsky,S.,Zeltner,N.,Mica,Y.,El-Nachef,W.,Zhao,H.,et al.(2016).Deriving human ENS

lineages for cell therapy and drug discovery in Hirschsprung disease. *Nature* 531,105-109.

[0314] Finzsch,M.,Schreiner,S.,Kichko,T.,Reeh,P.,Tamm,E.R.,Bosl,M.R.,Meijer,D.,and Wegner,M.(2010).Sox10 is required for Schwann cell identity and progression beyond the immature Schwann cell stage.*The Journal of cell biology* 189,701-712.

[0315] Gordoio,A.,Scuffham,P.,Shearer,A.,Oglesby,A.,and Tobian,J.A.(2003).The health care costs of diabetic peripheral neuropathy in the US.*Diabetes care* 26,1790-1795.

[0316] Grewal,A.S.,Bhardwaj,S.,Pandita,D.,Lather,V.,and Sekhon,B.S.(2016).Updates on Aldose Reductase Inhibitors for Management of Diabetic Complications and Non-diabetic Diseases.*Mini Rev.Med.Chem.*16,120-162.

[0317] Guest,J.,Santamaria,A.J.,and Benavides,F.D.(2013).Clinical translation of autologous Schwann cell transplantation for the treatment of spinal cord injury.*Curr.Opin.Organ Transplant*.18,682-689.

[0318] Jessen,K.R.,and Mirsky,R.(2016).The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves.*J.Physiol.*594,3521-3531.

[0319] Jessen,K.R.,Mirsky,R.,and Lloyd,A.C.(2015).Schwann Cells:Development and Role in Nerve Repair.*Cold Spring Harb.Perspect.Biol.*7,a020487.

[0320] Kocsis,J.D.,and Bunge,M.B.(2014).Transplantation of Schwann cells and olfactory ensheathing cells as a therapeutic strategy in spinal cord injury.In *Textbook of Neural Repair and Rehabilitation*:,M.Selzer,S.Clark,L.Cohen,G.Kwakkel,and R.Miller,eds.(Cambridge:Cambridge University Press).

[0321] Kocsis,J.D.,and Waxman,S.G.(2007).Schwann cells and their precursors for repair of central nervous system myelin.*Brain* 130,1978-1980.

[0322] La Fontaine,J.,Bhavan,K.,Talal,T.K.,and Lavery,L.A.(2014).Current concepts in the surgical management of acute diabetic foot infections.*Foot Edinb.Scotl.*24,123-127.

[0323] Lavdas,A.A.,Papastefanaki,F.,Thomaidou,D.,and Matsas,R.(2008).Schwann cell transplantation for CNS repair.*Curr.Med.Chem.*15,151-160.

[0324] Lee,G.,Kim,H.,Elkabetz,Y.,Al Shamy,G.,Panagiotakos,G.,Barberi,T.,Tabar,V.,and Studer,L.(2007).Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells.*Nat.Biotechnol.*25,1468-1475.

[0325] Li,R.,Liu Huawei,null,Yan,R.,and Hu,M.(2015).[RESEARCH ADVANCE OF DIFFERENTIATION OF INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS INTO Schwann CELLS IN VITRO].*Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi Chin.J.Reparative Reconstr.Surg.*29,1560-1563.

[0326] Liu,Q.,Spusta,S.C.,Mi,R.,Lassiter,R.N.,Stark,M.R.,Hoke,A.,Rao,M.S.,

and Zeng,X.(2012).Human neural crest stem cells derived from human ESCs and induced pluripotent stem cells:induction,maintenance,and differentiation into functional schwann cells.Stem cells translational medicine 1,266-278.

[0327] Lupski,J.R.(1998).Charcot-Marie-Tooth disease:lessons in genetic mechanisms.Mol.Med.4,3-11.

[0328] Maekawa,K.,Tanimoto,T.,Okada,S.,Suzuki,T.,Suzuki,T.,and Yabe-Nishimura,C.(2001).Expression of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase genes in Schwann cells isolated from rat:effects of high glucose and osmotic stress.Brain Res.Mol.Brain Res.87,251-256.

[0329] Menendez,L.,Yatskievych,T.A.,Antin,P.B.,and Dalton,S.(2011).Wnt signaling and a Smad pathway blockade direct the differentiation of human pluripotent stem cells to multipotent neural crest cells.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108,19240-19245.

[0330] Martyn,C.N.,and Hughes,R.A.(1997).Epidemiology of peripheral neuropathy.J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry 62,310-318.

[0331] Master,Z.,McLeod,M.,and Mendez,I.(2007).Benefits,risks and ethical considerations in translation of stem cell research to clinical applications in Parkinson's disease.J.Med.Ethics 33,169-173.

[0332] Mica,Y.,Lee,G.,Chambers,S.M.,Tomishima,M.J.,and Studer,L.(2013).Modeling neural crest induction,melanocyte specification,and disease-related pigmentation defects in hESCs and patient-specific iPSCs.Cell Rep.3,1140-1152.

[0333] Mizisin,A.P.(2014).Mechanisms of diabetic neuropathy:Schwann cells.Handb.Clin.Neurol.126,401-428.

[0334] Mizisin,A.P.,and Powell,H.C.(1993).Schwann cell injury is attenuated by aldose reductase inhibition in galactose intoxication.J.Neuropathol.Exp.Neurol.52,78-86.

[0335] Newbern,J.,and Birchmeier,C.(2010).Nrg1/ErbB signaling networks in Schwann cell development and myelination.Seminars in cell&developmental biology 21,922-928.

[0336] Oates,P.J.(2002).Polyol pathway and diabetic peripheral neuropathy.Int.Rev.Neurobiol.50,325-392.

[0337] Rodrigues,M.C.,Rodrigues,A.A.,Jr.,Glover,L.E.,Voltarelli,J.,and Borlongan,C.V.(2012).Peripheral nerve repair with cultured schwann cells: getting closer to the clinics.The Scientific World Journal 2012,413091.

[0338] Pareyson,D.(1999).Charcot-marie-tooth disease and related neuropathies:molecular basis for distinction and diagnosis.Muscle Nerve 22, 1498-1509.

[0339] Quasthoff,S.,and Hartung,H.P.Chemotherapy-induced peripheral

neuropathy. J. Neurol. 249, 9-17.

[0340] Rodrigues, M.C.O., Rodrigues, A.A., Glover, L.E., Voltarelli, J., and Borlongan, C.V. (2012). Peripheral Nerve Repair with Cultured Schwann Cells: Getting Closer to the Clinics. Sci. World J. 2012, e413091.

[0341] Semenchuk, M.R., Sherman, S., and Davis, B. (2001). Double-blind, randomized trial of bupropion SR for the treatment of neuropathic pain. Neurology 57, 1583-1588.

[0342] Simmons, Z., and Feldman, E.L. (2002). Update on diabetic neuropathy. Current opinion in neurology 15, 595-603.

[0343] Studer, L., Vera, E., and Cornacchia, D. (2015). Programming and Reprogramming Cellular Age in the Era of Induced Pluripotency. Cell stem cell 16, 591-600.

[0344] Tang, X., Zhou, L., Wagner, A.M., Marchetto, M.C.N., Muotri, A.R., Gage, F.H., and Chen, G. (2013). Astroglial cells regulate the developmental timeline of human neurons differentiated from induced pluripotent stem cells. Stem Cell Res. 11, 743-757.

[0345] Thompson, S.W., Davis, L.E., Kornfeld, M., Hilgers, R.D., and Standefer, J.C. (1984). Cisplatin neuropathy. Clinical, electrophysiologic, morphologic, and toxicologic studies. Cancer 54, 1269-1275.

[0346] Van Heyningen, R. (1959). Formation of Polyols by the Lens of the Rat with "Sugar" Cataract. Nature 184, 194-195.

[0347] Webber, C.A., Christie, K.J., Cheng, C., Martinez, J.A., Singh, B., Singh, V., Thomas, D., and Zochodne, D.W. (2011). Schwann cells direct peripheral nerve regeneration through the Netrin-1 receptors, DCC and Unc5H2. Glia 59, 1503-1517.

[0348] Williams, R.R., and Bunge, M.B. (2012). Schwann cell transplantation: a repair strategy for spinal cord injury? Prog. Brain Res. 201, 295-312.

[0349] Wu, K.K., and Huan, Y. (2001). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. In Current Protocols in Pharmacology, (John Wiley & Sons, Inc.), p.

[0350] Zochodne, D.W. (2007). Diabetes mellitus and the peripheral nervous system: manifestations and mechanisms. Muscle Nerve 36, 144-166.

[0351] Ziegler, L., Grigoryan, S., Yang, I.H., Thakor, N.V., and Goldstein, R.S. (2011). Efficient generation of schwann cells from human embryonic stem cell-derived neurospheres. Stem cell reviews 7, 394-403.

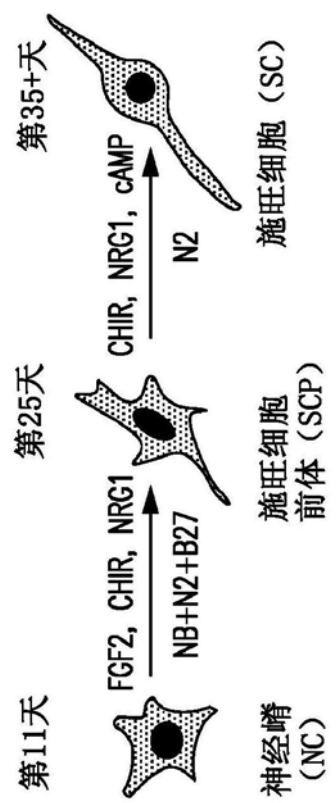


图1A

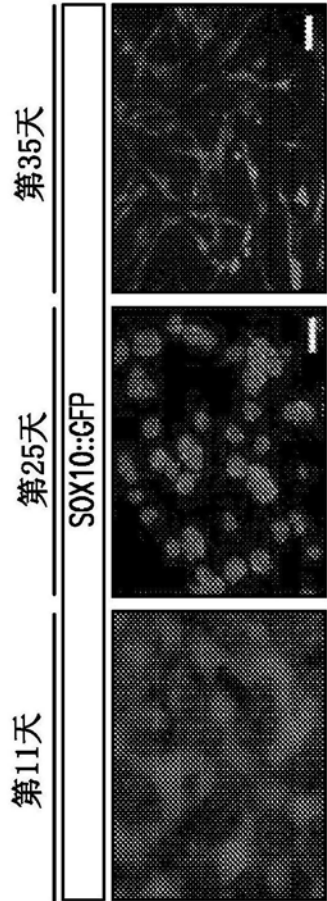


图1B

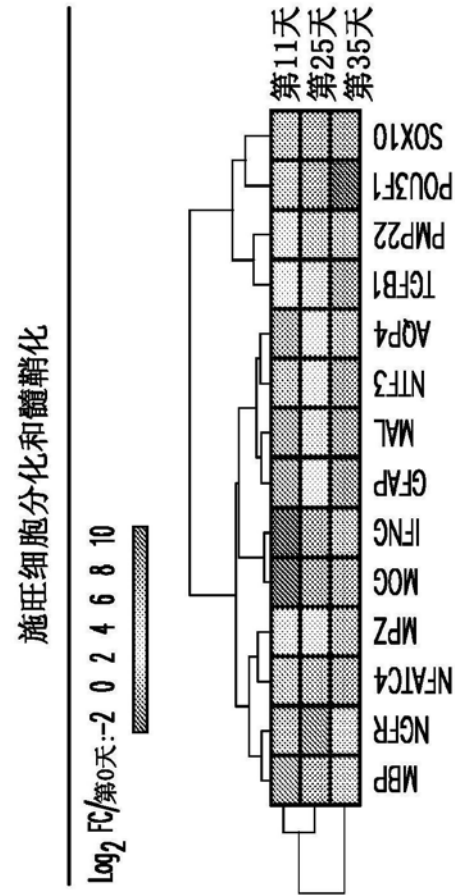


图1C

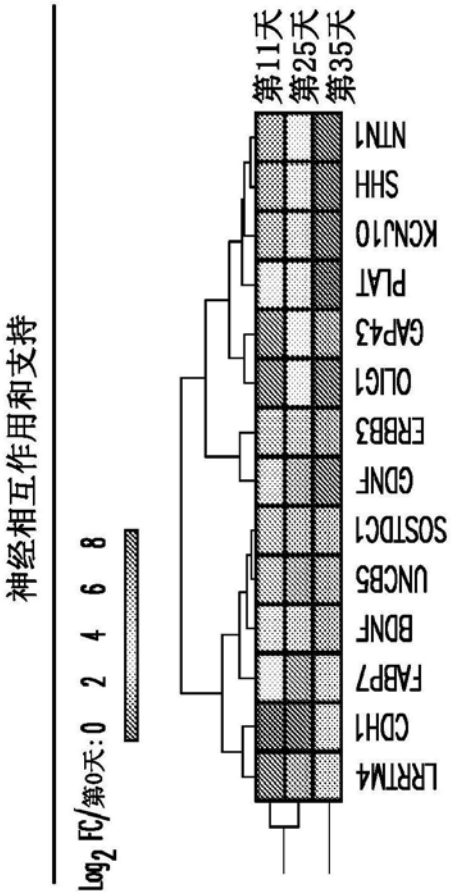


图1D

第60天施旺细胞

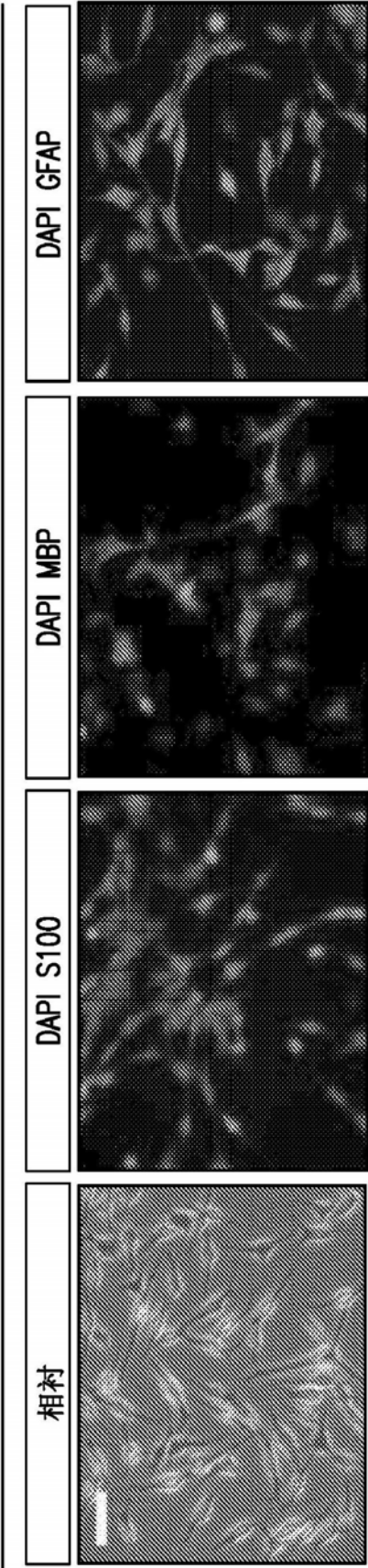


图1E

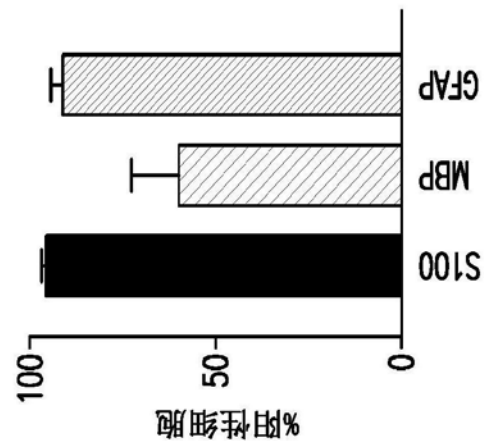


图1F

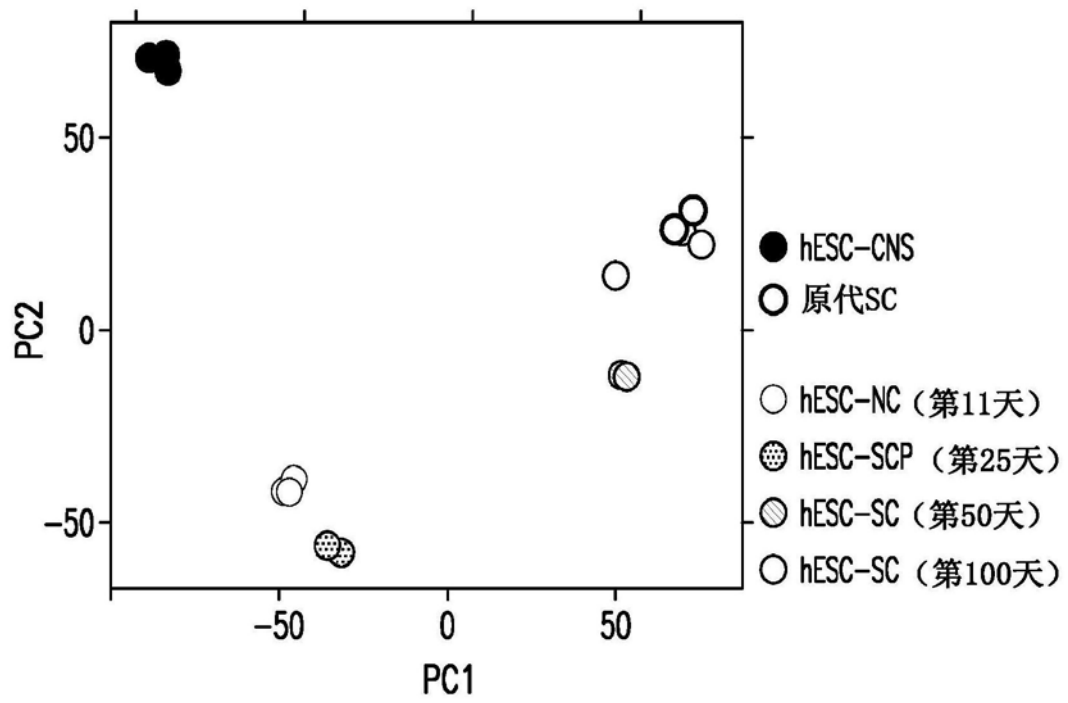


图1G

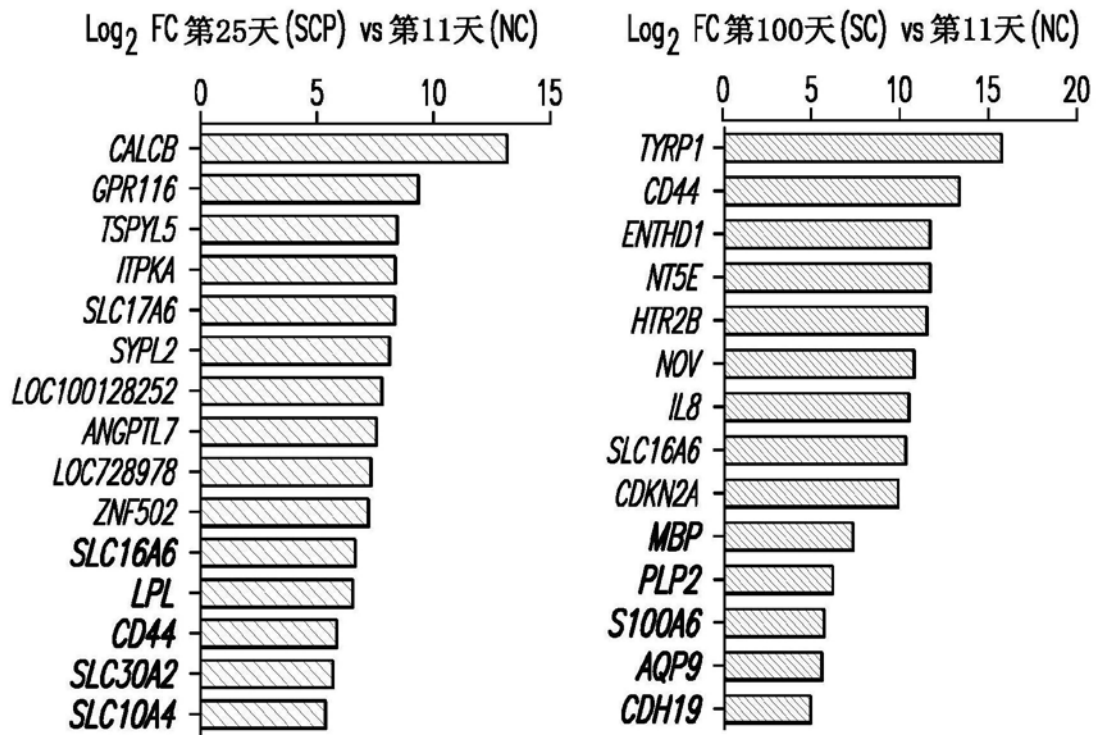


图1H

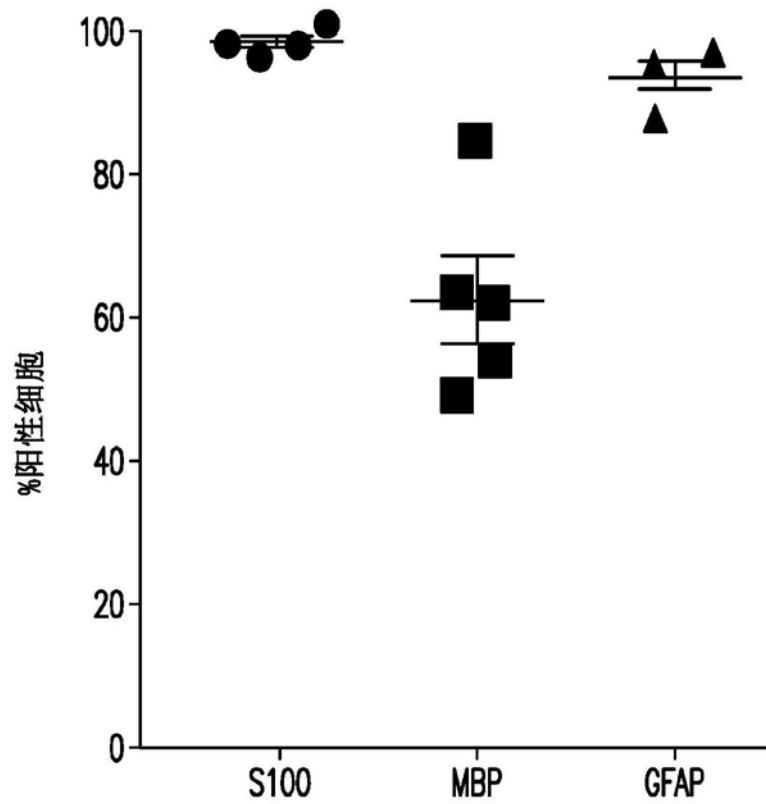


图1I

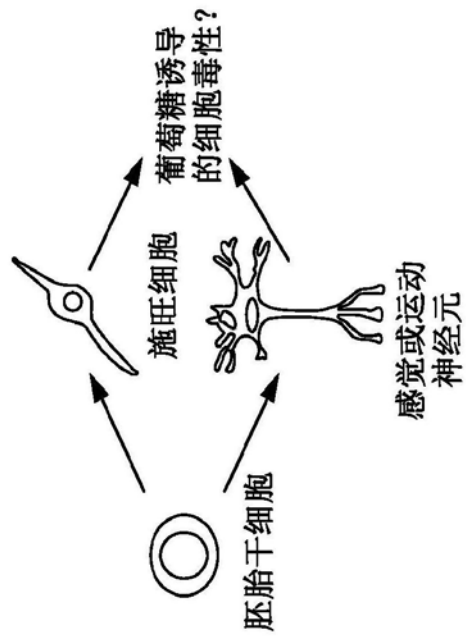


图2A

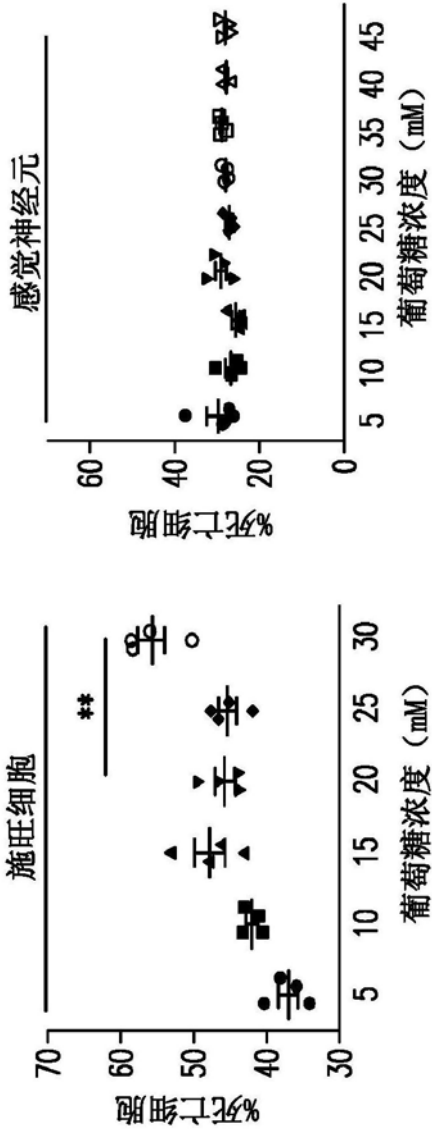


图2B

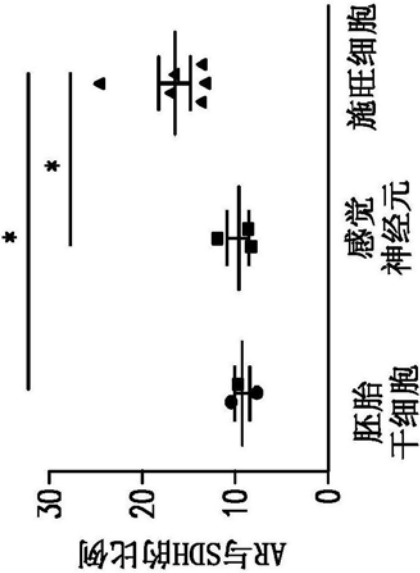


图2C

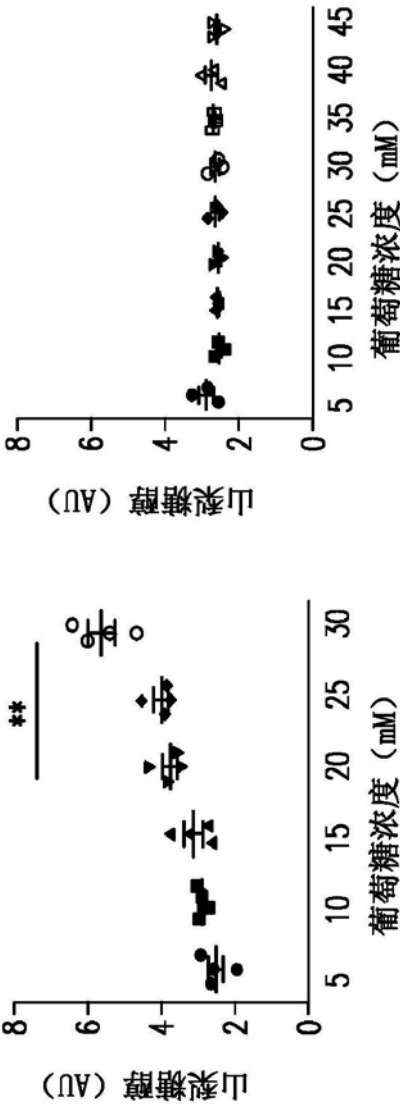


图2D

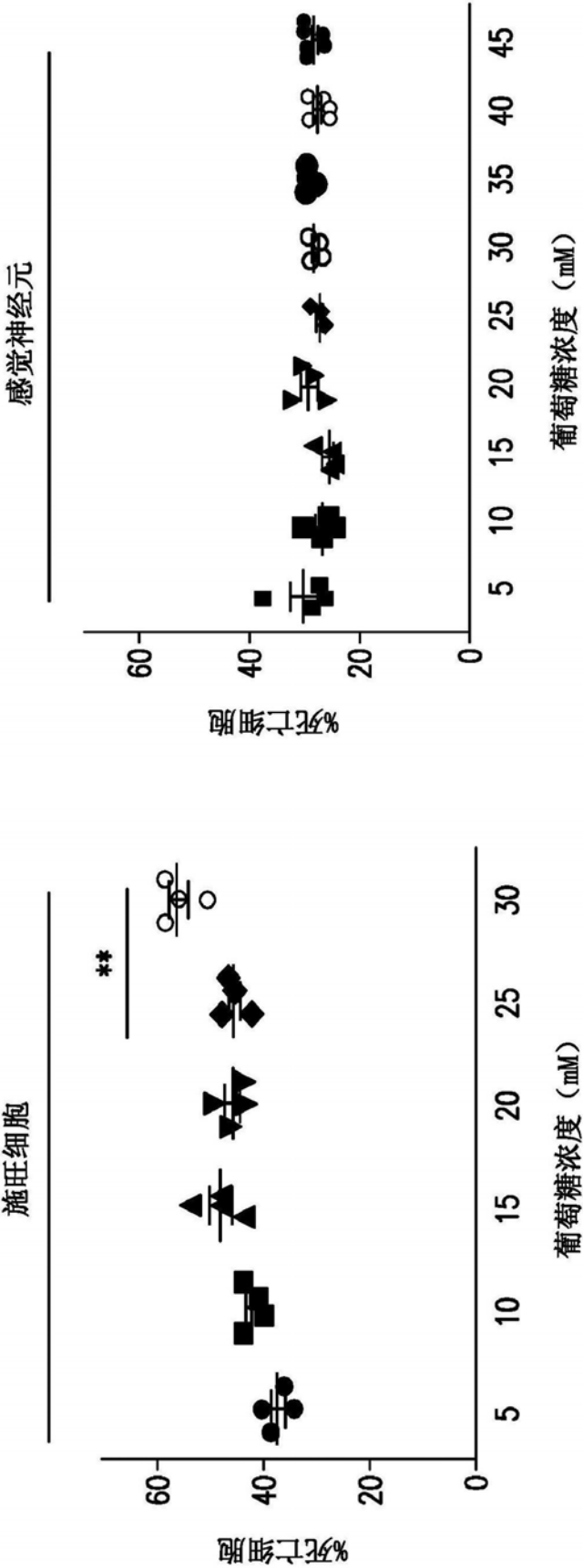


图2E

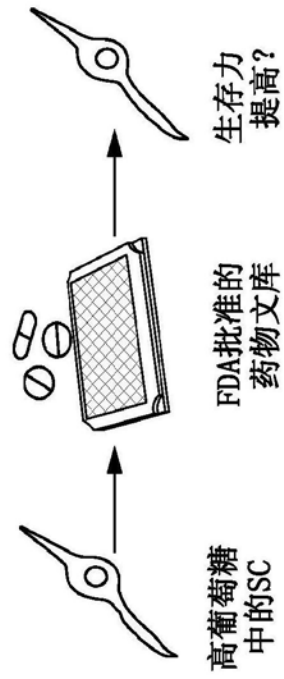


图3A

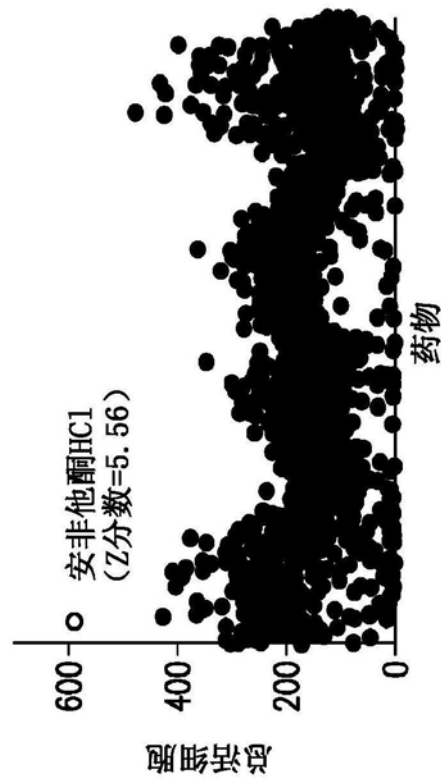


图3B

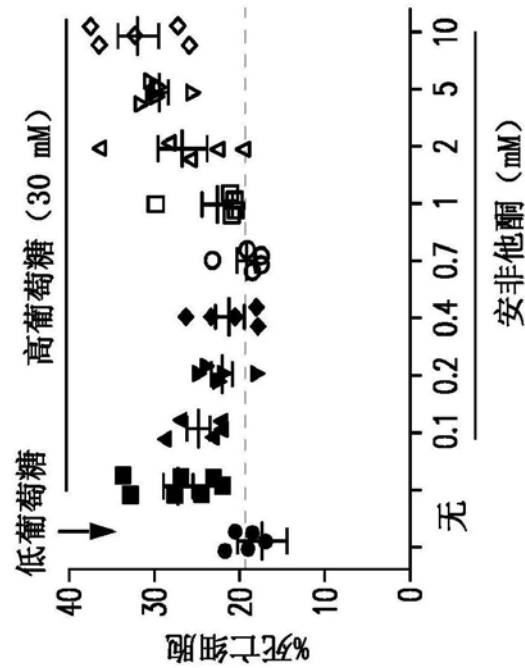


图3C

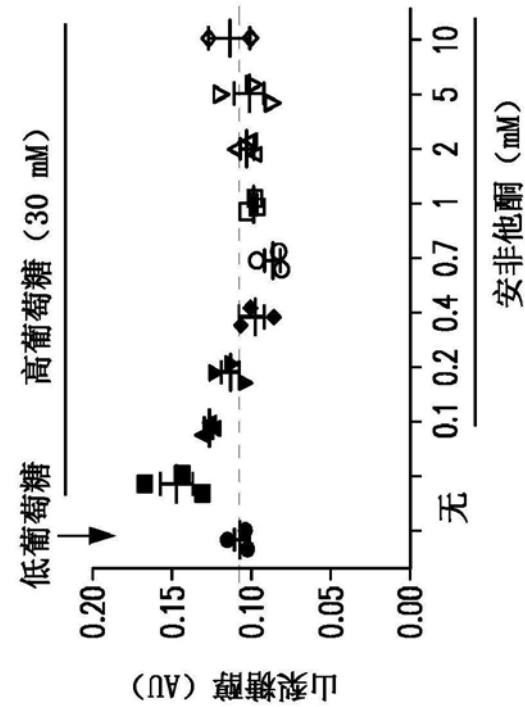


图3D

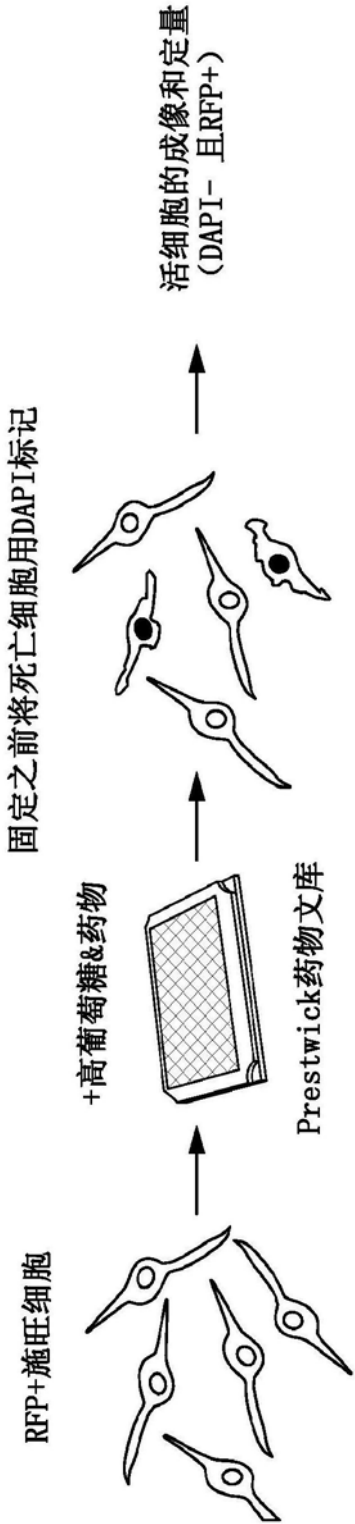


图3E

化合物	总活细胞	Z-分数
盐酸安非他酮	583	5.561673904
环戊噻嗪	478	4.165937472
卡托普利	428	3.501301075
伊拉地平	425	3.461422891
易混翠雀花碱	423	3.434837435
尼美舒利	409	3.248739244
甲苯磺丁脲	405	3.195568333
曲安奈德	393	3.036055597

图3F

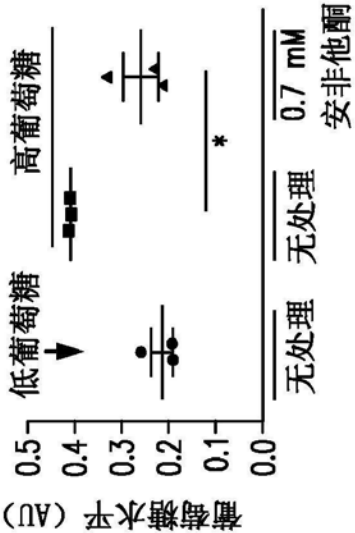


图4A

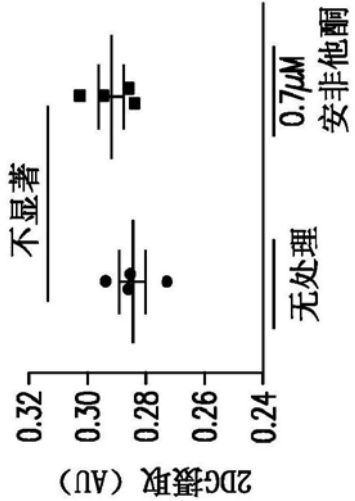


图4B

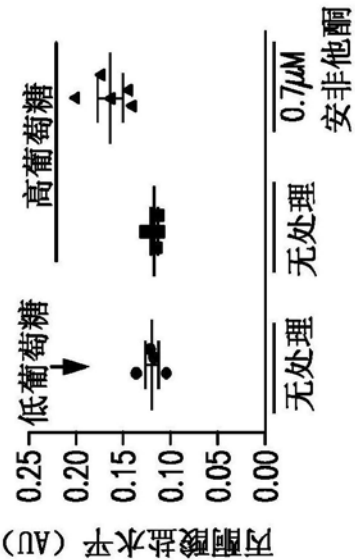


图4C

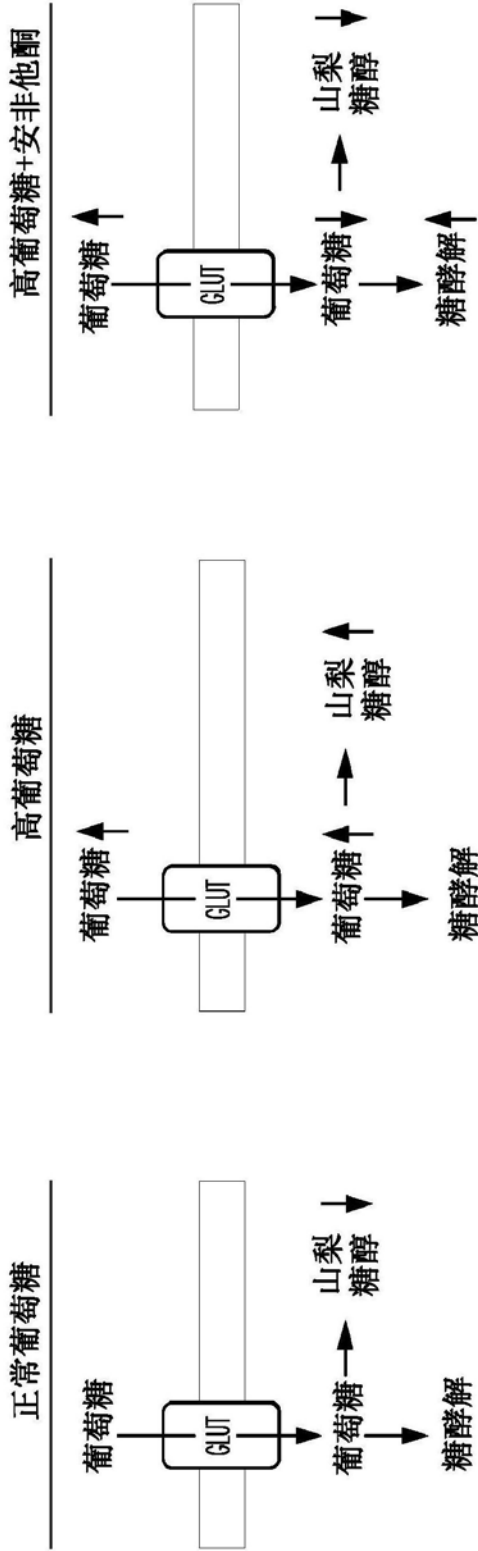


图4D



图5A

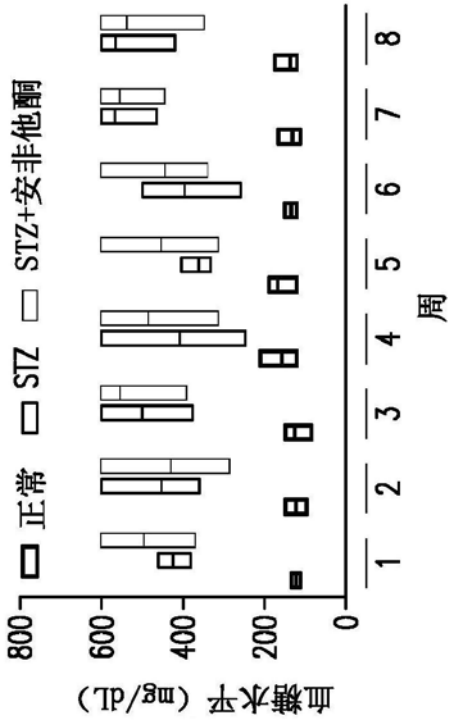


图5B

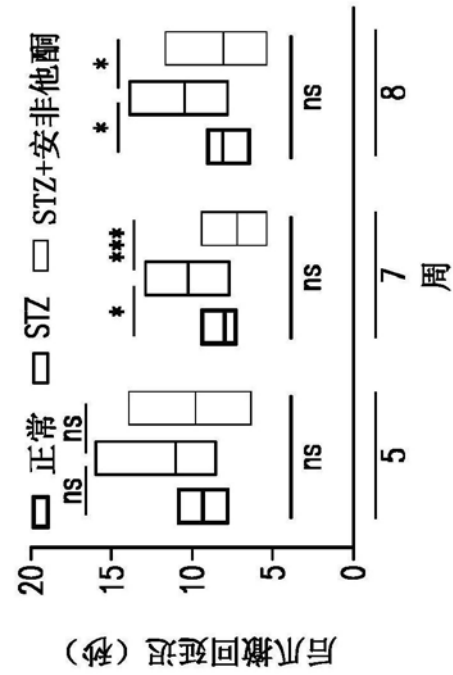


图5C

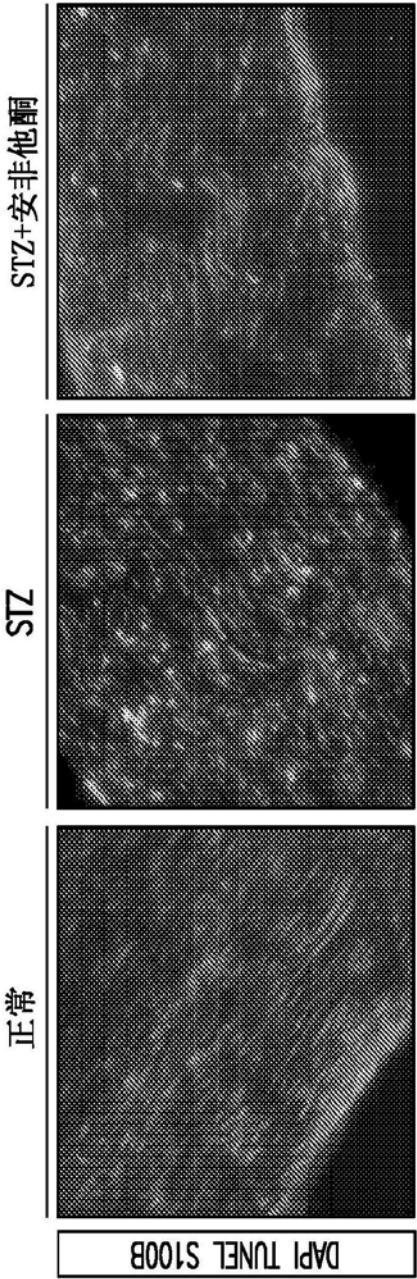


图5D

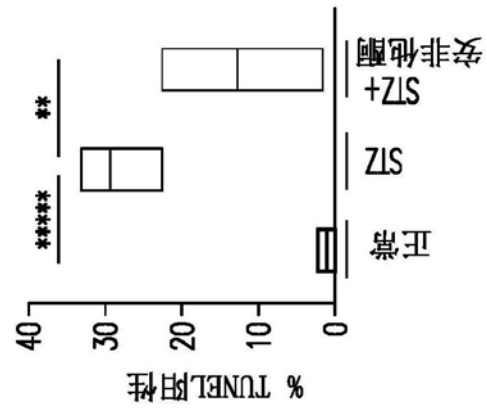


图5E

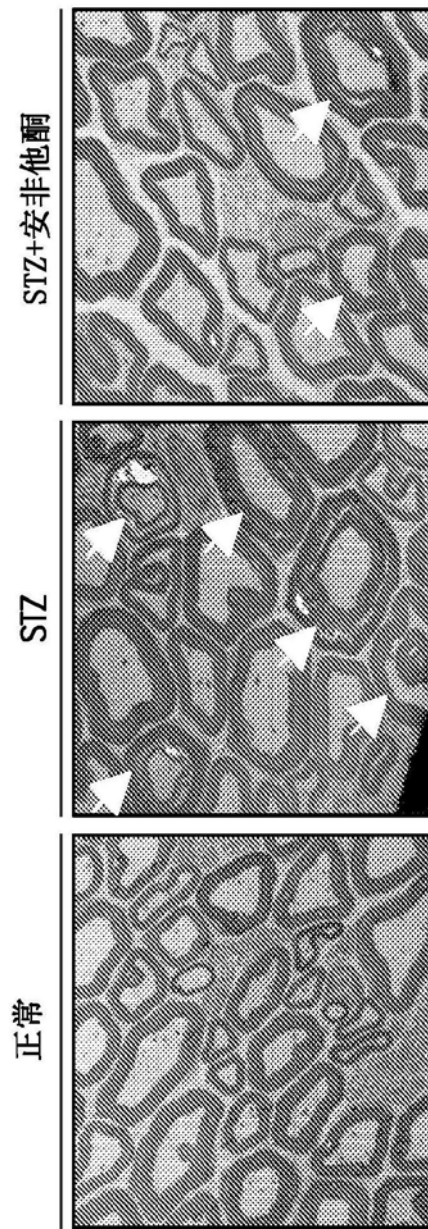


图5F

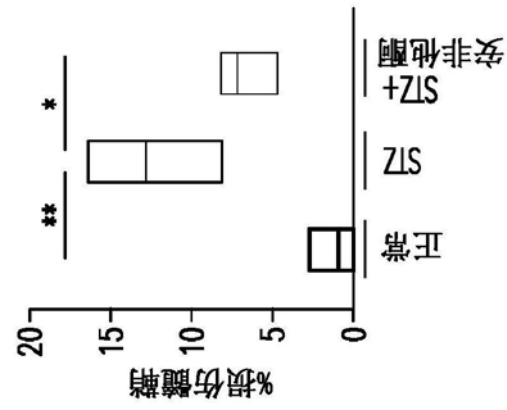


图5G

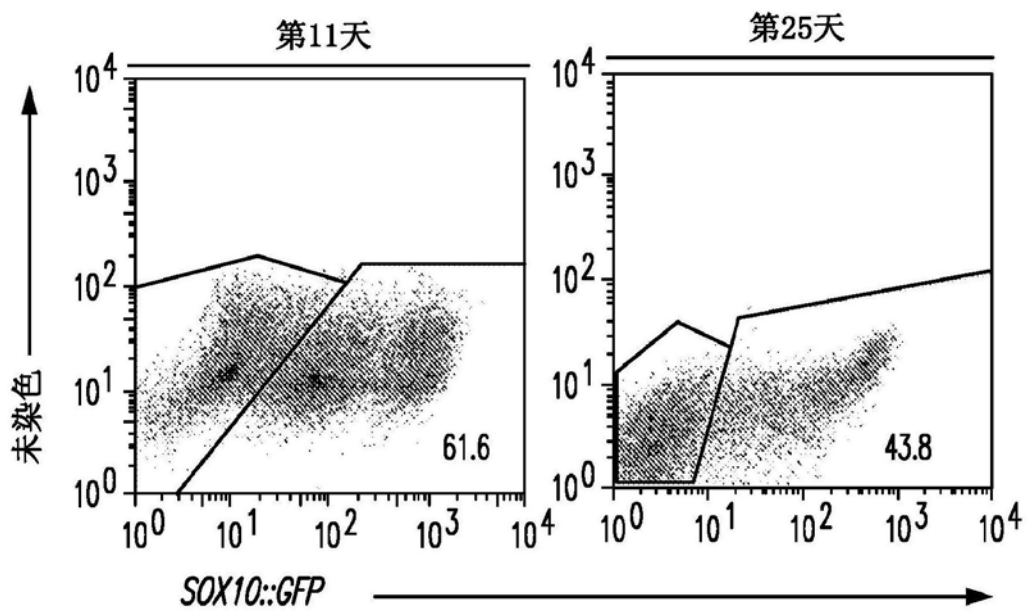


图6A

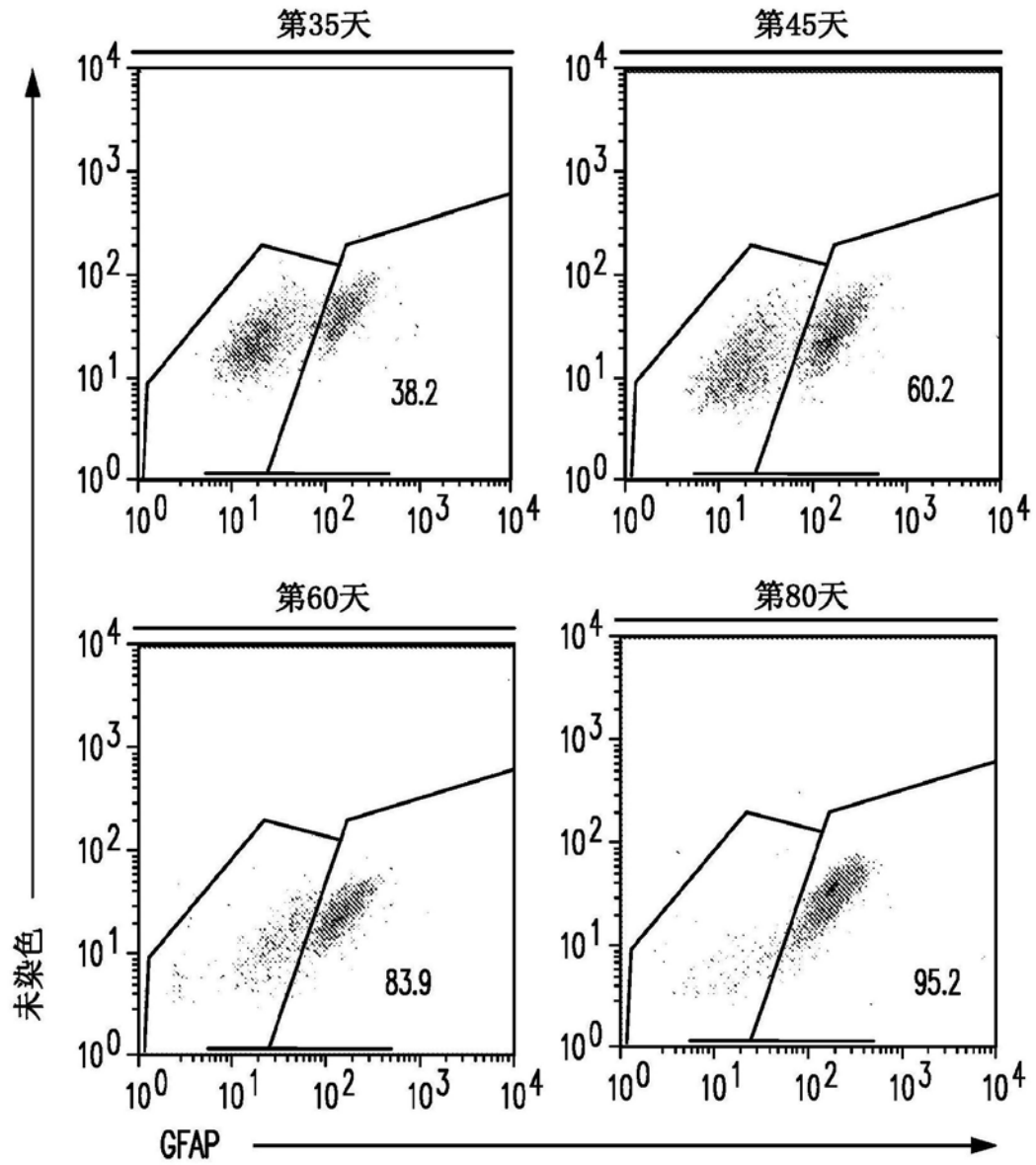


图6B

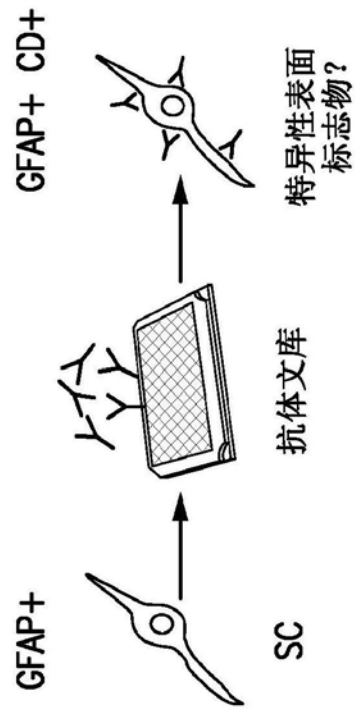


图7A

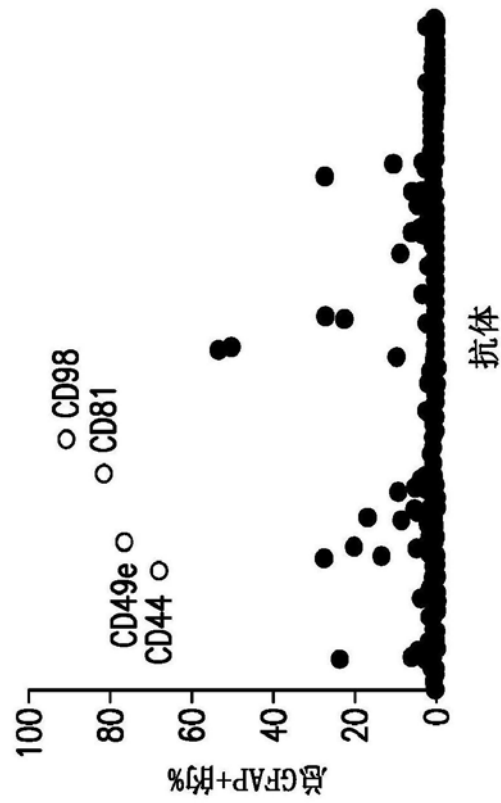


图7B

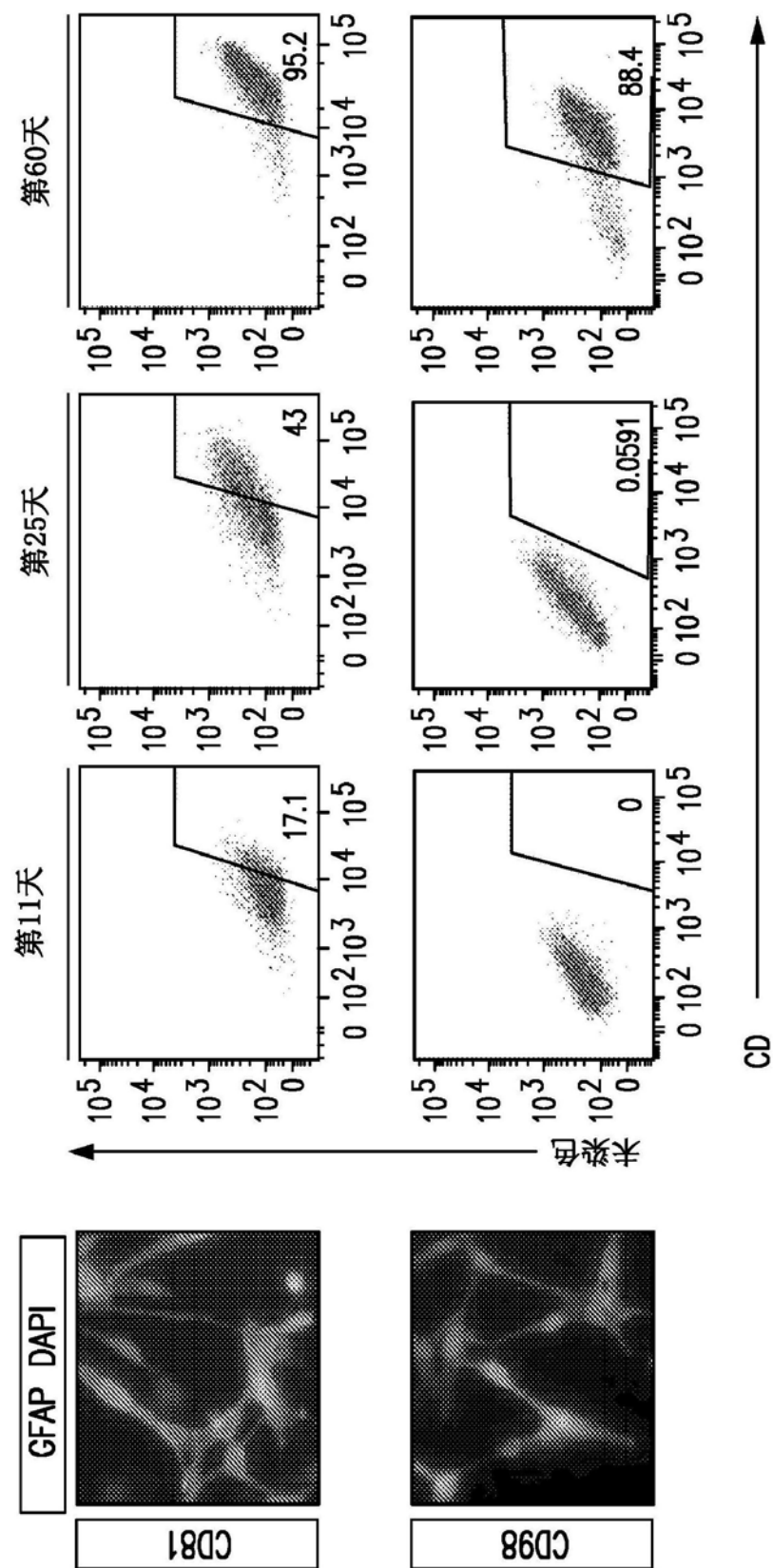


图7C续