



(10) 申请公布号 CN 120060140 A

(43) 申请公布日 2025. 05. 30

(21) 申请号 202510192544.0

(22) 申请日 2019.09.19

(30) 优先权数据

62/733,621 2018.09.19 US

(62) 分案原申请数据

201980070640.0 2019.09.19

(71) 申请人 谱系细胞疗法股份有限公司

地址 美国

(72) 发明人 R·R·奈尔 S·凯泽

A·S·帕里克

U·肖卡特—蒙塔兹

E·M·怀特利 N·C·曼利

C·R·哈尔贝施塔特

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

专利代理师 谢丽菲

(51) Int.Cl.

C12N 5/079 (2010.01)

C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 5/10 (2006.01)

权利要求书3页 说明书28页 附图5页

(54) 发明名称

用于在动态悬浮培养中分化多能干细胞的
方法

(57) 摘要

提供了用于使用TGF β /激活素/Nodal信号传导和BMP信号传导的小分子或蛋白质抑制剂在动态悬浮培养物中将多能干细胞分化为神经外胚层的方法。还提供了用于将多能干细胞例如人胚胎干细胞首先分化为神经外胚层,然后进一步分化为神经胶质祖细胞,并且进一步分化为少突胶质祖细胞(OPC)的方法和方案,以及由此获得的组合物。本公开内容的方法在分化过程的第7天可再现地产生神经外胚层祖细胞,在分化过程的第21天可再现地产生神经胶质祖细胞,和在分化过程的第42天可再现地产生OPC。

1. 一种用于从未分化的人多能干细胞获得包含神经胶质祖细胞的细胞群的方法,所述方法包括:

a) 获得未分化的人多能干细胞的非胚状体(非EB)聚集体的悬浮培养物,其中所述人多能干细胞保持未分化状态;

b) 在转化生长因子 β (TGF β)/激活素/Nodal信号传导的至少一种抑制剂和骨形态发生蛋白(BMP)信号传导的至少一种抑制剂的存在下,在动态悬浮液中将来自a)的非EB聚集体培养第一时间段,从而诱导分化为神经外胚层;

c) 在视黄酸和至少一种Smoothened受体激动剂的存在下,在动态悬浮液中将来自b)的非EB聚集体培养第二时间段;和

d) 在碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和表皮生长因子(EGF)的存在下,在动态悬浮液中将来自c)的聚集体培养另外一段时间,直到细胞成熟为神经胶质祖细胞。

2. 权利要求1所述的方法,其还包括从d)收获非EB聚集体并将其铺在基底上的附加步骤,从而导致细胞从聚集体中移出。

3. 权利要求2所述的方法,其中所述基底是重组人层粘连蛋白-521。

4. 权利要求1所述的方法,其中所述人多能干细胞是人胚胎干细胞(hESC)。

5. 权利要求1所述的方法,其中所述人多能干细胞是人诱导多能干细胞(hiPSC)。

6. 权利要求1所述的方法,其中所述TGF β /激活素/Nodal信号传导的至少一种抑制剂是激活素受体样激酶5(ALK5)的抑制剂。

7. 权利要求1所述的方法,其中所述TGF β /激活素/Nodal信号传导的至少一种抑制剂选自SB431542、LY2157299、GW788388、A-77-01、A-83-01和SB505124。

8. 权利要求1所述的方法,其中所述TGF β /激活素/Nodal信号传导的至少一种抑制剂是SB431542。

9. 权利要求1所述的方法,其中所述BMP信号传导的至少一种抑制剂是激活素受体样激酶2(ALK2)的抑制剂。

10. 权利要求1所述的方法,其中所述BMP信号传导的至少一种抑制剂选自Dorsomorphin、DMH-1、K02288、ML3467、LDN193189和Noggin蛋白。

11. 权利要求1所述的方法,其中所述BMP信号传导的至少一种抑制剂是Dorsomorphin。

12. 权利要求1所述的方法,其中所述至少一种Smoothened受体激动剂选自Purmorphamine、Smoothened激动剂(SAG, CAS 364590-63-6)和Sonic Hedgehog(SHH)蛋白。

13. 权利要求1所述的方法,其中所述至少一种Smoothened受体激动剂是Purmorphamine。

14. 权利要求1所述的方法,其中所述第一时间段是约三至四天。

15. 权利要求1所述的方法,其中所述第二时间段是约三天。

16. 权利要求1所述的方法,其中步骤a)至d)在约21天的时间内执行。

17. 一种分化的细胞群,其包含根据权利要求1所述的方法获得的神经胶质祖细胞。

18. 权利要求17所述的分化的细胞群,其中所述神经胶质祖细胞表达选自钙电压门控通道辅助亚基 γ 4(CACNG4)、脂肪酸结合蛋白7(FABP7)和性别决定区Y-盒6(SOX6)的一种或多种标志物。

19. 一种用于从未分化的人多能干细胞获得包含少突胶质祖细胞(OPC)的细胞群的方法

法,所述方法包括:

- a) 根据权利要求1所述的方法获得神经胶质祖细胞;
- b) 从a) 收获细胞并将其铺在基底上,从而导致细胞从聚集体中移出;和
- c) 在表皮生长因子(EGF)和血小板衍生的生长因子AA(PDGF-AA)的存在下,将来自b)的细胞贴壁培养另外一段时间,直到细胞成熟为OPC,

其中所述OPC表达选自神经/神经胶质抗原2(NG2)、血小板衍生的生长因子受体A(PDGFR α)和神经节苷脂GD3(GD3)的一种或多种标志物。

20. 权利要求19所述的方法,其中所述贴壁培养进行约21天的时间。

21. 权利要求19所述的方法,其中所述贴壁培养在选自以下的基底上进行:(i) 细胞粘附肽和(ii) 选自层粘连蛋白和玻连蛋白的细胞外基质。

22. 权利要求19所述的方法,其中所述贴壁培养在重组人层粘连蛋白-521上进行。

23. 权利要求19所述的方法,其中所述贴壁培养在层粘连蛋白-511E8片段上进行。

24. 权利要求19所述的方法,其中所述人多能干细胞是hESC。

25. 权利要求19所述的方法,其中所述人多能干细胞是hiPSC。

26. 一种分化的细胞群,其包含根据权利要求19所述的方法获得的OPC。

27. 权利要求26所述的分化的细胞群,其中至少60%的细胞是NG2阳性的。

28. 权利要求26所述的分化的细胞群,其中至少70%的细胞是NG2阳性的。

29. 权利要求26所述的分化的细胞群,其中至少80%的细胞是NG2阳性的。

30. 权利要求26所述的分化的细胞群,其中至少90%的细胞是NG2阳性的。

31. 权利要求26所述的分化的细胞群,其中至少60%的细胞是PDGFR α 阳性的。

32. 权利要求26所述的分化的细胞群,其中至少70%的细胞是PDGFR α 阳性的。

33. 权利要求26所述的分化的细胞群,其中至少80%的细胞是PDGFR α 阳性的。

34. 权利要求26所述的分化的细胞群,其中至少90%的细胞是PDGFR α 阳性的。

35. 权利要求26所述的分化的细胞群,其中至少60%的细胞是GD3阳性的。

36. 权利要求26所述的分化的细胞群,其中至少70%的细胞是GD3阳性的。

37. 权利要求26所述的分化的细胞群,其中至少80%的细胞是GD3阳性的。

38. 权利要求26所述的分化的细胞群,其中至少90%的细胞是GD3阳性的。

39. 一种用于诱导人多能干细胞分化为神经外胚层细胞的方法,所述方法包括:

a) 获得未分化的人多能干细胞的非胚状体(非EB)聚集体的悬浮培养物,其中所述人多能干细胞保持未分化状态;

b) 在转化生长因子 β (TGF β)/激活素/Nodal信号传导的至少一种抑制剂和骨形态发生蛋白(BMP)信号传导的至少一种抑制剂的存在下,在动态悬浮液中将来自a)的非EB聚集体培养第一时间段,从而诱导分化为神经外胚层;

c) 在视黄酸和至少一种Smoothened受体激动剂的存在下,在动态悬浮液中将来自b)的非EB聚集体培养第二时间段;直到细胞成熟为成对盒6(PAX6)阳性神经外胚层细胞。

40. 权利要求39所述的方法,其中所述人多能干细胞是人胚胎干细胞(hESC)。

41. 权利要求39所述的方法,其中所述人多能干细胞是人诱导多能干细胞(hiPSC)。

42. 权利要求39所述的方法,其中所述TGF β /激活素/Nodal信号传导的至少一种抑制剂是激活素受体样激酶5(ALK5)的抑制剂。

43. 权利要求39所述的方法,其中所述TGF β /激活素/Nodal信号传导的至少一种抑制剂选自SB431542、LY2157299、GW788388、A-77-01、A-83-01和SB505124。

44. 权利要求39所述的方法,其中所述TGF β /激活素/Nodal信号传导的至少一种抑制剂是SB431542。

45. 权利要求39所述的方法,其中所述BMP信号传导的至少一种抑制剂是激活素受体样激酶2(ALK2)的抑制剂。

46. 权利要求39所述的方法,其中所述BMP信号传导的至少一种抑制剂选自Dorsomorphin、DMH-1、K02288、ML3467、LDN193189和Noggin蛋白。

47. 权利要求39所述的方法,其中所述BMP信号传导的至少一种抑制剂是Dorsomorphin。

48. 权利要求39所述的方法,其中所述至少一种Smoothened受体激动剂选自Purmorphamine、Smoothened激动剂(SAG, CAS 364590-63-6)和Sonic Hedgehog(SHH)蛋白。

49. 权利要求39所述的方法,其中所述至少一种Smoothened受体激动剂是Purmorphamine。

50. 权利要求39所述的方法,其中所述第一时间段是约三至四天。

51. 权利要求39所述的方法,其中所述第二时间段是约三天。

52. 权利要求39所述的方法,其中步骤a)至c)在约7至8天的时间内执行。

53. 一种分化的细胞群,其包含根据权利要求39所述的方法获得的PAX6阳性神经外胚层细胞。

54. 权利要求53所述的分化的细胞群,其中所述PAX6阳性神经外胚层细胞还表达选自Hes家族BHLH、转录因子5(HES5)和含锌指和BTB结构域16(ZBTB16)的一种或多种标志物。

55. 一种用于从未分化的人多能干细胞获得包含神经胶质祖细胞的细胞群的方法,所述方法包括:

a) 在动态悬浮液中培养已解聚并形成单细胞悬浮液的未分化的人多能干细胞以获得非胚状体(非EB)聚集体,其中所述非EB聚集体中的人多能干细胞保持未分化状态;

b) 在转化生长因子 β (TGF β)/激活素/Nodal信号传导的至少一种抑制剂和骨形态发生蛋白(BMP)信号传导的至少一种抑制剂的存在下,在动态悬浮液中将来自a)的非EB聚集体培养第一时间段,从而诱导分化为神经外胚层;

c) 在视黄酸和至少一种Smoothened受体激动剂的存在下,在动态悬浮液中将来自b)的非EB聚集体培养第二时间段;和

d) 在碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和表皮生长因子(EGF)的存在下,在动态悬浮液中将来自c)的聚集体培养另外一段时间,直到细胞成熟为神经胶质祖细胞。

用于在动态悬浮培养中分化多能干细胞的方法

[0001] 本申请为分案,其母案申请的申请号为201980070640.0,申请日为2019年9月19日,发明名称为“用于在动态悬浮培养中分化多能干细胞的方法”。

技术领域

[0002] 本公开内容涉及细胞生物学以及神经外胚层和神经胶质谱系细胞(例如少突胶质祖细胞)的领域。更具体地,本公开内容涉及使用TGFβ/激活素/Nodal信号传导和BMP信号传导的小分子或蛋白质抑制剂在动态悬浮培养中将多能干细胞分化为神经外胚层的新方法。本公开内容进一步提供了用于将多能干细胞(例如人胚胎干细胞)首先分化为神经外胚层,然后进一步分化为神经胶质祖细胞,并且进一步分化为少突胶质祖细胞的新方法。本公开内容进一步涉及通过根据本发明的方法产生的表达一种或多种标志物的神经外胚层细胞、神经胶质祖细胞和少突胶质祖细胞。

背景技术

[0003] 少突胶质祖细胞(OPC)是中枢神经系统(CNS)中的神经胶质细胞的亚群,其成熟为产生髓磷脂的少突胶质细胞。少突胶质细胞产生髓鞘,其隔离神经元轴突以及在髓鞘丢失时使CNS损伤重新髓鞘化。少突胶质细胞还通过其他机制促进神经保护,包括产生促进神经元存活的神经营养因子(Wilkins A, Chandran S, Compston A. A role for oligodendrocyte-derived IGF-1 in trophic support of cortical neurons. 2001 *Glia*. 36(1):48-57; Dai X, Lercher LD, Clinton PM, Du Y, Livingston DL, Vieira C, Yang L, Shen MM, Dreyfus CF. The trophic role of oligodendrocytes in the basal forebrain. 2003 *J Neurosci*. 23(13):5846-53; Du Y, Dreyfus CF. Oligodendrocytes as providers of growth factors. 2002 *J Neurosci Res*. 68(6):647-54)。因此,少突胶质细胞是脱髓鞘和髓鞘形成不良病症(例如多发性硬化症,肾上腺脑白质营养不良和肾上腺髓质神经病)、其他神经退行性病症(例如阿尔茨海默病,肌萎缩侧索硬化和亨廷顿病)以及急性脊髓损伤(SCI)的重要治疗靶标。

[0004] OPC衍生自神经外胚层(也称为神经外胚层或神经管上皮),其产生神经祖细胞,该神经祖细胞将产生构成CNS的各种神经元和神经胶质细胞。已经开发了几种用于将人多能干细胞(例如胚胎干细胞(ESC)和诱导多能干细胞(iPSC))分化为可用于细胞治疗的OPC的方法。对于诱导神经外胚层谱系细胞和神经祖细胞的第一步,大多数现有方案依赖于胚状体(EB)和随后在尾化剂视黄酸的存在下在静态非贴壁培养物中神经球的形成(Nistor GI, Totoiu MO, Haque N, Carpenter MK, Keirstead HS. Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation. 2005 *Glia*. 49(3):385-96; Izrael M, Zhang P, Kaufman R, Shinder V, Ella R, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Chebath J, Revel M. Human oligodendrocytes derived from embryonic stem cells: Effect of noggin on phenotypic differentiation in vitro and on myelination in vivo. 2007 *Mol. Cell. Neurosci*. 34:

310-323;Hu BY,Du ZW,Zhang SC.Differentiation of human oligodendrocytes from pluripotent stem cells.2009Nat.Protoc.4:1614-1622)。还报道了在贴壁条件下的替代分化方案(Hu Z,Li T,Zhang X,Chen Y.Hepatocyte growth factor enhances the generation of high-purity oligodendrocytes from human embryonic stem cells.2009Differentiation.78:117-184)。基于EB的和贴壁分化方案都需要人工选择神经前体以优化产率,并且不容易扩展,从而限制了它们在制备大量治疗级细胞中的用途。另外,神经外胚层谱系之外的少量细胞类型能够在分化过程中持续存在,并在最终的OPC群体中促成非期望的细胞类型,包括例如上皮细胞或软骨细胞祖细胞(Manley NC,Priest CA,Denham J,Wirth ED 3rd,Lebkowski JS.Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells:Preclinical Efficacy and Safety in Cervical Spinal Cord Injury.Stem Cells Transl Med.2017Oct;6(10):1917-1929)。

[0005] 最近,已经开发出通过同时使用转化生长因子 β (TGF β)/激活素/Nodal信号传导的抑制剂和骨形态发生蛋白(BMP)信号传导的抑制剂来改善神经诱导(神经外胚层形成)的效率的方法。此过程(也被称为双重SMAD抑制)已显示出促进人胚胎干细胞向神经外胚层谱系细胞的有效分化(Chambers SM,Craft CA,Papapetrou EP,Tomishima M,Sadelain, M.Studer,L.Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling.2009Nat Biotechnol.27(3):275-280)。在标准的双重SMAD抑制方案中,在贴壁单层培养物上进行神经诱导和随后的分化步骤,从而消除了基于EB的神经诱导方法所产生的高度异质性细胞群,并最大限度地减少了非神经细胞。该方法已成功用于从多能干细胞产生神经胶质祖细胞和OPC(Douvaras P,Wang J,Zimmer M,Hanchuk S,O'Bara MA,Sadiq S,Sim FJ,Goldman J,Fossati V.Efficient generation of myelinating oligodendrocytes from primary progressive multiple sclerosis patients by induced pluripotent stem cells.2014Stem Cell Reports.3(2):250-9)。但是,与三维(3D)培养方法相比,贴壁单层培养的一个缺点是其有限的可扩展性和产率。此外,3D培养环境模仿了天然的细胞微环境;据信,与在(2D)贴壁单层中生长的细胞相比,使用3D细胞培养技术生长的细胞与天然组织和器官更密切相似。最后,贴壁单层培养依赖于使用不确定的成分和动物来源的组分,例如**Matrigel**[®]和敲除血清替代品(KSR)。

[0006] 为了解决这些限制,最近开发并测试了将双重SMAD抑制与EB形成相结合的方法(Kirkeby A,Grealish S,Wolf DA,Nelander J,Wood J,Lundblad M,Lindvall O,Parmar M.Generation of regionally specified neural progenitors and functional neurons from human embryonic stem cells under defined conditions.2012Cell Rep.1(6):703-14;Crompton LA,Byrne ML,Taylor H,Kerrigan TL,Bru-Mercier G,Badger JL,Barbuti PA,Jo J,Tyler SJ,Allen SJ,Kunath T,Cho K,Caldwell MA.Stepwise,non-adherent differentiation of human pluripotent stem cells to generate basal forebrain cholinergic neurons via hedgehog signaling.2013Stem Cell Res.11(3):1206-21;Pauly MG,Krajka V,Stengel F,Seibler P,Klein C,Capetian P.Adherent vs.Free-Floating Neural Induction by Dual SMAD Inhibition for Neurosphere Cultures Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells.2018Front Cell Dev Biol.6:3)。在基于EB的方法中,将TGF β /激活素/Nodal信号传

导和BMP信号传导的小分子抑制剂应用于在静态非贴壁培养中形成的EB。但是,基于EB的双重SMAD抑制作用不容易扩展用于大量靶细胞的产生,并导致获得的细胞中更大程度的变异性,部分原因是EB的静态培养导致形成不同大小的聚集体,并且需要在整个过程中进行频繁研磨(Crompton LA,Byrne ML,Taylor H,Kerrigan TL,Bru-Mercier G,Badger JL,Barbuti PA,Jo J,Tyler SJ,Allen SJ,Kunath T,Cho K,Caldwell MA.Stepwise,non-adherent differentiation of human pluripotent stem cells to generate basal forebrain cholinergic neurons via hedgehog signaling.2013Stem Cell Res.11(3):1206-21)。

[0007] 需要用于将多能干细胞分化为神经外胚层以及进一步分化为神经胶质祖细胞和OPC的改进方法。理想地,这样的方法应该易于扩展以产生足够数量的分化细胞用于细胞治疗应用,同时一致且可重复地产生靶细胞类型。

发明内容

[0008] 在本文所述的各种实施方案中,本公开内容尤其提供了用于在动态悬浮培养中将人多能干细胞(例如ESC和iPSC)分化为神经外胚层和神经胶质细胞的稳健、可靠的方案,其可以在生物反应器中进行并适于大规模培养。还提供了通过在动态悬浮培养中诱导分化为神经外胚层和进一步分化为神经胶质细胞以及随后将神经胶质细胞分化为OPC来将人多能干细胞分化为OPC的方案。

[0009] 本公开内容部分地基于以下发现:起始材料多能干细胞可以在动态悬浮液中聚集成非EB聚集体,其中多能干细胞保持未分化,随后,聚集体可以在动态悬浮液中通过使用TGFβ/激活素/Nodal信号传导的一种或多种抑制剂和BMP信号传导的一种或多种抑制剂被诱导分化为神经外胚层。与贴壁培养和基于EB的方法相比,根据本公开内容的在动态悬浮液中分化多能干细胞提供了用于从起始材料产生大量的靶神经外胚层谱系细胞的可扩展的、可再现的和可控制的方法。

[0010] 本公开内容的方法在分化过程的第7天可再现地产生神经外胚层祖细胞,在分化过程的第21天可再现地产生神经胶质祖细胞,和在分化过程的第42天可再现地产生OPC。根据本公开内容产生的第42天OPC与使用当前处于临床测试以治疗脊髓损伤的替代方法(Priest CA,Manley NC,Denham J,Wirth ED 3rd,Lebkowski JS.Preclinical safety of human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors supporting clinical trials in spinal cord injury.Regen Med.2015Nov;10(8):939-58;Manley NC,Priest CA,Denham J,Wirth ED 3rd,Lebkowski JS.Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells:Preclinical Efficacy and Safety in Cervical Spinal Cord Injury.Stem Cells Transl Med.2017Oct;6(10):1917-1929)产生的OPC相当(在其总体标志物表达谱方面),不同之处在于,根据本公开内容产生的OPC表达较低水平的非OPC标志物,包括与体外上皮囊肿形成相关的标志物。

[0011] 在一个实施方案中,本公开内容提供了一种从未分化的人多能干细胞获得包含神经胶质祖细胞的细胞群的方法。在某些实施方案中,所述方法包括:(a)获得未分化的人多能干细胞的非胚状体(非EB)聚集体的悬浮培养物,其中所述人多能干细胞保持未分化状态;(b)在转化生长因子β(TGFβ)/激活素/Nodal信号传导的至少一种抑制剂和骨形态发生

蛋白 (BMP) 信号传导的至少一种抑制剂的存在下,在动态悬浮液中将来自 (a) 的非EB聚集体培养第一时间段,从而诱导分化为神经外胚层; (c) 在视黄酸和至少一种Smoothened受体激动剂的存在下,在动态悬浮液中将来自 (b) 的非EB聚集体培养第二时间段;和 (d) 在碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 和表皮生长因子 (EGF) 的存在下,在动态悬浮液中将来自 (c) 的聚集体培养另外一段时间,直到细胞成熟为神经胶质祖细胞。

[0012] 在某些实施方案中,第一时间段是约三到四天。在某些实施方案中,第二时间段是约四天。在某些实施方案中,步骤 (a) 和 (b) 在约七至八天的时间内进行。在某些实施方案中,步骤 (a) 至 (d) 在约二十一天的时间内进行。

[0013] 在某些实施方案中,所述方法进一步包括从 (d) 收获非EB聚集体并将其铺在基底上的附加步骤,从而导致细胞从聚集体中移出。在某些实施方案中,基底是细胞粘附肽。在其他实施方案中,基底是细胞外基质蛋白。在某些实施方案中,基底是重组人层粘连蛋白-521。在其他实施方案中,基底是玻连蛋白或层粘连蛋白-511E8片段。在其他实施方案中,基底是合成基底,诸如,例如,**Synthemax®-II** SC基底。

[0014] 在进一步的实施方案中,所述方法包括另外的步骤:在存在表皮生长因子 (EGF) 和血小板衍生的生长因子AA (PDGF-AA) 的情况下,将已从粘附在基底上的聚集体移出的细胞培养另外一段时间,直到细胞成熟为OPC。在某些实施方案中,基底是细胞粘附肽。在其他实施方案中,基底是细胞外基质蛋白。在某些实施方案中,基底是重组人层粘连蛋白-521。在其他实施方案中,基底是玻连蛋白或层粘连蛋白-511E8片段。在某些实施方案中,贴壁培养进行约21天。

[0015] 在另一个实施方案中,本公开内容提供了一种诱导人多能干干细胞分化为神经外胚层细胞的方法,所述方法包括: (a) 获得未分化的人多能干细胞的非胚状体 (非EB) 聚集体的悬浮培养物,其中所述人多能干干细胞保持未分化状态; (b) 在转化生长因子 β (TGF β) /激活素/Nodal信号传导的至少一种抑制剂和骨形态发生蛋白 (BMP) 信号传导的至少一种抑制剂的存在下,在动态悬浮液中将来自 (a) 的非EB聚集体培养第一时间段,从而诱导分化为神经外胚层;和 (c) 在视黄酸和至少一种Smoothened受体激动剂的存在下,在动态悬浮液中将来自 (b) 的非EB聚集体培养第二时间段;直到细胞成熟为成对盒6 (PAX6) 阳性神经外胚层细胞。

[0016] 在某些实施方案中,第一时间段是约三到四天。在某些实施方案中,第二时间段是约四天。在某些实施方案中,步骤 (a) 至 (c) 在约七至八天的时间内进行。

[0017] 在另一个实施方案中,本公开内容提供了一种从未分化的人多能干干细胞获得包含神经胶质祖细胞的细胞群的方法,所述方法包括: (a) 在动态悬浮液中培养已解聚并形成单细胞悬浮液的未分化的人多能干干细胞以获得非胚状体 (非EB) 聚集体,其中非EB聚集体中的人多能干干细胞保持未分化状态; (b) 在转化生长因子 β (TGF β) /激活素/Nodal信号传导的至少一种抑制剂和骨形态发生蛋白 (BMP) 信号传导的至少一种抑制剂的存在下,在动态悬浮液中将来自 (a) 的非EB聚集体培养第一时间段,从而诱导分化为神经外胚层; (c) 在视黄酸和至少一种Smoothened受体激动剂的存在下,在动态悬浮液中将来自 (b) 的非EB聚集体培养第二时间段;和 (d) 在碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 和表皮生长因子 (EGF) 的存在下,在动态悬浮液中将来自 (c) 的聚集体培养另外一段时间,直到细胞成熟为神经胶质祖细胞。

[0018] 在某些实施方案中,TGF β /激活素/Nodal信号传导的至少一种抑制剂是激活素受

体样激酶5 (ALK5) 的抑制剂。在其他实施方案中, TGF β /激活素/Nodal信号传导的至少一种抑制剂选自SB431542、LY2157299、GW788388、A-77-01、A-83-01和SB505124。在其他实施方案中, TGF β /激活素/Nodal信号的抑制剂是SB431542。

[0019] 在某些实施方案中, BMP信号传导的至少一种抑制剂是激活素受体样激酶2 (ALK2) 的抑制剂。在其他实施方案中, BMP信号传导的至少一种抑制剂选自Dorsomorphin、DMH-1、K02288、ML3467、LDN193189和Noggin蛋白。在其他实施方案中, BMP信号传导的抑制剂是Dorsomorphin。

[0020] 在某些实施方案中, 至少一种Smoothened受体激动剂选自Purmorphamine、Smoothened激动剂 (SAG, CAS 364590-63-6) 和Sonic Hedgehog (SHH) 蛋白。在其他实施方案中, 所述Smoothened受体激动剂是Purmorphamine。

[0021] 另一个实施方案是分化的细胞群, 其包含根据本公开内容的方法获得的PAX6阳性神经外胚层细胞。在某些实施方案中, PAX6阳性神经外胚层细胞还表达选自HES5和ZBTB16的一种或多种标志物。

[0022] 另一个实施方案是分化的细胞群, 其包含根据本公开内容的方法获得的神经胶质祖细胞。在某些实施方案中, 神经胶质祖细胞表达选自钙电压门控通道辅助亚基 γ 4 (CACNG4)、脂肪酸结合蛋白7 (FABP7) 和性别决定区Y-盒6 (SOX6) 的一种或多种标志物。

[0023] 另一个实施方案是分化的细胞群, 其包含根据本公开内容的方法获得的OPC。在一个优选的实施方案中, 根据本发明的方法产生的OPC表达选自神经/神经胶质抗原2 (NG2)、血小板衍生的生长因子受体A (PDGFR α) 和神经节苷脂GD3 (GD3) (GD3也被称为抗二唾液酸神经节苷脂和神经节苷脂GD3合酶) 的一种或多种标志物。因此, 例如, 根据本发明制备的OPC可以表达NG2、PDGFR α 或GD3; NG2和PDGFR α 、NG2和GD3或PDGFR α 和GD3的组合; 或NG2、PDGFR α 和GD3的组合。在某些实施方案中, 分化的细胞群包含至少60%的NG2阳性细胞。在某些实施方案中, 分化的细胞群包含至少70%的NG2阳性细胞。在某些实施方案中, 分化的细胞群包含至少80%的NG2阳性细胞。在其他实施方案中, 分化的细胞群包含至少90%的NG2阳性细胞。在某些实施方案中, 分化的细胞群包含至少98%的NG2阳性细胞。在某些实施方案中, 分化的细胞群包含至少60%的PDGFR α 阳性细胞。在某些实施方案中, 分化的细胞群包含至少70%的PDGFR α 阳性细胞。在某些实施方案中, 分化的细胞群包含至少80%的PDGFR α 阳性细胞。在其他实施方案中, 分化的细胞群包含至少90%的PDGFR α 阳性细胞。在某些实施方案中, 分化的细胞群包含至少98%的PDGFR α 阳性细胞。在某些实施方案中, 分化的细胞群包含至少60%的GD3阳性细胞。在某些实施方案中, 分化的细胞群包含至少70%的GD3阳性细胞。在某些实施方案中, 分化的细胞群包含至少80%的GD3阳性细胞。在其他实施方案中, 分化的细胞群包含至少90%的GD3阳性细胞。在某些实施方案中, 分化的细胞群包含至少98%的GD3阳性细胞。

附图简要说明

[0025] 图1是描绘根据本公开内容的人胚胎干细胞向神经外胚层 (第7天) 和进一步向神经胶质祖细胞 (第21天) 和少突胶质祖细胞 (第42天) 的分化的图。DS = 动态悬浮液。测试了TGF β /激活素/Nodal信号传导 (SB431542除外) 和BMP信号传导 (Dorsomorphin除外) 的几种其他小分子抑制剂, 并发现它们在诱导分化为神经外胚层中同样起作用 (实施例7)。

[0026] 图2显示了根据本公开内容的通过针对多能性标志物的免疫细胞化学染色的未分化的人胚胎干细胞 (uhESC) 的代表性显微照片。显微照片的上排和下排各自显示针对DAPI、Nanog和Oct4(上排) 或DAPI、Nanog和Sox2(下排) 染色并在IN Cell Analyzer 2000上成像的uhESC的单个成像场。右下方图中的比例尺适用于图中的所有图像。

[0027] 图3显示了根据本公开内容在悬浮液中生成为非胚状体(非EB) 聚集体并通过免疫细胞化学染色的神经外胚层祖细胞的代表性显微照片。显微照片的上排和下排显示了从两个代表性实验产生并通过针对DAPI(左图)、PAX6(中图) 和PSA-NCAM(右图) 的免疫细胞化学染色的神经外胚层祖细胞的聚集体。染色的细胞聚集体在IN Cell Analyzer 2000上成像。右下方图中的比例尺适用于图中的所有图像。

[0028] 图4显示了根据本公开内容产生并通过免疫细胞化学染色的少突胶质祖细胞的代表性显微照片。显微照片的上排和下排显示了从两个代表性实验产生并通过针对DAPI(左图) 和NG2(右图) 的免疫细胞化学染色的少突胶质祖细胞。染色的细胞在IN Cell Analyzer 2000上成像。右下方图中的比例尺适用于图中的所有图像。

[0029] 图5显示了在悬浮液中形成细胞聚集体之前和之后24小时的uhESC的基因表达谱的相关性图。每个相关性图显示了来自两个单独实验的第-1天(聚集体形成前) 相对第0天(聚集体形成后24小时) 的基因表达谱的比较。对于每个图, 数据点代表通过Fluidigm qPCR评估并如实施例6中所述计算为标准化的 ΔCT 的76个基因中的每一个。R平方值显示在每个图的左上角, 并使用JMP软件(SAS, Cary, NC, USA) 基于最佳拟合线计算得出。

[0030] 图6显示了使用不同的小分子组合在悬浮液中分化成神经外胚层祖细胞的uhESC的第7天基因表达谱的相关性图。每个相关性图显示了用SB431542加Dorsomorphin相对每个图的y轴上指示的替代性小分子组合处理的细胞的第7天基因表达谱的比较。对于每个图, 数据点代表通过Fluidigm qPCR评估并如实施例7中所述计算为标准化的 ΔCT 的96个基因中的每一个。R平方值显示在每个图的左上角, 并使用JMP软件(SAS, Cary, NC, USA) 基于最佳拟合线计算得出发明详述

[0031] 本描述并非旨在成为可以实现本公开内容的所有不同方式或可以添加到本公开内容的所有特征的详细目录。例如, 关于一个实施方案示出的特征可以被并入其他实施方案中, 并且关于特定实施方案示出的特征可以从该实施方案中删除。因此, 本公开内容预期在本公开内容的一些实施方案中, 可以排除或省略本文阐述的任何特征或特征的组合。另外, 根据本公开内容, 对于本文中所建议的各种实施方案的众多变化和添加对于本领域技术人员将是明显的, 其不背离本公开内容。在其他情况下, 未详细显示公知的结构、界面和过程, 以免不必要地使本发明晦涩难懂。意图是, 本说明书的任何部分都不应被解释为影响对本发明的全部范围的任何部分的否认。因此, 以下描述旨在举例说明本公开内容的一些特定方面, 而不是穷举地指定其所有置换、组合和变型。

[0032] 除非另有定义, 否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本公开内容所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。在本文的公开内容的描述中使用的术语仅出于描述特定实施方案的目的, 而无意于限制本公开内容。

[0033] 本文引用的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献均通过引用整体并入本文。

[0034] 除非上下文另外指出, 否则特别意图是可以以任何组合使用本文描述的本公开内

容的各种特征。此外,本公开内容还预期在本公开内容的一些实施方案中,可以排除或省略本文示出的任何特征或特征的组合。

[0035] 本文公开的方法可以包括用于实现所描述的方法的一个或多个步骤或动作。在不脱离本发明的范围的情况下,方法步骤和/或动作可以彼此互换。换句话说,除非对于该方面的正确操作需要特定的步骤或动作顺序,否则可以修改特定步骤和/或动作的顺序和/或使用而不背离本发明的范围。

[0036] 如在本公开内容和所附权利要求书的描述中所使用的,单数形式“一个”、“一种”和“该”也旨在包括复数形式,除非上下文另外明确指出。

[0037] 如本文所用,“和/或”是指并涵盖一个或多个相关所列项目的任何和所有可能的组合,以及当以替代方式(“或”)解释时缺乏组合。

[0038] 当提及诸如百分比、密度、体积等的可测量值时,本文所使用的术语“约”和“大约”意指包括指定量的 $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 或甚至 $\pm 0.1\%$ 的变化。

[0039] 如本文所用,诸如“在X与Y之间”和“在约X与Y之间”的短语应被解释为包括X和Y。如本文所使用,诸如“在约X与Y之间”的短语意指“在约X与约Y之间”和诸如“约X至Y”意指“约X至约Y”。

[0040] 如本文所用,“少突胶质祖细胞”(OPC)是指在中枢神经系统中发现的具有神经外胚层/神经胶质谱系、表达特征性标志物神经/神经胶质抗原2(NG2)并且能够分化为少突胶质细胞的细胞。根据本发明的方法制备的OPC还可以表达选自NG2、PDGFR α 和GD3的一种或多种标志物。

[0041] 术语“神经胶质谱系细胞”、“神经胶质祖细胞”和“神经胶质细胞”在本文可互换使用,并且是指衍生自神经外胚层/神经祖细胞的非神经元CNS细胞。神经胶质祖细胞可以进一步分化形成OPC/少突胶质细胞或星形胶质细胞。在某些实施方案中,本公开内容的神经胶质祖细胞表达选自钙电压门控通道辅助亚基 $\gamma 4$ (CACNG4)、脂肪酸结合蛋白7(FABP7)和性别决定区Y-盒6(SOX6)的一种或多种标志物。

[0042] 术语“神经外胚层”、“神经外胚层细胞”、“神经外胚层前体”、“神经外胚层祖细胞”、“神经祖细胞”和“神经前体”在本文中可互换使用,并且是指可以沿神经前体途径分化并且能够形成CNS神经元、少突胶质细胞、星形胶质细胞和室管膜细胞的细胞。在某些实施方案中,本公开内容的神经外胚层细胞表达选自成对盒6(PAX6)、Hes家族BHLH转录因子5(HES5)和含锌指和BTB结构域16(ZBTB16)的一种或多种标志物。

[0043] 如本文所用,术语“胚状体”(EB)是指衍生自多能干细胞的三维细胞聚集体,其已经历朝向所有三个胚层的自发分化。当从抑制分化的培养条件中去除多能干细胞时,形成EB。例如,在人胚胎干细胞的情况下,从培养基中去除碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和转化生长因子 β (TGF β)导致朝向所有三个胚层的自发分化和EB的形成。

[0044] 如本文所用,术语“非胚状体聚集体”是指从多能干细胞形成的三维细胞聚集体,其中多能干细胞保持未分化。在本公开内容中,在维持多能性并抑制自发分化的细胞培养条件(即,未从培养基中去除bFGF和TGF β)下在动态悬浮液中形成非EB聚集体。随后,通过同时去除bFGF和TGF β 并添加神经外胚层分化因子(例如与骨形态发生蛋白信号传导途径的抑制剂组合的TGF β /激活素/Nodal信号传导途径的抑制剂)使未分化的细胞聚集体被导向神经外胚层祖细胞。

[0045] 如本文所用,术语“TGFβ/激活素/Nodal信号传导抑制剂”是指能够沿着转化生长因子β(TGFβ)/激活素/Nodal信号传导途径下调信号传导的小分子或蛋白调节剂。在某些实施方案中,TGFβ/激活素/Nodal信号传导抑制剂直接靶向I型TGFβ受体(TGFβR1),也称为激活素受体样激酶5(ALK5)。在某些实施方案中,TGFβ/激活素/Nodal信号传导抑制剂选自SB431542、LY2157299、GW788388、A-77-01、A-83-01和SB505124。

[0046] 如本文所用,术语“BMP信号传导抑制剂”是指能够沿着骨形态发生蛋白(BMP)信号传导途径下调信号传导的小分子或蛋白质调节剂。在某些实施方案中,BMP信号传导抑制剂直接靶向I型激活素A受体(ACVR1),也称为激活素受体样激酶2(ALK2)。在某些实施方案中,BMP信号传导抑制剂选自Dorsomorphin、DMH-1、K02288、ML3467、LDN193189和Noggin蛋白。

[0047] 如本文所用,术语“Smoothened激动剂”或“Smoothened受体激动剂”是指能够直接结合并激活G蛋白偶联的受体Smoothened(其是Sonic Hedgehog(SHH)信号传导途径的一部分)的小分子或蛋白质调节剂。在某些实施方案中,Smoothened受体激动剂选自Purmorphamine、Smoothened激动剂(SAG,CAS 364590-63-6)和Sonic Hedgehog(SHH)蛋白。

[0048] 如本文所用,术语“非期望的细胞类型”是指神经外胚层谱系之外的细胞,其可以在植入时导致异位组织的形成,或者在囊肿测定中导致一个或多个囊肿的形成,如本文所述。在一个实施方案中,“非期望的细胞类型”可包括上皮谱系细胞,例如CD49f(由神经祖细胞和上皮细胞两者表达的标志物)阳性的细胞,或CLDN6或EpCAM(由多能细胞和上皮细胞两者表达的两种标志物)阳性的细胞。

[0049] 如本文所用,“植入”或“移植”是指使用合适的递送技术(例如,使用注射装置)将细胞群施用到靶组织中。

[0050] 如本文所用,“受试者”是指动物或人。

[0051] 如本文所用,“需要其的受试者”是指在中枢神经系统中具有受损组织的动物或人。在一个实施方案中,动物或人经历运动功能丧失。

[0052] 如本文可互换使用的术语“中枢神经系统”和“CNS”是指控制身体的一种或多种活动的神经组织的复合体,其包括但不限于大脑和脊椎动物中的脊髓。

[0053] 如本文所用,关于病况或疾病的“治疗”或“医治”是用于在患者出现病况或疾病之后获得有益或期望的结果(优选地包括临床结果)的方法。关于疾病的有益或期望结果包括但不限于以下一种或多种:改善与疾病相关的病况,治愈疾病,减轻疾病的严重程度,延缓疾病的进展,缓解与疾病相关的一种或多种症状,增加罹患疾病的患者的生活质量,延长生存时间,及其任意组合。类似地,出于本公开内容的目的,关于病况的有益或期望的结果包括但不限于以下一种或多种:改善病况,治愈病况,减轻病况的严重程度,延缓病况的进展,缓解与病况相关的一种或多种症状,增加罹患病况的患者的生活质量,延长生存时间,及其任意组合。

[0054] 未分化的多能干细胞的繁殖和培养

[0055] 根据本公开内容的多能干细胞的分化可以使用任何合适的多能干细胞作为起始原料来进行。在一个实施方案中,可以在人胚胎干细胞(hESC)系上进行方法。在另一个实施方案中,可以使用诱导多能干细胞(iPSC)进行方法。在另一个实施方案中,可以使用衍生自H1、H7、H9、H13或H14细胞系的细胞进行方法。在另一个实施方案中,可以在灵长类动物多能干(pPS)细胞系上进行方法。在又一个实施方案中,可以使用衍生自单性生殖生物的未分化

干细胞来进行方法,所述单性生殖生物是在未受精的情况下被刺激以产生hESC的胚胎。

[0056] 先前已经描述了未分化的多能干细胞的繁殖和培养方法。关于多能干细胞的组织和细胞培养,读者可能希望参考本领域可获得的众多出版物中的任何出版物,例如 *Teratocarcinomas and Embryonic Stemcells:A Practical Approach* (E.J.Robertson, Ed., IRL Press Ltd.1987); *Guide to Techniques in Mouse Development* (P.M.Wasserman等人,Eds., Academic Press 1993); *Embryonic Stem Cell Differentiation in vitro* (M.V.Wiles, *Meth.Enzymol.*225:900,1993); *Properties and Uses of Embryonic Stem Cells:Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy* (P.D.Rathjen等人, *Reprod.Fertil.Dev.*10:31,1998;和R.I.Freshney, *Culture of Animal Cells*, Wiley-Liss, New York, 2000)。

[0057] 未分化的多能干细胞可以维持在未分化状态而无需添加饲养细胞(参见,例如,(2004)Rosler等人, *Dev.Dynam.*229:259)。无饲养层培养物通常由包含促进细胞增殖而不分化的因子的营养培养基支持(参见,例如,美国专利号6,800,480)。在一个实施方案中,可以使用包含此类因子的条件培养基。条件培养基可以通过将培养基与分泌此类因子的细胞一起培养来获得。合适的细胞包括但不限于辐照的($\sim 4,000\text{Rad}$)原代小鼠胚胎成纤维细胞、端粒化的小鼠成纤维细胞或衍生自pPS细胞的成纤维细胞样细胞(美国专利号6,642,048)。可以通过在无血清培养基(例如补充有20%血清替代品和4ng/mL bFGF的敲除DMEM)中铺板饲养层来适应培养基。已适应了1-2天的培养基可以补充其他bFGF,并用于支持pPS细胞培养1-2天(参见例如W0 01/51616;Xu等人,(2001)*Nat.Biotechnol.*19:971)。

[0058] 可替代地,可以使用新鲜的或未适应的培养基,其已补充有促进细胞以未分化形式增殖的其他因子(例如成纤维细胞生长因子或毛喉素)。非限制性实例包括补充有40-80ng/mL bFGF和任选地包含SCF(15ng/mL)或Flt3配体(75ng/mL)的基础培养基,例如X-VIVOTM10(Lonza,Walkersville,MD)或QBSFTM-60(Quality Biological Inc.Gaithersburg,Md.)(参见例如Xu等人,(2005)*Stem Cells* 23(3):315)。这些培养基制剂具有支持细胞以相比其他系统的2-3倍的速率生长的优点(参见,例如,W0 03/020920)。在一个实施方案中,可以在包含bFGF和TGF β 的培养基中培养未分化的多能细胞,例如hES细胞。bFGF的非限制性实例浓度包括约80ng/ml。TGF β 的非限制性实例浓度包括约0.5ng/ml。在又一个实施方案中,未分化的多能干细胞可以维持在可商购获得的完全培养基中,例如mTeSRTM(Stem Cell Technologies,Vancouver,Canada)。

[0059] 可以在饲养细胞层上培养未分化的多能细胞,所述饲养细胞通常是衍生自胚胎或胎儿组织的成纤维细胞(Thomson等人,(1998)*Science* 282:1145)。饲养细胞可以衍生自人或鼠来源。可以从各种人组织中分离出人饲养细胞,或者可以通过使人胚胎干细胞分化为成纤维细胞来衍生人饲养细胞(参见,例如,W0 01/51616)。可以使用的人饲养细胞包括但不限于胎盘成纤维细胞(参见,例如,Genbacev等人,(2005)*Fertil.Steril.*83(5):1517),输卵管上皮细胞(参见,例如,Richards等人,(2002)*Nat.Biotechnol.*,20:933),包皮成纤维细胞(参见,例如Amit等人,(2003)*Biol.Reprod.*68:2150)和子宫内膜细胞(参见,例如Lee等人,(2005)*Biol.Reprod.*72(1):42)。

[0060] 各种固体表面可用于培养未分化的多能细胞。这些固体表面包括但不限于标准的可商购获得的组织培养瓶或细胞培养板,例如6孔、24孔、96孔或144孔板。其他固体表面包

包括但不限于微载体和盘。适用于生长未分化的多能细胞的固体表面可以由多种物质制成,包括但不限于玻璃或塑料,例如聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚碳酸酯、聚四氟乙烯、聚酯薄膜(melinex)、thermanox或其组合。合适的表面可包含一种或多种聚合物,例如一种或多种丙烯酸酯。固体表面可以是三维形状。三维固体表面的非限制性示例先前已被描述,例如在美国专利公开号2005/0031598中。

[0061] 未分化的干细胞也可以在没有饲养层的条件下在生长基底上生长。生长基底可以是**Matrigel®**基质(例如,**Matrigel®**, **Matrigel®GFR**)、重组层粘连蛋白、层粘连蛋白-511重组片段E8或玻连蛋白。在本公开内容的某些实施方案中,生长基底是重组人层粘连蛋白-521(Biolamina, Sweden, 由Corning Inc., Corning, NY分发)。在其他实施方案中,基底是合成基底,诸如,例如**Synthemax®-II** SC基底。

[0062] 未分化的干细胞可以使用多种方法(例如使用胶原酶,或例如手动刮取)传代或继代培养。未分化的干细胞可以通过产生单细胞悬浮液的酶促手段(例如使用**Accutase®**(由Sigma Aldrich, MO分发)或类似的胰蛋白酶)继代培养。可替代地,未分化的干细胞可以使用非酶促手段(例如PBS中的0.5mM EDTA,或例如使用ReLeSR™(Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada))继代培养。

[0063] 在一个实施方案中,将多个未分化的干细胞以允许细胞在约三至约十天内达到汇合的接种密度进行接种或继代培养。在一个实施方案中,接种密度可以为约 6.0×10^3 个细胞/cm²至约 5.0×10^5 个细胞/cm²,例如约 1.0×10^4 个细胞/cm²,例如约 5.0×10^4 个细胞/cm²,例如约 1.0×10^5 个细胞/cm²,或例如约 3.0×10^5 个细胞/cm²生长表面。在另一个实施方案中,接种密度可以为约 6.0×10^3 个细胞/cm²至约 1.0×10^4 个细胞/cm²生长表面,例如约 6.0×10^3 个细胞/cm²至约 9.0×10^3 个细胞/cm²,例如约 7.0×10^3 个细胞/cm²至约 1.0×10^4 个细胞/cm²,例如约 7.0×10^3 个细胞/cm²至约 9.0×10^3 个细胞/cm²,或例如约 7.0×10^3 个细胞/cm²至约 8.0×10^3 个细胞/cm²生长表面。在又一个实施方案中,接种密度可以为约 1.0×10^4 个细胞/cm²至约 1.0×10^5 个细胞/cm²生长表面,例如约 2.0×10^4 个细胞/cm²至约 9.0×10^4 个细胞/cm²,例如约 3.0×10^4 个细胞/cm²至约 8.0×10^4 个细胞/cm²,例如约 4.0×10^4 个细胞/cm²至约 7.0×10^4 个细胞/cm²,或例如约 5.0×10^4 个细胞/cm²至约 6.0×10^4 个细胞/cm²生长表面。在一个实施方案中,接种密度可以为约 1.0×10^5 个细胞/cm²至约 5.0×10^5 个细胞/cm²生长表面,例如约 1.0×10^5 个细胞/cm²至约 4.5×10^5 个细胞/cm²,例如约 1.5×10^5 个细胞/cm²至约 4.0×10^5 个细胞/cm²,例如约 2.0×10^5 个细胞/cm²至约 3.5×10^5 个细胞/cm²,或例如约 2.5×10^5 个细胞/cm²至约 3.0×10^5 个细胞/cm²生长表面。

[0064] 根据本公开内容的方法,可以使用多种合适的细胞培养和继代培养技术中的任一种来培养干细胞。例如,可以每天完全更换培养基,在细胞继代培养后约2天开始。在一个实施方案中,当培养物达到约90%的集落覆盖率时,可以使用一种或多种合适的试剂例如**Accutase®**(以实现单细胞悬浮液用于定量)分离细胞并将其接种用于进行随后的培养。在一个实施方案中,然后可以在将细胞以允许细胞在合适的时间段(例如,约三至十天)内达到汇合的接种密度接种在合适的生长基底(例如重组人层粘连蛋白-521)上之前继代培养未分化的干细胞。在一个实施方案中,未分化的干细胞可以使用胶原酶IV继代培养并在重组层粘连蛋白上扩增。在另一个实施方案中,未分化的干细胞可以使用胶原酶IV继代培养,并在**Matrigel®**上扩增。在一个实施方案中,未分化的干细胞可以使用ReLeSR™继代培

养,并在重组人层粘连蛋白-521上扩增。

[0065] 对于接种未分化的干细胞,接种密度可以为约 6.0×10^3 个细胞/ cm^2 至约 5.0×10^5 个细胞/ cm^2 ,例如约 1.0×10^4 个细胞/ cm^2 ,例如约 5.0×10^4 个细胞/ cm^2 ,例如约 1.0×10^5 个细胞/ cm^2 ,或例如约 3.0×10^5 个细胞/ cm^2 生长表面。在另一个实施方案中,接种密度可以为约 6.0×10^3 个细胞/ cm^2 至约 1.0×10^4 个细胞/ cm^2 生长表面,例如约 6.0×10^3 个细胞/ cm^2 至约 9.0×10^3 个细胞/ cm^2 ,例如约 7.0×10^3 个细胞/ cm^2 至约 1.0×10^4 个细胞/ cm^2 ,例如约 7.0×10^3 个细胞/ cm^2 至约 9.0×10^3 个细胞/ cm^2 ,或例如约 7.0×10^3 个细胞/ cm^2 至约 8.0×10^3 个细胞/ cm^2 生长表面。在又一个实施方案中,接种密度可以为约 1.0×10^4 个细胞/ cm^2 至约 1.0×10^5 个细胞/ cm^2 生长表面,例如约 2.0×10^4 个细胞/ cm^2 至约 9.0×10^4 个细胞/ cm^2 ,例如约 3.0×10^4 个细胞/ cm^2 至约 8.0×10^4 个细胞/ cm^2 ,例如约 4.0×10^4 个细胞/ cm^2 至约 7.0×10^4 个细胞/ cm^2 ,或例如约 5.0×10^4 个细胞/ cm^2 至约 6.0×10^4 个细胞/ cm^2 生长表面。在一个实施方案中,接种密度可以为约 1.0×10^5 个细胞/ cm^2 至约 5.0×10^5 个细胞/ cm^2 生长表面,例如约 1.0×10^5 个细胞/ cm^2 至约 4.5×10^5 个细胞/ cm^2 ,例如约 1.5×10^5 个细胞/ cm^2 至约 4.0×10^5 个细胞/ cm^2 ,例如约 2.0×10^5 个细胞/ cm^2 至约 3.5×10^5 个细胞/ cm^2 ,或例如约 2.5×10^5 个细胞/ cm^2 至约 3.0×10^5 个细胞/ cm^2 生长表面。

[0066] 未分化多能干细胞的神经诱导

[0067] 本公开内容提供了使用TGF β /激活素/Nodal信号传导和BMP信号传导的小分子和蛋白调节剂将多能干细胞分化为神经外胚层并进一步分化为神经胶质祖细胞和OPC的方法。不受任何特定理论的束缚,发明人发现起始材料多能干细胞可以在动态悬浮液中聚集成非EB聚集体,其中多能干细胞保持未分化状态,随后可以在动态悬浮液中通过使用TGF β /激活素/Nodal信号传导的一种或多种抑制剂和BMP信号传导的一种或多种抑制剂(双重SMAD抑制)诱导聚集体分化为神经外胚层。与贴壁培养和基于EB的方法相比,动态悬浮液提供了可扩展、可重现和可控制的过程用于从起始材料产生大量细胞。本文详细描述了动态悬浮液中双重SMAD抑制的方法。

[0068] 在一个实施方案中,一种方法包括在TGF β /激活素/Nodal信号传导的一种或多种抑制剂和BMP信号传导的一种或多种抑制剂的存在下,在动态悬浮液中培养已形成小的非EB聚集体但保持未分化的未分化干细胞,从而开始神经诱导。在某些实施方案中,TGF β /激活素/Nodal信号传导的抑制剂是小分子。在其他实施方案中,TGF β /激活素/Nodal信号传导的抑制剂是蛋白质。在一些实施方案中,TGF β /激活素/Nodal信号传导的抑制剂的直接靶标是ALK5,也称为I型TGF β 受体(TGF β R1)。在某些实施方案中,BMP信号传导的抑制剂是小分子。在其他实施方案中,BMP信号传导的抑制剂是蛋白质。在一些实施方案中,BMP信号传导的抑制剂的直接靶标是ALK2,也称为I型激活素A受体(ACVR1)。在某些实施方案中,在双重SMAD抑制之后,在一种或多种Smoothened受体激动剂和视黄酸的存在下在动态悬浮液中培养所得的细胞。

[0069] 在某些实施方案中,TGF β /激活素/Nodal信号传导的抑制剂可以选自SB431542、LY2157299、GW788388、A-77-01、A-83-01和SB505124及其衍生物。在某些实施方案中,BMP信号传导的抑制剂可以选自Dorsomorphin、DMH-1、K02288、ML3467、LDN193189和Noggin蛋白。在某些实施方案中,Smoothened激动剂可以选自Purmorphamine、SAG(CAS 364590-63-6)、SSH蛋白及其衍生物。

[0070] 在一个实施方案中,一种方法包括获得包含保持未分化状态的多能干细胞的非EB聚集体;在小分子SB431542和Dorsomorphin的存在下,在动态悬浮液中将非EB聚集体培养第一时间段;以及然后在存在Smoothened激动剂和视黄酸的情况下,在动态悬浮液中将聚集体培养第二时间段,如图1所示。在一个实施方案中,第一时间段和第二时间段可以各自为约1至约四天,例如约一天,例如约两天,例如约三天,例如约四天。

[0071] 在一个实施方案中,一种方法包括在SB431542的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,SB431542的浓度为约1 μ M至约100 μ M,例如约5 μ M,约10 μ M,例如约15 μ M,例如约20 μ M,例如约25 μ M,例如约30 μ M,例如约35 μ M,例如约40 μ M,例如约45 μ M,例如约50 μ M,例如约55 μ M,例如约60 μ M,例如约65 μ M,例如约70 μ M,例如约75 μ M,例如约80 μ M,例如约85 μ M,例如约90 μ M,或例如约95 μ M。在另一个实施方案中,一种方法包括在SB431542的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,SB431542的浓度为约1 μ M至约20 μ M,例如约1 μ M至约13 μ M,例如约8 μ M至约20 μ M,例如约8 μ M至约13 μ M,或例如约9 μ M至约11 μ M。在又一个实施方案中,一种方法包括在SB431542的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,SB431542的浓度为约20 μ M至约40 μ M,例如约20 μ M至约33 μ M,例如约28 μ M至约40 μ M,例如约28 μ M至约33 μ M,或例如约29 μ M至约31 μ M。在一个实施方案中,一种方法包括在SB431542的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,SB431542的浓度为约40 μ M至约60 μ M,例如约40 μ M至约53 μ M,例如约48 μ M至约55 μ M,例如约48 μ M至约53 μ M,或例如约49 μ M至约51 μ M。在一个实施方案中,一种方法包括在SB431542的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,SB431542的浓度为约60 μ M至约80 μ M,例如约60 μ M至约73 μ M,例如约68 μ M至约75 μ M,例如约68 μ M至约73 μ M,或例如约69 μ M至约71 μ M。在一个实施方案中,一种方法包括在SB431542的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,SB431542的浓度为约80 μ M至约100 μ M,例如约80 μ M至约93 μ M,例如约88 μ M至约95 μ M,例如约88 μ M至约93 μ M,或例如约89 μ M至约91 μ M。在一个实施方案中,一种方法包括在SB431542的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,SB431542的浓度为约10 μ M。

[0072] 在一个实施方案中,一种方法包括在ALK5抑制剂的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,ALK5抑制剂的浓度为约250nM至约250 μ M,例如约1 μ M、约10 μ M、50 μ M、约100 μ M、约150 μ M或约200 μ M。在一个实施方案中,一种方法包括在约10 μ M的ALK5抑制剂的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体。

[0073] 在一个实施方案中,一种方法包括在LY364947的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,LY364947的浓度为约250nM至约250 μ M,例如约1 μ M、约10 μ M、约50 μ M、约100 μ M、约150 μ M或约200 μ M。在一个实施方案中,一种方法包括在约10 μ M的LY364947的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体。

[0074] 在一个实施方案中,一种方法包括在GW788388的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,GW788388的浓度为约250nM至约250 μ M,例如约1 μ M、约10 μ M、约50 μ M、约100 μ M、约150 μ M或约200 μ M。在一个实施方案中,一种方法包括在约10 μ M的GW788388的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体。

[0075] 在一个实施方案中,一种方法包括在A-77-01的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,A-77-01的浓度为约250nM至约250 μ M,例如约1 μ M、约10 μ M、约50 μ M、约100 μ M、约150 μ M或约200 μ M。在一个实施方案中,一种方法包括在约10 μ M的A-77-01的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体。

[0076] 在一个实施方案中,一种方法包括在A-83-01的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,A-83-01的浓度为约250nM至约250 μ M,例如约1 μ M、约10 μ M、约50 μ M、约100 μ M、约150 μ M或约200 μ M。在一个实施方案中,一种方法包括在约10 μ M的A-83-01的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体。

[0077] 在一个实施方案中,一种方法包括在SB505124的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,SB505124的浓度为约250nM至约250 μ M,例如约1 μ M、约10 μ M、约50 μ M、约100 μ M、约150 μ M或约200 μ M。在一个实施方案中,一种方法包括在约10 μ M的SB505124的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体。

[0078] 在一个实施方案中,一种方法包括在Dorsomorphin的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,Dorsomorphin的浓度为约0.2 μ M至约20 μ M,例如约0.5 μ M,例如约0.8 μ M,例如约1 μ M,例如约1.5 μ M,例如约2 μ M,例如约2.5 μ M,例如约3 μ M,例如约3.5 μ M,例如约4 μ M,例如约4.5 μ M,例如约5 μ M,例如约5.5 μ M,例如约6 μ M,例如约6.5 μ M,例如约7 μ M,例如约7.5 μ M,例如约8 μ M,例如约8.5 μ M,例如约9 μ M,例如约10 μ M,例如约11 μ M,例如约12 μ M,例如约13 μ M,例如约14 μ M,例如约15 μ M,例如约16 μ M,例如约17 μ M,例如约18 μ M,或例如约19 μ M。在另一个实施方案中,一种方法包括在Dorsomorphin的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,Dorsomorphin的浓度为约0.2 μ M至约1 μ M,例如约0.2 μ M至约0.9 μ M,例如约0.3 μ M至约0.8 μ M,例如约0.4 μ M至约0.7 μ M,或例如约0.5 μ M至约0.6 μ M。在又一个实施方案中,一种方法包括在Dorsomorphin的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,Dorsomorphin的浓度为约1 μ M至约10 μ M,例如约1 μ M至约9 μ M,例如约2 μ M至约8 μ M,例如约3 μ M至约7 μ M,或例如约4 μ M至约6 μ M。在一个实施方案中,一种方法包括在Dorsomorphin的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,Dorsomorphin的浓度为约10 μ M至约20 μ M,例如约10 μ M至约19 μ M,例如约12 μ M至约18 μ M,例如约13 μ M至约17 μ M,或例如约14 μ M至约16 μ M。在一个实施方案中,一种方法包括在Dorsomorphin的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,Dorsomorphin的浓度为约2 μ M。

[0079] 在一个实施方案中,一种方法包括在ALK2抑制剂的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,ALK2抑制剂的浓度为约1nM至约20 μ M,例如约10nM、约50nM、约100nM、约150nM、约200nM、约500nM、约1 μ M、约5 μ M、约10 μ M或约15 μ M。

[0080] 在一个实施方案中,一种方法包括在约1 μ M至约10 μ M的浓度的DMH-1的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体。在一个实施方案中,一种方法包括在约2 μ M的DMH-1的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体。

[0081] 在一个实施方案中,一种方法包括在约1 μ M至约10 μ M的浓度的K02288的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体。在一个实施方案中,一种方法包括在约2 μ M的K02288的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体。

[0082] 在一个实施方案中,一种方法包括在约1 μ M至约10 μ M的浓度的ML347的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体。在一个实施方案中,一种方法包括在约2 μ M的ML347的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体。

[0083] 在一个实施方案中,一种方法包括在Purmorphamine的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,Purmorphamine的浓度为约0.05 μ M至约5 μ M,例如约0.08 μ M,例如约0.1 μ M,例如约0.2 μ M,例如约0.3 μ M,例如约0.4 μ M,例如约0.5 μ M,例如约0.6 μ M,例如约0.7 μ M,例如约0.8 μ M,例如约0.9 μ M,例如约1 μ M,例如约2 μ M,例如约3 μ M,例如约4 μ M。在另一个实施方案中,

一种方法包括在Purmorphamine的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,Purmorphamine的浓度为约0.05 μ M至约0.1 μ M,例如约0.06 μ M至约0.09 μ M,或例如约0.07 μ M至约0.08 μ M。在另一个实施方案中,一种方法包括在Purmorphamine的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,Purmorphamine的浓度为约0.1 μ M至约1 μ M,例如约0.2 μ M至约0.9 μ M,例如约0.3 μ M至约0.8 μ M,例如约0.4 μ M至约0.7 μ M,或例如约0.5 μ M至约0.6 μ M。在另一个实施方案中,一种方法包括在Purmorphamine的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,Purmorphamine的浓度为约1 μ M至约5 μ M,例如约1 μ M至约4 μ M,例如约2 μ M至约5 μ M,或例如约2 μ M至约4 μ M。在一个实施方案中,一种方法包括在约0.5 μ M的浓度的Purmorphamine的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体。

[0084] 在一个实施方案中,一种方法包括在Smoothened激动剂的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,Smoothened激动剂的浓度为约2.5nM至约5 μ M,例如约50nM、约100nM、约250nM、约500nM、约750nM、约1 μ M或约2.5 μ M。

[0085] 在一个实施方案中,一种方法包括在SAG的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,SAG的浓度为约10nM至约1 μ M,例如约10nM至约100nM,例如约100nM至约500nM,或例如约500nM至约1000nM。在一个实施方案中,一种方法包括在约0.5 μ M的SAG的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体。

[0086] 在一个实施方案中,一种方法包括在SHH蛋白的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体,SHH蛋白的浓度为约2.5nM至约250nM,例如约2.5nM至约10nM,例如约10nM至约100nM,或例如约100nM至约250nM。在一个实施方案中,一种方法包括在约25nM的SHH蛋白的存在下在动态悬浮液中培养非EB聚集体。

[0087] 适用于动态悬浮培养的任何细胞培养容器或反应器均可用于本公开内容中设想的分化步骤。容器壁通常对培养细胞的粘附是惰性的或具有抵抗力。还有防止细胞沉降的手段,例如搅拌机制,如磁力或机械驱动的搅拌棒或桨,摇动机制(通常由外部连接到容器)或反转机制(即,旋转容器以改变细胞上的重力方向的装置)。

[0088] 适用于过程开发的悬浮培养的容器包括可商购获得的旋转器、摇动袋或摇瓶的常用范围。适用于商业化生产的示例性生物反应器包括VerticalWheelTM生物反应器(PBS Biotech,Camarillo,CA)。

[0089] OPC组合物

[0090] 本公开内容的方法可用于获得适于细胞疗法的包含少突胶质祖细胞(OPC)的组合物。根据本公开内容获得的OPC表达高水平的OPC的蛋白聚糖NG2特征和低水平的与非期望的细胞类型相关的非OPC标志物,例如CD49f,其可以由神经祖细胞和上皮细胞两者表达,并且与体外囊肿形成相关(Debnath J,Muthuswamy SK,Brugge JS.Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures.2003Methods.3:256-68)或CLDN6和EpCAM,由多能细胞和上皮细胞两者表达的两个标志物(Lin D,Guo Y,Li Y,Ruan Y,Zhang M,Jin X,Yang M,Lu Y,Song P,Zhao S,Dong B,Xie Y,Dang Q,Quan C.Bioinformatic analysis reveals potential properties of human Claudin-6regulation and functions.Oncol Rep.2017Aug;38(2):875-885;Huang L,Yang Y,Yang F,Liu S,Zhu Z,Lei Z,Guo J.Functions of EpCAM in physiological processes and diseases(Review).Int J

Mol Med.2018Oct;42(4):1771-1785)。

[0091] 在某些实施方案中,根据本公开内容产生的OPC是人多能干细胞的体外分化的后代。在某些实施方案中,根据本公开内容获得的OPC是人胚胎干细胞的体外分化的后代。在其他实施方案中,根据本公开内容获得的OPC是诱导多能干(iPS)细胞的体外分化的后代。

[0092] 可以通过使用流式细胞术对各种细胞标志物进行定量来确定获得的OPC群体的一个或多个特征,例如以确定对特定标志物或一组标志物阳性的细胞群的百分比,或者鉴定存在于OPC群体中的非期望的细胞类型。在一个实施方案中,根据本发明的方法制备的OPC表达选自NG2、PDGFR α 和GD3的一种或多种标志物。

[0093] 根据本公开内容获得的OPC群体可以包含约30%至约100%的NG2阳性细胞,例如至少约35%,例如至少约40%,例如至少约45%,例如至少约50%,例如至少约55%,例如至少约60%,例如至少约65%,例如至少约70%,例如至少约75%,例如至少约80%,例如至少约85%,例如至少约90%,例如至少约95%,例如至少约98%,例如至少约99%,例如至少约99.5%,例如至少约99.8%,或例如至少约99.9%的NG2阳性细胞。在某些实施方案中,根据本公开内容获得的OPC群体可包含约45%至约75%的NG2阳性细胞,例如约45%至约50%,例如约50%至约55%,例如约55%至约60%,例如约60%至约65%,例如约65%至约70%,例如约70%至约75%,例如约50%至约70%,例如约55%至约65%,或例如约58%至约63%的NG2阳性细胞。在其他实施方案中,根据本公开内容获得的OPC群体可以包含约60%至约90%的NG2阳性细胞,例如约60%至约65%,例如约65%至约70%的阳性细胞。根据本公开内容获得的OPC群体可以包含约30%至约100%的PDGFR α 阳性细胞,例如至少约35%,例如至少约40%,例如至少约45%,例如至少约50%,例如至少约55%,例如至少约60%,例如至少约65%,例如至少约70%,例如至少约75%,例如至少约80%,例如至少约85%,例如至少约90%,例如至少约95%,例如至少约98%,例如至少约99%,例如至少约99.5%,例如至少约99.8%,或例如至少约99.9%的PDGFR α 阳性细胞。在某些实施方案中,根据本公开内容获得的OPC群体可包含约45%至约75%的PDGFR α 阳性细胞,例如约45%至约50%,例如约50%至约55%,例如约55%至约60%,例如约60%至约65%,例如约65%至约70%,例如约70%至约75%,例如约50%至约70%,例如约55%至约65%,或例如约58%至约63%的PDGFR α 阳性细胞。在其他实施方案中,根据本公开内容获得的OPC群体可包含约60%至约90%的PDGFR α 阳性细胞,例如约60%至约65%,例如约65%至约70%的阳性细胞。根据本公开内容获得的OPC群体可以包含约30%至约100%的GD3阳性细胞,例如至少约35%,例如至少约40%,例如至少约45%,例如至少约50%,例如至少约55%,例如至少约60%,例如至少约65%,例如至少约70%,例如至少约75%,例如至少约80%,例如至少约85%,例如至少约90%,例如至少约95%,例如至少约98%,例如至少约99%,例如至少约99.5%,例如至少约99.8%,或例如至少约99.9%的GD3阳性细胞。在某些实施方案中,根据本公开内容获得的OPC群体可以包含约45%至约75%的GD3阳性细胞,例如约45%至约50%,例如约50%至约55%,例如约55%至约60%,例如约60%至约65%,例如约65%至约70%,例如约70%至约75%,例如约50%至约70%,例如约55%至约65%,或例如约58%至约63%的GD3阳性细胞。在其他实施方案中,根据本公开内容获得的OPC群体可以包含约60%至约90%的GD3阳性细胞,例如约60%至约65%,例如约65%至约70%的阳性细胞。

[0094] 在一个实施方案中,根据本公开内容获得的OPC群体能够在如本公开内容的实施

例8中所述的囊肿测定中每100,000个细胞形成少于或等于四个上皮囊肿。在另一个实施方案中,根据本公开内容获得的OPC群体能够在囊肿测定中每100,000个细胞形成少于或等于三个上皮囊肿。在另一个实施方案中,根据本公开内容获得的OPC群体能够在囊肿测定中每100,000个细胞形成少于或等于两个上皮囊肿。在又一个实施方案中,根据本公开内容获得的OPC群体能够在如本公开内容的实施例8中所述的囊肿测定中每100,000个细胞形成少于或等于一个上皮囊肿。

[0095] 非期望的细胞类型

[0096] 根据本公开内容获得的OPC群体含有低水平的非期望的细胞类型,例如通过流式细胞术量化与非期望的细胞类型相关的标志物所测量的。在非限制性实例中,根据本公开内容获得的第42天的OPC包含0%至4%的表达上皮细胞相关标志物EpCAM、CD49f和CLDN6的细胞(实施例5,表2)。

[0097] 与非期望的细胞类型相关的标志物可以包括小于约20%的非期望的细胞类型,例如小于约19%,例如小于约18%,例如小于约17%,例如小于约16%,例如小于约15%,例如小于约14%,例如小于约13%,例如小于约12%,例如小于约11%,例如小于约10%,例如小于约9%,例如小于约8%,例如小于约7%,例如小于约6%,例如小于约5%,例如小于约4%,例如小于约3%,例如小于约2%,例如小于约1%,例如小于约0.5%,例如小于约0.1%,例如小于约0.05%,或例如小于约0.01%的非期望的细胞类型。在另一个实施方案中,细胞群可包含约15%至约20%的非期望的细胞类型,例如约19%至约20%,例如约18%至约20%,例如约17%至约20%,例如约16%至约20%,例如约15%至约19%,或例如约16%至约18%的非期望的细胞类型。在又一个实施方案中,细胞群可包含约10%至约15%的非期望的细胞类型,例如约14%至约15%,例如约13%至约15%,例如约12%至约15%,例如约11%至约15%,或例如约12%至约14%的非期望的细胞类型。在一个实施方案中,细胞群可包含约1%至约10%的非期望的细胞类型,例如约2%至约10%,例如约1%至约9%,例如约2%至约8%,例如约3%至约7%,或例如约4%至约6%的非期望的细胞类型。在一个实施方案中,细胞群可包含约0.1%至约1%的非期望的细胞类型,例如约0.2%至约1%,例如约0.1%至约0.9%,例如约0.2%至约0.8%,例如约0.3%至约0.7%,或例如约0.4%至约0.6%的非期望的细胞类型。在一个实施方案中,细胞群可包含约0.01%至约0.1%的非期望的细胞类型,例如约0.02%至约0.1%,例如约0.01%至约0.09%,例如约0.02%至约0.08%,例如约0.03%至约0.07%,或例如约0.04%至约0.06%的非期望的细胞类型。在一个实施方案中,低水平的非期望的细胞类型可以表示存在小于约15%的非期望的细胞类型。

[0098] 在一个实施方案中,非期望的细胞类型可以包括表达选自CD49f、CLDN6或EpCAM的一种或多种标志物的细胞。

[0099] 制剂

[0100] 根据本公开内容的OPC组合物可以进一步包含药学上可接受的载体。在一个实施方案中,药学上可接受的载体可以包含二甲基亚砜(DMSO)。在一个实施方案中,药学上可接受的载体不包含二甲基亚砜。在一个实施方案中,组合物可适于在-80°C至-195°C或低于-80°C至-195°C的温度下冷冻保存。

[0101] 根据本公开内容的OPC组合物可以配制成用于通过直接注射到受试者的脊髓中来

施用。在一个实施方案中,根据本公开内容的OPC组合物可以被配制用于脑内、心室内、鞘内、鼻内或脑池内施用至受试者。在一个实施方案中,根据本公开内容的OPC组合物可以配制成用于通过直接注射到受试者的脑中的梗塞腔或紧邻受试者的脑中的梗塞腔直接注射来施用。在一个实施方案中,根据本公开内容的组合物可以配制成用于通过植入施用。在一个实施方案中,根据本公开内容的组合物可以配制为溶液。

[0102] 根据本公开内容的OPC组合物可包含约 1×10^6 至约 5×10^8 个细胞/毫升,例如约 1×10^6 个细胞/毫升,例如约 2×10^6 个细胞/毫升,例如约 3×10^6 个细胞/毫升,例如约 4×10^6 个细胞/毫升,例如约 5×10^6 个细胞/毫升,例如约 6×10^6 个细胞/毫升,例如约 7×10^6 个细胞/毫升,例如约 8×10^6 个细胞/毫升,例如约 9×10^6 个细胞/毫升,例如约 1×10^7 个细胞/毫升,例如约 2×10^7 个细胞/毫升,例如约 3×10^7 个细胞/毫升,例如约 4×10^7 个细胞/毫升,例如约 5×10^7 个细胞/毫升,例如约 6×10^7 个细胞/毫升,例如约 7×10^7 个细胞/毫升,例如约 8×10^7 个细胞/毫升,例如约 9×10^7 个细胞/毫升,例如约 1×10^8 个细胞/毫升,例如约 2×10^8 个细胞/毫升,例如约 3×10^8 个细胞/毫升,例如约 4×10^8 个细胞/毫升,或例如约 5×10^8 个细胞/毫升。在另一个实施方案中,根据本公开内容的组合物可包含约 1×10^8 至约 5×10^8 个细胞/毫升,例如约 1×10^8 至约 4×10^8 个细胞/毫升,例如约 2×10^8 至约 5×10^8 个细胞/毫升,例如约 1×10^8 至约 3×10^8 个细胞/毫升,例如约 2×10^8 至约 4×10^8 个细胞/毫升,或例如约 3×10^8 至约 5×10^8 个细胞/毫升。在又一个实施方案中,根据本公开内容的组合物可以包含约 1×10^7 至约 1×10^8 个细胞/毫升,例如约 2×10^7 至约 9×10^7 个细胞/毫升,例如约 3×10^7 至约 8×10^7 个细胞/毫升,例如约 4×10^7 至约 7×10^7 个细胞/毫升,或例如约 5×10^7 至约 6×10^7 个细胞/毫升。在一个实施方案中,根据本公开内容的组合物可包含约 1×10^6 至约 1×10^7 个细胞/毫升,例如约 2×10^6 至约 9×10^6 个细胞/毫升,例如约 3×10^6 至约 8×10^6 个细胞/毫升,例如约 4×10^6 至约 7×10^6 个细胞/毫升,或例如约 5×10^6 至约 6×10^6 个细胞/毫升。在又一个实施方案中,根据本公开内容的组合物可以包含至少约 1×10^6 个细胞/毫升,例如至少约 2×10^6 个细胞/毫升,例如至少约 3×10^6 个细胞/毫升,例如至少约 4×10^6 个细胞/毫升,例如至少约 5×10^6 个细胞/毫升,例如至少约 6×10^6 个细胞/毫升,例如至少约 7×10^6 个细胞/毫升,例如至少约 8×10^6 个细胞/毫升,例如至少约 9×10^6 个细胞/毫升,例如至少约 1×10^7 个细胞/毫升,例如至少约 2×10^7 个细胞/毫升,例如至少约 3×10^7 个细胞/毫升,例如至少约 4×10^7 个细胞/毫升,或例如至少约 5×10^7 个细胞/毫升。在一个实施方案中,根据本公开内容的组合物可包含多至约 1×10^8 个细胞或更多,例如多至约 2×10^8 个细胞/毫升或更多,例如多至约 3×10^8 个细胞/毫升或更多,例如多至约 4×10^8 个细胞/毫升或更多,例如多至约 5×10^8 个细胞/毫升或更多,或例如多至约 6×10^8 个细胞/毫升。

[0103] 在一个实施方案中,根据本公开内容的OPC组合物可以包含约 4×10^7 至约 2×10^8 个细胞/毫升。

[0104] 在另一个实施方案中,根据本公开内容的OPC组合物可以具有约10微升至约5毫升的体积,例如约20微升,例如约30微升,例如约40微升,例如约50微升,例如约60微升,例如约70微升,例如约80微升,例如约90微升,例如约100微升,例如约200微升,例如约300微升,例如约400微升,例如约500微升,例如约600微升,例如约700微升,例如约800微升,例如约900微升,例如约1毫升,例如约1.5毫升,例如约2毫升,例如约2.5毫升,例如约3毫升,例如约3.5毫升,例如约4毫升,或例如约4.5毫升。在一个实施方案中,根据本公开内容的组合物

可具有约10微升至约100微升的体积,例如约20微升至约90微升,例如约30微升至约80微升,例如约40微升至约70微升,或例如约50微升至约60微升。在另一个实施方案中,根据本公开内容的组合物可具有约100微升至约1毫升的体积,例如约200微升至约900微升,例如约300微升至约800微升,例如约400微升至约700微升,或例如约500微升至约600微升。在又一个实施方案中,根据本公开内容的组合物可以具有约1毫升至约5毫升的体积,例如约2毫升至约5毫升,例如约1毫升至约4毫升,例如约1毫升至约3毫升,例如约2毫升至约4毫升,或例如约3毫升至约5毫升。在一个实施方案中,根据本公开内容的OPC组合物可以具有约20微升至约500微升的体积。在另一个实施方案中,根据本公开内容的OPC组合物可以具有约50微升至约100微升的体积。在又一个实施方案中,根据本公开内容的OPC组合物可以具有约50微升至约200微升的体积。在另一个实施方案中,根据本公开内容的OPC组合物可以具有约20微升至约400微升的体积。在一个实施方案中,根据本公开内容的OPC组合物可以在容器中,该容器被配置用于冷冻保存或用于向有此需要的受试者施用。在一个实施方案中,容器可以是预填充的注射器。

[0105] 使用方法

[0106] 根据本公开内容获得的OPC组合物可以用于细胞疗法中以改善需要治疗的受试者中的一种或多种神经功能。在一个实施方案中,可以将根据本公开内容的OPC细胞群注射或植入到需要其的受试者中。在一个实施方案中,可以将根据本公开内容的细胞群植入到需要其的受试者中以用于治疗脊髓损伤、中风或多发性硬化。

[0107] 在一个实施方案中,根据本公开内容的细胞群能够在受试者的植入部位处诱导裸露的轴突的髓鞘形成。在一个实施方案中,根据本公开内容的方法产生的细胞群可以表现出改善的植入和迁移能力。在一个实施方案中,根据本公开内容的方法产生的细胞群可以能够改善受试者中神经组织的损伤后修复或再生。

[0108] 根据本公开内容的细胞群可以能够在将群体植入受试者后改善需要治疗的受试者的感觉功能。可以使用脊髓损伤神经分类的国际标准(ISNCSCI)测验来评估感觉功能的改善,例如确定右侧和左侧的针刺和轻触感的水平。根据本公开内容的细胞群可以能够在将群体植入受试者后改善需要治疗的受试者的运动功能。可以使用ISNCSCI测验评估改善的运动功能,例如确定右侧和左侧的完全麻痹的运动水平、可察觉的或可见的收缩、主动运动、抵抗重力的全活动度以及足够的抵抗力。

[0109] 根据本公开内容的细胞群能够在12个月或更短的时间内减少损伤诱导的中枢神经系统实质空化的体积。在一个实施方案中,根据本公开内容的细胞群能够在6个月或更短,5个月或更短,4个月或更短,3个月或更短,或2个月或更短,或少于1个月内减少受试者中损伤诱导的中枢神经系统实质空化的体积。

[0110] 现在已经大体上描述了本发明,通过参考以下以举例方式提供的实施例,将更容易理解本发明,除非另有说明,否则这些实施例不旨在限制本公开内容。

实施例

[0111] 实施例1-未分化的人胚胎干细胞的培养和扩增

[0112] 来自H1系(WA01;Thomson JA,Itskovitz-Eldor J,Shapiro SS,Waknitz MA,Swiergiel JJ,Marshall VS,Jones JM.Embryonic stemcell lines derived from human

blastocysts. Science. 1998 Nov 6; 282(5391): 1145-7) 产生的工作细胞库(WCB)的未分化的人胚胎干细胞(uhESC)在重组人层粘连蛋白-521(Corning#354224)包被的、经组织培养物处理的聚苯乙烯225cm²培养瓶(Corning#431082)上在完全mTeSR™-1培养基(Stem Cell Technologies#85850)中培养。每天完全更换培养基,直到细胞达到约80-90%汇合,然后使用ReLeSR™试剂(Stem Cell Technologies#05872)传代uhESC。将ReLeSR™举起的uhESC细胞接种到新的层粘连蛋白-521包被的225cm²烧瓶中,并在接种后两天恢复每日培养基更换。在如实施例2所述的分化为神经外胚层祖细胞之前,取决于实验,将来自WCB的培养的uhESC以这种方式扩增2至5次传代。

[0113] 实施例2-在动态悬浮培养中将人胚胎干细胞分化为神经外胚层祖细胞的方法

[0114] 第-1天:将扩增的uhESC(约90%汇合)分离,并用**Accutase®**(Stem Cell Technologies#07920)解聚以形成单细胞悬浮液,从而允许准确的细胞计数和均匀的接种密度。然后将解聚的uhESC以 1×10^6 个活细胞/mL的浓度接种到PBS-0.1或PBS-0.5微型生物反应器系统(PBS Biotech)(分别设置为以35RPM或25RPM旋转(第-1天))中进行动态悬浮培养。将细胞接种在神经胶质祖细胞培养基(GPM;由补充有2%B27补充剂(Gibco目录号17504-044)和0.04μg/ml三碘-甲状腺原氨酸(Sigma目录号T5516-1MG)的DMEM/F12(Gibco目录号10565-018)组成)和补充有10μM Rho激酶抑制剂(RI, Tocris目录号1254)以支持细胞存活的未分化的hESC培养基(如实施例1中的)的1:1混合物中。在最初的24小时内,形成了uhESC的小的均匀的聚集体。与胚状体(EB)形成相比,小聚集体中的细胞没有开始自发分化,而是维持其多能性,如通过qPCR测量的标志物表达所证实的(图5)。

[0115] 第0-3天:为了起始分化为神经外胚层,对于接下来的四天,将小的非EB聚集体在动态悬浮液中在分别以45或32RPM旋转的PBS-0.1或PBS-0.5微型生物反应器中在补充有10μM SB431542(Sigma-Aldrich,目录号S4317)和2μM Dorsomorphin(Sigma-Aldrich,目录号P5499)的GPM中培养。通过使聚集体沉降、去除70-80%的用过的培养基并用等体积的补充有10μMSB431542和2μM Dorsomorphin的GPM替换来每天补充培养基。

[0116] 第4-6天:将细胞在动态悬浮液中在补充有0.5μM Purmorphamine(Reprocell,目录号04-0009)、1μM视黄酸(Sigma-Aldrich,目录号R2625)和150μM抗坏血酸(Sigma Aldrich,目录号A4544)的GPM中以45RPM(PBS-0.1微型生物反应器)或32RPM(PBS-0.5微型生物反应器)进一步培养另外三天。通过使聚集体沉降、去除70-80%的用过的培养基并用等体积的补充有0.5μM的Purmorphamine、1μM的视黄酸和150μM的抗坏血酸的GPM替换来每天补充培养基。

[0117] 第7天:在动态悬浮培养分化过程的第7天收集分化的细胞的子集,并使其经受通过免疫细胞化学(ICC)(如实施例5中所述)和qPCR(如实施例6中所述)进行的标志物表达的分析。到第7天,细胞表达神经外胚层特征性的标志物(表2,图3)。分别如实施例3和4所述,将剩余的第7天的细胞分化为神经胶质谱系细胞,并进一步分化为少突胶质祖细胞。

[0118] 实施例3-在动态悬浮培养中将人胚胎干细胞分化为神经胶质谱系细胞的方法

[0119] 如实施例2中所述进行uhESC向神经外胚层/神经祖细胞的分化(第0-6天)。在第7天,通过将分化培养基修改为补充有20ng/mL人碱性成纤维细胞生长因子(hbFGF, Thermo Fisher,目录号PHG0263)、10ng/mL表皮生长因子(EGF, Thermo Fisher,目录号PHG0311)和10μM RI的GPM来起始向神经胶质祖细胞的分化。对于接下来的两周(第8-20天),将细胞聚

集体在动态悬浮液中以45rpm (PBS-0.1微型生物反应器) 或32RPM (PBS-0.5微型生物反应器) 在补充有20ng/mL bFGF和10ng/mL EGF的GPM中维持,每天使用重力沉降和70-80%的培养基交换来补充培养基。在第14天,还将10 μ M RI添加到新鲜培养基中。

[0120] 在动态悬浮培养分化过程的第21天收集分化细胞的子集,并使其经受通过qPCR (如实施例6中所述) 进行的标志物表达的分析。到第21天,分化的细胞表达与神经胶质谱系细胞一致的标志物(表2)。

[0121] 实施例4-将人胚胎干细胞分化为少突胶质祖细胞的方法

[0122] 将实施例3中获得神经胶质谱系前体细胞进一步分化为少突胶质祖细胞。用于第0-20天的分化方案如实施例2和3中所述。在第21天,将聚集体从动态悬浮培养转移至在用重组人层粘连蛋白-521 (rhLN-521) 包被的组织培养容器上的贴壁培养。例如,从具有60mL的聚集体悬浮液的1x PBS-0.1L微型生物反应器开始,将60mL的培养物分装到2x T75烧瓶中,每个烧瓶具有30mL的培养物。从第21天开始并一直持续到分化过程结束,在补充有20ng/mL EGF和10ng/mL血小板衍生的生长因子-AA (PDGF-AA, PeproTech, 目录号AF-100-13A) 的GPM中培养细胞,每隔一天进行完全培养基更换。在第28和35天,使用TrypLETMSelect (Thermo Fisher, 目录号A12859-01) 分离细胞培养物,计数并以4x 10⁴个活细胞/cm²接种到rhLN-521包被的容器上。从第35天开始直到第42天收获为止,隔日更换GPM。

[0123] 在分化过程的第42天收集分化的细胞的子集,并使其经受通过流式细胞术(如实施例5中所述)、免疫细胞化学(如实施例5中所述) 和qPCR(如实施例6中所述) 进行的标志物表达的分析。到第42天,如通过三种分析方法(表1、表2、图4) 测量的,分化的细胞表达少突胶质祖细胞特征性的标志物。

[0124] 在第42天收获OPC。使用TrypLETMSelect将细胞从容器中分离出来,计数并在CryoStor10 (BioLife Solutions, 目录号210102) 中重新配制,随后冷冻保存。

[0125] 实施例5-通过免疫细胞化学和流式细胞术表征分化的细胞群

[0126] 流式细胞术和免疫细胞化学 (ICC) 可用于检测和表征细胞群中蛋白质标志物表达的不同方面。虽然流式细胞术可用于量化群体中显示给定蛋白质标志物谱的个体细胞的百分比,但ICC提供关于每种蛋白质标志物的亚细胞定位的其他信息,并可应用于单个细胞或细胞聚集体。通过使用这些蛋白质谱分析方法中的一种或两种,我们追踪了根据本公开内容的方法的人胚胎干细胞向神经外胚层祖细胞、神经胶质祖细胞和少突胶质祖细胞的分化。

[0127] 对于在悬浮液中分化为神经外胚层祖细胞的人胚胎干细胞,通过ICC表征起始材料(未分化的多能细胞) 和分化的第7天细胞聚集体中的蛋白质标志物表达。在室温 (RT) 下,将贴壁的多能细胞和细胞聚集体在4%多聚甲醛 (PFA) 中固定30分钟。固定的细胞和聚集体用磷酸缓冲盐水 (PBS) 洗涤,然后将固定的聚集体依次置于浓度递增的蔗糖溶液 (10%、20%和30%重量/体积) 中分别在室温下放置30分钟、在室温下放置30分钟和在4 $^{\circ}$ C放置过夜。在蔗糖替换后,将聚集体包埋在Tissue-Tek最佳切割温度 (OCT) 溶液 (Sakura Finetek USA#4583) 中,并冷冻在-80 $^{\circ}$ C。将嵌入OCT的聚集体温热至-20 $^{\circ}$ C,使用低温恒温器 (型号CM3050 S, Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL, USA) 切成30 μ m切片,并安装到多聚L-赖氨酸 (Sigma-Aldrich#P4707) 包被的载玻片上。为了进行免疫细胞化学染色,使固定的贴壁细胞和载玻片固定的聚集体切片透化,并在由PBS中的0.1% TritonTMX-100/2% 正常山羊血

清/1%牛血清白蛋白组成的封闭溶液中在室温 (RT) 下封闭2小时。在透化和封闭后,将贴壁细胞和聚集体切片在无Triton™X-100并含有对感兴趣的蛋白质标志物具有特异性的一抗(包括Nanog (Abcam#ab21624)、Oct4 (Millipore#MAB4401))和Sox2 (Abcam#ab92494)以检测多能细胞,或PAX6 (BD Pharmingen#561462)和PSA-NCAM (Invitrogen#14-9118-80)以检测神经外胚层祖细胞)的封闭溶液中于4℃孵育过夜。然后用PBS将贴壁细胞和聚集体切片洗涤3次,然后在没有Triton™X-100的封闭溶液中与对所选一抗具有特异性的二抗和4',6-双脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 复染剂在室温下避光孵育1小时。用PBS将贴壁细胞和聚集体切片洗涤3次,并使用IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) 成像。

[0128] 图2和图3分别显示了起始多能细胞群和第7天的神经外胚层祖细胞的代表性ICC数据。如图2所示,未分化的人胚胎干细胞的起始群体表达典型的多能性标志物Nanog、Oct4和Sox2 (Wang Z, Oron E, Nelson B, Razis S, Ivanova N. Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2012 Apr 6; 10(4):440-54)。在分化7天后,来自两个代表性实验的细胞聚集体表达PAX6和PSA-NCAM,这是神经外胚层祖细胞特征性的两个蛋白质标志物(图3, Lippmann ES, Williams CE, Ruhl DA, Estevez-Silva MC, Chapman ER, Coon JJ, Ashton RS. Deterministic HOX patterning in human pluripotent stem cell-derived neuroectoderm. *Stem Cell Reports*. 2015 Apr 14; 4(4):632-44; Kim DS, Lee DR, Kim HS, Yoo JE, Jung SJ, Lim BY, Jang J, Kang HC, You S, Hwang DY, Leem JW, Nam TS, Cho SR, Kim DW. Highly pure and expandable PSA-NCAM-positive neural precursors from human ESC and iPSC-derived neural rosettes. *PLoS One*. 2012; 7(7):e39715)。

[0129] 对于通过第42天分化为少突胶质祖细胞的人胚胎干细胞,通过流式细胞术和ICC表征所得的单细胞群体中的蛋白质标志物表达。

[0130] 为了通过ICC表征少突胶质祖细胞的蛋白质标志物表达,如上文所述,对载玻片固定的聚集体切片进行染色,除了在室温下用100%甲醇进行透化2分钟,并且封闭溶液由PBS中的10%胎牛血清组成。

[0131] 图4显示了第42天的少突胶质祖细胞的代表性ICC数据。来自两个代表性实验的所得单细胞群体表达少突胶质祖细胞标志物NG2 (Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, Phatnani HP, Guarnieri P, Caneda C, Ruderisch N, Deng S, Liddel SA, Zhang C, Daneman R, Maniatis T, Barres BA, Wu JQ. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci*. 2014 Sep 3; 34(36):11929-47)。

[0132] 为了在第42天通过流式细胞术定量细胞表面标志物,将细胞在解冻培养基 (DMEM 培养基中10%胎牛血清) 中解冻,离心并重悬于染色缓冲液 (PBS中2%胎牛血清/0.05%叠氮化钠)。将细胞与对感兴趣的标志物具有特异性的一抗(包括NG2 (Invitrogen#37-2300)、GD3 (Millipore#MAB2053)、A2B5 (BD#563775)、CD49f (Millipore#CBL458P)、EpCAM (Dako#M080401-2)和CLDN6 (Thermo Fisher#MA5-24076))及其同种型对照在冰上孵育30分钟。用染色缓冲液洗涤细胞以去除未结合的抗体;在未缀合的抗体的情况下,然后将细胞与适当的荧光团缀合的二抗在冰上孵育30分钟。洗涤细胞,然后加入碘化丙啶以区分死细胞。在一些情况下,将细胞在包被有Matrigel (Corning#356231)的组织培养容器中于37℃/5%CO2

下培养过夜,以恢复对实施例4中所述的第42天收获程序表现出敏感性的蛋白质标志物,然后用TrypLE™Select(Thermo Fisher#A12859-01)进行收获并如上文所述染色用于流式细胞术分析。在Attune NxT(Thermo Fisher,Waltham,MA,USA)流式细胞仪上分析所有细胞。为了计算表达给定蛋白质标志物的细胞的百分比,对用碘化丙啶染色的死细胞进行门控,并将与相应抗体结合的活细胞数表示为在针对表现出与同型对照抗体的非特异性结合的细胞数进行校正后所分析的细胞总数的分数。

[0133] 表1显示了根据实施例4中描述的方法产生的第42天少突胶质祖细胞的代表性流式细胞术数据。如两个代表性运行所显示的,所得细胞群中高比例的细胞表达特征性少突胶质细胞标志物,包括NG2(Zhang Y,Chen K,Sloan SA,Bennett ML,Scholze AR,O'Keefe S,Phatnani HP,Guarnieri P,Caneda C,Ruderisch N,Deng S,Liddelow SA,Zhang C,Daneman R,Maniatis T,Barres BA,Wu JQ.An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia,neurons,and vascular cells of the cerebral cortex.J Neurosci.2014Sep3;34(36):11929-47)和GD3(Gallo V,Zhou JM,McBain CJ,Wright P,Knutson PL,Armstrong RC.Oligodendrocyte progenitor cell proliferation and lineage progression are regulated by glutamate receptor-mediated K⁺channel block.J Neurosci.1996Apr15;16(8):2659-70)以及Pre-OPC标志物A2B5(Keirstead HS,Nistor G,Bernal G,Totoiu M,Cloutier F,Sharp K,Steward O.Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury.J Neurosci.2005May 11;25(19):4694-705)。此外,在所得群体中最地程度地检测到非OPC标志物,包括神经祖细胞/上皮标志物CD49f(Krebsbach PH,Villa-Diaz LG.The Role of Integrin α 6(CD49f) in Stem Cells:More than a Conserved Biomarker.Stem Cells Dev.2017Aug 1;26(15):1090-1099)和上皮标志物CLDN6(Lin D,Guo Y,Li Y,Ruan Y,Zhang M,Jin X,Yang M,Lu Y,Song P,Zhao S,Dong B,Xie Y,Dang Q,Quan C.Bioinformatic analysis reveals potential properties of human Claudin-6regulation and functions.Oncol Rep.2017Aug;38(2):875-885)和EpCAM(Huang L,Yang Y,Yang F,Liu S,Zhu Z,Lei Z,Guo J.Functions of EpCAM in physiological processes and diseases(Review).Int J Mol Med.2018Oct;42(4):1771-1785)。

[0134] 表1.通过根据本公开内容的方法产生的少突胶质祖细胞的代表性流式细胞术数据。

	OPC/Pre-OPC 标志物			非-OPC 标志物		
	NG2	GD3	A2B5	CD49f	CLDN6	EpCAM
[0135] 运行 1	98%	74%	22%	2%	2%	1%
运行 2	89%	72%	49%	4%	2%	0%

[0136] 与当前处于临床测试以治疗脊髓损伤和使用另一种方法产生的OPC(Priest CA,Manley NC,Denham J,Wirth ED 3rd,Lebkowski JS.Preclinical safety of human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors supporting clinical trials in spinal cord injury.Regen Med.2015Nov;10(8):939-58;Manley NC,Priest

CA, Denham J, Wirth ED 3rd, Lebkowski JS. Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells: Preclinical Efficacy and Safety in Cervical Spinal Cord Injury. *Stem Cells Transl Med.* 2017 Oct; 6(10):1917-1929) 相比, 通过本公开内容中描述的方法产生的细胞群导致更高比例的少突胶质祖细胞标志物NG2阳性的细胞, 和减少的非OPC标志物CD49f、CLDN6和EpCAM的表达。

[0137] 实施例6-通过基因表达谱分析表征分化的细胞群

[0138] 基因表达谱分析可用于表征起始多能细胞群和分化的每个阶段(包括神经外胚层祖细胞、神经胶质祖细胞和少突胶质祖细胞的产生)的细胞表型。基因表达谱分析包括使用诸如微阵列和RNA-seq的方法进行整体转录组谱分析, 和使用灵敏度更高的方法诸如实时定量PCR(qPCR)进行靶基因谱分析。

[0139] 为进行基因表达谱分析, 将细胞在Qiagen RLT裂解缓冲液(Qiagen#79216)中裂解, 并根据制造商的指南使用Qiagen RNeasy Mini Kit(Qiagen#74106)纯化RNA。对于基于qPCR的分析, 然后根据制造商的指南, 使用Invitrogen Superscript IV VIL0 Mastermix(Thermo Fisher Scientific#11756050), 根据标准方法将纯化的RNA转换为cDNA。然后根据制造商的指南, 使用基因特异性引物-探针组(Applied Biosystems Taqman Gene Expression Assays, Thermo Fisher Scientific#4331182)对靶基因和参考管家基因的相对表达水平进行定量。为了确定一组给定的靶基因的相对表达水平, 在ABI 7900HT实时序列检测系统(Applied Biosystems)、BioMark HD系统(Fluidigm)或等效系统上进行PCR反应。将每个靶基因标准化至一个或多个参考基因, 例如GAPDH, 以确定其相对表达水平。

[0140] 图5显示了在收获时, 在形成三维细胞聚集体之前(第-1天)和24小时后, 在形成小的非胚状体(非EB)聚集体之后(第0天, 紧接在神经外胚层分化开始之前), uhESC的代表性qPCR分析。进行了两个代表性实验, 并收集和处理RNA样品以用于使用上文所述的方法通过qPCR进行基因表达谱分析。使用76个基因的组进行Fluidigm qPCR, 该基因的组由多能性和早期分化的已知标志物组成。对于每个基因, 相对于五个管家基因(ACTB、GAPDH、EP300、PGK1、SMAD1)的平均值计算标准化的 Δ CT值。第-1天相对第0天的所有 Δ CT值的所得的相关性图显示于图5, 并表明第0天的小的非EB聚集体中的细胞保留了多能性基因的表达, 并且具有与第-1天的uhESC相似的测试标志物总体表达谱。表2中呈现的相对于基线的倍数变化的计算结果进一步支持了这一点, 表2显示了对于两个代表性实验, uhESC的聚集体形成后24小时(第0天的uhESC)的高水平的多能性标志物NANOG、LIN28A和SOX2。

[0141] 表2显示了来自两个代表性实验的qPCR结果, 所述实验测量了通过根据本公开内容的方法产生的细胞群中的多能性基因、神经外胚层祖细胞基因、神经胶质祖细胞基因和少突胶质祖细胞基因的表达。在以下时间点收集RNA样品: uhESC细胞聚集体形成开始后24小时以及分化之前(第0天), 随后分化为神经外胚层祖细胞(第7天), 随后分化为神经胶质祖细胞(第21天)以及随后分化为少突胶质祖细胞(第42天)。使用如上所述的方法对RNA样品进行处理以用于qPCR。对选定的指示每种分化状态的基因的组进行定量, 包括: 三个多能性基因(NANOG、LIN28A、SOX2), 三个神经外胚层祖细胞基因(PAX6、HES5、ZBTB16), 三个神经胶质祖细胞基因(CACGN4、FABP7、SOX6)和三个少突胶质祖细胞基因(CSPG4、PDGFR α 、DCN)。对于每个基因, 使用五个管家基因(ACTB、GAPDH、EP300、PGK1、SMAD1)的平均值计算标准化的 Δ CT值, 并使用 $\Delta\Delta$ CT方法计算相对于基线(低于定量极限的表达)的倍数表达。

[0142] 表2.根据本公开内容分化为OPC的H1 uhESC中的多能性、神经外胚层祖细胞(NEPC)、神经胶质祖细胞(GPC)和少突胶质祖细胞(OPC)的基因标志物的qPCR分析。

	运行 1 第 0 天 uhESC	运行 2 第 0 天 uhESC	运行 1 第 7 天 NEPC	运行 2 第 7 天 NEPC	运行 1 第 21 天 GPC	运行 2 第 21 天 GPC	运行 1 第 42 天 OPC	运行 2 第 42 天 OPC
多能性基因								
NANOG	236	244	2	2	2	1	2	1
LIN28A	410	203	240	160	3	1	2	1
SOX2	603	628	1381	1337	661	453	12	18
神经外胚层祖细胞 (NEPC) 基因								
PAX6	1	2	971	1329	180	193	2	2
HES5	1	2	295	555	384	511	2	1
ZBTB16	1	2	154	166	70	47	5	1
胶质祖细胞 (GPC) 基因								
CACNG4	21	20	96	169	377	474	86	73
FABP7	6	7	7	6	407	221	14	13
SOX6	1	2	6	6	36	58	6	8
少突胶质祖细胞 (OPC) 基因								
CSPG4	5	2	2	2	2	1	234	225
PDGFR α	1	2	4	2	4	2	32	88
DCN	1	2	2	2	30	17	753	803

[0145] 参照表2,通过根据本公开内容的方法使uhESC分化7天,导致与神经外胚层祖细胞一致的基因表达谱,包括NANOG的下调以及LIN28A、SOX2、PAX6、HES5和ZBTB16的表达 (Patterson M, Chan DN, Ha I, Case D, Cui Y, Van Handel B, Mikkola HK, Lowly WE. Defining the nature of human pluripotent stem cell progeny. Cell Res. 2012 Jan; 22(1):178-93; Lippmann ES, Williams CE, Ruhl DA, Estevez-Silva MC, Chapman ER, Coon JJ, Ashton RS. Deterministic HOX patterning in human pluripotent stem cell-derived neuroectoderm. Stem Cell Reports. 2015 Apr 14; 4(4):632-44; Woo SM, Kim J, Han HW, Chae JI, Son MY, Cho S, Chung HM, Han YM, Kang YK. Notch signaling is required for maintaining stem-cell features of neuroprogenitor cells derived from human embryonic stem cells. BMC Neurosci. 2009 Aug 17; 10:97; Avantaggiato V, Pandolfi PP, Ruthardt M, Hawe N, Acampora D, Pelicci PG, Simeone A. Developmental analysis of murine Promyelocyte

Leukemia Zinc Finger (PLZF) gene expression: implications for the neuromeric model of the forebrain organization. *J Neurosci*. 1995 Jul; 15(7Pt1):4927-42)。

[0146] 在基于悬浮液的分化的21天后,所得的细胞群显示出与神经胶质祖细胞一致的基因表达谱,包括多能性和神经外胚层祖细胞标志物的下调以及CACNG4、FABP7和SOX6的诱导 (Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, Phatnani HP, Guamieri P, Caneda C, Ruderisch N, Deng S, Liddelow SA, Zhang C, Daneman R, Maniatis T, Barres BA, Wu JQ. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci*. 2014 Sep 3; 34(36):11929-47; Petit A, Sanders AD, Kennedy TE, Tetzlaff W, Glattfelder KJ, Dalley RA, Puchalski RB, Jones AR, Roskams AJ. Adult spinal cord radial glia display a unique progenitor phenotype. *PLoS One*. 2011; 6(9):e24538; Baroti T, Zimmermann Y, Schillinger A, Liu L, Lommes P, Wegner M, Stolt CC. Transcription factors Sox5 and Sox6 exert direct and indirect influences on oligodendroglial migration in spinal cord and forebrain. *Glia*. 2016 Jan; 64(1):122-38)。

[0147] 根据本公开内容中描述的方法分化42天后,所得的细胞群表达与少突胶质祖细胞一致的标志物,包括早期谱系标志物的下调和CSPG4 (NG2)、PDGFR α 和IDCN的诱导 (Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, Phatnani HP, Guamieri P, Caneda C, Ruderisch N, Deng S, Liddelow SA, Zhang C, Daneman R, Maniatis T, Barres BA, Wu JQ. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci*. 2014 Sep 3; 34(36):11929-47)。

[0148] 实施例7-使用TGFBR1/激活素/NODAL信号传导和BMP信号传导的替代性小分子抑制剂将人胚胎干细胞分化为神经外胚层祖细胞

[0149] 除了实施例2中使用的小分子抑制剂 (SB431542和Dorsomorphin) 之外,还测试了TGFBR1/激活素/Nodal信号传导和BMP信号传导的替代性小分子抑制剂的在悬浮液中将人胚胎干细胞分化为神经外胚层祖细胞的能力。表3列出了所测试的替代性小分子抑制剂。在Ultra Low Attachment 6孔组织培养板 (Corning#3471) 的一式两份的孔中测试了每种条件。

[0150] 表3. 用于在悬浮液中将人胚胎干细胞分化为神经外胚层祖细胞的小分子抑制剂。

	抑制剂	测试的浓度	主要结合靶标	供应商目录号
[0151]	TGFBR1/激活素/Nodal 抑制剂			

[0152]

SB431542	10 μM	ALK5、ALK4、 ALK7	Sigma-Aldrich # S4317
LY2157299	10 μM	ALK5	ApexBio # A8348
GW788388	10 μM	ALK5、ALK4、 ALK7	ApexBio # A8301
A-77-01	10 μM	ALK5	ApexBio # A3132
A-83-01	10 μM	ALK5、ALK4、 ALK7	ApexBio # A3133
SB505124	10 μM	ALK5、ALK4、 ALK7	ApexBio # A3799
BMP 抑制剂			
Dorsomorphin	2 μM	ALK2、ALK3、 ALK6	Sigma-Aldrich # P5499
DMH-1	2 μM	ALK2、ALK3	ApexBio # B3686
K02288	2 μM	ALK2、ALK1、 ALK3、ALK6	ApexBio # B2286
ML347	2 μM	ALK2、ALK1	ApexBio # B3688

[0153] 在分化第7天,收集细胞并进行处理以用于RNA提取和通过如实施例6中所述的qPCR进行基因表达谱分析。对于每个基因,相对于五个管家基因(CTB、GAPDH、EP300、PGK1、SMAD1)的平均值计算标准化的 Δ CT值,并使用 $\Delta\Delta$ CT方法计算相对于基线(低于定量极限的表达)的倍数表达。表4显示了每种小分子组合的生物学重复的倍数表达值的平均值(相对于基线)。参照表4,使用每种测试的小分子组合使uhESC在悬浮液中分化7天导致多能性标志物NANOG的下调以及与神经外胚层祖细胞表型相关的基因(包括LIN28A、SOX2、PAX6、HES5和ZBTB16)的相似程度的维持的表达或诱导。

[0154] 为了获得在用每种小分子组合处理后所得的第7天细胞表型的更全面的比较,使用96个基因的组进行Fluidigm qPCR,该基因的组由多能性、神经外胚层祖细胞、神经管模式、神经胶质祖细胞、少突胶质祖细胞、神经嵴细胞、神经元、星形胶质细胞、周细胞、施万细胞和上皮细胞的已知标志物组成。参照图6,每种替代性小分子组合的第7天细胞表型与通过用SB431542加Dorsomorphin处理产生的细胞表型的通过标准化 Δ CT值的回归图的比较表明,使用测试的每种小分子组合可以实现相似的总体细胞表型。综上所述,表4和图6中显示的结果支持(i)TGF β R1/激活素/Nodal信号传导抑制剂以及(ii)BMP信号传导抑制剂的各种组合可用于使用本公开内容的方法在悬浮液中将uhESC分化为神经外胚层祖细胞,和进一步分化为神经胶质祖细胞以及分化为少突胶质祖细胞。

[0155] 表4. 使用小分子抑制剂的不同组合分化为NEPC的H1 uhESC中多能性和神经外胚层祖细胞(NEPC)的基因标志物的qPCR分析。

	SB431	SB431	SB431	SB43154	LY215	GW788	A-77-0	A-83-0	SB5051
	542+D	542+D	542+K	2+ML34	7299+	388+Do	1+Dor	1+Dors	24+Dor
	orso	MH-1	02288	7	Dorso	orso	so	o	so
多能性基因									
	NANOG	2	4	1	1	3	2	3	2
[0156]	LIN28A	518	473	684	565	554	607	648	646
	SOX2	1335	1488	1412	1257	1325	1270	1385	1395
	SOX2	1335	1488	1412	1257	1325	1270	1385	1349
神经外胚层祖细胞基因									
	PAX6	791	836	741	615	748	692	791	514
	HES5	1025	862	1047	698	1040	1012	876	650
	ZBTB16	201	192	210	220	203	198	198	159
									188

[0157] 实施例8-使用体外囊肿测定评估分化的OPC群体中外来的上皮谱系细胞的存在

[0158] 使用体外囊肿测定测试了根据本公开内容产生的OPC群体中非期望的上皮谱系细胞的存在。囊肿测定基本上根据Debnath等人(Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. 2003 Methods. 3:256-68)的方案进行。简而言之, OPC在3D培养系统中在已知刺激上皮囊肿形成的因子的存在下生长20天。除了视觉检测囊肿外, 还使用免疫细胞化学评估了含有上皮标志物CD49f的基底外侧蛋白表达的囊性结构的存在。

[0159] 将OPC在支持囊肿的培养基中以 21.9×10^3 个细胞/cm²的密度接种在**Matrigel®**垫(Corning)上(总共将 0.5×10^6 个细胞接种在24孔板的12个孔中)。将细胞培养20天。在第20天, 进行活囊肿计数, 使用Cell Recovery Solution(Corning#354253)溶解**Matrigel®**, 将细胞在4%多聚甲醛(PFA)中在冰上固定5分钟, 并在封闭缓冲液中透化过夜。随后, 对囊肿进行CD49f(ITGA6)、鬼笔环肽染色, 并用DAPI复染。使用IN Cell Analyzer 2000(GE Healthcare Life Sciences)对囊肿进行成像, 并使用IN Cell Developer软件(GE Healthcare Life Sciences)和MATLAB™(Mathworks)对囊肿频率、大小和染色强度进行定量。

[0160] 参照表5, 使用根据本公开内容的方法从两个代表性运行产生的并且在体外囊肿测定中测试的OPC产生比通过先前发现在体内引起上皮囊肿形成的替代方法(Manley NC, Priest CA, Denham J, Wirth ED 3rd, Lebkowski JS. Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells: Preclinical Efficacy and Safety in Cervical Spinal Cord Injury. Stem Cells Transl Med. 2017 Oct; 6(10):1917-1929)产生的三个对照批次的OPC(对照A、对照B和对照C)更少的囊肿。基于这些结果, 预期根据本公开内容产生的OPC将在体内形成很少或没有上皮囊肿。

[0161] 表5. 通过根据本公开内容的方法产生的少突胶质祖细胞的代表性囊肿测定结果。

[0162]		对照	对照	对照	运行 1	运行 2
		A	B	C		
[0163]	囊肿 /100,000 个细胞输入	6.2	16.8	25.6	0.4	0.4

[0164] 尽管已经参考特定实施方案描述了本公开内容,但是本领域技术人员将理解,在不脱离本公开内容的范围的情况下,可以进行各种改变并且可以用等同物代替其要素。另外,在不脱离本公开内容的范围的情况下,可以做出许多修改以使特定情况或材料适应本公开内容的教导。

[0165] 因此,意图是本公开内容不限于作为预期用于实现本公开内容的最佳模式而公开的特定实施方案,而是本公开内容将包括落入所附权利要求的范围和精神内的所有方面。

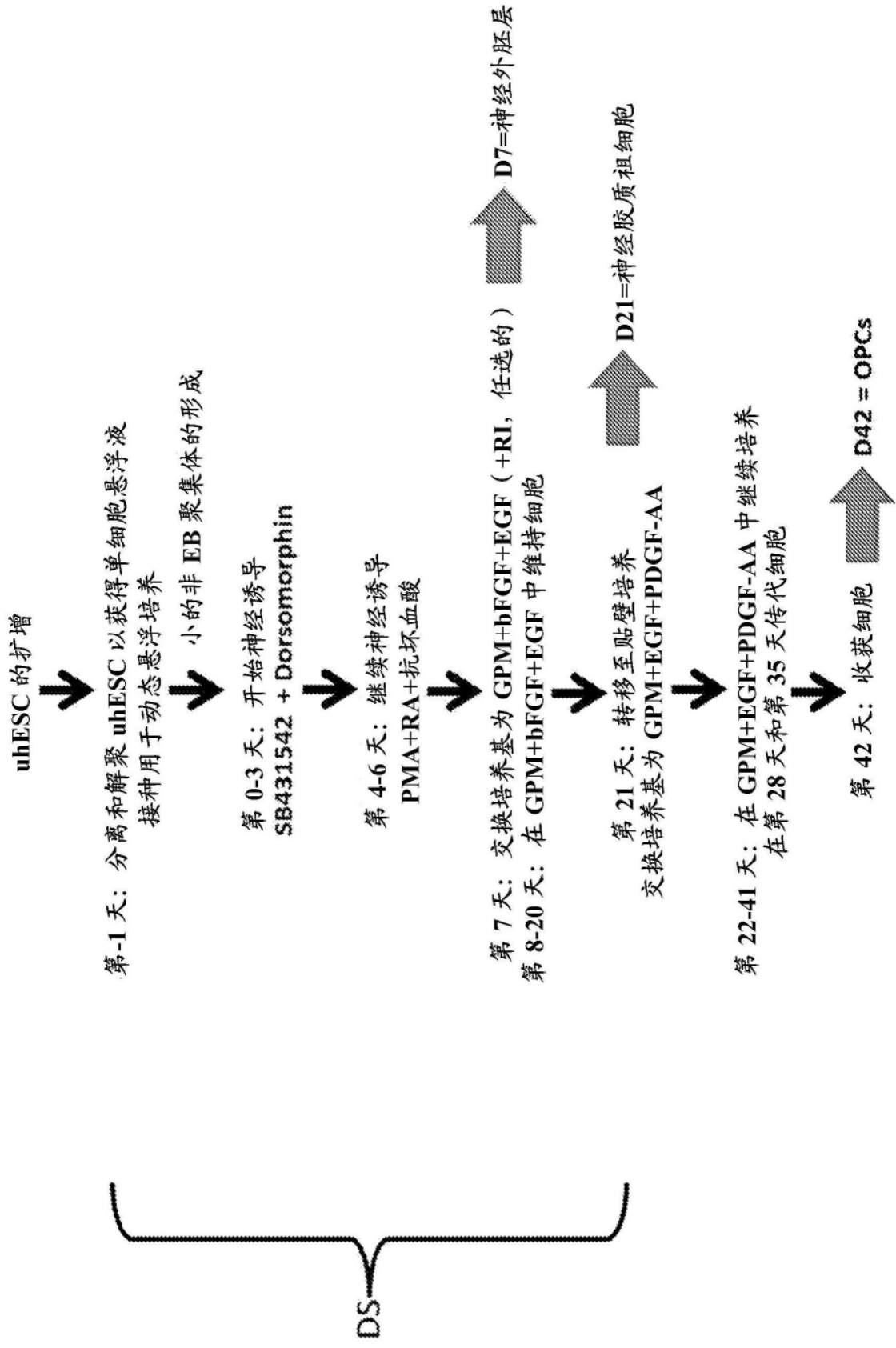


图1

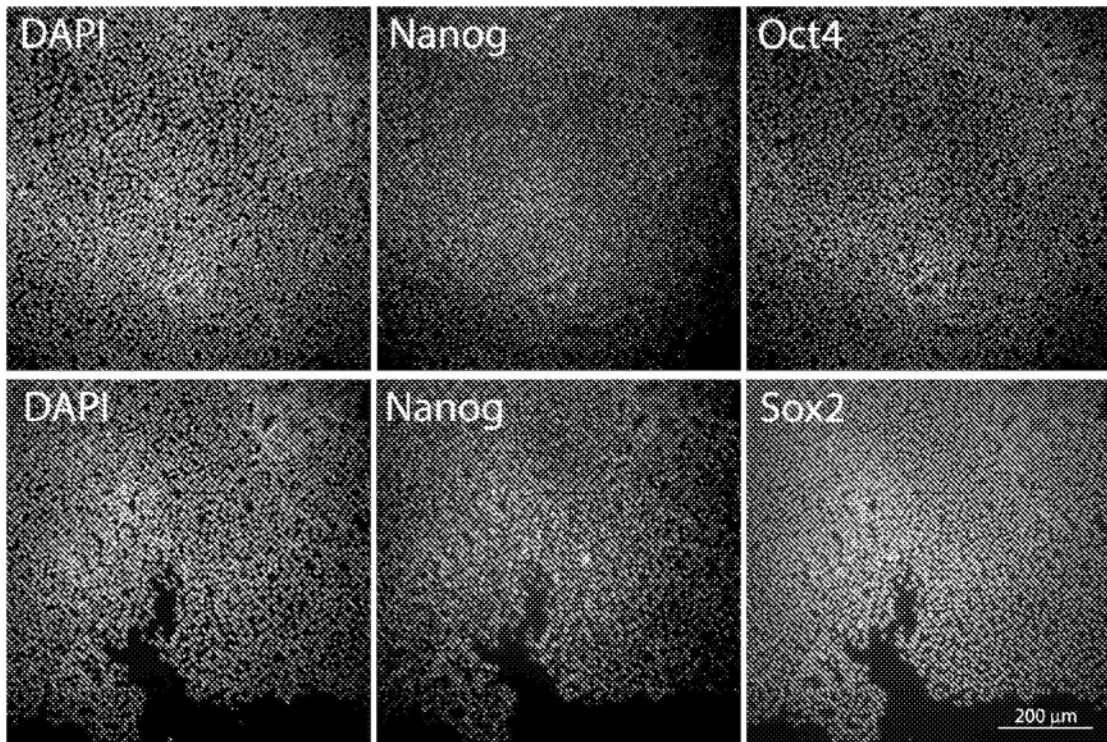


图2

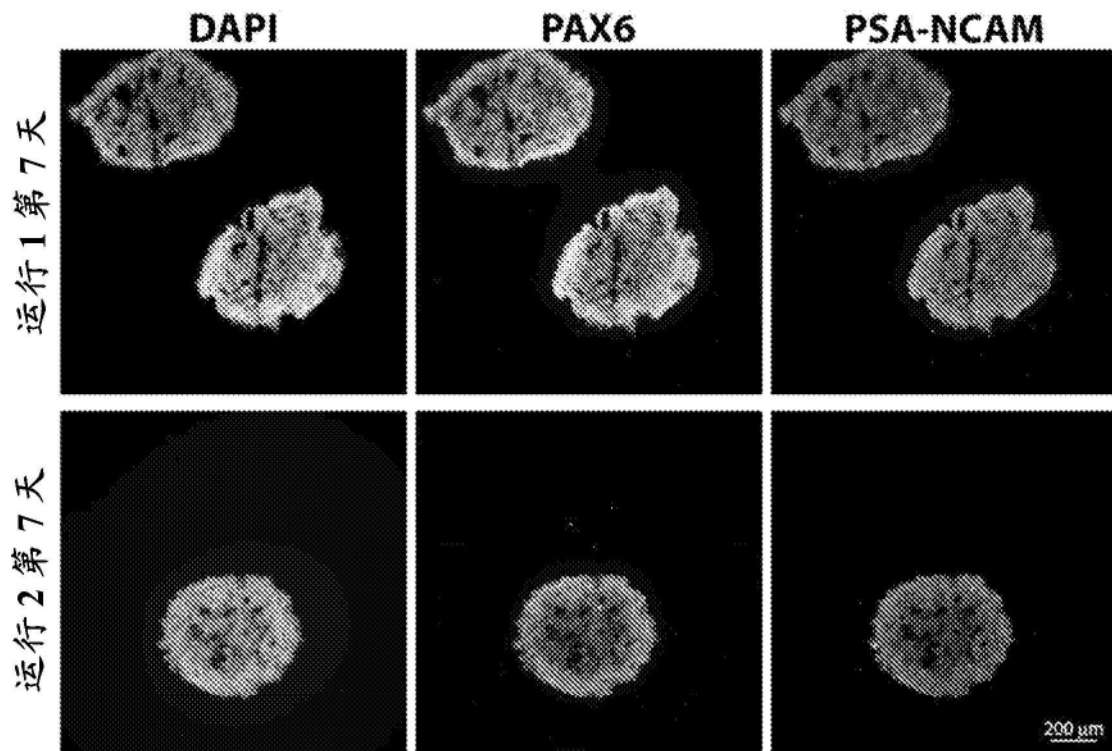


图3

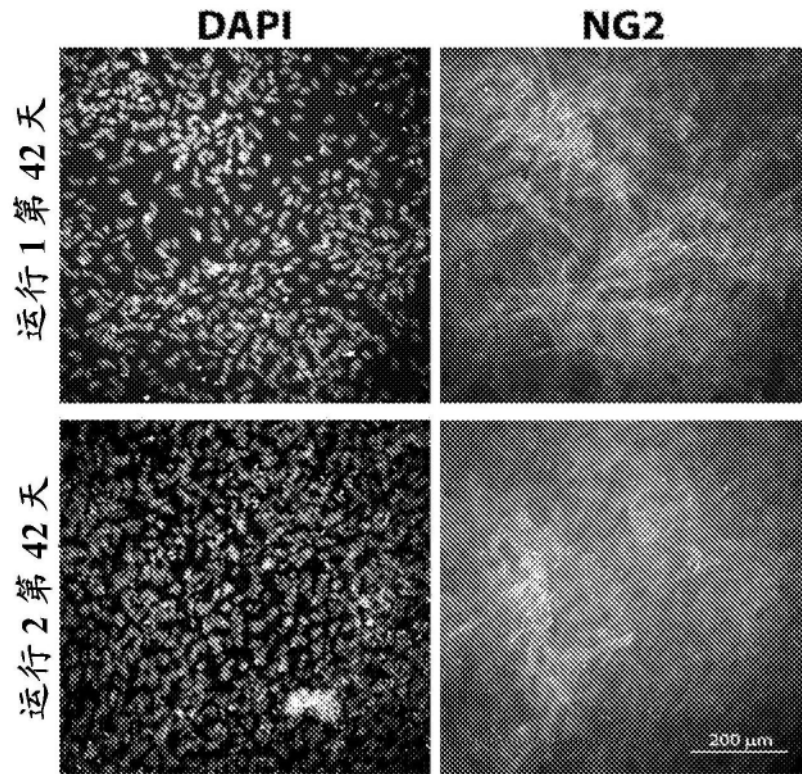


图4

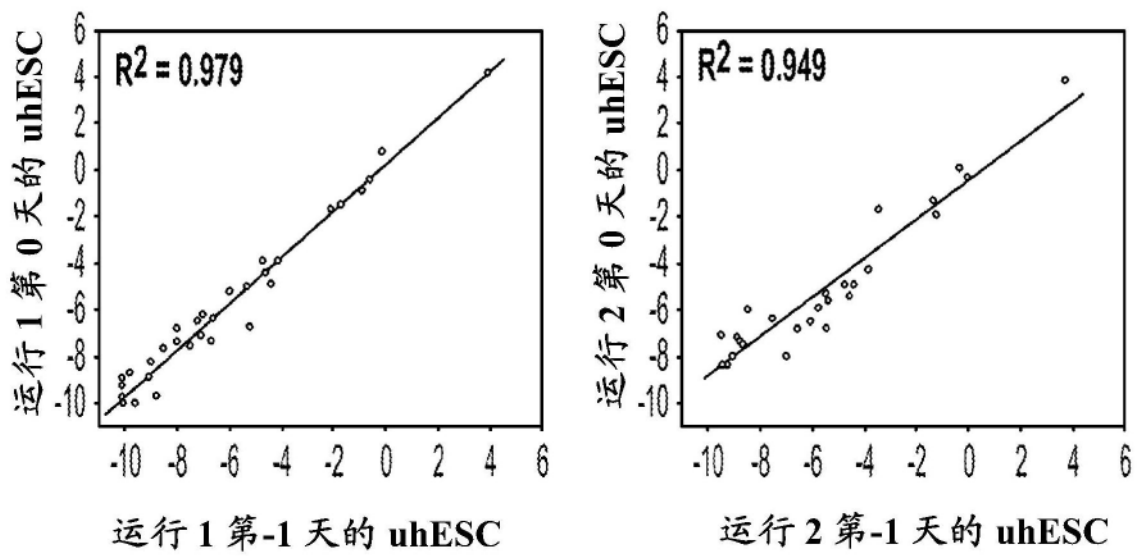


图5

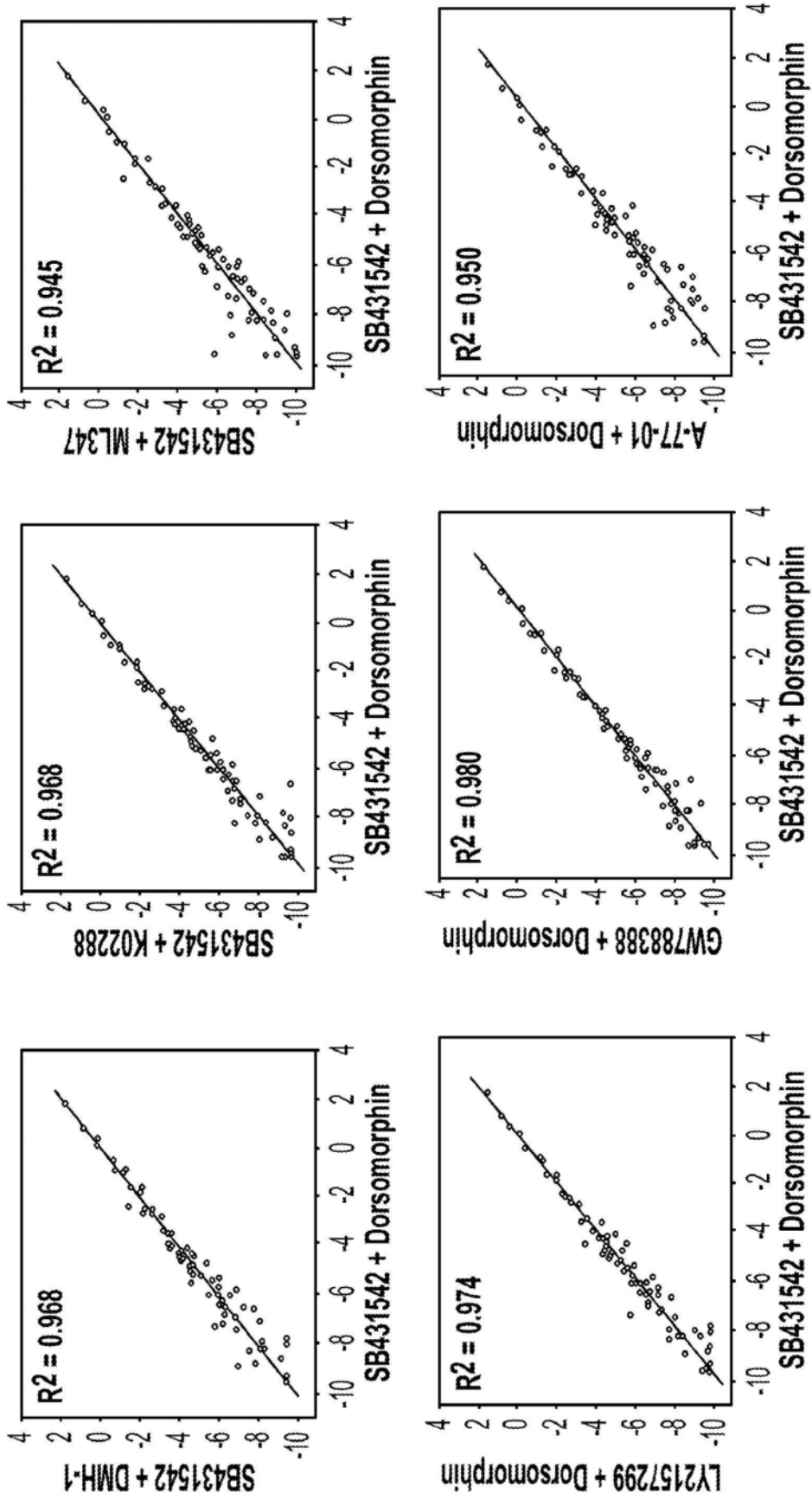


图6A

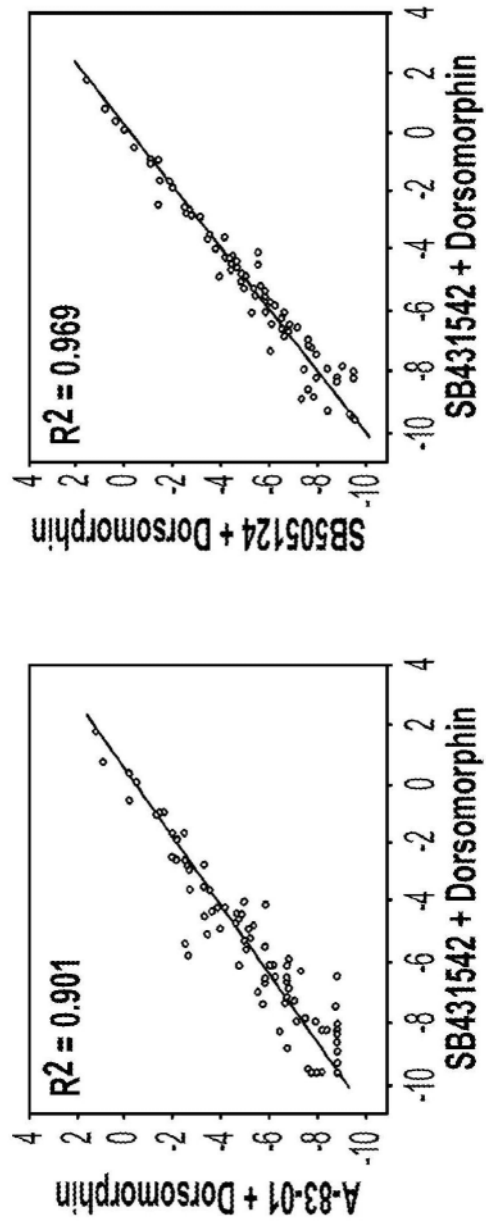


图6B