



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0077095  
(43) 공개일자 2019년07월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 5/079* (2010.01) *A61K 35/28* (2015.01)  
*A61P 19/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12N 5/0622* (2013.01)  
*A61K 35/28* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7017089
- (22) 출원일자(국제) 2017년11월14일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2019년06월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/061541
- (87) 국제공개번호 WO 2018/090002  
국제공개일자 2018년05월17일
- (30) 우선권주장  
62/421,816 2016년11월14일 미국(US)

- (71) 출원인  
메모리얼 슬로안 케터링 캔서 센터  
미국, 뉴욕 10065, 뉴욕, 요크 애비뉴 1275
- (72) 발명자  
스튜더 로렌즈  
미국 뉴욕주 10065 뉴욕 이스트 68번 스트리트  
415  
파타히 파라나크  
미국 캘리포니아주 94131 샌프란시스코 아파트 4  
워렌 드라이브 446
- (74) 대리인  
특허법인태평양

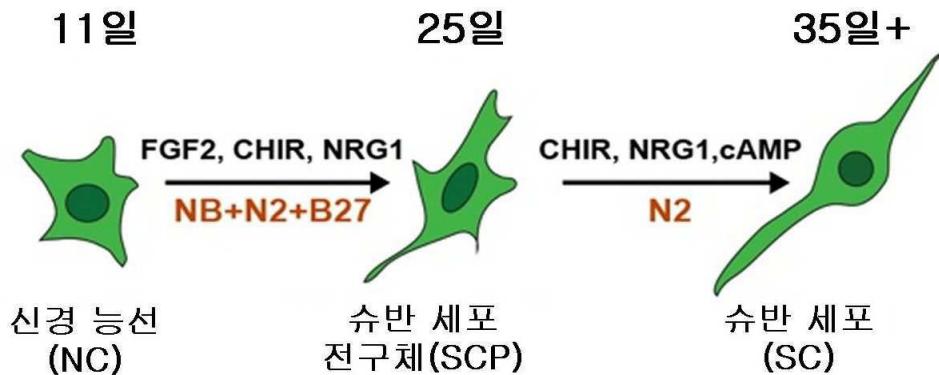
전체 청구항 수 : 총 287 항

(54) 발명의 명칭 줄기 세포 유래 슈반 세포

### (57) 요약

본원에서 개시된 요지 사안은 줄기 세포의 슈반 세포 전구체 및 슈반 세포로의 시험관내 분화 유도 방법, 및 이러한 방법에 의해 생성된 슈반 세포 전구체 및 슈반 세포를 제공한다. 본원에서 개시된 요지 사안은 또한 PNS 및 /또는 CNS의 재생을 위한, 미엘린 손상의 방지 및/또는 보수를 위한, 및/또는 슈반 세포 관련 장애(예로, 말초 신경병증, 예로, 당뇨병성 말초 신경병증)의 방지 및/또는 치료를 위한 이러한 슈반 세포 전구체 및 슈반 세포의 용도를 제공한다.

**대 표 도** - 도1a



(52) CPC특허분류

*A61K 35/30* (2013.01)

*A61P 19/00* (2018.01)

*C12N 2501/115* (2013.01)

*C12N 2501/15* (2013.01)

*C12N 2501/415* (2013.01)

*C12N 2506/02* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

줄기 세포 집단(population)을 하나 이상의 TGF $\beta$  / Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 접촉시키는 단계 및 상기 세포를 하나 이상의 Wnt 활성화제와 접촉시키는 단계, 및 상기 세포를 하나 이상의 FGF 활성화제와 적어도 약 3 일 동안 추가로 접촉시켜 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단을 생성하는 단계를 포함하는 줄기 세포의 분화를 시험관내에서 유도하는 방법.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 세포를 상기 하나 이상의 FGF 활성화제와 약 14일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 세포와 상기 하나 이상의 FGF 활성화제의 최초 접촉은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$  / Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 20일 이하인 방법.

#### 청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 세포와 상기 하나 이상의 FGF 활성화제의 최초 접촉은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$  / Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 10일 내지 약 15일인 방법.

#### 청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 세포와 상기 하나 이상의 FGF 활성화제의 최초 접촉은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$  / Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 11일인 방법.

#### 청구항 6

청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포를 하나 이상의 SC 분화 유도제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 세포를 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안 접촉시켜 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단을 생성하는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 세포를 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 14일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 9

청구항 6 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포와 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제의 최초 접촉은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$

/Activin-Nodal1 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 10일 내지 약 15일인 방법.

### 청구항 10

청구항 6 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포를 상기 하나 이상의 FGF 활성화제 및 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제와 함께 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 11

청구항 1 내지 청구항 10 중 어느 한 항에 있어서,

상기 줄기 세포 집단은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal1 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 25일 또는 그 이후에 하나 이상의 상기 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단으로 분화되는 방법.

### 청구항 12

청구항 1 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 있어서,

상기 줄기 세포를 하나 이상의 SMAD 억제제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 13

청구항 12에 있어서,

상기 줄기 세포를 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal1 신호전달의 억제제 및 상기 하나 이상의 SMAD 억제제와 함께 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 14

청구항 1 내지 청구항 13 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포와 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제의 최초 접촉은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal1 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 4일 이하인 방법.

### 청구항 15

청구항 14에 있어서,

상기 세포와 상기 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제의 최초 접촉은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal1 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 2일인 방법.

### 청구항 16

청구항 14에 있어서,

상기 세포와 상기 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제의 최초 접촉은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal1 신호전달의 억제제의 최초 접촉과 같은 날인 방법.

### 청구항 17

청구항 1 내지 청구항 16 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal1 신호전달의 억제제는 SB431542, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 방법.

### 청구항 18

청구항 17에 있어서,

상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal1 신호전달의 억제제는 SB431542인 방법.

### 청구항 19

청구항 12 내지 청구항 18 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 SMAD 억제제는 LDN193189, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 방법.

### 청구항 20

청구항 19에 있어서,

상기 하나 이상의 SMAD 억제제는 LDN193189인 방법.

### 청구항 21

청구항 1 내지 청구항 20 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 Wnt 활성화제는 Wnt 신호전달의 활성화를 위해 글리코겐 합성효소 키나제 3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ )를 저하시키는 방법.

### 청구항 22

청구항 21에 있어서,

상기 하나 이상의 Wnt 활성화제는 CHIR99021, Wnt-1, WNT3A, Wnt4, Wnt5a, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 방법.

### 청구항 23

청구항 22에 있어서,

상기 하나 이상의 Wnt 활성화제는 CHIR99021인 방법.

### 청구항 24

청구항 6 내지 청구항 23 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 SC 분화 유도제는 뉴레굴린, LIF, CNTF, 폴스콜린, TGF $\beta$  및 FBS로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

### 청구항 25

청구항 24에 있어서,

상기 하나 이상의 SC 분화 유도제는 NRG1인 방법.

### 청구항 26

청구항 1 내지 청구항 25 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 FGF 활성화제는 FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF7, FGF8, FGF10, FGF18, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

### 청구항 27

청구항 26에 있어서,

상기 하나 이상의 FGF 활성화제는 FGF2인 방법.

### 청구항 28

청구항 1 내지 청구항 27 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커는 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, 및 SLC10A4로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

### 청구항 29

청구항 1 내지 청구항 28 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 줄기 세포는 인간 줄기 세포인 방법.

### 청구항 30

청구항 29에 있어서,

상기 인간 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포, 인간 유도된 다능성 줄기 세포, 인간 단성생식 줄기 세포, 원시 생식 세포-유사 다능성 줄기 세포, 배반엽상충 줄기 세포, F-클래스 다능성 줄기 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

### 청구항 31

청구항 1 내지 청구항 30 중 어느 한 항에 있어서,

상기 분화된 세포 집단이 상기 분화된 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 선호하는 조건을 거치게 하는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 32

청구항 31에 있어서,

상기 분화된 세포의 상기 슈반 세포 집단으로의 성숙을 선호하는 상기 조건은 상기 분화된 세포를 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 33

청구항 32에 있어서,

상기 분화된 SC 전구체 세포 집단을 상기 하나 이상의 FGF 활성화제 및 상기 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 34

청구항 33에 있어서,

상기 분화된 SC 전구체 세포 집단을 상기 하나 이상의 FGF 활성화제 및 상기 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 약 10일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 35

청구항 33에 있어서,

상기 분화된 SC 전구체 세포 집단을 상기 하나 이상의 FGF 활성화제 및 상기 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 약 35일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 36

청구항 31 내지 청구항 35 중 어느 한 항에 있어서,

상기 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 37

청구항 36에 있어서,

상기 분화된 SC 전구체 세포 집단을 상기 하나 이상의 SC 분화 증강제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 38**

청구항 37에 있어서,

상기 분화된 SC 전구체 세포 집단을 상기 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 10일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 39**

청구항 37에 있어서,

상기 분화된 SC 전구체 세포 집단을 상기 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 35일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 40**

청구항 36 내지 청구항 39 중 어느 한 항에 있어서,

상기 분화된 SC 전구체 세포 집단을 상기 하나 이상의 FGF 활성화제, 상기 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제, 및 상기 하나 이상의 SC 분화 증강제와 함께 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 41**

청구항 31 내지 청구항 40 중 어느 한 항에 있어서,

상기 분화된 세포의 상기 슈반 세포 집단으로의 성숙을 선호하는 상기 조건은 상기 분화된 세포를 하나 이상의 SC 분화 증강제와 추가로 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 42**

청구항 36 내지 청구항 41 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 SC 분화 증강제는 사이클릭 아데노신 모노포스페이트(cAMP), 폴스콜린, LIF, 및 CNTF로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 43**

청구항 42에 있어서,

상기 하나 이상의 SC 분화 증강제는 cAMP인 방법.

**청구항 44**

청구항 1 내지 청구항 44 중 어느 한 항에 있어서,

상기 분화된 세포 집단을 3D 구형체로 응집시키는 단계; 및 상기 3D 구형체를 상기 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 상기 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 45**

청구항 44에 있어서,

상기 3D 구형체를 부착 배양에서 배양하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 46**

청구항 31 내지 청구항 45 중 어느 한 항에 있어서,

상기 슈반 세포 집단은 하나 이상의 슈반 세포 마커를 발현하는 방법.

**청구항 47**

청구항 46에 있어서,

상기 하나 이상의 슈반 세포 마커는 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, TGF $\beta$ 1, CD9, CD81, CD44, CD98, CD49E, CD49D, TYRP1, ENTHD1, NT5E, HTR2B, NOV, IL8, SLC16A6, CDKN2A, PLP2, S100A6, AQP9, 및 CDH19로 이루어진 군으로부터 선택되는 슈반 세포 마커로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

#### 청구항 48

하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 시험관내에서 분화된 세포 집단으로서, 상기 분화된 세포 집단은

줄기 세포 집단을 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제 및 하나 이상의 Wnt 활성화제와 접촉시키는 단계, 및

상기 줄기 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제와 적어도 약 3일 동안 추가로 접촉시키는 단계 후에 줄기 세포 집단으로부터 유도되는 분화된 세포 집단.

#### 청구항 49

청구항 48에 있어서,

상기 세포는 상기 하나 이상의 FGF 활성화제와 약 14일 동안 접촉되는 분화된 세포 집단.

#### 청구항 50

청구항 48 또는 청구항 49에 있어서,

상기 세포와 상기 하나 이상의 FGF 활성화제의 최초 접촉은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 20일 이하인 분화된 세포 집단.

#### 청구항 51

청구항 49에 있어서,

세포와 상기 하나 이상의 FGF 활성화제의 최초 접촉은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 10일 내지 약 15일인 분화된 세포 집단.

#### 청구항 52

청구항 49에 있어서,

상기 세포와 상기 하나 이상의 FGF 활성화제의 최초 접촉은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 11일인 분화된 세포 집단.

#### 청구항 53

청구항 48 내지 청구항 52 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 하나 이상의 SC 분화 유도제와 추가로 접촉되는 분화된 세포 집단.

#### 청구항 54

청구항 53에 있어서,

상기 세포는 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안 추가로 접촉되는 분화된 세포 집단.

#### 청구항 55

청구항 53 또는 청구항 54에 있어서,

상기 세포와 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제의 최초 접촉은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 10일 내지 약 15일인 분화된 세포 집단.

#### 청구항 56

청구항 53 내지 청구항 55 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제, 상기 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제와 함께 추가로 접촉되는 분화된 세포 집단.

### 청구항 57

청구항 48 내지 청구항 56 중 어느 한 항에 있어서,

상기 줄기 세포 집단은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF  $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 25일 또는 그 이후에 하나 이상의 상기 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단으로 분화되는 분화된 세포 집단.

### 청구항 58

청구항 48 내지 청구항 57 중 어느 한 항에 있어서,

상기 줄기 세포는 하나 이상의 SMAD 억제제와 추가로 접촉되는 분화된 세포 집단.

### 청구항 59

청구항 58에 있어서,

상기 줄기 세포 집단은 상기 하나 이상의 TGF  $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제 및 상기 하나 이상의 SMAD 억제제와 함께 접촉되는 분화된 세포 집단.

### 청구항 60

청구항 48 내지 청구항 59 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포와 상기 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제의 최초 접촉은 상기 줄기 세포 집단과 상기 하나 이상의 TGF  $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 4일 이하인 분화된 세포 집단.

### 청구항 61

청구항 60에 있어서,

세포와 상기 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제의 최초 접촉은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF  $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 2일인 분화된 세포 집단.

### 청구항 62

청구항 60에 있어서,

상기 세포와 상기 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제의 최초 접촉은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF  $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉과 같은 날인 분화된 세포 집단.

### 청구항 63

청구항 48 내지 청구항 63 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 TGF  $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제는 SB431542, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 분화된 세포 집단.

### 청구항 64

청구항 63에 있어서,

상기 하나 이상의 TGF  $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제는 SB431542인 분화된 세포 집단.

### 청구항 65

청구항 58 내지 청구항 64 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 SMAD 억제제는 LDN193189, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 분화된 세포 집단.

#### 청구항 66

청구항 65에 있어서,

상기 하나 이상의 SMAD 억제제는 LDN193189인 분화된 세포 집단.

#### 청구항 67

청구항 48 내지 청구항 66 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 Wnt 활성화제는 Wnt 신호전달의 활성화를 위해 글리코겐 합성효소 키나제 3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ )를 저하시키는 분화된 세포 집단.

#### 청구항 68

청구항 67에 있어서,

상기 하나 이상의 Wnt 활성화제는 CHIR99021, Wnt-1, WNT3A, Wnt4, Wnt5a, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 분화된 세포 집단.

#### 청구항 69

청구항 68에 있어서,

상기 하나 이상의 Wnt 활성화제는 CHIR99021인 분화된 세포 집단.

#### 청구항 70

청구항 53 내지 청구항 69 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 SC 분화 유도제는 뉴레굴린, LIF, CNTF, 폴스콜린, TGF $\beta$  및 FBS로 이루어진 군으로부터 선택되는 분화된 세포 집단.

#### 청구항 71

청구항 70에 있어서,

상기 하나 이상의 SC 분화 유도제는 NRG1인 분화된 세포 집단.

#### 청구항 72

청구항 48 내지 청구항 71 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 FGF 활성화제는 FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF7, FGF8, FGF10, FGF18, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 분화된 세포 집단.

#### 청구항 73

청구항 72에 있어서,

상기 하나의 FGF 활성화제는 FGF2인 분화된 세포 집단.

#### 청구항 74

청구항 48 내지 청구항 73 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커는 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, 및 SLC10A4로 이루어진 군으로부터 선택되는 분화된 세포 집단.

#### 청구항 75

청구항 48 내지 청구항 74 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 줄기 세포는 인간 줄기 세포인 분화된 세포 집단.

#### 청구항 76

청구항 75에 있어서,  
상기 인간 줄기 세포는 인간 다능성 줄기 세포인 분화된 세포 집단.

#### 청구항 77

청구항 75에 있어서,  
상기 인간 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포, 인간 유도된 다능성 줄기 세포, 인간 단성생식 줄기 세포, 원시 생식 세포-유사 다능성 줄기 세포, 배반엽상층 줄기 세포, 및 F-클래스 다능성 줄기 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 분화된 세포 집단.

#### 청구항 78

하나 이상의 슈반 세포 마커를 발현하는 시험관내에서 분화된 세포 집단으로서, 상기 분화된 세포 집단은 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 접촉시킨 후에 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 청구항 48 내지 청구항 77 중 어느 한 항의 세포 집단으로부터 유도되는 분화된 세포 집단.

#### 청구항 79

청구항 78에 있어서,  
상기 분화된 세포 집단은 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 청구항 48 내지 청구항 77 중 어느 한 항의 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 추가로 접촉시킨 후에 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포 집단으로부터 유도되는 분화된 세포 집단.

#### 청구항 80

청구항 78 또는 청구항 79에 있어서,

상기 하나 이상의 SC 분화 증강제는 사이클릭 아데노신 모노포스페이트(cAMP), 폴스콜린, LIF, 및 CNTF로 이루어진 군으로부터 선택되는 분화된 세포 집단.

#### 청구항 81

청구항 80에 있어서,  
상기 하나 이상의 SC 분화 증강제는 cAMP인 분화된 세포 집단.

#### 청구항 82

청구항 78 내지 청구항 81 중 어느 한 항에 있어서,  
하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 청구항 48 내지 청구항 77 중 어느 한 항의 상기 세포 집단은 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안 접촉되는 분화된 세포 집단.

#### 청구항 83

청구항 82에 있어서,  
하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 청구항 48 내지 청구항 77 중 어느 한 항의 상기 세포 집단은 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 약 10일 동안 접촉되는 분화된 세포 집단.

#### 청구항 84

청구항 82에 있어서,

하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 청구항 48 내지 청구항 77 중 어느 한 항의 상기 세포 집단은 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 약 35일 동안 접촉되는 분화된 세포 집단.

### 청구항 85

청구항 78 내지 청구항 84 중 어느 한 항에 있어서,

하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 청구항 48 내지 청구항 77 중 어느 한 항의 상기 세포 집단은 하나 이상의 SC 분화 증강제와 적어도 약 3일 동안 접촉되는 분화된 세포 집단.

### 청구항 86

청구항 85에 있어서,

하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 청구항 48 내지 청구항 77 중 어느 한 항의 상기 세포 집단은 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 10일 동안 접촉되는 분화된 세포 집단.

### 청구항 87

청구항 85에 있어서,

하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 청구항 48 내지 청구항 77 중 어느 한 항의 상기 세포 집단은 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 35일 동안 접촉되는 분화된 세포 집단.

### 청구항 88

청구항 77 내지 청구항 87 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 슈반 세포 마커는 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, 및 CDH19로 이루어진 군으로부터 선택되는 슈반 세포 마커로 이루어진 군으로부터 선택되는 분화된 세포 집단.

### 청구항 89

청구항 48 내지 청구항 77 중 어느 한 항의 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 포함하는 조성물.

### 청구항 90

청구항 78 내지 청구항 88 중 어느 한 항의 슈반 세포 집단을 포함하는 조성물.

### 청구항 91

대상체에서 슈반 세포 관련 장애를 방지 및/또는 치료하는 방법으로서, 슈반 세포 관련 장애를 앓는 대상체에 하기 중 하나의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법:

- (a) 청구항 48 내지 청구항 77 중 어느 한 항의 분화된 슈반 세포 전구체 집단;
- (b) 청구항 48 내지 청구항 77 중 어느 한 항의 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 포함하는 조성물;
- (c) 청구항 78 내지 청구항 88 중 어느 한 항의 슈반 세포 집단; 및
- (d) 청구항 78 내지 청구항 88 중 어느 한 항의 슈반 세포 집단을 포함하는 조성물.

### 청구항 92

청구항 91에 있어서,

상기 슈반 세포 관련 장애는 말초 신경병증인 방법.

### 청구항 93

청구항 91 또는 청구항 92에 있어서,  
상기 말초 신경병증은 당뇨병성 말초 신경병증인 방법.

### 청구항 94

대상체에서 슈반 세포 관련 장애를 방지 및/또는 치료하기 위한 청구항 48 내지 청구항 77 중 어느 한 항의 분화된 슈반 세포 전구체 집단.

### 청구항 95

청구항 94에 있어서,  
상기 슈반 세포 관련 장애는 말초 신경병증인 분화된 슈반 세포 전구체 집단.

### 청구항 96

청구항 95에 있어서,  
상기 말초 신경병증은 당뇨병성 말초 신경병증인 분화된 슈반 세포 전구체 집단.

### 청구항 97

대상체에서 슈반 세포 관련 장애를 방지 및/또는 치료하기 위한 청구항 48 내지 청구항 77 중 어느 한 항의 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 포함하는 조성물.

### 청구항 98

청구항 97에 있어서,  
상기 슈반 세포 관련 장애는 말초 신경병증인 조성물.

### 청구항 99

청구항 98에 있어서,  
상기 말초 신경병증은 당뇨병성 말초 신경병증인 조성물.

### 청구항 100

대상체에서 슈반 세포 관련 장애를 방지 및/또는 치료하기 위한 청구항 78 내지 청구항 88 중 어느 한 항의 슈반 세포 집단.

### 청구항 101

청구항 100에 있어서,  
상기 슈반 세포 관련 장애는 말초 신경병증인 슈반 세포 집단.

### 청구항 102

청구항 101에 있어서,  
상기 말초 신경병증은 당뇨병성 말초 신경병증인 슈반 세포 집단.

### 청구항 103

대상체에서 슈반 세포 관련 장애를 방지 및/또는 치료하기 위한 청구항 78 내지 청구항 88 중 어느 한 항의 슈반 세포 집단을 포함하는 조성물.

### 청구항 104

청구항 103에 있어서,

상기 슈반 세포 관련 장애는 말초 신경병증인 조성물.

### 청구항 105

청구항 104에 있어서,

상기 말초 신경병증은 당뇨병성 말초 신경병증인 조성물.

### 청구항 106

슈반 세포 관련 장애를 방지 및/또는 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 청구항 48 내지 청구항 77 중 어느 한 항의 분화된 슈반 세포 전구체 집단의 용도.

### 청구항 107

청구항 106에 있어서,

상기 슈반 세포 관련 장애는 말초 신경병증인 용도.

### 청구항 108

청구항 107에 있어서,

상기 말초 신경병증은 당뇨병성 말초 신경병증인 용도.

### 청구항 109

슈반 세포 관련 장애를 방지 및/또는 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 청구항 48 내지 청구항 77 중 어느 한 항의 분화된 슈반 세포 전구체 집단 조성물의 용도.

### 청구항 110

청구항 109에 있어서,

상기 슈반 세포 관련 장애는 말초 신경병증인 용도.

### 청구항 111

청구항 110에 있어서,

상기 말초 신경병증은 당뇨병성 말초 신경병증인 용도.

### 청구항 112

슈반 세포 관련 장애를 방지 및/또는 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 청구항 78 내지 청구항 88 중 어느 한 항의 슈반 세포 집단의 용도.

### 청구항 113

청구항 112에 있어서,

상기 슈반 세포 관련 장애는 말초 신경병증인 용도.

### 청구항 114

청구항 113에 있어서,

상기 말초 신경병증은 당뇨병성 말초 신경병증인 용도.

### 청구항 115

슈반 세포 관련 장애를 방지 및/또는 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 청구항 78 내지 청구항 88 중 어느 한 항의 슈반 세포 집단 조성물의 용도.

**청구항 116**

청구항 115에 있어서,  
상기 슈반 세포 관련 장애는 말초 신경병증인 용도.

**청구항 117**

청구항 116에 있어서,  
상기 말초 신경병증은 당뇨병성 말초 신경병증인 용도.

**청구항 118**

하나 이상의 TGF $\beta$  /Activin-Nodal 신호전달의 억제제,  
하나 이상의 Wnt 활성화제, 및  
하나 이상의 FGF 활성화제를 포함하는 줄기 세포의 분화를 유도하기 위한 키트.

**청구항 119**

청구항 118에 있어서,  
줄기 세포를 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단으로 분화를 유도하기 위한 지침을 포함하며, 상기 지침은 상기 세포를 상기 하나 이상의 FGF 활성화제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.

**청구항 120**

청구항 119에 있어서,  
상기 지침은 상기 세포를 상기 하나 이상의 FGF 활성화제와 약 14일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.

**청구항 121**

청구항 119 또는 청구항 120에 있어서,  
상기 지침은 상기 세포와 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제의 최초 접촉으로부터 약 20일 이하에 상기 세포를 상기 하나 이상의 FGF 활성화제와 최초 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.

**청구항 122**

청구항 121에 있어서,  
상기 세포와 상기 하나 이상의 FGF 활성화제의 최초 접촉은 상기 세포와 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제의 최초 접촉으로부터 약 10일 내지 약 15일인 키트.

**청구항 123**

청구항 1202에 있어서,  
상기 세포와 상기 하나 이상의 FGF 활성화제의 최초 접촉은 상기 세포와 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제의 최초 접촉으로부터 11일인 키트.

**청구항 124**

청구항 118 내지 청구항 123 중 어느 한 항에 있어서,  
하나 이상의 SC 분화 유도제를 추가로 포함하는 키트.

**청구항 125**

청구항 124에 있어서,

상기 지침은 상기 세포를 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안 추가로 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.

### 청구항 126

청구항 125에 있어서,

상기 지침은 상기 세포를 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 14일 동안 추가로 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.

### 청구항 127

청구항 124 내지 청구항 126 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포와 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제의 최초 접촉은 상기 세포와 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제의 최초 접촉으로부터 약 10일 내지 약 15일인 키트.

### 청구항 128

청구항 124 내지 청구항 127 중 어느 한 항에 있어서,

상기 지침은 상기 세포를 상기 하나 이상의 FGF 활성화제 및 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제와 함께 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.

### 청구항 129

청구항 118 내지 청구항 128 중 어느 한 항에 있어서,

하나 이상의 SMAD 억제제를 추가로 포함하는 키트.

### 청구항 130

청구항 129에 있어서,

상기 지침은 상기 줄기 세포를 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제 및 상기 하나 이상의 SMAD 억제제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 키트.

### 청구항 131

청구항 130에 있어서,

상기 지침은 상기 줄기 세포를 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제 및 상기 하나 이상의 SMAD 억제제와 함께 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.

### 청구항 132

청구항 118 내지 청구항 131 중 어느 한 항에 있어서,

상기 지침은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 4일 이하에 상기 세포를 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제와 최초 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.

### 청구항 133

청구항 132에 있어서,

상기 지침은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 2일에 상기 세포를 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제와 최초 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.

### 청구항 134

청구항 132에 있어서,

상기 지침은 상기 세포와 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제의 최초 접촉과 같은 날에 상기 줄기 세포를 상기 하나

이상의 TGF $\beta$  /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 최초 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.

#### 청구항 135

청구항 118 내지 청구항 134 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 TGF $\beta$  /Activin-Nodal 신호전달의 억제제는 SB431542, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 키트.

#### 청구항 136

청구항 135에 있어서,

상기 하나 이상의 TGF $\beta$  /Activin-Nodal 신호전달의 억제제는 SB431542인 키트.

#### 청구항 137

청구항 129 내지 청구항 136 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 SMAD 억제제는 LDN193189, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 키트.

#### 청구항 138

청구항 137에 있어서,

상기 하나 이상의 SMAD 억제제는 LDN193189인 키트.

#### 청구항 139

청구항 118 내지 청구항 138 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 Wnt 활성화제는 Wnt 신호전달의 활성화를 위해 글리코겐 합성효소 키나제 3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ )를 저하시키는 키트.

#### 청구항 140

청구항 139에 있어서,

상기 하나 이상의 Wnt 활성화제는 CHIR99021, Wnt-1, WNT3A, Wnt4, Wnt5a, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 키트.

#### 청구항 141

청구항 140에 있어서,

상기 하나 이상의 Wnt 활성화제는 CHIR99021인 키트.

#### 청구항 142

청구항 124 내지 청구항 141 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 SC 분화 유도제는 뉴레굴린, LIF, CNTF, 폴스콜린, TGF $\beta$  및 FBS로 이루어진 군으로부터 선택되는 키트.

#### 청구항 143

청구항 142에 있어서,

상기 하나 이상의 SC 분화 유도제는 NRG1인 키트.

#### 청구항 144

청구항 118 내지 청구항 143 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 FGF 활성화제는 FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF7, FGF8, FGF10, FGF18, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 키트.

#### 청구항 145

청구항 144에 있어서,

상기 하나의 FGF 활성화제는 FGF2인 키트.

#### 청구항 146

청구항 118 내지 청구항 145 중 어느 한 항에 있어서,

하나 이상의 SC 분화 증강제, 및 상기 분화된 세포를 슈반 세포 집단으로 성숙을 유도하기 위한 지침을 추가로 포함하는 키트.

#### 청구항 147

청구항 146에 있어서,

상기 하나 이상의 SC 분화 증강제는 사이클릭 아데노신 모노포스페이트(cAMP), 폴스콜린, LIF, 및 CNTF로 이루어진 군으로부터 선택되는 키트.

#### 청구항 148

청구항 147에 있어서,

상기 하나 이상의 SC 분화 증강제는 cAMP인 키트.

#### 청구항 149

청구항 146 내지 청구항 148 중 어느 한 항에 있어서,

상기 분화된 세포를 슈반 세포 집단으로 성숙을 유도하기 위한 상기 지침은 상기 분화된 세포를 상기 하나 이상의 FGF 활성화제 및 상기 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.

#### 청구항 150

청구항 149에 있어서,

상기 분화된 세포를 슈반 세포 집단으로 성숙을 유도하기 위한 상기 지침은 상기 분화된 SC 전구체 세포 집단을 상기 하나 이상의 FGF 활성화제 및 상기 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.

#### 청구항 151

청구항 149에 있어서,

상기 분화된 세포를 슈반 세포 집단으로 성숙을 유도하기 위한 상기 지침은 상기 분화된 SC 전구체 세포 집단을 상기 하나 이상의 FGF 활성화제 및 상기 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 약 10일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.

#### 청구항 152

청구항 150에 있어서,

상기 분화된 세포를 슈반 세포 집단으로 성숙을 유도하기 위한 상기 지침은 상기 분화된 SC 전구체 세포 집단을 상기 하나 이상의 FGF 활성화제 및 상기 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 약 35일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.

#### 청구항 153

청구항 146 내지 청구항 151 중 어느 한 항에 있어서,

상기 분화된 세포를 슈반 세포 집단으로 성숙을 유도하기 위한 상기 지침은 상기 분화된 SC 전구체 세포 집단을 상기 하나 이상의 SC 분화 증강제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 키트.

#### 청구항 154

청구항 153에 있어서,

상기 분화된 세포를 슈반 세포 집단으로 성숙을 유도하기 위한 상기 지침은 상기 분화된 SC 전구체 세포 집단을 상기 하나 이상의 SC 분화 증강제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 키트.

#### 청구항 155

청구항 154에 있어서,

상기 분화된 세포를 슈반 세포 집단으로 성숙을 유도하기 위한 상기 지침은 상기 분화된 SC 전구체 세포 집단을 상기 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 14일 동안 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 키트.

#### 청구항 156

청구항 154에 있어서,

상기 분화된 세포를 슈반 세포 집단으로 성숙을 유도하기 위한 상기 지침은 상기 분화된 SC 전구체 세포 집단을 상기 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 35일 동안 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 키트.

#### 청구항 157

청구항 153 내지 청구항 156 중 어느 한 항에 있어서,

상기 분화된 세포를 슈반 세포 집단으로 성숙을 유도하기 위한 상기 지침은 상기 분화된 SC 전구체 세포 집단을 상기 하나 이상의 FGF 활성화제, 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제, 및 하나 이상의 SC 분화 증강제와 함께 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.

#### 청구항 158

줄기 세포 집단을 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 접촉시키는 단계, 및 상기 세포를 하나 이상의 Wnt 활성화제와 접촉시키는 단계, 및 상기 줄기 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제와 적어도 약 3일 동안, 약 3일 내지 약 20일, 약 10일 내지 약 20일 또는 약 10일 내지 약 15일 동안 추가로 접촉시켜 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단을 생성하는 단계를 포함하는 줄기 세포의 분화를 시험관내에서 유도하는 방법으로서, 상기 하나 이상의 FGF 활성화제와 상기 세포의 최초 접촉은 상기 줄기 세포 와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 10일 이하인 방법.

#### 청구항 159

청구항 158에 있어서,

상기 세포와 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제의 최초 접촉은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 4일 이하인 방법.

#### 청구항 160

청구항 158 또는 청구항 159에 있어서,

상기 세포를 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안, 약 3일 내지 약 20일 동안, 약 10일 내지 약 20일 또는 약 10일 내지 약 15일 동안 추가로 접촉시켜 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단을 생성하는 단계를 추가로 포함하며, 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제와 상기 세포의 최초 접촉은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 10일 이하인 방법.

#### 청구항 161

청구항 160에 있어서,

상기 세포를 하나 이상의 SC 분화 유도제 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 함께 적어도 약 3일 동안, 약 3일 내지 약 20일 동안, 약 10일 내지 약 20일 또는 약 10일 내지 약 15일 동안 추가로 접촉시켜 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단을 생성하는 단계를 추가로 포함하며, 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 상기 세포의 최초 접촉은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal1 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 10일 이하인 방법.

#### 청구항 162

하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 시험관내에서 분화된 세포 집단으로서, 상기 분화된 세포 집단은 줄기 세포 집단을 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal1 신호전달의 억제제와 접촉시키는 단계, 상기 세포를 하나 이상의 Wnt 활성화제와 접촉시키는 단계, 및 상기 세포를 하나 이상의 FGF 활성화제와 적어도 약 3일 동안, 약 3일 내지 약 20일 동안, 약 10일 내지 약 20일 또는 약 10일 내지 약 15일 동안 추가로 접촉시키는 단계 후에 줄기 세포 집단으로부터 유도되며, 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제 및 상기 하나 이상의 FGF 활성화제와 상기 세포의 최초 접촉은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal1 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 20일 이하인 분화된 세포 집단.

#### 청구항 163

청구항 162에 있어서,

상기 세포와 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제의 최초 접촉은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal1 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 4일 이하인 분화된 세포 집단.

#### 청구항 164

청구항 162 또는 청구항 163에 있어서,

상기 세포를 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안, 약 3일 내지 약 20일 동안, 약 10일 내지 약 20일 또는 약 10일 내지 약 15일 동안 추가로 접촉시키는 단계를 추가로 포함하며, 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제와 상기 세포의 최초 접촉은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal1 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 10일 이하인 분화된 세포 집단.

#### 청구항 165

청구항 164에 있어서,

상기 세포를 하나 이상의 SC 분화 유도제 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 함께 적어도 약 3일 동안, 약 3일 내지 약 20일 동안, 약 10일 내지 약 20일 또는 약 10일 내지 약 15일 동안 추가로 접촉시키는 단계를 추가로 포함하며, 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 상기 세포의 최초 접촉은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal1 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 10일 이하인 방법.

#### 청구항 166

신경 능선 계통 세포의 분화를 시험관내에서 유도하는 방법으로서, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 Wnt 활성화제, 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 포함하여 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포 집단을 생성하는 방법.

#### 청구항 167

청구항 166에 있어서,

상기 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 168

청구항 166 또는 청구항 167에 있어서,

상기 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제 및 하나

이상의 FGF 활성화제와 최대 약 30일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 169

청구항 166 내지 청구항 168 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 약 5일 내지 약 15일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 170

청구항 169에 있어서,

하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 약 14일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 171

청구항 166 내지 청구항 170 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 유도제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 172

청구항 171에 있어서,

상기 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 173

청구항 171 또는 청구항 172에 있어서,

상기 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제와 최대 약 30일 동안 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 174

청구항 171 내지 청구항 173 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 14일 동안 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 175

청구항 171 내지 청구항 174 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 상기 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 하나 이상의 SC 분화 유도제와 함께 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 176

청구항 166 내지 청구항 175 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 Wnt 활성화제는 Wnt 신호전달의 활성화를 위해 글리코겐 합성효소 키나제 3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ )를 저하시키는 방법.

### 청구항 177

청구항 176에 있어서,

상기 하나 이상의 Wnt 활성화제는 CHIR99021, Wnt-1, WNT3A, Wnt4, Wnt5a, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 방법.

### 청구항 178

청구항 177에 있어서,  
상기 하나 이상의 Wnt 활성화제는 CHIR99021인 방법.

### 청구항 179

청구항 171 내지 청구항 178 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 하나 이상의 SC 분화 유도제는 뉴레굴린, LIF, CNTF, 폴스콜린, TGF $\beta$  및 FBS로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

### 청구항 180

청구항 179에 있어서,  
상기 하나 이상의 SC 분화 유도제는 NRG1인 방법.

### 청구항 181

청구항 166 내지 청구항 180 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 하나 이상의 FGF 활성화제는 FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF7, FGF8, FGF10, FGF18, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

### 청구항 182

청구항 181에 있어서,  
상기 하나 이상의 FGF 활성화제는 FGF2인 방법.

### 청구항 183

청구항 166 내지 청구항 182 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커는 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, 및 SLC10A4로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

### 청구항 184

청구항 166 내지 청구항 183 중 어느 한 항에 있어서,  
하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단이 상기 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 선호하는 조건을 거치게 하는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 185

청구항 184에 있어서,  
상기 조건은 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 186

청구항 185에 있어서,  
하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 187

청구항 186에 있어서,

하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 상기 하나 이상의 FGF 활성화제 및 상기 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 약 10일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 188

청구항 186에 있어서,

하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 상기 하나 이상의 FGF 활성화제 및 상기 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 약 35일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 189

청구항 184 내지 청구항 188 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조건은 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 190

청구항 189에 있어서,

하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 상기 하나 이상의 SC 분화 증강제와 적어도 약 3일 동안 추가로 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 191

청구항 190에 있어서,

하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 상기 하나 이상의 SC 분화 증강제와 적어도 약 10일 동안 추가로 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 192

청구항 191에 있어서,

하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 상기 하나 이상의 SC 분화 증강제와 적어도 약 35일 동안 추가로 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 193

청구항 189 내지 청구항 192 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 상기 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 SC 분화 증강제와 함께 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 194

청구항 189 내지 청구항 193 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 SC 분화 증강제는 사이클릭 아데노신 모노포스페이트(cAMP), 폴스콜린, LIF, 및 CNTF로 이루 어진 군으로부터 선택되는 방법.

### 청구항 195

청구항 194에 있어서,

상기 하나 이상의 SC 분화 증강제는 cAMP인 방법.

### 청구항 196

청구항 184 내지 청구항 195 중 어느 한 항에 있어서,

상기 슈반 세포 집단은 하나 이상의 슈반 세포 마커를 발현하는 방법.

**청구항 197**

청구항 196에 있어서,

상기 하나 이상의 슈반 세포 마커는 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, TGF $\beta$ 1, CD9, CD81, CD44, CD98, CD49E, CD49D, TYRP1, ENTHD1, NT5E, HTR2B, NOV, IL8, SLC16A6, CDKN2A, PLP2, S100A6, AQP9, 및 CDH19로 이루어진 군으로부터 선택되는 슈반 세포 마커로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 198**

청구항 166 내지 청구항 197 중 어느 한 항에 있어서,

상기 신경 능선 계통 마커는 SOX10, p75, HNK1, CD49D, ERBB3, TFAP2, SNAIL 및 SLUG로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 199**

하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 시험관내에서 분화된 세포 집단으로서, 상기 분화된 세포 집단은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제와 적어도 약 3일 동안, 최대 약 30일 동안, 또는 약 5일 내지 약 15일 동안 접촉시키는 단계 후에 신경 능선 계통 세포 집단으로부터 유도되는 분화된 세포 집단.

**청구항 200**

청구항 199에 있어서,

하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 상기 세포 집단은 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 14일 동안 접촉되는 분화된 세포 집단.

**청구항 201**

청구항 199 또는 청구항 200에 있어서,

하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 상기 세포 집단은 하나 이상의 SC 분화 유도제와 추가로 접촉되는 분화된 세포 집단.

**청구항 202**

청구항 201에 있어서,

하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 상기 세포 집단은 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안, 최대 약 30일 동안, 또는 약 5일 내지 약 15일 동안 추가로 접촉되는 분화된 세포 집단.

**청구항 203**

청구항 202에 있어서,

하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 상기 세포 집단은 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 14일 동안 추가로 접촉되는 분화된 세포 집단.

**청구항 204**

청구항 199 내지 청구항 203 중 어느 한 항에 있어서,

하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 상기 세포 집단은 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 하나 이상의 SC 분화 유도제와 함께 접촉되는 분화된 세포 집단.

**청구항 205**

청구항 199 내지 청구항 204 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 Wnt 활성화제는 Wnt 신호전달의 활성화를 위해 글리코겐 합성효소 키나제 3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ )를 저하시키는 분화된 세포 집단.

#### 청구항 206

청구항 205에 있어서,

상기 하나 이상의 Wnt 활성화제는 CHIR99021, Wnt-1, WNT3A, Wnt4, Wnt5a, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 분화된 세포 집단.

#### 청구항 207

청구항 206에 있어서,

상기 하나 이상의 Wnt 활성화제는 CHIR99021인 분화된 세포 집단.

#### 청구항 208

청구항 201 내지 청구항 207 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 SC 분화 유도제는 뉴레굴린, LIF, CNTF, 폴스콜린, TGF $\beta$  및 FBS로 이루어진 군으로부터 선택되는 분화된 세포 집단.

#### 청구항 209

청구항 208에 있어서,

상기 하나 이상의 SC 분화 유도제는 NRG1인 분화된 세포 집단.

#### 청구항 210

청구항 199 내지 청구항 209 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 FGF 활성화제는 FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF7, FGF8, FGF10, FGF18, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 분화된 세포 집단.

#### 청구항 211

청구항 210에 있어서,

상기 하나의 FGF 활성화제는 FGF2인 분화된 세포 집단.

#### 청구항 212

청구항 199 내지 청구항 211 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커는 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, 및 SLC10A4로 이루어진 군으로부터 선택되는 분화된 세포 집단.

#### 청구항 213

청구항 199 내지 청구항 212 중 어느 한 항에 있어서,

신경 능선 계통 마커는 SOX10, p75, HNK1, CD49D, ERBB3, TFAP2, SNAIL 및 SLUG로 이루어진 군으로부터 선택되는 분화된 세포 집단.

#### 청구항 214

줄기 세포 집단을 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단으로 시험관내에서 분화시키는 단계, 및 상기 분화된 세포를 하나 이상의 Wnt 활성화제 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 접촉시켜 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포 집단을 생성하는 단계를 포함하는 줄기 세포의 분화를 시험관내에서 유도하는 방법.

### 청구항 215

청구항 214에 있어서,

상기 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 216

청구항 215에 있어서,

상기 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제와 최대 약 30일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 217

청구항 216에 있어서,

상기 방법은 상기 분화된 세포를 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제와 약 5일 내지 약 15일 또는 약 10일 내지 15일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 218

청구항 217에 있어서,

하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 약 14일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 219

청구항 214 내지 청구항 218 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 유도제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 220

청구항 219에 있어서,

상기 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 221

청구항 220에 있어서,

상기 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 유도제와 최대 약 30일 동안 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 222

청구항 221에 있어서,

상기 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 14일 동안 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 223

청구항 214 내지 청구항 222 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 SC 분화 유도제와 함께 접촉시켜 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포 집단을 생성하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 224**

청구항 214 내지 청구항 223 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 Wnt 활성화제는 Wnt 신호전달의 활성화를 위해 글리코겐 합성효소 키나제 3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ )를 저하시키는 방법.

**청구항 225**

청구항 224에 있어서,

상기 하나 이상의 Wnt 활성화제는 CHIR99021, Wnt-1, WNT3A, Wnt4, Wnt5a, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 방법.

**청구항 226**

청구항 225에 있어서,

상기 하나 이상의 Wnt 활성화제는 CHIR99021인 방법.

**청구항 227**

청구항 219 내지 청구항 226 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 SC 분화 유도제는 뉴레콜린, LIF, CNTF, 폴스콜린, TGF $\beta$  및 FBS로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 228**

청구항 227에 있어서,

상기 하나 이상의 SC 분화 유도제는 NRG1인 방법.

**청구항 229**

청구항 214 내지 청구항 228 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 FGF 활성화제는 FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF7, FGF8, FGF10, FGF18, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 230**

청구항 229에 있어서,

상기 하나 이상의 FGF 활성화제는 FGF2인 방법.

**청구항 231**

청구항 214 내지 청구항 230 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커는 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, 및 SLC10A4로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 232**

청구항 214 내지 청구항 231 중 어느 한 항에 있어서,

하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단이 상기 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 선호하는 조건을 거치게 하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 233**

청구항 232에 있어서,

상기 조건은 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 234

청구항 233에 있어서,

하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 상기 하나 이상의 FGF 활성화제 및 상기 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 235

청구항 234에 있어서,

하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 상기 하나 이상의 FGF 활성화제 및 상기 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 약 10일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 236

청구항 234에 있어서,

하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 상기 하나 이상의 FGF 활성화제 및 상기 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 약 35일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 237

청구항 232 내지 청구항 236 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조건은 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 추가로 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 238

청구항 237에 있어서,

상기 조건은 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 적어도 약 3일 동안 추가로 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 239

청구항 238에 있어서,

상기 조건은 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 10일 동안 추가로 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 240

청구항 238에 있어서,

상기 조건은 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 35일 동안 추가로 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 241

청구항 237 내지 청구항 240 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조건은 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 상기 하나 이상의 FGF 활성화제, 상기 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제, 및 상기 하나 이상의 SC 분화 증강제와 함께 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 242

청구항 237 내지 청구항 241 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 SC 분화 증강제는 사이클릭 아데노신 모노포스페이트(cAMP), 폴스콜린, LIF, 및 CNTF로 이루 어진 군으로부터 선택되는 방법.

#### 청구항 243

청구항 242에 있어서,

상기 하나 이상의 SC 분화 증강제는 cAMP인 방법.

#### 청구항 244

청구항 232 내지 청구항 243 중 어느 한 항에 있어서,

상기 슈반 세포 집단은 하나 이상의 슈반 세포 마커를 발현하는 방법.

#### 청구항 245

청구항 244에 있어서,

상기 하나 이상의 슈반 세포 마커는 LRRTM4, CDH1, FABP7, BDNF, UNCB5, SOSTDC1, OLIG1, PLAT, KCNJ10, SHH, NTN1, GDNF, NGFR, NFATC4, MOG, IFNG, MAL, NTF3, TGFB1, SOX10, S100, GFAP, POU3F1, PMP22, MBP, AQP4, MPZ, GFAP, ERBB3, CD9, CD81, CD44, CD98, CD49E, CD49D, TYRP1, ENTHD1, NT5E, HTR2B, NOV, IL8, SLC16A6, CDKN2A, PLP2, S100A6, AQP9, 및 CDH19로 이루어진 군으로부터 선택되는 슈반 세포 마커로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

#### 청구항 246

청구항 213 내지 청구항 245 중 어느 한 항에 있어서,

줄기 세포 집단을 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단으로 시험관내에서 분화시키는 것은 SMAD 신호전달의 억제 및 Wnt 신호전달의 활성화를 포함하는 방법.

#### 청구항 247

청구항 214 내지 청구항 246 중 어느 한 항에 있어서,

줄기 세포 집단을 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단으로 시험관내에서 분화시키는 것은 상기 줄기 세포를 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 접촉시키는 단계, 및 상기 세포를 하나 이상의 Wnt 활성화제와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 248

청구항 247에 있어서,

상기 줄기 세포 집단을 하나 이상의 SMAD 억제제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 249

청구항 248에 있어서,

상기 줄기 세포를 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제 및 상기 하나 이상의 SMAD 억제제와 함께 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 250

청구항 247 내지 청구항 249 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포와 하나 이상의 Wnt 활성화제의 최초 접촉은 상기 줄기 세포 집단과 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 4일 이하인 방법.

#### 청구항 251

청구항 250에 있어서,

상기 세포와 상기 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제의 최초 접촉은 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 2일인 방법.

#### **청구항 252**

청구항 247 내지 청구항 251 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제는 SB431542, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 방법.

#### **청구항 253**

청구항 252에 있어서,

상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제는 SB431542인 방법.

#### **청구항 254**

청구항 248 내지 청구항 253 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 SMAD 억제제는 LDN193189, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 방법.

#### **청구항 255**

청구항 254에 있어서,

상기 하나 이상의 SMAD 억제제는 LDN193189인 방법.

#### **청구항 256**

청구항 214 내지 청구항 255 중 어느 한 항에 있어서,

상기 신경 능선 계통 마커는 SOX10, p75, HNK1, CD49D, ERBB3, TFAP2, SNAIL 및 SLUG로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

#### **청구항 257**

대상체에서 PNS 및/또는 CNS를 재생하는 방법으로서, 대상체에 하기 중 하나의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법:

- (a) 청구항 48 내지 청구항 77 및 청구항 197 내지 청구항 211 중 어느 한 항의 분화된 슈반 세포 전구체 집단;
- (b) 청구항 48 내지 청구항 77 및 청구항 199 내지 청구항 213 중 어느 한 항의 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 포함하는 조성물;
- (c) 청구항 78 내지 청구항 88 중 어느 한 항의 슈반 세포 집단; 및
- (d) 청구항 78 내지 청구항 88 중 어느 한 항의 슈반 세포 집단을 포함하는 조성물.

#### **청구항 258**

대상체에서 PNS 및/또는 CNS를 재생하기 위한 청구항 48 내지 청구항 77 및 청구항 199 내지 청구항 213 중 어느 한 항의 분화된 슈반 세포 전구체 집단.

#### **청구항 259**

대상체에서 PNS 및/또는 CNS를 재생하기 위한 청구항 48 내지 청구항 77 및 청구항 199 내지 청구항 213 중 어느 한 항의 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 포함하는 조성물.

#### **청구항 260**

대상체에서 PNS 및/또는 CNS를 재생하기 위한 청구항 78 내지 청구항 88 중 어느 한 항의 슈반 세포 집단.

**청구항 261**

대상체에서 PNS 및/또는 CNS를 재생하기 위한 청구항 78 내지 청구항 88 중 어느 한 항의 슈반 세포 집단을 포함하는 조성물.

**청구항 262**

PNS 및/또는 CNS를 재생하기 위한 약제의 제조에 있어서의 청구항 48 내지 청구항 77 및 청구항 199 내지 청구항 213 중 어느 한 항의 분화된 슈반 세포 전구체 집단의 용도.

**청구항 263**

PNS 및/또는 CNS를 재생하기 위한 약제의 제조에 있어서의 청구항 48 내지 청구항 77 및 청구항 199 내지 청구항 213 중 어느 한 항의 분화된 슈반 세포 전구체 집단 조성물의 용도.

**청구항 264**

PNS 및/또는 CNS를 재생하기 위한 약제의 제조에 있어서의 청구항 78 내지 청구항 88 중 어느 한 항의 슈반 세포 집단의 용도.

**청구항 265**

PNS 및/또는 CNS를 재생하기 위한 약제의 제조에 있어서의 청구항 78 내지 청구항 88 중 어느 한 항의 슈반 세포 집단 조성물의 용도.

**청구항 266**

대상체에서 미엘린 손상을 방지 및/또는 치료하는 방법으로서, 대상체에 하기 중 하나의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법:

- (a) 청구항 48 내지 청구항 77 및 청구항 199 내지 청구항 213 중 어느 한 항의 분화된 슈반 세포 전구체 집단;
- (b) 청구항 48 내지 청구항 77 및 청구항 199 내지 청구항 213 중 어느 한 항의 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 포함하는 조성물;
- (c) 청구항 78 내지 청구항 88 중 어느 한 항의 슈반 세포 집단; 및
- (d) 청구항 78 내지 청구항 88 중 어느 한 항의 슈반 세포 집단을 포함하는 조성물.

**청구항 267**

대상체에서 미엘린 손상을 방지 및/또는 치료하기 위한 청구항 48 내지 청구항 77 및 청구항 199 내지 청구항 213 중 어느 한 항의 분화된 슈반 세포 전구체 집단.

**청구항 268**

대상체에서 미엘린 손상을 방지 및/또는 치료하기 위한 청구항 48 내지 청구항 77 및 청구항 199 내지 청구항 213 중 어느 한 항의 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 포함하는 조성물.

**청구항 269**

대상체에서 미엘린 손상을 방지 및/또는 치료하기 위한 청구항 78 내지 청구항 88 중 어느 한 항의 슈반 세포 집단.

**청구항 270**

대상체에서 미엘린 손상을 방지 및/또는 치료하기 위한 청구항 78 내지 청구항 88 중 어느 한 항의 슈반 세포 집단을 포함하는 조성물.

**청구항 271**

미엘린 손상을 방지 및/또는 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 청구항 48 내지 청구항 77 및 청구항 199

내지 청구항 213 중 어느 한 항의 분화된 슈반 세포 전구체 집단의 용도.

### 청구항 272

미엘린 손상을 방지 및/또는 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 청구항 48 내지 청구항 77 및 청구항 199 내지 청구항 213 중 어느 한 항의 분화된 슈반 세포 전구체 집단 조성물의 용도.

### 청구항 273

미엘린 손상을 방지 및/또는 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 청구항 78 내지 청구항 88 중 어느 한 항의 슈반 세포 집단의 용도.

### 청구항 274

미엘린 손상을 방지 및/또는 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 청구항 78 내지 청구항 88 중 어느 한 항의 슈반 세포 집단 조성물의 용도.

### 청구항 275

시험관내에서 분화된 세포 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 세포 집단의 적어도 약 50%는 하나 이상의 SC 전구체 마커를 발현하고, 상기 세포 집단의 약 25% 미만은 줄기 세포 마커, CNS 마커, 뉴런 세포 마커, 및 중간엽 전구체 마커로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는 조성물.

### 청구항 276

청구항 275에 있어서,

상기 하나 이상의 SC 전구체 마커는 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, 및 SLC10A4로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

### 청구항 277

청구항 275 또는 청구항 276에 있어서,

상기 줄기 세포 마커는 OCT4, NANOG, SSEA4 및 SSEA3. NAU1로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

### 청구항 278

청구항 275 내지 청구항 277 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CNS 마커는 PAX6, NESTIN, 및 SOX1로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

### 청구항 279

청구항 275 내지 청구항 278 중 어느 한 항에 있어서,

상기 뉴런 세포 마커는 TUJ1, MAP2, NFH, BRN3A, ISL1, TH, ASCL1, CHAT, PHOX2B, PHOX2A, TRKA, TRKB, 및 TRKC로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

### 청구항 280

청구항 275 내지 청구항 279 중 어느 한 항에 있어서,

상기 중간엽 전구체 마커는 SMA, 및 CD73으로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

### 청구항 281

시험관내에서 분화된 세포 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 세포 집단의 적어도 약 50%는 하나 이상의 SC 마커를 발현하고, 상기 세포의 약 25% 미만은 SC 전구체 마커, 줄기 세포 마커, CNS 마커, 뉴런 세포 마커, 및 중간엽 전구체 마커로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는 조성물.

**청구항 282**

청구항 281에 있어서,

상기 하나 이상의 SC 마커는 LRRTM4, CDH1, FABP7, BDNF, UNCB5, SOSTDC1, OLIG1, PLAT, KCNJ10, SHH, NTN1, GDNF, SOX10, S100, GFAP, POU3F1, PMP22, MBP, AQP4, MPZ, GFAP, ERBB3, CD9, CD81, CD44, CD98, CD49E, CD49D, NGFR, NFATC4, MOG, IFNG, MAL, NTF3, TGFB1, TYRP1, ENTHD1, NT5E, HTR2B, NOV, IL8, SLC16A6, CDKN2A, PLP2, S100A6, AQP9, 및 CDH19로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

**청구항 283**

청구항 281 또는 청구항 282에 있어서,

상기 SC 전구체 마커는 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, 및 SLC10A4로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

**청구항 284**

청구항 281 내지 청구항 283 중 어느 한 항에 있어서,

상기 줄기 세포 마커는 OCT4, NANOG, SSEA4 및 SSEA3. NAU1로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

**청구항 285**

청구항 281 내지 청구항 284 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CNS 마커는 PAX6, NESTIN, 및 SOX1로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

**청구항 286**

청구항 281 내지 청구항 285 중 어느 한 항에 있어서,

상기 뉴런 세포 마커는 TUJ1, MAP2, NFH, BRN3A, ISL1, TH, ASCL1, CHAT, PHOX2B, PHOX2A, TRKA, TRKB, 및 TRKC로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

**청구항 287**

청구항 281 내지 청구항 286 중 어느 한 항에 있어서,

상기 중간엽 전구체 마커는 SMA, 및 CD73으로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

**발명의 설명****기술 분야****[0001] 관련 출원에 관한 교차 참조**

본 출원은 2016년 11월 14일에 출원된 미국 가출원 제62/421,816호에 대한 우선권을 청구하며, 그 내용은 전문이 본원에 참조로 포함되고, 각각에 대한 우선권이 청구된다.

**[0003] 개요**

본원에서 개시된 요지 사안은 줄기 세포(예로, 인간 줄기 세포)로부터 유도된 슈반 세포 전구체 및 슈반 세포 그리고 말초 신경계(PNS) 및/또는 중추 신경계("CNS")의 재생에서의 세포-기반 치료, 미엘린 손상의 방지 및/또는 보수, 및/또는 말초 신경병증(예로, 당뇨병성 말초 신경병증)의 방지 및/또는 치료를 위한 이의 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

슈반 세포(SC)는 말초 신경계(PNS)의 아교 세포이며 PNS 기능을 위해 필수적이다. 이들은 슈반 세포 전구체 (SCP) 중간체를 통해 신경 능선(NC)으로부터 발생한다. SC는 PNS의 기능적 조절, 유지 및 보수에서 중추적 역할

을 담당하며, 부상 후에 신경 보수를 촉진하는 탁월한 능력을 나타낸다(Jessen et al., 2015; Lavdas et al., 2008). SC 결함은 광범위한 인간 장애, 예컨대 슈반세포증, 샤르코 마리 투스병(Charcot Marie Tooth Disease), 길랭 바레 증후군(Guillain Barre Syndrome) 및 당뇨병성 말초 신경병증(DPN)을 포함하는 다양한 다른 말초 신경병증에 관여된다.

[0006] 당뇨병은 말초 신경병증의 주요 원인으로, 당뇨병 환자의 30%(Callaghan et al., 2012) 내지 60%(Zochodne, 2007)에 영향을 미친다. 이는 삶의 질 감소 및 유병률과 사망률 증가를 유도하는 주요 건강 문제를 나타낸다(La Fontaine et al., 2014). 미국에서 DPN에 관련된 의료 비용은 2001년에 연간 46억 달러 내지 137억 달러로 추산되었으며, 계속 증가하고 있다(Gordois et al., 2003). DPN의 증상은 다양하지만, 자율 및 ENS 합병증뿐만 아니라 감각 기능이상 및 통증이 포함된다.

[0007] 현재 글루코스 수준을 조심스럽게 모니터링하고 조정하여 추가 손상을 방지하는 일차 목표를 추구하는 것 외에 DPN에 대해 유효한 치료는 존재하지 않는다. 대증 치료에는 신경병 통증에 대처하기 위한 오피오이드뿐만 아니라 항우울제, 항경련제의 사용이 포함된다.

[0008] DPN의 발병기전에는 말초 신경에서 세포독성 및 변성을 야기하는 몇몇 복잡한 기여 인자가 관여될 수 있다(Simmons and Feldman, 2002). 당뇨병에서 고혈당증, 저산소증 및 산화적 스트레스가 특히 감각 신경에서 SC의 변성을 야기한다는 증거가 존재한다(Eckersley, 2002). 궁극적인 증상은 뉴런의 기능이상으로부터 일어나는 반면, 감각 뉴런 또는 아교 세포가 DPN의 발병기전에서 핵심 역할을 담당하는지 여부는 불명확하다. 이러한 메커니즘의 분해는 질환 표현형에 대한 비-세포 차율 인자의 복잡한 기여로 인해 현재의 동물 모델에서는 매우 난제가 되고 있다.

[0009] 이전에 확립된 hPSC 분화 프로토콜은 감각 뉴런에 대한 체계적 접근을 가능하게 하지만, hPSC로부터 SC의 강력한 유도 방법은 존재하지 않는다. 또한, 이후의 SC-유사 세포는 핵심 계통 마커의 강력한 발현을 나타내지 않으며 일반적으로 미엘린 구조를 생성하지 못한다. 따라서, 인간 줄기 세포로부터 SC 전구체 및 SC를 생성하는 시험관내 방법 및 프로토콜에 대한 필요성이 남아있다.

### 발명의 내용

[0010] 본원에서 개시된 요지 사안은, 예로, 시험관내 분화에 의한, 줄기 세포(예로, 인간 줄기 세포)로부터 유도되는 슈반 세포 전구체 및 슈반 세포, 그리고 상기 세포를 생성하고 사용하는 방법에 관한 것이다.

[0011] 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 신경 능선 계통 세포의 분화를 시험관내에서 유도하기 위한 방법을 제공한다. 소정 구현예에서, 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 wingless(Wnt) 신호전달의 활성화제("Wnt 활성화제"로 언급됨), 및 하나 이상의 섬유아세포 성장 인자(FGF) 신호전달의 활성화제("FGF 활성화제"로 언급됨)와 접촉시켜 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포 집단을 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 Wnt 활성화제, 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 Wnt 활성화제, 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 최대 약 30일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 Wnt 활성화제, 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 약 5일 내지 약 15일 또는 약 10일 내지 15일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0012] 소정 구현예에서, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포는 신경 능선 세포이다. 소정 구현예에서, 신경 능선 계통 마커는 SOX10, p75, HNK1, CD49D, ERBB3, TFAP2, SNAIL 및 SLUG로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0013] 소정 구현예에서, 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 슈반 세포 분화를 유도하는 하나 이상의 분자("SC 분화 유도제"로 언급됨)와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 SC 분화 유도제와 최대 약 30일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 SC 분화 유도제와 약 5일 내지 약 15일 또는 약 10일 내지 15일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 SC 분화 유도제와 동시적으로 및/또는 함께 접촉시키는 단계

를 포함한다.

- [0014] 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 줄기 세포의 분화를 시험관내에서 유도하기 위한 방법을 제공한다.
- [0015] 소정 구현예에서, 줄기 세포의 분화를 시험관내에서 유도하기 위한 방법은 줄기 세포 집단("줄기 세포 집단"으로 언급됨)을 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단으로 시험관내에서 분화시키는 단계, 및 분화된 세포를 하나 이상의 Wnt 활성화제, 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 접촉시켜 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포 집단을 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 Wnt 활성화제, 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 Wnt 활성화제, 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 최대 약 30일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 분화된 세포를 하나 이상의 Wnt 활성화제, 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 약 5일 내지 약 15일 또는 약 10일 내지 15일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0016] 소정 구현예에서, 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 유도제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 SC 분화 유도제와 최대 약 30일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 SC 분화 유도제와 약 5일 내지 약 15일 또는 약 10일 내지 15일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 SC 분화 유도제와 동시에 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0017] 소정 구현예에서, 줄기 세포 집단의 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단으로의 시험관내 분화는 SMAD 신호전달의 억제 및 Wnt 신호전달의 활성화를 포함한다. 소정 구현예에서, 줄기 세포 집단의 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단으로의 시험관내 분화는 줄기 세포 집단을 하나 이상의 전환 성장 인자 베타(TGF $\beta$ )/Activin-Nodal 신호전달의 억제제, 및 하나 이상의 Wnt 활성화제와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0018] 소정 구현예에서, 줄기 세포 집단을 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 접촉시키는 단계를 포함하는 줄기 세포의 분화를 시험관내에서 유도하기 위한 방법은 세포를 하나 이상의 Wnt 활성화제, 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 세포를 하나 이상의 SC 분화 유도제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 세포를 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 SC 분화 유도제와 동시에 및/또는 함께 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0019] 소정 구현예에서, 방법은 세포를 하나 이상의 FGF 활성화제와 적어도 약 3일 동안, 적어도 약 4일 동안, 적어도 약 5일 동안, 적어도 약 6일 동안, 적어도 약 7일 동안, 적어도 약 8일 동안, 적어도 약 9일 동안, 적어도 약 10일 동안, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 적어도 약 15일, 적어도 약 16일, 적어도 약 17일, 적어도 약 18일, 적어도 약 19일, 또는 적어도 약 20일 동안 접촉시켜 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단을 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 세포를 하나 이상의 FGF 활성화제와 약 10일 내지 약 20일 또는 약 10일 내지 약 15일 동안 접촉시켜 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단을 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 세포를 하나 이상의 FGF 활성화제와 14일 동안 접촉시켜 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단을 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 세포를 하나 이상의 FGF 활성화제와 약 15일 동안 접촉시켜 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단을 생성하는 단계를 포함한다.
- [0020] 소정 구현예에서, 하나 이상의 FGF 활성화제와 세포의 최초 접촉은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 적어도 약 5일(예로, 약 20일 이하)이다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 FGF 활성화제와 세포의 최초 접촉은 줄기 세포 집단과 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉 후 약 5일 내지 약 20일(예로, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 8일, 약 9일, 약 10일, 약 11일, 약 12일, 약 13일, 약 14일, 약 15일, 약 16일, 약 17일, 약 18일, 약 19일, 또는 약 20일)이다.
- [0021] 소정 구현예에서, 방법은 세포를 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안, 적어도 약 4일 동안, 적어도

도 약 5일 동안, 적어도 약 6일 동안, 적어도 약 7일 동안, 적어도 약 8일 동안, 적어도 약 9일 동안, 적어도 약 10일 동안, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 적어도 약 15일, 적어도 약 16일, 적어도 약 17일, 적어도 약 18일, 적어도 약 19일, 또는 적어도 약 20일 동안 접촉시켜, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단을 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 약 을 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 10일 내지 약 20일 또는 약 10일 내지 약 15일 동안 접촉시켜 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단을 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 세포를 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 14일 동안 접촉시켜 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단을 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 세포를 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 15일 동안 접촉시켜 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단을 생성하는 단계를 포함한다.

[0022] 소정 구현예에서, 하나 이상의 SC 분화 유도제와 세포의 최초 접촉은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉 후 적어도 약 5일(예로, 약 20일 이하)이다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 SC 분화 유도제와 세포의 최초 접촉은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉 후 약 5일 내지 약 20일(예로, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 8일, 약 9일, 약 10일, 약 11일, 약 12일, 약 13일, 약 14일, 약 15일, 약 16일, 약 17일, 약 18일, 약 19일, 또는 약 20일)이다.

[0023] 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 줄기 세포의 분화를 시험관내에서 유도하기 위한 방법을 제공한다. 소정 구현예에서, 줄기 세포 집단의 분화를 시험관내에서 유도하기 위한 방법은 줄기 세포 집단을 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제, 및 하나 이상의 Wnt 활성화제의 활성화제와 접촉시키는 단계, 및 세포를 하나 이상의 FGF 활성화제와 추가로 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 하나 이상의 FGF 활성화제와 세포의 최초 접촉은 줄기 세포 집단과 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 20일 이하이다.

[0024] 소정 구현예에서, 하나 이상의 FGF 활성화제와 세포의 최초 접촉은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 10일이다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 FGF 활성화제와 세포의 최초 접촉은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 11일이다.

[0025] 소정 구현예에서, 방법은 세포를 하나 이상의 SC 분화 유도제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 하나 이상의 SC 분화 유도제와 세포의 최초 접촉은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 20일 이하이다.

[0026] 소정 구현예에서, 하나 이상의 SC 분화 유도제와 세포의 최초 접촉은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 10일이다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 SC 분화 유도제와 세포의 최초 접촉은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 11일이다. 소정 구현예에서, 방법은 세포를 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 SC 분화 유도제와 동시에 및/또는 함께 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0027] 소정 구현예에서, 하나 이상의 Wnt 활성화제와 세포의 최초 접촉은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 4일 이하이다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 Wnt 활성화제와 세포의 최초 접촉은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 2일이다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 Wnt 활성화제와 세포의 최초 접촉은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉과 동시에 일어난다.

[0028] 소정 구현예에서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커는 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, 및 SLC10A4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커는 표 1~4에 기재된 유전자로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커는 CALCB, GRP116, TSPYL5, ITPKA, SLC17A6, SYPL2, LOC100128252, ANGPTL7, LOC728978, 및 ZNF502로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0029] 소정 구현예에서, 방법은 줄기 세포를 하나 이상의 Small Mothers Against Decapentaplegic(SMAD) 신호전달의 억제제("SMAD 억제제"로 언급됨)와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 줄기 세포를

하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제 및 SMAD 억제제와 함께 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0030] 소정 구현예에서, 방법은 하나 이상의 SC 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단으로 분화된 세포의 하나 이상의 슈반 세포 마커를 발현하는 슈반 세포 집단으로의 성숙을 선호하는 조건을 거치는 단계를 추가로 포함한다. 슈반 세포는 미엘린화 슈반 세포 또는 비-미엘린화 슈반 세포가 될 수 있다.

[0031] 소정 구현예에서, 분화된 SC 전구체 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 선호하는 조건은 분화된 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 조건은 분화된 세포 집단을 슈반 세포 분화를 증강시키는 하나 이상의 분자("SC 분화 증강제"로 언급됨)와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 분화된 SC 전구체 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 선호하는 조건은 분화된 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제, 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제, 및 하나 이상의 SC 분화 증강제와 동시에 및/또는 함께 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 SC 분화 증강제는 사이클릭 아데노신 모노포스페이트(cAMP), 폴스콜린(Forskolin), LIF, 및 CNTF로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0032] 소정 구현예에서, 분화된 SC 전구체 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 선호하는 조건은 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 적어도 약 10일, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 또는 적어도 약 15일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 분화된 SC 전구체 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 선호하는 조건은 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 약 10일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 분화된 SC 전구체 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 선호하는 조건은 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 약 11일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 분화된 SC 전구체 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 선호하는 조건은 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 약 35일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0033] 소정 구현예에서, 조건은 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 적어도 약 10일, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 또는 적어도 약 15일 동안 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 분화된 SC 전구체 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 선호하는 조건은 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 10일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 분화된 SC 전구체 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 선호하는 조건은 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 11일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 분화된 SC 전구체 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 선호하는 조건은 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 35일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0034] 소정 구현예에서, 방법은 세포를 하나 이상의 FGF 활성화제, 하나 이상의 SC 분화 유도제, 및 하나 이상의 SC 분화 증강제와 동시에 및/또는 함께 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0035] 소정 구현예에서, 분화된 SC 전구체 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 선호하는 조건은 분화된 SC 전구체 세포 집단을 3D 구형체로 응집시키는 단계; 및 3D 구형체를 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 조건은 3D 구형체를 하나 이상의 SC 분화 증강제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 조건은 3D 구형체를 하나 이상의 FGF 활성화제, 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제, 및 하나 이상의 SC 분화 증강제와 동시에 및/또는 함께 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 3D 구형체를 혼탁 배양으로 배양하는 단계를 추가로 포함한다.

[0036] 소정 구현예에서, 하나 이상의 슈반 세포 마커는 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, 및 CDH19로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 SC 마커는 표 1~4에 기재된 유전자로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 SC 마커는 TYRP1, CD44, ENTHD1, NT5E, HTR2B, NOV, IL8, SLC16A6, 및 CDKN2A로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0037] 본원에서 개시된 요지 사안은 또한 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 시험관내에서 분화된 세포 집단을 제공한다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단은 본원에서 기재된 시험관내 분화 방법에 의해 줄기 세포 집단으로부터 유도된다.
- [0038] 소정 구현예에서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단은 줄기 세포 집단을 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제, 및 하나 이상의 Wnt 활성화제와 접촉시키는 단계, 및 세포를 하나 이상의 FGF 활성화제와 적어도 약 3일(예로, 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 적어도 약 10일, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 적어도 약 15일, 적어도 약 16일, 적어도 약 17일, 적어도 약 18일, 적어도 약 19일, 또는 적어도 약 20일; 약 10일 내지 약 20일 또는 약 10일 내지 약 15일) 동안 추가로 접촉시키는 단계 후에 줄기 세포 집단으로부터 유도된다.
- [0039] 소정 구현예에서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단은 세포를 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일(예로, 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 적어도 약 10일, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 적어도 약 15일, 적어도 약 16일, 적어도 약 17일, 적어도 약 18일, 적어도 약 19일, 또는 적어도 약 20일; 약 10일 내지 약 20일 또는 약 10일 내지 약 15일) 동안 추가로 접촉시키는 단계 후에 줄기 세포 집단으로부터 유도된다.
- [0040] 소정 구현예에서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단은 줄기 세포 집단을 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제, 및 하나 이상의 Wnt 활성화제와 접촉시키는 단계, 및 세포를 하나 이상의 FGF 활성화제와 추가로 접촉시키는 단계 후에 줄기 세포 집단으로부터 유도되며, 여기서 하나 이상의 FGF 활성화제와 세포의 최초 접촉은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 20일 이하(예로, 약 10일 내지 약 15일, 예로, 10일 또는 11일)이다.
- [0041] 소정 구현예에서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단은 세포를 하나 이상의 SC 분화 유도제와 추가로 접촉시키는 단계 후에 줄기 세포 집단으로부터 유도되며, 여기서 하나 이상의 SC 분화 유도제와 세포의 최초 접촉은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 20일 이하(예로, 약 10일 내지 약 15일, 예로, 10일 또는 11일)이다.
- [0042] 소정 구현예에서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단은 줄기 세포 집단을 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제, 및 하나 이상의 Wnt 활성화제와 접촉시키는 단계, 및 세포를 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 SC 분화 유도제와 동시적으로 및/또는 함께 추가로 접촉시키는 단계 후에 줄기 세포 집단으로부터 유도된다.
- [0043] 본원에서 개시된 요지 사안은 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 이러한 분화된 세포를 포함하는 조성물을 추가로 제공한다.
- [0044] 본원에서 개시된 요지 사안은 또한 하나 이상의 슈반 세포 마커를 발현하는 시험관내에서 분화된 세포 집단을 제공한다. 소정 구현예에서, 분화된 세포 집단은 본원에서 기재된 시험관내 분화 방법에 의해 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단으로부터 유도된다.
- [0045] 소정 구현예에서, 하나 이상의 슈반 세포 마커를 발현하는 분화된 세포 집단은 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 적어도 약 10일, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 또는 적어도 약 15일 동안 접촉시키는 단계 후에 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단으로부터 유도된다.
- [0046] 소정 구현예에서, 하나 이상의 슈반 세포 마커를 발현하는 분화된 세포 집단은 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 적어도 약 10일, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 또는 적어도 약 15일 동안 추가로 접촉시키는 단계 후에 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단으로부터 유도된다.
- [0047] 소정 구현예에서, 하나 이상의 슈반 세포 마커를 발현하는 분화된 세포 집단은 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제, 하나 이상의 SC 분화 유도제, 및 하나 이상의

SC 분화 증강제와 동시적으로 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 적어도 약 10일, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 또는 적어도 약 15일 동안 추가로 접촉시키는 단계 후에 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단으로부터 유도된다.

[0048] 본원에서 개시된 요지 사안은 하나 이상의 슈반 세포 마커를 발현하는 이러한 분화된 세포 집단을 포함하는 조성물을 추가로 제공한다.

[0049] 또한, 본원에서 개시된 요지 사안은 줄기 세포의 분화를 유도하기 위한 키트를 제공한다. 소정 구현예에서, 키트는 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제, 하나 이상의 Wnt 활성화제, 및 하나 이상의 FGF 활성화제를 포함한다. 소정 구현예에서, 키트는 줄기 세포의 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단으로의 분화를 유도하기 위한 지침을 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 세포를 하나 이상의 FGF 활성화제와 적어도 약 3일(예로, 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 적어도 약 10일, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 적어도 약 15일, 적어도 약 16일, 적어도 약 17일, 적어도 약 18일, 적어도 약 19일, 또는 적어도 약 20일; 약 10일 내지 약 20일 또는 약 10일 내지 약 15일) 동안 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0050] 소정 구현예에서, 지침은 하나 이상의 FGF 활성화제와 세포를 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 20일 이하(예로, 10일 또는 11일)에 최초 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0051] 소정 구현예에서, 키트는 하나 이상의 SC 분화 유도제를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 세포를 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일(예로, 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 적어도 약 10일, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 적어도 약 15일, 적어도 약 16일, 적어도 약 17일, 적어도 약 18일, 적어도 약 19일, 또는 적어도 약 20일; 약 10일 내지 약 20일 또는 약 10일 내지 약 15일) 동안 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 세포를 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 SC 분화 유도제와 동시적으로 및/또는 함께 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0052] 소정 구현예에서, 키트는 하나 이상의 SMAD 억제제를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 줄기 세포를 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제 및 SMAD 억제제와 함께 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0053] 소정 구현예에서, 키트는 분화된 슈반 세포 전구체 집단의 하나 이상의 슈반 세포 마커를 발현하는 세포 집단으로의 성숙을 유도하기 위한 키트를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 적어도 약 10일, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 또는 적어도 약 15일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 약 10일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 약 11일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 35일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0054] 소정 구현예에서, 분화된 슈반 세포 전구체 집단의 하나 이상의 슈반 세포 마커를 발현하는 세포 집단으로의 성숙을 유도하기 위한 키트는 하나 이상의 SC 분화 증강제를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 분화된 슈반 세포 전구체 집단의 하나 이상의 슈반 세포 마커를 발현하는 세포 집단으로의 성숙을 유도하기 위한 지침은 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 적어도 약 10일, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 또는 적어도 약 15일 동안 추가로 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 10일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 분화된 슈반 세포 전구체 집단의 하나 이상의 슈반 세포 마커를 발현하는 세포 집단으로의 성숙을 유도하기 위한 지침은 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 11일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 분화된 슈반 세포 전구체 집단의 하나 이상의 슈반 세포 마커를 발현하는 세포 집단으로의 성숙을 유도하기 위한 지침은 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 하나

이상의 SC 분화 증강제와 약 35일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 분화된 슈반 세포 전구체 집단의 하나 이상의 슈반 세포 마커를 발현하는 세포 집단으로의 성숙을 유도하기 위한 지침은 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제, 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제, 및 하나 이상의 SC 분화 증강제와 동시적으로 및/또는 함께 접촉시키는 단계를 포함한다.

- [0055] 소정 구현예에서, 줄기 세포 집단은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 25일 또는 그 이후에 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단으로 분화된다.
- [0056] 소정 구현예에서, 줄기 세포 집단은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 35일 또는 그 이후에 슈반 세포 집단으로 분화된다.
- [0057] 소정 구현예에서, 분화된 슈반 세포 전구체 집단은 하나 이상의 슈반 세포 마커를 발현하는 분화된 세포와 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제 중 하나 또는 둘 다의 최초 접촉으로부터 약 10일 또는 그 이후에 슈반 세포 집단으로 분화된다.
- [0058] 소정 구현예에서, 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제는 SB431542, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자이다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제는 SB431542이다.
- [0059] 소정 구현예에서, 하나 이상의 SMAD 억제제는 LDN193189, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자이다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 SMAD 억제제는 LDN193189이다.
- [0060] 소정 구현예에서, 하나 이상의 Wnt 활성화제는 Wnt 신호전달의 활성화를 위해 글리코겐 합성효소 키나제 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )를 저하시킨다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 Wnt 활성화제는 CHIR99021 및 WNT3A, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자이다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 Wnt 활성화제는 CHIR99021이다.
- [0061] 소정 구현예에서, 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제는 뉴레굴린(neuregulin), LIF, CNTF, 폴스콜린, TGF $\beta$ , FBS 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 하나의 슈반 세포 분화 유도제는 뉴레굴린 1(NRG1)이다.
- [0062] 소정 구현예에서, SC 분화 증강제는 뉴레굴린 사이클릭 아데노신 모노포스페이트(cAMP), 폴스콜린, LIF, 및 CNTF로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0063] 소정 구현예에서, 하나 이상의 FGF 활성화제는 FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF7, FGF8, FGF10, FGF18, 이의 유도체, 및 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 FGF 활성화제는 FGF2이다.
- [0064] 소정 구현예에서, 줄기 세포는 인간 줄기 세포이다. 소정 구현예에서, 인간 줄기 세포는 인간 다능성 줄기 세포이다. 소정 구현예에서, 인간 다능성 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포, 및 인간 유도된 다능성 줄기 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 비-인간 줄기 세포, 예를 들어, 비체한적으로 포유류 줄기 세포, 영장류 줄기 세포, 또는 설치류, 마우스, 래트, 개, 고양이, 말, 돼지, 소, 양 등으로부터의 줄기 세포이다.
- [0065] 본원에서 개시된 요지 사안은 방지 및/또는 치료하는 방법을 추가로 제공하며 슈반 세포 관련 장애는 말초 신경 병증이다. 소정 구현예에서, 말초 신경병증은 당뇨병성 말초 신경병증이다. 소정 구현예에서, 방법은 본원에서 기재된 분화된 슈반 세포 전구체 또는 이를 포함하는 조성물의 유효량을 말초 신경병증을 앓는 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 본원에서 기재된 분화된 슈반 세포 또는 이를 포함하는 조성물의 유효량을 말초 신경병증을 앓는 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0066] 본원에서 개시된 요지 사안은 대상체에서 말초 신경병증을 치료하기 위한 본원에서 기재된 분화된 슈반 세포 전구체 또는 이를 포함하는 조성물을 추가로 제공한다. 또한, 본원에서 개시된 요지 사안은 대상체에서 말초 신경 병증을 치료하기 위한 본원에서 기재된 분화된 슈반 세포 또는 이를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0067] 본원에서 개시된 요지 사안은 말초 신경병증을 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 본원에서 기재된 분화된 슈반 세포 전구체 또는 이를 포함하는 조성물의 용도를 추가로 제공한다. 또한, 본원에서 개시된 요지 사안은 말초 신경병증을 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 본원에서 기재된 분화된 슈반 세포 또는 이를 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

- [0068] A. 소정의 비체한적 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 줄기 세포 집단을 하나 이상의 TGF $\beta$  /Activin-Nodal 신호전달의 억제제 및 하나 이상의 Wnt 활성화제와 접촉시키는 단계, 및 상기 세포를 하나 이상의 FGF 활성화제와 적어도 약 3일 동안 추가로 접촉시켜 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단을 생성하는 단계를 포함하는 줄기 세포의 분화를 시험관내에서 유도하기 위한 방법을 제공한다.
- [0069] A1. 상기 A에 있어서, 상기 세포를 상기 하나 이상의 FGF 활성화제와 약 14일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0070] A2. 상기 A에 있어서, 상기 세포와 상기 하나 이상의 FGF 활성화제의 최초 접촉이 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$  /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 20일 이하인 방법.
- [0071] A3. 상기 A에 있어서, 상기 세포와 상기 하나 이상의 FGF 활성화제의 최초 접촉이 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$  /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 10일 내지 약 15일인 방법.
- [0072] A4. 상기 A에 있어서, 상기 세포와 상기 하나 이상의 FGF 활성화제의 최초 접촉이 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$  /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 11일인 방법.
- [0073] A5. 상기 A에 있어서, 상기 세포를 하나 이상의 SC 분화 유도제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0074] A6. 상기 A에 있어서, 상기 세포를 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안 접촉시켜 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단을 생성하는 단계를 포함하는 방법.
- [0075] A7. 상기 A에 있어서, 상기 세포를 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 14일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0076] A8. 상기 A에 있어서, 상기 세포와 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제의 최초 접촉이 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$  /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 10일 내지 약 15일인 방법.
- [0077] A9. 상기 A에 있어서, 상기 세포를 상기 하나 이상의 FGF 활성화제 및 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제와 함께 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0078] A10. 상기 A에 있어서, 상기 줄기 세포 집단이 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$  /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 25일 또는 그 이후에 하나 이상의 상기 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단으로 분화되는 방법.
- [0079] A11. 상기 A에 있어서, 상기 줄기 세포를 하나 이상의 SMAD 억제제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0080] A12. 상기 A에 있어서, 상기 줄기 세포를 상기 하나 이상의 TGF $\beta$  /Activin-Nodal 신호전달의 억제제 및 상기 하나 이상의 SMAD 억제제와 함께 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0081] A13. 상기 A에 있어서, 상기 세포와 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제의 최초 접촉이 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$  /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 4일 이하인 방법.
- [0082] A14. 상기 A에 있어서, 상기 세포와 상기 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제의 최초 접촉이 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$  /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 2일인 방법.
- [0083] A15. 상기 A에 있어서, 상기 세포와 상기 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제의 최초 접촉이 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$  /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉과 같은 날인 방법.
- [0084] A16. 상기 A에 있어서, 상기 하나 이상의 TGF $\beta$  /Activin-Nodal 신호전달의 억제제가 SB431542, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 방법.
- [0085] A17. 상기 A에 있어서, 상기 하나 이상의 TGF $\beta$  /Activin-Nodal 신호전달의 억제제가 SB431542인 방법.
- [0086] A18. 상기 A에 있어서, 상기 하나 이상의 SMAD 억제제가 LDN193189, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 방법.
- [0087] A19. 상기 A에 있어서, 상기 하나 이상의 SMAD 억제제가 LDN193189인 방법.
- [0088] A20. 상기 A에 있어서, 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제가 Wnt 신호전달의 활성화를 위해 글리코겐 합성효소 키나제 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )를 저하시키는 방법.
- [0089] A21. 상기 A에 있어서, 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제가 CHIR99021, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진

군으로부터 선택되는 소분자인 방법.

- [0090] A22. 상기 A에 있어서, 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제가 CHIR99021인 방법.
- [0091] A23. 상기 A에 있어서, 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제가 뉴레굴린, LIF, CNTF, 폴스콜린, TGF $\beta$  및 FBS로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0092] A24. 상기 A에 있어서, 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제가 NRG1인 방법.
- [0093] A25. 상기 A에 있어서, 상기 하나 이상의 FGF 활성화제가 FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF7, FGF8, FGF10, FGF18, 이의 유도체, 및 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0094] A26. 상기 A에 있어서, 상기 하나 이상의 FGF 활성화제가 FGF2인 방법.
- [0095] A27. 상기 A에 있어서, 상기 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커가 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, 및 SLC10A4로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0096] A28. 상기 A에 있어서, 상기 줄기 세포가 인간 줄기 세포인 방법.
- [0097] A29. 상기 A에 있어서, 상기 인간 줄기 세포가 인간 배아 줄기 세포, 인간 유도된 다능성 줄기 세포, 인간 단성 생식 줄기 세포, 원시 생식 세포-유사 다능성 줄기 세포, 배반엽상층(epiblast) 줄기 세포, F-클래스 다능성 줄기 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0098] A30. 상기 A에 있어서, 상기 분화된 세포 집단으로 상기 분화된 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 선호하는 조건을 거치는 단계를 포함하는 방법.
- [0099] A31. 상기 A에 있어서, 상기 분화된 세포의 상기 슈반 세포 집단으로의 성숙을 선호하는 상기 조건이 상기 분화된 세포를 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0100] A32. 상기 A에 있어서, 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0101] A33. 상기 A에 있어서, 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 10일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0102] A34. 상기 A에 있어서, 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 35일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0103] A35. 상기 A에 있어서, 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0104] A36. 상기 A에 있어서, 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0105] A37. 상기 A에 있어서, 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 10일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0106] A38. 상기 A에 있어서, 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 35일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0107] A39. 상기 A에 있어서, 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제, 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제, 및 하나 이상의 SC 분화 증강제와 함께 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0108] A40. 상기 A에 있어서, 상기 분화된 세포의 상기 슈반 세포 집단으로의 성숙을 선호하는 상기 조건이 상기 분화된 세포를 하나 이상의 SC 분화 증강제와 추가로 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0109] A41. 상기 A에 있어서, 상기 하나 이상의 SC 분화 증강제가 뉴레굴린, 사이클릭 아데노신 모노포스페이트(cAMP), 폴스콜린, LIF, 및 CNTF로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0110] A42. 상기 A에 있어서, 상기 하나 이상의 SC 분화 증강제가 cAMP인 방법.

- [0111] A43. 상기 A에 있어서, 상기 분화된 세포 집단을 3D 구형체로 응집시키는 단계; 및 상기 3D 구형체를 상기 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 상기 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0112] A44. 상기 A에 있어서, 상기 3D 구형체를 부착 배양에서 배양하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0113] A45. 상기 A에 있어서, 상기 슈반 세포 집단이 하나 이상의 슈반 세포 마커를 발현하는 방법.
- [0114] A46. 상기 A에 있어서, 상기 하나 이상의 슈반 세포 마커가 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, 및 CDH19로 이루어진 군으로부터 선택되는 슈반 세포 마커로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0115] B. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 시험관내에서 분화된 세포 집단으로서, 상기 분화된 세포 집단이
- [0116] 줄기 세포 집단을 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제 및 하나 이상의 Wnt 활성화제와 접촉시키는 단계, 및
- [0117] 상기 세포를 하나 이상의 FGF 활성화제와 적어도 약 3일 동안 추가로 접촉시키는 단계 후에 줄기 세포 집단으로부터 유도되는 분화된 세포 집단을 제공한다.
- [0118] B1. 상기 B에 있어서, 상기 세포가 상기 하나 이상의 FGF 활성화제와 14일 동안 접촉되는 분화된 세포 집단.
- [0119] B2. 상기 B에 있어서, 상기 세포와 상기 하나 이상의 FGF 활성화제의 최초 접촉이 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 20일 이하인 분화된 세포 집단.
- [0120] B3. 상기 B에 있어서, 상기 세포와 상기 하나 이상의 FGF 활성화제의 최초 접촉이 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 10일 내지 약 15일인 분화된 세포 집단.
- [0121] B4. 상기 B에 있어서, 상기 세포와 상기 하나 이상의 FGF 활성화제의 최초 접촉이 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 11일인 분화된 세포 집단.
- [0122] B5. 상기 B에 있어서, 상기 세포가 하나 이상의 SC 분화 유도제와 추가로 접촉되는 분화된 세포 집단.
- [0123] B6. 상기 B에 있어서, 상기 세포가 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안 추가로 접촉되는 분화된 세포 집단.
- [0124] B7. 상기 B에 있어서, 상기 세포와 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제의 최초 접촉이 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 10일 내지 약 15일인 분화된 세포 집단.
- [0125] B8. 상기 B에 있어서, 상기 세포가 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제, 상기 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제와 함께 추가로 접촉되는 분화된 세포 집단.
- [0126] B9. 상기 B에 있어서, 상기 줄기 세포 집단이 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 25일 또는 그 이후에 하나 이상의 상기 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단으로 분화되는 분화된 세포 집단.
- [0127] B10. 상기 B에 있어서, 상기 줄기 세포가 하나 이상의 SMAD 억제제와 추가로 접촉되는 분화된 세포 집단.
- [0128] B11. 상기 B에 있어서, 상기 줄기 세포가 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제 및 상기 하나 이상의 SMAD 억제제와 함께 접촉되는 분화된 세포 집단.
- [0129] B12. 상기 B에 있어서, 상기 세포와 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제의 최초 접촉이 상기 줄기 세포 집단과 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 4일 이하인 분화된 세포 집단.
- [0130] B13. 상기 B에 있어서, 상기 세포와 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제의 최초 접촉이 상기 줄기 세포 집단과 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 2일인 분화된 세포 집단.

- [0131] B14. 상기 B에 있어서, 상기 줄기 세포 집단과 상기 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제의 최초 접촉이 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉과 같은 날인 분화된 세포 집단.
- [0132] B15. 상기 B에 있어서, 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제가 SB431542, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 분화된 세포 집단.
- [0133] B16. 상기 B에 있어서, 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제가 SB431542인 분화된 세포 집단.
- [0134] B17. 상기 B에 있어서, 상기 하나 이상의 SMAD 억제제가 LDN193189, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 분화된 세포 집단.
- [0135] B18. 상기 B에 있어서, 상기 하나 이상의 SMAD 억제제가 LDN193189인 분화된 세포 집단.
- [0136] B19. 상기 B에 있어서, 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제가 Wnt 신호전달의 활성화를 위해 글리코겐 합성효소 카나제 3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ )를 저하시키는 분화된 세포 집단.
- [0137] B20. 상기 B에 있어서, 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제가 CHIR99021, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 분화된 세포 집단.
- [0138] B21. 상기 B에 있어서, 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제가 CHIR99021인 분화된 세포 집단.
- [0139] B22. 상기 B에 있어서, 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제가 뉴레콜린, LIF, CNTF, 폴스콜린, TGF $\beta$  및 FBS로 이루어진 군으로부터 선택되는 분화된 세포 집단.
- [0140] B23. 상기 B에 있어서, 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제가 NRG1인 분화된 세포 집단.
- [0141] B24. 상기 B에 있어서, 상기 하나 이상의 FGF 활성화제가 FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF7, FGF8, FGF10, FGF18, 이의 유도체, 및 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 분화된 세포 집단.
- [0142] B25. 상기 B에 있어서, 상기 하나의 FGF 활성화제가 FGF2인 분화된 세포 집단.
- [0143] B26. 상기 B에 있어서, 상기 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커가 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, 및 SLC10A4로 이루어진 군으로부터 선택되는 분화된 세포 집단.
- [0144] B27. 상기 B에 있어서, 상기 줄기 세포가 인간 줄기 세포인 분화된 세포 집단.
- [0145] B28. 상기 B에 있어서, 상기 인간 줄기 세포가 인간 배아 줄기 세포, 인간 유도된 다능성 줄기 세포, 인간 단성 생식 줄기 세포, 원시 생식 세포-유사 다능성 줄기 세포, 배반엽상층 줄기 세포, 및 F-클래스 다능성 줄기 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 분화된 세포 집단.
- [0146] C. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 하나 이상의 슈반 세포 마커를 발현하는 시험관내에서 분화된 세포 집단으로서, 상기 분화된 세포 집단이 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 접촉시키는 단계 후에 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단으로부터 유도되는 분화된 세포 집단을 제공한다.
- [0147] C1. 상기 C에 있어서, 상기 분화된 세포 집단이 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 추가로 접촉시키는 단계 후에 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단으로부터 유도되는 분화된 세포 집단.
- [0148] C2. 상기 C에 있어서, 상기 하나 이상의 SC 분화 증강제가 뉴레콜린, 사이클릭 아데노신 모노포스페이트(cAMP), 폴스콜린, LIF, 및 CNTF로 이루어진 군으로부터 선택되는 분화된 세포 집단.
- [0149] C3. 상기 C에 있어서, 상기 하나 이상의 SC 분화 증강제가 cAMP인 분화된 세포 집단.
- [0150] C4. 상기 C에 있어서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단이 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안 접촉되는 분화된 세포 집단.
- [0151] C5. 상기 C에 있어서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단이 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안 접촉되는 분화된 세포 집단.

화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 약 10일 동안 접촉되는 분화된 세포 집단.

[0152] C6. 상기 C에 있어서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단이 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 약 35일 동안 접촉되는 분화된 세포 집단.

[0153] C7. 상기 C에 있어서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단이 하나 이상의 SC 분화 증강제와 적어도 약 3일 동안 접촉되는 분화된 세포 집단.

[0154] C8. 상기 C에 있어서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단이 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 10일 동안 접촉되는 분화된 세포 집단.

[0155] C9. 상기 C에 있어서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단이 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 35일 동안 접촉되는 분화된 세포 집단.

[0156] C10. 상기 C에 있어서, 상기 하나 이상의 슈반 마커가 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, CD41, CD44, CD98, CD49E, CD49D, TYRP1, ENTHD1, NT5E, HTR2B, NOV, IL8, SLC16A6, CDKN2A, PLP2, S100A6, AQP9, 및 CDH19로 이루어진 군으로부터 선택되는 슈반 세포 마커로 이루어진 군으로부터 선택되는 분화된 세포 집단.

[0157] D. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 상기 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0158] E. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 상기 슈반 세포 집단을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0159] F. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 대상체에서 슈반 세포 관련 장애를 방지 및/또는 치료하는 방법으로서, 슈반 세포 관련 장애를 앓는 대상체에 하기 중 하나의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다:

[0160] (a) 상기 분화된 슈반 세포 전구체 집단;

[0161] (b) 상기 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 포함하는 조성물;

[0162] (c) 상기 슈반 세포 집단; 및

[0163] (d) 상기 슈반 세포 집단을 포함하는 조성물.

[0164] F1. 상기 F에 있어서, 슈반 세포 관련 장애가 말초 신경병증인 방법.

[0165] F2. 상기 F에 있어서, 말초 신경병증이 당뇨병성 말초 신경병증인 방법.

[0166] G. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 대상체에서 슈반 세포 관련 장애를 방지 및/또는 치료하기 위한 상기 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 제공한다.

[0167] G1. 상기 G에 있어서, 슈반 세포 관련 장애가 말초 신경병증인 분화된 슈반 세포 전구체 집단.

[0168] G2. 상기 G에 있어서, 말초 신경병증이 당뇨병성 말초 신경병증인 분화된 슈반 세포 전구체 집단.

[0169] H. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 대상체에서 슈반 세포 관련 장애를 방지 및/또는 치료하기 위한 상기 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0170] H1. 상기 H에 있어서, 슈반 세포 관련 장애가 말초 신경병증인 조성물.

[0171] H2. 상기 H에 있어서, 말초 신경병증이 당뇨병성 말초 신경병증인 조성물.

[0172] I. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 대상체에서 슈반 세포 관련 장애를 방지 및/또는 치료하기 위한 상기 슈반 세포 집단을 제공한다.

[0173] I1. 상기 I에 있어서, 슈반 세포 관련 장애가 말초 신경병증인 슈반 세포 집단.

[0174] I2. 상기 I에 있어서, 말초 신경병증이 당뇨병성 말초 신경병증인 슈반 세포 집단.

[0175] J. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 대상체에서 슈반 세포 관련 장애를 방지 및/또는 치료하기 위한 상기 슈반 세포 집단을 포함하는 조성물을 제공한다.

- [0176] J1. 상기 J에 있어서, 슈반 세포 관련 장애가 말초 신경병증인 조성물.
- [0177] J2. 상기 J에 있어서, 말초 신경병증이 당뇨병성 말초 신경병증인 조성물.
- [0178] K. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 슈반 세포 관련 장애를 방지 및/또는 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 상기 분화된 슈반 세포 전구체 집단의 용도를 제공한다.
- [0179] K1. 상기 K에 있어서, 슈반 세포 관련 장애가 말초 신경병증인 용도.
- [0180] K2. 상기 K에 있어서, 말초 신경병증이 당뇨병성 말초 신경병증인 용도.
- [0181] L. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 슈반 세포 관련 장애를 방지 및/또는 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 상기 분화된 슈반 세포 전구체 집단 조성물의 용도를 제공한다.
- [0182] L1. 상기 L에 있어서, 슈반 세포 관련 장애가 말초 신경병증인 용도.
- [0183] L2. 상기 L에 있어서, 말초 신경병증이 당뇨병성 말초 신경병증인 용도.
- [0184] M. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 슈반 세포 관련 장애를 방지 및/또는 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 상기 슈반 세포 집단의 용도를 제공한다.
- [0185] M1. 상기 M에 있어서, 슈반 세포 관련 장애가 말초 신경병증인 용도.
- [0186] M2. 상기 M에 있어서, 말초 신경병증이 당뇨병성 말초 신경병증인 용도.
- [0187] N. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 슈반 세포 관련 장애를 방지 및/또는 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 상기 슈반 세포 집단 조성물의 용도를 제공한다.
- [0188] N1. 상기 N에 있어서, 슈반 세포 관련 장애가 말초 신경병증인 용도.
- [0189] N2. 상기 N에 있어서, 말초 신경병증이 당뇨병성 말초 신경병증인 용도.
- [0190] P. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은
- [0191] 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제,
- [0192] 하나 이상의 Wnt 활성화제, 및
- [0193] 하나 이상의 FGF 활성화제를 포함하는, 줄기 세포의 분화를 유도하기 위한 키트를 제공한다.
- [0194] P1. 상기 P에 있어서, 줄기 세포의 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단으로의 분화를 유도하기 위한 지침을 포함하며, 상기 지침은 상기 세포를 상기 하나 이상의 FGF 활성화제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.
- [0195] P2. 상기 P에 있어서, 상기 지침이 상기 세포를 상기 하나 이상의 FGF 활성화제와 14일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.
- [0196] P3. 상기 P에 있어서, 상기 세포와 상기 하나 이상의 FGF 활성화제의 최초 접촉이 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제의 최초 접촉으로부터 약 20일 이하인 키트.
- [0197] P4. 상기 P에 있어서, 상기 세포와 상기 하나 이상의 FGF 활성화제의 최초 접촉이 상기 세포와 하나 이상의 Wnt 활성화제의 최초 접촉으로부터 약 10일 내지 약 15일인 키트.
- [0198] P5. 상기 P에 있어서, 상기 세포와 상기 하나 이상의 FGF 활성화제의 최초 접촉이 상기 세포와 하나 이상의 Wnt 활성화제의 최초 접촉으로부터 약 11일인 키트.
- [0199] P6. 상기 P에 있어서, 하나 이상의 SC 분화 유도제를 추가로 포함하는 키트.
- [0200] P7. 상기 P에 있어서, 상기 지침이 상기 세포를 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안 추가로 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.
- [0201] P8. 상기 P에 있어서, 상기 지침이 상기 세포를 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 14일 동안 추가로 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.
- [0202] P9. 상기 P에 있어서, 상기 세포와 하나 이상의 SC 분화 유도제의 최초 접촉이 상기 세포와 하나 이상의 Wnt 활

성화제의 최초 접촉으로부터 약 10일 내지 약 15일인 키트.

- [0203] P10. 상기 P에 있어서, 상기 지침이 상기 세포를 상기 하나 이상의 FGF 활성화제 및 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제와 함께 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.
- [0204] P11. 상기 P에 있어서, 하나 이상의 SMAD 억제제를 추가로 포함하는 키트.
- [0205] P12. 상기 P에 있어서, 상기 지침이 상기 줄기 세포를 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제 및 상기 하나 이상의 SMAD 억제제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 키트.
- [0206] P13. 상기 P에 있어서, 상기 지침이 상기 줄기 세포를 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제 및 상기 하나 이상의 SMAD 억제제와 함께 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.
- [0207] P14. 상기 P에 있어서, 상기 지침이 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 4일 이하에 상기 세포를 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제와 최초 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.
- [0208] P15. 상기 P에 있어서, 상기 지침이 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 2일에 상기 세포를 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제와 최초 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.
- [0209] P16. 상기 P에 있어서, 상기 지침이 상기 세포와 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제의 최초 접촉과 같은 날에 상기 줄기 세포를 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 최초 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.
- [0210] P17. 상기 P에 있어서, 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제가 SB431542, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 키트.
- [0211] P18. 상기 P에 있어서, 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제가 SB431542인 키트.
- [0212] P19. 상기 P에 있어서, 상기 하나 이상의 SMAD 억제제가 LDN193189, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 키트.
- [0213] P20. 상기 P에 있어서, 상기 하나 이상의 SMAD 억제제가 LDN193189인 키트.
- [0214] P21. 상기 P에 있어서, 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제가 Wnt 신호전달의 활성화를 위해 글리코겐 합성효소 카나제 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )를 저하시키는 키트.
- [0215] P22. 상기 P에 있어서, 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제가 CHIR99021, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 키트.
- [0216] P23. 상기 P에 있어서, 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제가 CHIR99021인 키트.
- [0217] P24. 상기 P에 있어서, 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제가 뉴레굴린, LIF, CNTF, 폴스콜린, TGF $\beta$  및 FBS로 이루어진 군으로부터 선택되는 키트.
- [0218] P25. 상기 P에 있어서, 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제가 NRG1인 키트.
- [0219] P26. 상기 P에 있어서, 상기 하나 이상의 FGF 활성화제가 FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF7, FGF8, FGF10, FGF18, 이의 유도체, 및 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 키트.
- [0220] P27. 상기 P에 있어서, 상기 하나의 FGF 활성화제가 FGF2인 키트.
- [0221] P28. 상기 P에 있어서, 하나 이상의 SC 분화 증강제, 및 상기 분화된 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 유도하기 위한 지침을 추가로 포함하는 키트.
- [0222] P29. 상기 P에 있어서, 상기 하나 이상의 SC 분화 증강제가 뉴레굴린, 사이클릭 아데노신 모노포스페이트 (cAMP), 폴스콜린, LIF, 및 CNTF로 이루어진 군으로부터 선택되는 키트.
- [0223] P30. 상기 P에 있어서, 상기 하나 이상의 SC 분화 증강제가 cAMP인 키트.
- [0224] P31. 상기 P에 있어서, 상기 분화된 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 유도하기 위한 상기 지침이 상기 분화된 세포를 상기 하나 이상의 FGF 활성화제 및 상기 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 접촉시키는 단계를 포

함하는 키트.

- [0225] P32. 상기 P에 있어서, 상기 분화된 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 유도하기 위한 상기 지침이 상기 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.
- [0226] P33. 상기 P에 있어서, 상기 분화된 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 유도하기 위한 상기 지침이 상기 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 약 10일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.
- [0227] P34. 상기 P에 있어서, 상기 분화된 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 유도하기 위한 상기 지침이 상기 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 약 35일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.
- [0228] P35. 상기 P에 있어서, 상기 분화된 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 유도하기 위한 상기 지침이 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 키트.
- [0229] P36. 상기 P에 있어서, 상기 분화된 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 유도하기 위한 상기 지침이 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 키트.
- [0230] P37. 상기 P에 있어서, 상기 분화된 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 유도하기 위한 상기 지침이 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 14일 동안 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 키트.
- [0231] P38. 상기 P에 있어서, 상기 분화된 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 유도하기 위한 상기 지침이 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 35일 동안 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 키트.
- [0232] P39. 상기 P에 있어서, 상기 분화된 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 유도하기 위한 상기 지침이 분화된 SC 전구체 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제, 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제, 및 하나 이상의 SC 분화 증강제와 함께 접촉시키는 단계를 포함하는 키트.
- [0233] Q. 소정의 비제한적 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 줄기 세포 집단을 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 접촉시키는 단계, 및 상기 세포를 하나 이상의 Wnt 활성화제와 접촉시키는 단계, 그리고 상기 세포를 하나 이상의 FGF 활성화제와 적어도 약 3일 동안, 약 3일 내지 약 20일 동안, 약 10일 내지 약 20일 또는 약 10일 내지 약 15일 동안 추가로 접촉시켜 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단을 생성하는 단계를 포함하는 줄기 세포의 분화를 시험관내에서 유도하기 위한 방법으로서, 상기 하나 이상의 FGF 활성화제와 상기 세포의 최초 접촉이 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 10일 이하인 방법을 제공한다.
- [0234] Q1. 상기 Q에 있어서, 상기 세포와 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제의 최초 접촉이 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 4일 이하인 방법.
- [0235] Q2. 상기 Q에 있어서, 상기 세포를 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안, 약 3일 내지 약 20일 동안, 약 10일 내지 약 20일 또는 약 10일 내지 약 15일 동안 추가로 접촉시켜 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단을 생성하는 단계를 추가로 포함하며, 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제와 세포의 최초 접촉이 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 10일 이하인 방법.
- [0236] Q3. 상기 Q에 있어서, 상기 세포를 하나 이상의 SC 분화 유도제 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 함께 적어도 약 3일 동안, 약 3일 내지 약 20일 동안, 약 10일 내지 약 20일 또는 약 10일 내지 약 15일 동안 추가로 접촉시켜 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 분화된 세포 집단을 생성하는 단계를 추가로 포함하며, 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 세포의 최초 접촉이 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 10일 이하인 방법.
- [0237] R. 소정의 비제한적 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 시험관내에서 분화된 세포 집단으로서, 상기 분화된 세포 집단이 줄기 세포 집단을 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 접촉시키는 단계, 및 세포를 하나 이상의 Wnt 활성화제와 접촉시키는 단계, 및 상기 세포를 하나 이상의 FGF 활성화제와 적어도 약 3일 동안, 약 3일 내지 약 20일 동안, 약 10일 내지 약 20일 또

는 약 10일 내지 약 15일 동안 추가로 접촉시키는 단계 후에 줄기 세포 집단으로부터 유도되며, 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 세포의 최초 접촉이 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 20일 이하인 분화된 세포 집단을 제공한다.

- [0238] R1. 상기 R에 있어서, 상기 세포와 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제의 최초 접촉이 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 4일 이하인 분화된 세포 집단.
- [0239] R2. 상기 Q에 있어서, 상기 세포를 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안, 약 3일 내지 약 20일 동안, 약 10일 내지 약 20일 또는 약 10일 내지 약 15일 동안 추가로 접촉시키는 단계를 추가로 포함하며, 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제와 세포의 최초 접촉이 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 10일 이하인 방법.
- [0240] R3. 상기 Q에 있어서, 상기 세포를 하나 이상의 SC 분화 유도제 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 함께 적어도 약 3일 동안, 약 3일 내지 약 20일 동안, 약 10일 내지 약 20일 또는 약 10일 내지 약 15일 동안 추가로 접촉시키는 단계를 추가로 포함하며, 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 세포의 최초 접촉이 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 10일 이하인 방법.
- [0241] S. 소정의 비제한적 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 신경 능선 계통 세포의 분화를 시험관내에서 유도하기 위한 방법으로서, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 Wnt 활성화제 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 포함하여 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포 집단을 생성하는 방법을 제공한다.
- [0242] S1. 상기 S에 있어서, 방법이 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 Wnt 활성화제 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0243] S2. 상기 S에 있어서, 방법이 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 Wnt 활성화제 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 최대 약 30일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0244] S3. 상기 S에 있어서, 방법이 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 Wnt 활성화제 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 약 5일 내지 약 15일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0245] S4. 상기 S에 있어서, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 하나 이상의 Wnt 활성화제 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 약 14일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0246] S5. 상기 S에 있어서, 방법이 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 유도제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0247] S6. 상기 S에 있어서, 방법이 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0248] S7. 상기 S에 있어서, 방법이 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 유도제와 최대 약 30일 동안 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0249] S8. 상기 S에 있어서, 방법이 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 14일 동안 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0250] S9. 상기 S에 있어서, 방법이 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 하나 이상의 SC 분화 유도제와 함께 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0251] S10. 상기 S에 있어서, 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제가 Wnt 신호전달의 활성화를 위해 글리코겐 합성효소 키나제 3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ )를 저하시키는 방법.
- [0252] S11. 상기 S에 있어서, 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제가 CHIR99021, Wnt-1, WNT3A, Wnt4, Wnt5a, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 방법.
- [0253] S12. 상기 S에 있어서, 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제가 CHIR99021인 방법.
- [0254] S13. 상기 S에 있어서, 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제가 뉴레굴린, LIF, CNTF, 폴스콜린, TGF $\beta$  및 FBS로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

- [0255] S14. 상기 S에 있어서, 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제가 NRG1인 방법.
- [0256] S15. 상기 S에 있어서, 상기 하나 이상의 FGF 활성화제가 FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF7, FGF8, FGF10, FGF18, 이의 유도체, 및 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0257] S16. 상기 S에 있어서, 상기 하나 이상의 FGF 활성화제가 FGF2인 방법.
- [0258] S17. 상기 S에 있어서, 상기 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커가 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, 및 SLC10A4로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0259] S18. 상기 S에 있어서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단으로 상기 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 선호하는 조건을 거치는 단계를 포함하는 방법.
- [0260] S19. 상기 S에 있어서, 상기 조건이 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0261] S20. 상기 S에 있어서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0262] S21. 상기 S에 있어서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 약 10일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0263] S22. 상기 S에 있어서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 약 35일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0264] S23. 상기 S에 있어서, 상기 조건이 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0265] S24. 상기 S에 있어서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 적어도 약 3일 동안 추가로 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0266] S25. 상기 S에 있어서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 적어도 약 10일 동안 추가로 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0267] S26. 상기 S에 있어서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 적어도 약 35일 동안 추가로 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0268] S27. 상기 S에 있어서, 방법이 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 SC 분화 증강제와 함께 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0269] S28. 상기 S에 있어서, 상기 하나 이상의 SC 분화 증강제가 뉴레콜린, 사이클릭 아데노신 모노포스페이트(cAMP), 폴스콜린, LIF, 및 CNTF로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0270] S29. 상기 S에 있어서, 상기 하나 이상의 SC 분화 증강제가 cAMP인 방법.
- [0271] S30. 상기 S에 있어서, 상기 슈반 세포 집단이 하나 이상의 슈반 세포 마커를 발현하는 방법.
- [0272] S31. 상기 S에 있어서, 상기 하나 이상의 슈반 세포 마커가 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, 및 CDH19로 이루어진 군으로부터 선택되는 슈반 세포 마커로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0273] S32. 상기 S에 있어서, 신경 능선 계통 마커가 SOX10, p75, HNK1, CD49D, ERBB3, TFAP2, SNAIL 및 SLUG로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0274] T. 소정의 비제한적 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 시험관내에서 분화된 세포 집단으로서, 상기 분화된 세포 집단이 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제와 적어도 약 3일 동안, 최대 약 30일 동안, 또는 약 5일 내지 약 15일 동안 접촉시키는 단계 후에 신경 능선 계통 세포 집단으로부터 유도되는 분화된 세포

집단을 제공한다.

- [0275] T1. 상기 T에 있어서, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 상기 세포 집단이 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 약 14일 동안 접촉되는 분화된 세포 집단.
- [0276] T2. 상기 T에 있어서, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 상기 세포 집단이 하나 이상의 SC 분화 유도제와 추가로 접촉되는 분화된 세포 집단.
- [0277] T3. 상기 T에 있어서, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 상기 세포 집단이 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안, 최대 약 30일 동안, 또는 약 5일 내지 약 15일 동안 추가로 접촉되는 분화된 세포 집단.
- [0278] T4. 상기 T에 있어서, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 상기 세포 집단이 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 14일 동안 추가로 접촉되는 분화된 세포 집단.
- [0279] T5. 상기 T에 있어서, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 상기 세포 집단이 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 하나 이상의 SC 분화 유도제와 동시적으로 접촉되는 분화된 세포 집단.
- [0280] T6. 상기 T에 있어서, 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제가 Wnt 신호전달의 활성화를 위해 글리코겐 합성효소 키나제 3β(GSK3β)를 저하시키는 분화된 세포 집단.
- [0281] T7. 상기 T에 있어서, 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제가 CHIR99021, Wnt-1, WNT3A, Wnt4, Wnt5a, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 분화된 세포 집단.
- [0282] T8. 상기 T에 있어서, 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제가 CHIR99021인 분화된 세포 집단.
- [0283] T9. 상기 T에 있어서, 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제가 뉴레콜린, LIF, CNTF, 폴스콜린, TGFβ 및 FBS로 이루어진 군으로부터 선택되는 분화된 세포 집단.
- [0284] T10. 상기 T에 있어서, 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제가 NRG1인 분화된 세포 집단.
- [0285] T11. 상기 T에 있어서, 상기 하나 이상의 FGF 활성화제가 FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF7, FGF8, FGF10, FGF18, 이의 유도체, 및 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 분화된 세포 집단.
- [0286] T12. 상기 T에 있어서, 상기 하나의 FGF 활성화제가 FGF2인 분화된 세포 집단.
- [0287] T13. 상기 T에 있어서, 상기 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커가 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, 및 SLC10A4로 이루어진 군으로부터 선택되는 분화된 세포 집단.
- [0288] T14. 상기 T에 있어서, 신경 능선 계통 마커가 SOX10, p75, HNK1, CD49D, ERBB3, TFAP2, SNAIL 및 SLUG로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0289] U. 소정 구현예에서, 줄기 세포의 분화를 시험관내에서 유도하기 위한 방법이 줄기 세포 집단을 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단으로 시험관내에서 분화시키는 단계, 및 분화된 세포를 하나 이상의 Wnt 활성화제 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 접촉시켜 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포 집단을 생성하는 단계를 포함한다.
- [0290] U1. 상기 U에 있어서, 방법이 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0291] U2. 상기 U에 있어서, 방법이 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제와 최대 약 30일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0292] U3. 상기 U에 있어서, 방법이 분화된 세포를 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제와 약 5일 내지 약 15일 또는 약 10일 내지 약 15일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0293] U4. 상기 U에 있어서, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 약 14일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0294] U5. 상기 U에 있어서, 방법이 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화

유도제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

- [0295] U6. 상기 U에 있어서, 방법이 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0296] U7. 상기 U에 있어서, 방법이 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 유도제와 최대 약 30일 동안 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0297] U8. 상기 U에 있어서, 방법이 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 14일 동안 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0298] U9. 상기 U에 있어서, 방법이 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 SC 분화 유도제와 함께 접촉시켜 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포 집단을 생성하는 단계를 포함하는 방법.
- [0299] U10. 상기 U에 있어서, 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제가 Wnt 신호전달의 활성화를 위해 글리코겐 합성효소 키나제 3β (GSK3β)를 저하시키는 방법.
- [0300] U11. 상기 U에 있어서, 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제가 CHIR99021, Wnt-1, WNT3A, Wnt4, Wnt5a, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 방법.
- [0301] U12. 상기 U에 있어서, 상기 하나 이상의 Wnt 활성화제가 CHIR99021인 방법.
- [0302] U13. 상기 U에 있어서, 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제가 뉴레굴린, LIF, CNTF, 폴스콜린, TGFβ 및 FBS로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0303] U14. 상기 U에 있어서, 상기 하나 이상의 SC 분화 유도제가 NRG1인 방법.
- [0304] U15. 상기 U에 있어서, 상기 하나 이상의 FGF 활성화제가 FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF7, FGF8, FGF10, FGF18, 이의 유도체, 및 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0305] U16. 상기 U에 있어서, 상기 하나 이상의 FGF 활성화제가 FGF2인 방법.
- [0306] U17. 상기 U에 있어서, 상기 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커가 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, 및 SLC10A4로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0307] U18. 상기 U에 있어서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단으로 상기 세포의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 선호하는 조건을 거치는 단계를 포함하는 방법.
- [0308] U19. 상기 U에 있어서, 상기 조건이 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0309] U20. 상기 U에 있어서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0310] U21. 상기 U에 있어서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 약 10일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0311] U22. 상기 U에 있어서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 약 35일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0312] U23. 상기 U에 있어서, 상기 조건이 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 추가로 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0313] U24. 상기 U에 있어서, 상기 조건이 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 적어도 약 3일 동안 추가로 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0314] U25. 상기 U에 있어서, 상기 조건이 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 10일 동안 추가로 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0315] U26. 상기 U에 있어서, 상기 조건이 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 하나 이

상의 SC 분화 증강제와 약 35일 동안 추가로 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

- [0316] U27. 상기 U에 있어서, 상기 조건이 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 상기 세포 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제, 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제, 및 하나 이상의 SC 분화 증강제와 동시적으로 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0317] U28. 상기 U에 있어서, 상기 하나 이상의 SC 분화 증강제가 뉴레굴린, 사이클릭 아데노신 모노포스페이트 (cAMP), 폴스콜린, LIF, 및 CNTF로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0318] U29. 상기 U에 있어서, 상기 하나 이상의 SC 분화 증강제가 cAMP인 방법.
- [0319] U30. 상기 U에 있어서, 상기 슈반 세포 집단이 하나 이상의 슈반 세포 마커를 발현하는 방법.
- [0320] U31. 상기 U에 있어서, 상기 하나 이상의 슈반 세포 마커가 LRRTM4, CDH1, FABP7, BDNF, UNCB5, SOSTDC1, OLIG1, PLAT, KCNJ10, SHH, NTN1, GDNF, NGFR, NFATC4, MOG, IFNG, MAL, NTF3, TGFB1, SOX10, S100, GFAP, POU3F1, PMP22, MBP, AQP4, MPZ, GFAP, ERBB3, CD9, CD81, CD44, CD98, CD49E, CD49D, TYRP1, ENTHD1, NT5E, HTR2B, NOV, IL8, SLC16A6, CDKN2A, PLP2, S100A6, AQP9, 및 CDH19로 이루어진 군으로부터 선택되는 슈반 세포 마커로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0321] U32. 상기 U에 있어서, 줄기 세포 집단의 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단으로의 시험관내 분화가 SMAD 신호전달의 억제 및 Wnt 신호전달의 활성화를 포함하는 방법.
- [0322] U33. 상기 U에 있어서, 줄기 세포 집단의 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단으로의 시험관내 분화가 줄기 세포를 하나 이상의 TGF  $\beta$  /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 접촉시키는 단계, 및 세포를 하나 이상의 Wnt 활성화제와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0323] U34. 상기 U에 있어서, 상기 줄기 세포 집단을 하나 이상의 SMAD 억제제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0324] U35. 상기 U에 있어서, 상기 줄기 세포 집단을 상기 하나 이상의 TGF  $\beta$  /Activin-Nodal 신호전달의 억제제 및 상기 하나 이상의 SMAD 억제제와 함께 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0325] U36. 상기 U에 있어서, 상기 세포와 하나 이상의 Wnt 활성화제의 최초 접촉이 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF  $\beta$  /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 4일 이하인 방법.
- [0326] U37. 상기 U에 있어서, 상기 세포와 상기 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제의 최초 접촉이 상기 줄기 세포와 상기 하나 이상의 TGF  $\beta$  /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 2일인 방법.
- [0327] U38. 상기 U에 있어서, 상기 하나 이상의 TGF  $\beta$  /Activin-Nodal 신호전달의 억제제가 SB431542, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 방법.
- [0328] U39. 상기 U에 있어서, 상기 하나 이상의 TGF  $\beta$  /Activin-Nodal 신호전달의 억제제가 SB431542인 방법.
- [0329] U40. 상기 U에 있어서, 상기 하나 이상의 SMAD 억제제가 LDN193189, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자인 방법.
- [0330] U41. 상기 U에 있어서, 상기 하나 이상의 SMAD 억제제가 LDN193189인 방법.
- [0331] U42. 상기 U에 있어서, 신경 능선 계통 마커가 SOX10, p75, HNK1, CD49D, ERBB3, TFAP2, SNAIL 및 SLUG로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0332] V. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 대상체에서 PNS 및/또는 CNS를 재생하는 방법으로서, 대상체에 하기 중 하나의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다:

  - [0333] (a) 상기 분화된 슈반 세포 전구체 집단;
  - [0334] (b) 상기 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 포함하는 조성물;
  - [0335] (c) 상기 슈반 세포 집단; 및
  - [0336] (d) 상기 슈반 세포 집단을 포함하는 조성물.

- [0337] W. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 대상체에서 PNS 및/또는 CNS의 재생을 위한 상기 분화된 슈

반 세포 전구체 집단을 제공한다.

- [0338] X. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 대상체에서 PNS 및/또는 CNS의 재생을 위한 상기 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0339] Y. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 대상체에서 PNS 및/또는 CNS의 재생을 위한 상기 슈반 세포 집단을 제공한다.
- [0340] Z. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 대상체에서 PNS 및/또는 CNS의 재생을 위한 상기 슈반 세포 집단을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0341] AA. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 PNS 및/또는 CNS의 재생을 위한 약제의 제조에 있어서의 상기 분화된 슈반 세포 전구체 집단의 용도를 제공한다.
- [0342] AB. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 PNS 및/또는 CNS의 재생을 위한 약제의 제조에 있어서의 상기 분화된 슈반 세포 전구체 집단 조성물의 용도를 제공한다.
- [0343] AC. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 PNS 및/또는 CNS의 재생을 위한 약제의 제조에 있어서의 상기 슈반 세포 집단의 용도를 제공한다.
- [0344] AD. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 PNS 및/또는 CNS의 재생을 위한 약제의 제조에 있어서의 상기 슈반 세포 집단 조성물의 용도를 제공한다.
- [0345] AE. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 대상체에서 미엘린 손상을 방지 및/또는 치료하는 방법으로서, 대상체에 하기 중 하나의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다:
  - (a) 상기 분화된 슈반 세포 전구체 집단;
  - (b) 상기 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 포함하는 조성물;
  - (c) 상기 슈반 세포 집단; 및
  - (d) 상기 슈반 세포 집단을 포함하는 조성물.
- [0346] AF. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 대상체에서 미엘린 손상을 방지 및/또는 치료하기 위한 상기 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 제공한다.
- [0347] AG. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 대상체에서 미엘린 손상을 방지 및/또는 치료하기 위한 상기 분화된 슈반 세포 전구체 집단을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0348] AH. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 대상체에서 미엘린 손상을 방지 및/또는 치료하기 위한 상기 슈반 세포 집단을 제공한다.
- [0349] AI. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 대상체에서 미엘린 손상을 방지 및/또는 치료하기 위한 상기 슈반 세포 집단을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0350] AJ. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 미엘린 손상을 방지 및/또는 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 상기 분화된 슈반 세포 전구체 집단의 용도를 제공한다.
- [0351] AK. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 미엘린 손상을 방지 및/또는 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 상기 분화된 슈반 세포 전구체 집단 조성물의 용도를 제공한다.
- [0352] AL. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 미엘린 손상을 방지 및/또는 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 상기 슈반 세포 집단의 용도를 제공한다.
- [0353] AM. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 미엘린 손상을 방지 및/또는 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 상기 슈반 세포 집단 조성물의 용도를 제공한다.
- [0354] AU. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 시험관내에서 분화된 세포 집단을 포함하는 조성물로서, 세포 집단의 적어도 약 50%(예로, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99%)가 하나 이상의 SC 전구체 마커를 발현하며, 세포 집단의 약 15% 미만(예로, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 약 1% 미만, 약 0.5% 미만, 또는 약 0.1% 미만)이 줄기 세포 마커, CNS 마커, 뉴런 세포 마커, 및 중간엽 전구체

마커로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는 조성물을 제공한다.

- [0359] AU1. 상기 AU에 있어서, 하나 이상의 SC 전구체 마커가 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, 및 SLC10A4로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.
- [0360] AU2. 상기 AU에 있어서, 줄기 세포 마커가 OCT4, NANOG, SSEA4 및 SSEA3. NAU1로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.
- [0361] AU3. 상기 AU에 있어서, CNS 마커가 PAX6, NESTIN, 및 SOX1로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.
- [0362] AU4. 상기 AU에 있어서, 뉴런 세포 마커가 TUJ1, MAP2, NFH, BRN3A, ISL1, TH, ASCL1, CHAT, PHOX2B, PHOX2A, TRKA, TRKB, 및 TRKC로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.
- [0363] AU5. 상기 AU에 있어서, 중간엽 전구체 마커가 SMA, 및 CD73으로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.
- [0364] AV. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 요지 사안은 시험관내에서 분화된 세포 집단을 포함하는 조성물로서, 세포 집단의 적어도 약 50%(예로, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99%)가 하나 이상의 SC 마커를 발현하며, 세포의 약 15% 미만(예로, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 약 1% 미만, 약 0.5% 미만, 또는 약 0.1% 미만)이 SC 전구체 마커, 줄기 세포 마커, CNS 마커, 뉴런 세포 마커, 및 중간엽 전구체 마커로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는 조성물을 제공한다.
- [0365] AV1. 상기 AV에 있어서, 하나 이상의 SC 마커가 LRRTM4, CDH1, FABP7, BDNF, UNCB5, SOSTDC1, OLIG1, PLAT, KCNJ10, SHH, NTN1, GDNF, SOX10, S100, GFAP, POU3F1, PMP22, MBP, AQP4, MPZ, GFAP, ERBB3CD9, CD81, CD44, CD98, CD49E, CD49D, NGFR, NFATC4, MOG, IFNG, MAL, NTF3 TGFB1, TYRP1, ENTHD1, NT5E, HTR2B, NOV, IL8, SLC16A6, CDKN2A, PLP2, S100A6, AQP9, 및 CDH19로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.
- [0366] AV2. 상기 AV에 있어서, SC 전구체 마커가 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, 및 SLC10A4로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.
- [0367] AV3. 상기 AV에 있어서, 줄기 세포 마커가 OCT4, NANOG, SSEA4 및 SSEA3. NAU1로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.
- [0368] AV4. 상기 AU에 있어서, CNS 마커가 PAX6, NESTIN, 및 SOX1로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.
- [0369] AV5. 상기 AV에 있어서, 뉴런 세포 마커가 TUJ1, MAP2, NFH, BRN3A, ISL1, TH, ASCL1, CHAT, PHOX2B, PHOX2A, TRKA, TRKB, 및 TRKC로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.
- [0370] AV6. 상기 AV에 있어서, 중간엽 전구체 마커가 SMA, 및 CD73으로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물.

### 도면의 간단한 설명

[0371] 도 1a~1i: hESC로부터 SC의 유도. (1a) 슈반 세포 전구체 및 슈반 세포를 유도하기 위한 프로토콜(11일~35일)의 도식적 예시. (1b) 분화 11일, 25일 및 35일차의 SOX10::GFP 발현. (1c, 1d) 슈반 세포 분화 및 미엘린화(1c) 및 신경 상호작용 및 지지(1d)에 관여되는 슈반 계통 마커 패널에 대한 qRT-PCR. SOX10에 대한 정렬되지 않은 및 CD49D 정렬된 분화된 NC 세포의 면역형광. (1e) 60일차에 슈반 계통 마커에 대한 hESC-유래 SC의 대표적 면역형광 이미지. f) (1e)에서의 마커의 정량. (1g) CNS 전구체 대비 분화 50일 및 100일차에 CD49d 정제된 NC, CD49d 정제된 SCP, 인간 일차 슈반 세포, 및 CD98 정제된 hESC-유래 SC의 주성분 분석. (1h) 25일 SCP 및 100 일 SC에서 상위 10개(일반 글씨체) 및 선택된 추가의(진한 글씨체), 유의미하게 상향조절된 유전자. (1i) (1e)에서의 마커의 정량. 축적 막대= b 왼쪽 및 중간 패널에서 100  $\mu\text{m}$  및 b 오른쪽 패널 및 e에서 25  $\mu\text{m}$

도 2a~2e: hESC-SC 및 hESC-유래 슈반 세포의 시험관내 기능적 특성규명이 hESC-유래 감각 뉴런을 미엘린화함. (2a) hESC-유래 감각 또는 운동 뉴런과 hESC-SC 공동-배양의 도식적 예시. (2b) hESC-SC와 hESC-감각 뉴런의 물리적 연합. (2c) 투과 전자 현미경이 hESC-SC와 hESC-감각 뉴런의 장기 공동-배양에서 시험관내 미엘린화의 증거를 나타냄(SC 분화 80주 + 공동-배양 4개월). (2d) hESC-SC와 hESC-운동 뉴런의 물리적 연합. (2e) 공동-배양 40일 및 70일 후 hESC-SC 및 hESC-운동 뉴런 공동-배양의 칼슘 조영 정량. 축적 막대 = 2b 왼쪽 패널에서 100  $\mu\text{m}$ , 2b 오른쪽 패널에서 20  $\mu\text{m}$ , 및 2c에서 0.2  $\mu\text{m}$ .

**도 3a~3e:** hESC-SC의 생체내 기능적 특성규명. (3a) 성체 래트 좌골 신경에서 hESC-SC 이식의 도식적 예시. RFP+ hPSC-유래 슈반 세포를 부상 부위에서 신경 암웨 후 주사하였다(성체 실코스포린-A 처리된 SD 래트). (3b) 이식 8주 후 인간 특이적 핵 마커 SC101에 대한 그래프팅된 좌골 신경의 면역형광 염색. (3c) RFP(그래프팅된 인간 세포), 축삭 마커(NFH) 및 DAPI에 대한 티징처리된 신경 섬유의 공초점 분석. (3d) RFP(그래프팅된 인간 세포), 미엘린 마커 MAG(상부 패널) 및 P0(하부 패널) 및 DAPI에 대한 티징처리된 신경 섬유의 공초점 분석. (3e) RFP 및 결절 마커 Kv1.2(K<sup>+</sup> 채널, 화살표 머리, 상부 패널), CASPR(화살표 머리, 중간 패널), Pan-Na<sup>+</sup>(나트륨 채널, 화살표 머리, 하부 패널)에 대한 티징처리된 신경 섬유의 공초점 분석. 축적 막대 = b에서 100 μm, c 및 d에서 20 μm, 및 e에서 10 μm.

**도 4a~4b:** hESC-유래 SCP 및 SC 계통의 특성규명. (4a) hESC-유래 NC(11일) 및 SCP(25일)에서 SOX10::GFP의 유세포 측정 분석. (4b) 시험관내 분화 동안 상이한 시점에서 hESC-유래 SC에서 GFAP의 유세포 측정 분석.

**도 5a~5c:** 항체 스크리닝으로 인간 SC에 대한 신규한 표면 마커를 동정함. (5a) 항체 스크리닝 패러다임의 도식적 예시. (5b) 일차 스크리닝으로 hESC-SC에 대한 신규한 표면 마커를 동정함. (5c) SC 분화의 상이한 단계에서 표면 마커 발현의 면역세포화학 및 유세포 측정-기반 검정.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0372]

본원에서 개시된 요지 사안은 슈반 세포("SC")로 시험관내에서 추가 유도될 수 있는, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포(즉, 슈반 세포 전구체 "SC 전구체")로의 줄기 세포(예로, 인간 줄기 세포)의 분화를 시험관내에서 유도하기 위한 방법, 이러한 방법에 의해 생성되는 세포(SC 전구체 및 SC) 및 이러한 세포를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 또한 PNS 및/또는 CNS의 재생을 위한, 미엘린 손상의 방지 및/또는 치료를 위한 및/또는 슈반 세포 관련 장애, 예로, 말초 신경병증(예로, 당뇨병성 말초 신경병증)의 방지 및/또는 치료를 위한, 및 PNS 및/또는 CNS의 재생, 미엘린 손상의 방지 및/또는 치료 및/또는 슈반 세포 관련 장애, 예로, 말초 신경병증(예로, 당뇨병성 말초 신경병증)의 방지 및/또는 치료에 적합한 화합물의 스크리닝을 위한 이러한 세포의 용도가 제공된다.

[0373]

제한으로서가 아니라 개시의 명확성이라는 목적을 위해, 상세한 설명은 하기 하위섹션으로 구분된다:

[0374]

1. 정의

[0375]

2. 줄기 세포를 분화시키는 방법

[0376]

3. 슈반 세포 전구체 및 슈반 세포를 포함하는 조성물

[0377]

4. 치료 방법

[0378]

5. 키트

[0379]

1. 정의

[0380]

본 명세서에서 사용되는 용어는 일반적으로 본 발명의 맥락 내에서 그리고 각각의 용어가 사용되는 구체적 맥락에서, 당분야에서의 이의 일반적인 의미를 갖는다. 소정 용어가 아래에서, 또는 명세서의 다른 곳에서 논의되어 본 발명의 조성물 및 방법을 실시자에게 설명하고 및 이를 어떻게 제조하고 사용하는지에 대한 추가 안내를 제공한다.

[0381]

용어 "약" 또는 "대략"은 당업자에 의해 결정되는 특정 값에 대한 허용 가능한 오차 범위 내임을 의미하며, 이는 부분적으로 그 값이 어떻게 측정되는지 또는 결정되는지, 즉, 측정 시스템의 한계에 의존할 것이다. 예를 들어, "약"은 당분야에서의 실시에 따라 표준 편차 3 이내 또는 그 초과를 의미할 수 있다. 대안적으로, "약"은 주어진 값의 최대 20%, 예로, 최대 10%, 최대 5%, 또는 최대 1% 범위를 의미할 수 있다. 대안적으로, 특히 생물학적 시스템 또는 공정에 대해, 이 용어는 값의 10-배 크기 이내, 예로 5-배 이내, 또는 2-배 이내를 의미할 수 있다.

[0382]

"신호 전달 단백질"에 대해 본원에서 사용되는 용어 "신호전달"은 막 수용체 단백질에 대한 리간드 결합 또는 일부 다른 자극에 의해 활성화되거나 달리 영향을 받는 단백질을 나타낸다. 신호 전달 단백질의 예에는 비제한적으로 섬유아세포 성장 인자(FGF), SMAD, 베타-카테닌을 포함하는 wingless(Wnt) 복합체 단백질, NOTCH, 전환성장 인자 베타(TGF $\beta$ ), Activin, Nodal 및 글리코겐 합성효소 키나제 3β(GSK3P) 단백질이 포함된다. 여러 세포 표면 수용체 또는 내부 수용체 단백질에 있어서, 리간드-수용체 상호작용은 세포의 반응에 직접 연관되지 않

는다. 리간드 활성화된 수용체는 세포의 거동에 대한 리간드의 궁극적인 생리적 효과가 생성되기 전에 먼저 세포 내부의 다른 단백질과 상호작용할 수 있다. 종종, 몇몇 상호작용 세포 단백질의 연쇄 거동이 수용체 활성화 또는 억제 후에 변경된다. 수용체 활성화에 의해 유도된 전체 세포 변화 세트가 신호 전달 메커니즘 또는 신호 전달 경로로 불린다.

- [0383] 본원에서 사용되는 용어 "신호"는 세포 구조 및 기능에서 변화를 제어하는 내부 및 외부 인자를 나타낸다. 이들은 성질 상 화학적이거나 물리적일 수 있다.
- [0384] 본원에서 사용되는 용어 "리간드"는 수용체에 결합하는 분자 및 단백질, 예로, TGF $\beta$ , Activin, Nodal, 뼈 형태 형성 단백질(BMP) 등을 나타낸다.
- [0385] 본원에서 사용되는 "억제제"는 분자 또는 경로의 신호 전달 기능을 방해하는(예로, 감소시키는, 줄이는, 억제하는, 제거하는, 또는 차단하는) 화합물 또는 분자(예로, 소분자, 웹타이드, 웹타이드 모사체, 천연 화합물, siRNA, 앤티-센스 핵산, 앱타미, 또는 항체)를 나타낸다. 억제제는 일례로, SMAD 신호전달과 직접 접촉함으로써, SMAD mRNA와 접촉함으로써, SMAD의 입체형태 변화를 유도함으로써, SMAD 단백질 수준을 줄임으로써, 또는 신호전달 파트너(예로, 본원에서 기재된 것들 포함)와의 SMAD 상호작용을 방해함으로써, 그리고 SMAD 표적 유전자(예로, 본원에서 기재된 것들 포함)의 발현에 영향을 미침으로써, 언급된 단백질(신호전달 분자, 언급된 신호전달 분자와 관여되는 임의의 분자, 언급된 연합 분자, 글리코겐 합성효소 키나제 3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ ))(예로, 비제한적으로 본원에서 기재된 신호전달 분자)의 임의의 활성을 변화시키는 임의의 화합물 또는 분자일 수 있다. 억제제에는 또한 상류 신호전달 분자(예로, 세포외 도메인 내, 신호전달 분자 및 효과의 예에는 뼈 형태 형성 단백질을 격리하는 Noggin, ALK 수용체 1,2,3, 및 6의 활성화 억제에 따른 하류 SMAD 활성화의 방지가 포함됨)를 인터셉트함으로써 SMAD의 생물학적 활성을 간접적으로 조절하는 분자가 포함된다. 마찬가지로, Chordin, Cerberus, Follistatin은 SMAD 신호전달의 세포외 활성화제를 유사하게 격리한다. 막통과 단백질인 Bambi도 세포외 TGF $\beta$  신호전달 분자를 격리하기 위한 가(pseudo)-수용체로서 작용한다. activin, nodal, TGF $\beta$ , 및 BMP를 차단하는 항체가 SMAD 신호전달 등의 세포외 활성화제를 중화시키기 위한 용도에 대해 고려된다. 결합에 의해 유도되고 언급된 신호전달 분자로부터의 상류 분자에 영향을 미쳐, 다시 언급된 분자의 억제를 유도하는 억제에 부가하여, 억제제는 경쟁적 억제(또 다른 알려진 결합 단백질의 결합을 배제하거나 감소시키는 방식으로 활성 부위에 결합함) 및 알로스테릭 억제(그 단백질의 활성 부위에 대한 화합물의 결합을 방해하는 방식으로 단백질 입체형태를 변화시키는 방식으로 단백질에 결합함)의 관점에서 설명된다. 억제제는 신호전달 표적에 실제로 접촉함으로써 신호전달 표적 또는 신호전달 표적 경로를 억제하는 "직접적 억제제"일 수 있다.
- [0386] 본원에서 사용되는 용어 "슈반 세포 전구체"는 비제한적으로 본원에서 개시된 슈반 세포 전구체 마커가 포함되는, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포를 나타낸다. 적합한 성숙 조건 하에서, 슈반 세포 전구체는 슈반 세포가 될 수 있다.
- [0387] 본원에서 사용되는 용어 "슈반 세포"는 비제한적으로 본원에서 개시된 슈반 세포 마커가 포함되는, 하나 이상의 슈반 세포 마커를 발현하는 세포를 나타낸다. 슈반 세포는 미엘린화 슈반 세포 또는 비-미엘린화 슈반 세포일 수 있다. 소정 구현예에서, 슈반 세포는 말초 신경계에서 뉴런의 축삭을 유지하고 재생시킬 수 있다(예로, 건강한 축삭의 유지). 소정 구현예에서, 슈반 세포는 미엘린 초(sheath)를 형성할 수 있다. 소정 구현예에서, 슈반 세포는 리막(Remak) 번들을 형성할 수 있다.
- [0388] 본원에서 사용되는 "활성화제"는 분자 또는 경로의 신호전달 기능, 예로, Wnt 신호전달, 또는 FGF 신호전달의 활성화를 증가시키거나, 유도하거나, 자극하거나, 활성화하거나, 촉진하거나, 증강시키는 화합물을 나타낸다.
- [0389] 본원에서 사용되는 용어 "유도체"는 유사한 코어 구조를 갖는 화학적 화합물을 나타낸다.
- [0390] 본원에서 사용되는 용어 "세포의 집단" 또는 "세포 집단"은 적어도 2개 세포의 그룹을 나타낸다. 비제한적 예에서, 세포 집단에는 적어도 약 10개, 적어도 약 100개, 적어도 약 200개, 적어도 약 300개, 적어도 약 400개, 적어도 약 500개, 적어도 약 600개, 적어도 약 700개, 적어도 약 800개, 적어도 약 900개, 적어도 약 1000개 세포가 포함될 수 있다. 집단은 하나의 세포 유형을 포함하는 순수한 집단, 예컨대 SC 전구체 집단, SC 집단, 또는 미분화 줄기 세포의 집단일 수 있다. 대안적으로, 집단은 하나를 초과하는 세포 유형, 예를 들어 혼합된 세포 집단, 예로, SC 전구체 및 SC의 혼합된 집단을 포함할 수 있다.
- [0391] 본원에서 사용되는 용어 "줄기 세포"는 배양에서 무한한 기간 동안 분열하며 특화된 세포를 생성하는 능력을 갖는 세포를 나타낸다. 인간 줄기 세포는 인간 유래인 줄기 세포를 나타낸다.
- [0392] 본원에서 사용되는 용어 "배아 줄기 세포"는 배양에서 연장된 기간 동안 분화하지 않고 분열할 수 있는, 착상-

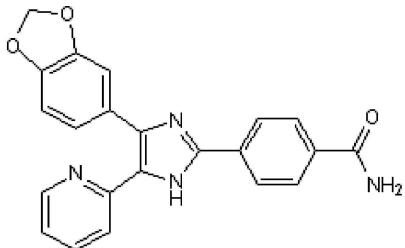
전 단계 배아로부터 유도되며 3개의 일차 배엽층의 세포 및 조직으로 발생하는 것으로 알려져 있는 원시(미분화) 세포를 나타낸다. 인간 배아 줄기 세포는 인간으로부터 유도되는 배아 줄기 세포를 나타낸다. 본원에서 사용되는 용어 "인간 배아 줄기 세포" 또는 "hESC"는 배양에서 연장된 기간 동안 분화하지 않고 분열할 수 있는, 최대로 포배 단계까지를 포함하는 초기 단계 인간 배아로부터 유도되며, 3개의 일차 배엽층의 세포 및 조직으로 발생하는 것으로 알려져 있는 다능성 줄기 세포("PSC")의 한 유형을 나타낸다.

- [0393] 본원에서 사용되는 용어 "배아 줄기 세포주"는 최대 수 일, 수 개월 내지 수 년 동안 분화하지 않고 증식하는 것을 허용하는 시험관내 조건 하에 배양된 배아 줄기 세포 집단을 나타낸다.
- [0394] 본원에서 사용되는 용어 "만능"은 신체의 모든 세포 유형에 더하여 배아와 조직, 예컨대 태반을 이루는 모든 세포 유형을 생성하는 능력을 나타낸다.
- [0395] 본원에서 사용되는 용어 "다능"은 신체의 하나를 초과하는 세포 유형으로 발생하는 능력을 나타낸다.
- [0396] 본원에서 사용되는 용어 "다능성"은 내배엽, 중배엽, 및 외배엽을 포함하는 유기체의 3개 발생 배엽층으로 발생하는 능력을 나타낸다.
- [0397] 본원에서 사용되는 용어 "유도된 다능성 줄기 세포" 또는 "iPSC"는 체세포, 예를 들어 CI 4, C72 등으로의 소정 배아 유전자(예컨대 OCT4, SOX2, 및 KLF4 트랜스유전자)의 도입에 의해 형성되는, 배아 줄기 세포와 유사한 다능성 줄기 세포의 한 유형을 나타낸다(예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 문헌[Takahashi and Yamanaka Cell 126, 663-676 (2006)] 참고).
- [0398] 본원에서 사용되는 용어 "체세포"는 때때로 "성체" 세포로 나타내는, 생식세포(난자 또는 정자) 이외의 체내의 모든 세포를 나타낸다.
- [0399] 본원에서 사용되는 용어 "신체(성체) 줄기 세포"는 자가-재생(실험실에서) 및 분화 모두에 대해 제한된 능력을 갖는 여러 기관 및 분화된 조직에서 확인되는 상대적으로 드문 미분화 세포를 나타낸다. 이러한 세포는 이의 분화능이 다양하지만, 보통 기원 기관에서의 세포 유형으로 제한된다.
- [0400] 본원에서 사용되는 용어 "뉴런"은 신경계의 기본적인 기능 단위인 신경 세포를 나타낸다. 뉴런은 세포체 및 그 돌기-축삭 및 하나 이상의 가지돌기로 이루어진다. 뉴런은 시냅스에서 신경전달물질을 방출함으로써 다른 뉴런 또는 세포로 정보를 전달한다.
- [0401] 본원에서 사용되는 용어 "증식"은 세포수 증가를 나타낸다.
- [0402] 본원에서 사용되는 용어 "미분화"는 아직 특화된 세포 유형으로 발생되지 않은 세포를 나타낸다.
- [0403] 본원에서 사용되는 용어 "분화"는 특화되지 않은 배아 세포가 특화된 세포, 예컨대 심장, 간, 또는 근육 세포의 특성을 획득하는 과정을 나타낸다. 분화는 보통, 세포 표면에 포매된 단백질이 관여되는 신호전달 경로를 통해, 세포 유전자와 세포 밖의 물리적 및 화학적 조건의 상호작용에 의해 제어된다.
- [0404] 본원에서 사용되는 용어 "유도된 분화"는 특정(예를 들어, 요망되는) 세포 유형, 예컨대 SC 전구체로의 분화를 유도하는 줄기 세포 배양 조건의 조작을 나타낸다.
- [0405] 줄기 세포에 대해 본원에서 사용되는 용어 "유도된 분화"는 줄기 세포의 다능성 상태로부터 보다 성숙하거나 특화된 세포 운명(예로 SC 전구체, SC 등)으로의 전이를 촉진하는 소분자, 성장 인자 단백질, 및 다른 성장 조건의 사용을 나타낸다.
- [0406] 세포에 대해 본원에서 사용되는 용어 "분화 유도"는 디폴트 세포 유형(유전형 및/또는 표현형)의 비-디폴트 세포 유형(유전형 및/또는 표현형)으로의 변화를 나타낸다. 따라서, "줄기 세포에서의 분화 유도"는 줄기 세포(예로, 인간 줄기 세포)를 줄기 세포와 상이한 특징, 예컨대 유전형(예로, 유전 분석, 예컨대 마이크로어레이에 의해 결정되는 유전자 발현의 변화) 및/또는 표현형(예로, 단백질, 예컨대 SC 전구체 마커(들) 및 SC 마커(들)의 발현 변화)을 갖는 자손 세포로 분열하도록 하는 유도를 나타낸다.
- [0407] 본원에서 사용되는 용어 "세포 배양"은 연구 또는 의학적 치료를 위한 인공 배지에서의 시험관내 세포 성장을 나타낸다.
- [0408] 본원에서 사용되는 용어 "배양 배지"는 배양 용기, 예컨대 페트리 플레이트, 멀티-웰 플레이트 등에서 세포를 덮고, 세포에 영양을 공급하고 세포를 지지하는 영양소를 함유하는 액체를 나타낸다. 배양 배지에는 또한 세포에서 요망되는 변화를 생성하기 위해 첨가된 성장 인자가 포함될 수 있다.

- [0409] 본원에서 사용되는 세포를 화합물(예로, 하나 이상의 억제제, 활성화제, 및/또는 유도제)과 "접착시키는"이라는 용어는 화합물이 세포를 터치할 수 있도록 할 위치에 이를 배치하는 것을 나타낸다. 접촉은 임의의 적합한 방법을 사용하여 달성될 수 있다. 예를 들어, 접촉은 화합물을 세포의 튜브에 첨가하여 달성될 수 있다. 접촉은 또한 화합물을 세포를 포함하는 배양 배지에 첨가하여 달성될 수 있다. 각각의 화합물(예로, 본원에서 개시된 억제제, 활성화제, 및 유도제)은 용액(예로, 농축된 용액)으로서 세포를 포함하는 배양 배지에 첨가될 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 세포뿐만 아니라 화합물(예로, 본원에서 개시된 억제제, 활성화제, 및 유도제)이 제형화된 세포 배양 배지에 존재할 수 있다.
- [0410] 본원에서 사용되는 용어 "시험관내"는 인공 환경 및 인공 환경 내에서 일어나는 공정 및 반응을 나타낸다. 시험관내 환경은 비제한적으로 시험관 및 세포 배양으로 예시된다.
- [0411] 본원에서 사용되는 용어 "생체내"는 천연 환경(예로, 동물 또는 세포) 및 천연 환경 내에서 일어나는 공정, 예컨대 배아 발생, 세포 분화, 신경관 형성 등을 나타낸다.
- [0412] 유전자 또는 단백질에 관해 본원에서 사용되는 용어 "발현"은 검정, 예컨대 마이크로어레이 검정, 항체 염색 검정 등을 사용해서 관찰될 수 있는 mRNA 또는 단백질의 생성을 나타낸다.
- [0413] 본원에서 사용되는 용어 "마커" 또는 "세포 마커"는 특정 세포 또는 세포 유형을 확인시켜주는 유전자 또는 단백질을 나타낸다. 세포에 대한 마커는 하나의 마커에 제한되지 않을 수 있고, 마커는 지정된 마커 그룹이 하나의 세포 또는 세포 유형을 또 다른 세포 또는 세포 유형으로부터 확인시켜줄 수 있도록 하는 마커 "패턴"을 나타낼 수 있다.
- [0414] 본원에서 개시된 임의의 세포에 대해 수행되는 경우, 본원에서 사용되는 용어 "로부터 유도되는" 또는 "로부터 확립되는" 또는 "로부터 분화되는"은 임의의 조작, 예컨대, 비제한적으로, 시험관내에서 배양된, 단세포 단리, 예를 들어 단백질, 화학물질, 방사선, 바이러스로의 감염, DNA 서열로의, 예컨대 형태원 등으로의 전달감염을 사용하는 처리 및/또는 돌연변이화, 배양된 모체 세포에 함유되는 임의의 세포의 선택(예컨대 연속 배양에 의해)을 사용하여 세포주, 조직(예컨대 해리된 배아, 또는 유체 내의 모체 세포로부터 수득된(예로, 단리된, 정제된 등) 세포를 나타낸다. 유도된 세포는 성장 인자, 사이토카인, 사이토카인 처리의 선택된 진행에 대한 반응, 접착성, 접착성의 부재, 정렬 절차 등에 의해 혼합된 집단으로부터 선택될 수 있다.
- [0415] 본원에서 "개체" 또는 "대상체"는 척추동물, 예컨대 인간 또는 비-인간 동물, 예를 들어, 포유류이다. 포유류에는 비제한적으로 인간, 영장류, 농장 동물, 스포츠 동물, 설치류 및 애완동물이 포함된다. 비-인간 동물 대상체의 비제한적 예에는 설치류, 예컨대 마우스, 래트, 햄스터, 및 기니아픽; 토끼; 개; 고양이; 양; 돼지; 염소; 소; 말; 및 비-인간 영장류, 예컨대 유인원 및 원숭이가 포함된다.
- [0416] 본원에서 사용되는 용어 "질환"은 세포, 조직, 또는 기관의 정상 기능을 손상시키거나 방해하는 임의의 상태 또는 장애를 나타낸다.
- [0417] 본원에서 사용되는 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 치료받는 개체 또는 세포의 질환 경과를 변경하려는 시도의 임상적 개입을 나타내며, 예방을 위해 또는 임상 병리 경과 동안 수행될 수 있다. 치료의 치료 효과에는, 비제한적으로, 질환의 발생 또는 재발 방지, 증상의 경감, 질환의 임의의 직접적 또는 간접적인 병리적 결과의 약화, 전이 방지, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 완화 또는 일시적 억제, 및 면제 또는 개선된 예후가 포함된다. 질환 또는 장애의 진행을 방지함으로써, 치료는 영향받거나 진단받은 대상체 또는 장애를 갖는 것으로 추정되는 대상체에서 장애로 인한 악화를 방지할 수 있지만, 또한 치료는 장애에 대한 위험에 처한 또는 장애를 갖는 것으로 추정되는 대상체에서 장애의 개시 또는 장애의 증상을 방지할 수 있다.
- [0418] 2. 줄기 세포를 분화시키는 방법
- [0419] 본원에서 개시된 요지 사안은 줄기 세포(예로, 인간 줄기 세포)의 분화를 시험관내에서 유도하기 위한 방법을 제공한다.). 소정 구현예에서, 줄기 세포는 인간 줄기 세포이다. 인간 줄기 세포의 비제한적 예에는 인간 배아 줄기 세포(hESC), 인간 다능성 줄기 세포(hPSC), 인간 유도된 다능성 줄기 세포(hiPSC), 인간 단성생식 줄기 세포, 원시 생식 세포-유사 다능성 줄기 세포, 배반엽상증 줄기 세포, F-클래스 다능성 줄기 세포, 신체 줄기 세포, 암 줄기 세포, 또는 계통 특이적 분화가 가능한 임의의 다른 세포가 포함된다. 소정 구현예에서, 인간 줄기 세포는 인간 다능성 줄기 세포이다. 소정 구현예에서, 인간 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포(hESC)이다. 소정 구현예에서, 인간 줄기 세포는 인간 유도된 다능성 줄기 세포(hiPSC)이다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 비제한적으로 포유류 줄기 세포, 영장류 줄기 세포, 또는 설치류, 마우스, 래트, 개, 고양이, 말, 돼지, 소, 양 등

으로부터의 줄기 세포를 포함하는 비-인간 줄기 세포이다.

- [0420] 본 발명자들은 이전에 줄기 세포(예로, hPSC)의 신경 계통의 한 유형으로의 분화를 유도하기 위한 이중 SMAD 억제의 용도를 개시하였다(그 전문이 참조로 포함되는, 문헌[Chambers (2009)]). 또한, 본 발명자들은 이전에 SMAD 신호전달의 순차적 억제에 이어 Wnt 신호전달의 활성화에 의한 줄기 세포의 신경 능선 계통 세포(예로, 통각수용기)로의 분화를 개시하였다(모두 이의 전문이 참조로 포함되는, 문헌[Chambers (2012); Mica (2013)]; WO2011/149762; 문헌[Fattah (2016)]; 및 2015년 12월 23일에 출원된 미국 특허 출원 제62/387,468호).
- [0421] 본원에서 개시된 요지 사안은 줄기-세포-유래 슈반 세포에 대한 것이다. 소정 구현예에서, 줄기 세포의 SC로의 분화에는 3개 상: 줄기 세포의 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포(신경 능선 계통 세포)로의 시험관내 분화, 신경 능선 계통 세포의 SC 전구체로의 시험관내 분화, 및 SC 전구체의 SC로의 시험관내 분화 또는 성숙이 포함된다. 비제한적으로 문헌[Chambers (2012); Mica (2013)]; WO2011/149762; 2015년 12월 23일에 출원된 미국 특허 출원 제62/387,468호; 및 문헌[Fattah (2016)]에 개시된 것들을 포함하는, 줄기 세포의 신경 능선 계통 세포로의 시험관내 분화를 위한 임의의 적합한 방법이 본원에서 개시된 방법의 첫 번째 상에서 사용될 수 있다. 소정 구현예에서, 줄기 세포 집단은 신경 능선 계통 세포 집단으로 시험관내에서 분화되고, 이는 SC 전구체 집단으로 시험관내에서 분화되고, 이는 SC 집단으로 시험관내에서 추가로 유도된다.
- [0422] 신경 능선 계통 마커의 비제한적 예에는 SOX10, p75, HNK1, CD49D, ERBB3, TFAP2, SNAIL 및 SLUG가 포함된다.
- [0423] 소정 구현예에서, 신경 능선 계통 세포는 SMAD 신호전달 및 Wnt 신호전달의 활성화의 억제에 의해 줄기 세포로부터 시험관내에서 분화된다. 소정 구현예에서, 방법은 줄기 세포 집단(예로, 인간 줄기 세포)을 하나 이상의 전환 성장 인자 베타(TGF $\beta$ )/Activin-Nodal 신호전달의 억제제 및 하나 이상의 Wnt 활성화제와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0424] 소정 구현예에서, SC 전구체는 SC 분화를 유도하여 신경 능선 계통 세포로부터 시험관내에서 분화된다. 소정 구현예에서, 방법은 신경 능선 계통 세포(예로, SMAD 신호전달의 억제 및 Wnt 신호전달의 활성화에 의해 줄기 세포로부터 유도되는 신경 능선 계통 세포) 집단을 하나 이상의 Wnt 활성화제 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 신경 능선 계통 세포(예로, SMAD 신호전달의 억제 및 Wnt 신호전달의 활성화에 의해 줄기 세포로부터 유도되는 신경 능선 계통 세포) 집단을 하나 이상의 SC 분화 유도제와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0425] 소정 구현예에서, SC는 SC 분화를 증강시켜 SC 전구체로부터 시험관내에서 분화된다. 소정 구현예에서, 방법은 SC 전구체(예로, SC 분화를 유도하여 신경 능선 계통 세포로부터 유도되는 SC 전구체 세포) 집단을 하나 이상의 FGF 활성화제, 하나 이상의 SC 분화 유도제와 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 SC 전구체(예로, SC 분화를 유도하여 신경 능선 계통 세포로부터 유도되는 SC 전구체 세포) 집단을 하나 이상의 SC 분화 증강제와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0426] 1.1. 줄기 세포의 신경 능선 계통 세포로의 시험관내 분화
- [0427] 소정 구현예에서, 줄기 세포의 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포로의 분화를 시험관내에서 유도하기 위한 방법은 줄기 세포(예로, 인간 줄기 세포) 집단을 하나 이상의 전환 성장 인자 베타(TGF $\beta$ )/Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제는 TGF $\beta$ , 뼈 형태형성 단백질(BMP), Nodal, 및 activin을 포함하는 리간드를 중화하거나, 수용체 및 하류 효과인자의 차단을 통해 이의 신호 경로를 차단한다. TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 비제한적 예는 이의 전문이 참조로 포함되는 WO2011/149762, 문헌[Chambers (2009), 및 Chambers (2012)]에 개시된다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제는 SB431542, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자이다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제는 SB431542이다.
- [0428] "SB431542"는 번호 CAS 301836-41-9, 분자식 C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>, 및 명칭 4-[4-(1,3-벤조디옥솔-5-일)-5-(2-페리디닐)-1H-이미다졸-2-일]-벤즈아미드를 갖는 분자를 나타내며, 예를 들어 아래의 구조를 참고한다:

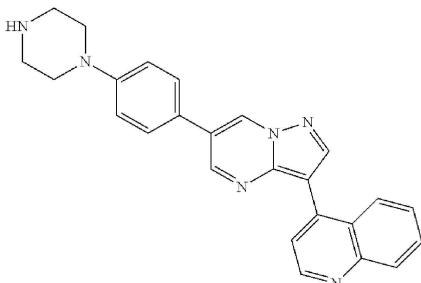


[0429]

소정 구현예에서, 줄기 세포의 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포로의 분화를 시험관내에서 유도하기 위한 방법은 줄기 세포를 하나 이상의 Small Mothers Against Decapentaplegic(SMAD) 신호전달의 억제제("SMAD 억제제")와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. SMAD 억제제의 비제한적 예는 이의 전문이 참조로 포함되는 WO2011/149762, 문헌[Chambers (2009), 및 Chambers (2012)]에 개시된다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 SMAD 신호전달의 억제제는 LDN193189, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자이다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 SMAD 억제제는 LDN193189이다.

[0431]

"LDN193189"는 하기 식을 갖는 화학식 C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>의, 소분자 DM-3189, IUPAC 명칭 4-(6-(4-(4-(피페라진-1-일)페닐)파라졸로[1,5-a]피리미딘-3-일)퀴놀린을 나타낸다.



[0432]

LDN193189는 SMAD 신호전달 억제제로서 기능할 수 있다. LDN193189는 또한 ALK2, ALK3, 및 ALK6, 단백질 티로신 키나제(PTK)의 매우 강력한 소-분자 억제제이며, I형 TGFβ 수용체의 ALK1 및 ALK3 패밀리 구성원의 신호전달을 억제하고, 뼈 형태형성 단백질(BMP) BMP2, BMP4, BMP6, BMP7, 및 엑티빈(Aktivin) 사이토카인 신호를 포함하는 여러 생물학적 신호의 전파 및 후속적으로 Smad1, Smad5, 및 Smad8의 SMAD 인산화의 억제를 일으킨다(본원에서 참조로 포함되는 문헌[Yu et al. (2008) Nat Med 14:1363-1369; Cuny et al. (2008) Bioorg. Med. Chem. Lett. 18: 4388-4392]).

[0434]

소정 구현예에서, 줄기 세포의 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포로의 분화를 시험관내에서 유도하기 위한 방법은 세포를 하나 이상의 Wnt 활성화제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 리간드에 대해 본원에서 사용되는 용어 "WNT" 또는 "wingless"는 WNT 수용체, 예컨대 Frizzled 및 LRPDerailed/Ryk 수용체 패밀리의 수용체와 상호작용 할 수 있는 분비된 단백질 그룹(즉 인간에서 Int1(integration 1))을 나타낸다. 신호전달 경로에 대해 본원에서 사용되는 용어 "WNT" 또는 "wingless"는 β-카테닌으로 또는 이것이 없이 매개되는, Wnt 패밀리 리간드 및 Wnt 패밀리 수용체, 예컨대 Frizzled 및 LRPDerailed/Ryk 수용체로 이루어진 신호 경로를 나타낸다. 소정 구현예에서, WNT 신호전달 경로에는 β-카테닌, 예로, WNT/-카테닌에 의한 매개가 포함된다.

[0435]

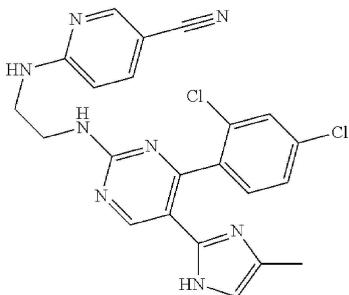
소정 구현예에서, 하나 이상의 Wnt 활성화제는 Wnt 신호전달의 활성화를 위해 글리코겐 합성효소 키나제 3β(GSK3β)를 저하시킨다. 따라서, Wnt 활성화제는 GSK3β 억제제일 수 있다. GSK3P 억제제는 WNT 신호전달 경로를 활성화할 수 있으며, 예로, 이의 전문이 본원에 참조로 포함되는 문헌[Cadigan, et al., J Cell Sci. 2006;119:395-402; Kikuchi, et al., Cell Signaling. 2007;19:659-671]을 참고한다. 본원에서 사용되는 용어 "글리코겐 합성효소 키나제 3β 억제제"는 글리코겐 합성효소 키나제 3β 효소를 억제하는 화합물을 나타내며, 예를 들어, 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 문헌[Doble, et al., J Cell Sci. 2003;116:1175-1186]을 참고한다.

[0436]

Wnt 활성화제 또는 GSK3β 억제제의 비제한적 예는 이의 전문이 참조로 포함되는 WO2011/149762, 문헌[Chambers (2012), 및 Calder et al., J Neurosci. 2015 Aug 19;35(33):11462-81]에 개시된다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 Wnt 활성화제는 CHIR99021, WNT3A, Wnt-1, Wnt4, Wnt5a, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소분자이다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 Wnt 활성화제는 CHIR99021이다.

[0437]

"CHIR99021"(또한 "아미노파리미딘" 또는 "3-[3-(2-카복시에틸)-4-메틸파롤-2-메틸리데닐]-2-인돌리논"으로 알려져 있음)은 하기 식을 갖는 IUPAC 명칭 6-(2-(4-(2,4-디클로로페닐)-5-(4-메틸-1H-이미다졸-2-일)파리미딘-2-일아미노)에틸아미노)니코티노니트릴을 나타낸다.



[0438]

CHIR99021은 고도로 선택적이며, 관련 및 미관련 키나제 패널에 대해 거의 1000-배의 선택성을 나타내고, 인간 GSK3 $\beta$ 에 대해 IC<sub>50</sub>=6.7 nM 및 설치류 GSK3 $\beta$  상동체에 대해 나노몰 농도의 IC<sub>50</sub> 값을 갖는다.

[0440]

줄기 세포의 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포로의 시험판내 분화를 위해, 줄기 세포는 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 적어도 약 10일, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 적어도 약 15일, 적어도 약 16일, 적어도 약 17일, 적어도 약 18일, 적어도 약 19일, 적어도 약 20일, 적어도 약 21일, 적어도 약 22일, 적어도 약 23일, 적어도 약 24일, 적어도 약 25일, 적어도 약 26일, 적어도 약 27일, 적어도 약 28일, 적어도 약 29일, 또는 적어도 약 30일 동안 접촉될 수 있다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 최대 약 3일, 최대 약 4일, 최대 약 5일, 최대 약 6일, 최대 약 7일, 최대 약 8일, 최대 약 9일, 최대 약 10일, 최대 약 11일, 최대 약 12일, 최대 약 13일, 최대 약 14일, 최대 약 15일, 최대 약 16일, 최대 약 17일, 최대 약 18일, 최대 약 19일, 최대 약 20일, 최대 약 21일, 최대 약 22일, 최대 약 23일, 최대 약 24일, 최대 약 25일, 최대 약 26일, 최대 약 27일, 최대 약 28일, 최대 약 29일, 또는 최대 약 30일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 약 4일 내지 약 30일, 약 4일 내지 약 27일, 약 4일 내지 약 26일, 약 4일 내지 약 25일, 약 4일 내지 약 24일, 약 4일 내지 약 20일, 약 4일 내지 약 15일, 약 4일 내지 약 10일, 약 5일 내지 약 15일, 약 5일 내지 약 10일, 약 10일 내지 약 15일, 약 15일 내지 약 20일, 약 10일 내지 약 20일, 약 20일 내지 약 25일, 또는 약 25일 내지 약 30일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 10일 내지 약 15일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 8일, 약 9일, 약 10일, 약 11일, 약 12일, 약 13일, 약 14일, 약 15일, 약 16일, 약 17일, 약 18일, 약 19일, 약 20일, 약 21일, 약 22일, 약 23일, 약 24일, 약 25일, 약 26일, 약 27일, 약 28일, 약 29일, 또는 약 30일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 약 10일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 약 11일 동안 접촉된다.

[0441]

줄기 세포의 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포로의 시험판내 분화를 위해, 줄기 세포는 하나 이상의 SMAD 신호전달의 억제제와 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 적어도 약 10일, 적어도 약 11일, 적어도 약 12, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 적어도 약 15일, 적어도 약 16일, 적어도 약 17일, 적어도 약 18일, 적어도 약 19일, 적어도 약 20일, 적어도 약 21일, 적어도 약 22일, 적어도 약 23일, 적어도 약 24일, 적어도 약 25일, 적어도 약 26일, 적어도 약 27일, 적어도 약 28일, 적어도 약 29일, 또는 적어도 약 30일 동안 접촉될 수 있다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나 이상의 SMAD 신호전달의 억제제와 최대 약 3일, 최대 약 4일, 최대 약 5일, 최대 약 6일, 최대 약 7일, 최대 약 8일, 최대 약 9일, 최대 약 10일, 최대 약 11일, 최대 약 12일, 최대 약 13일, 최대 약 14일, 최대 약 15일, 최대 약 16일, 최대 약 17일, 최대 약 18일, 최대 약 19일, 최대 약 20일, 최대 약 21일, 최대 약 22일, 최대 약 23일, 최대 약 24일, 최대 약 25일, 최대 약 26일, 최대 약 27일, 최대 약 28일, 최대 약 29일, 또는 최대 약 30일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나 이상의 SMAD 신호전달의 억제제와 약 4일 내지 약 30일, 약 4일 내지 약 27일, 약 4일 내지 약 26일, 약 4일 내지 약 25일, 약 4일 내지 약 24일, 약 4일 내지 약 20일, 약 4일 내지 약 15일, 약 4일 내지 약 10일, 약 5일 내지 약 15일, 약 5일 내지 약 10일, 약 10일 내지 약 20일, 약 20일 내지 약 25일, 또는 약 25일 내지

약 30일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나 이상의 SMAD 신호전달의 억제제와 10일 내지 약 15일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나 이상의 SMAD 신호전달의 억제제와 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 8일, 약 9일, 약 10일, 약 11일, 약 12일, 약 13일, 약 14일, 약 15일, 약 16일, 약 17일, 약 18일, 약 19일, 약 20일, 약 21일, 약 22일, 약 23일, 약 24일, 약 25일, 약 26일, 약 27일, 약 28일, 약 29일, 또는 약 30일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나 이상의 SMAD 신호전달의 억제제와 약 10일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나 이상의 SMAD 신호전달의 억제제와 약 11일 동안 접촉된다.

[0442] 또한, 세포는 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 적어도 약 10일, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 적어도 약 15일, 적어도 약 16일, 적어도 약 17일, 적어도 약 18일, 적어도 약 19일, 적어도 약 20일, 적어도 약 21일, 적어도 약 22일, 적어도 약 23일, 적어도 약 24일, 적어도 약 25일, 적어도 약 26일, 적어도 약 27일, 적어도 약 28일, 또는 적어도 약 29일, 적어도 약 30일 동안 접촉될 수 있다. 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 최대 약 4일, 최대 약 5일, 최대 약 6일, 최대 약 7일, 최대 약 8일, 최대 약 9일, 최대 약 10일, 최대 약 11일, 최대 약 12일, 최대 약 13일, 최대 약 14일, 최대 약 15일, 최대 약 16일, 최대 약 17일, 최대 약 18일, 최대 약 19일, 최대 약 20일, 최대 약 21일, 최대 약 22일, 최대 약 23일, 최대 약 24일, 최대 약 25일, 최대 약 26일, 최대 약 27일, 최대 약 28일, 또는 최대 약 29일, 또는 최대 약 30일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 약 4일 내지 약 30일, 약 4일 내지 약 27일, 약 4일 내지 약 26일, 약 4일 내지 약 25일, 약 4일 내지 약 24일, 약 4일 내지 약 20일, 약 4일 내지 약 15일, 약 4일 내지 약 10일, 약 5일 내지 약 15일, 약 5일 내지 약 10일, 약 10일 내지 약 15일, 약 15일 내지 약 20일, 약 10일 내지 약 20일, 약 20일 내지 약 25일, 또는 약 25일 내지 약 30일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 5일 내지 약 15일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 8일, 약 9일, 약 10일, 약 11일, 약 12일, 약 13일, 약 14일, 약 15일, 약 16일, 약 17일, 약 18일, 약 19일, 약 20일, 약 21일, 약 22일, 약 23일, 약 24일, 약 25일, 약 26일, 약 27일, 약 28일, 약 29일, 또는 약 30일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 약 11일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 약 10일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 약 9일 동안 접촉된다.

[0443] 소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 약 1 nM 내지 약 300 nM, 약 5 nM 내지 약 250 nM, 약 10 nM 내지 약 200 nM, 약 10 nM 내지 약 50 nM, 약 50 nM 내지 약 150 nM, 약 80 nM 내지 약 120 nM, 약 90 nM 내지 약 110 nM, 약 50 nM 내지 약 100 nM, 약 100 nM 내지 약 150 nM, 약 150 nM 내지 약 200 nM, 약 200 nM 내지 약 250 nM, 또는 약 250 nM 내지 약 300 nM의 농도로 접촉된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 약 80 nM 내지 약 120 nM의 농도로 접촉된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 약 100 nM의 농도로 접촉된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 매일, 2일마다 또는 이를마다, 상술된 농도 중 임의의 하나로 접촉된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 매일 약 100 nM의 농도로 접촉된다.

[0444] 소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나 이상의 SMAD 신호전달의 억제제와 약 1  $\mu$ M 내지 100  $\mu$ M, 약 1  $\mu$ M 내지 20  $\mu$ M, 약 1  $\mu$ M 내지 15  $\mu$ M, 약 1  $\mu$ M 내지 10  $\mu$ M, 약 1  $\mu$ M 내지 5  $\mu$ M, 약 5  $\mu$ M 내지 10  $\mu$ M, 약 5  $\mu$ M 내지 15  $\mu$ M, 약 15  $\mu$ M 내지 20  $\mu$ M, 약 20  $\mu$ M 내지 30  $\mu$ M, 약 30  $\mu$ M 내지 40  $\mu$ M, 약 40  $\mu$ M 내지 50  $\mu$ M, 약 50  $\mu$ M 내지 60  $\mu$ M, 약 60  $\mu$ M 내지 70  $\mu$ M, 약 70  $\mu$ M 내지 80  $\mu$ M, 약 80  $\mu$ M 내지 90  $\mu$ M, 또는 약 90  $\mu$ M 내지 100  $\mu$ M의 농도로 접촉된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나 이상의 SMAD 신호전달의 억제제와 약 5  $\mu$ M 내지 15  $\mu$ M의 농도로 접촉된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나 이상의 SMAD 신호전달의 억제제와 약 10  $\mu$ M의 농도로 접촉된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나 이상의 SMAD 신호전달의 억제제와 매일, 2일마다 또는 이를마다 상술된 농도 중 임의의 하나로 접촉된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나 이상의 SMAD 신호전달의 억제제와 매일 약 10  $\mu$ M의 농도로 접촉된다.

[0445] 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 약 1  $\mu$ M 내지 100  $\mu$ M, 약 1  $\mu$ M 내지 20  $\mu$ M, 약 1  $\mu$ M 내지 15  $\mu$ M, 약 1  $\mu$ M 내지 10  $\mu$ M, 약 1  $\mu$ M 내지 5  $\mu$ M, 약 5  $\mu$ M 내지 10  $\mu$ M, 약 5  $\mu$ M 내지 15  $\mu$ M, 약 15  $\mu$ M 내지 20  $\mu$ M, 약 20  $\mu$ M 내지 30  $\mu$ M, 약 30  $\mu$ M 내지 40  $\mu$ M, 약 40  $\mu$ M 내지 50  $\mu$ M, 약 50  $\mu$ M 내지 60  $\mu$ M, 약 60  $\mu$ M 내지 70  $\mu$ M, 약 70  $\mu$ M 내지 80  $\mu$ M, 약 80  $\mu$ M 내지 90  $\mu$ M, 또는 약 90  $\mu$ M

내지  $100 \mu\text{M}$ 의 농도로 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 약  $1 \mu\text{M}$  내지  $5 \mu\text{M}$ 의 농도로 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 약  $3 \mu\text{M}$ 의 농도로 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 매일, 2일마다 또는 이틀마다 상술된 농도 중 임의의 하나로 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 매일 약  $3 \mu\text{M}$ 의 농도로 접촉된다.

#### 1.2. 신경 능선 계통 세포의 슈반 세포 전구체로의 시험관내 분화

[0446] 신경 능선 계통 세포의 슈반 세포 전구체로의 직접적 분화를 위해 본원에서 개시된 분화 방법은 세포(예로, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포, 예로, 줄기 세포 집단과 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달 및 선택적으로 하나 이상의 SMAD 억제제의 접촉, 및 세포와 하나 이상의 Wnt 활성화제의 추가 접촉 후 분화된 세포)를 본원에서 기재된 하나 이상의 Wnt 활성화제, 및 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제("FGF 활성화제")와 접촉시켜 SC 전구체 집단, 예로, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포를 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 세포(예로, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포, 예로, 줄기 세포 집단과 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달 및 선택적으로 하나 이상의 SMAD 억제제의 접촉, 및 세포와 하나 이상의 Wnt 활성화제의 추가 접촉 후 분화된 세포)를 슈반 세포 분화를 유도하는 하나 이상의 분자("SC 분화 유도제")와 접촉시켜 SC 전구체 집단, 예로, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포를 생성하는 단계를 포함한다.

[0447] SC 분화 유도제의 비제한적 예에는 뉴레굴린, LIF, CNTF, 폴스콜린, TGF $\beta$  및 FBS가 포함된다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 SC 분화 유도제는 뉴레굴린 1(NRG1)이다.

[0448] FGF 신호전달의 활성화제의 비제한적 예에는 FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF7, FGF8, FGF10, FGF18, 이의 유도체, 및 혼합물이 포함된다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 FGF 활성화제는 FGF2이다.

[0449] 소정 구현예에서, 세포(예로, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포)는 하나 이상의 Wnt 활성화제 및 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 함께 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포(예로, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포)는 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 하나 이상의 SC 분화 유도제와 함께 접촉된다. 예를 들어, 하나 이상의 Wnt 활성화제 및 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제는 모두 세포(예로, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포)를 포함하는 세포 배양 배지에 존재한다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제는 세포(예로, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포, 예로, 줄기 세포 집단과 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달 및 선택적으로 하나 이상의 SMAD 억제제의 접촉, 및 세포와 하나 이상의 Wnt 활성화제의 추가 접촉 후 분화된 세포)를 포함하는 세포 배양 배지에 매일(또는 2일마다 또는 이틀마다) 함께 침가된다.

[0450] 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포는 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 적어도 약 10일, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 적어도 약 15일, 적어도 약 16일, 적어도 약 17일, 적어도 약 18일, 적어도 약 19일, 또는 적어도 약 20일 동안 접촉되어, SC 전구체를 생성할 수 있다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포는 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 10일 동안 접촉되어 SC 전구체를 생성한다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포는 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 최대 약 15일, 최대 약 16일, 최대 약 17일, 최대 약 18일, 최대 약 19일, 최대 약 20일, 최대 약 21일, 최대 약 22일, 최대 약 23일, 최대 약 24일, 최대 약 25일, 최대 약 26일, 최대 약 27일, 최대 약 28일, 최대 약 29일, 또는 최대 약 30일 동안 접촉되어 SC 전구체를 생성한다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포는 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 3일 내지 약 5일, 약 5일 내지 약 10일, 약 10일 내지 약 15일, 약 15일 내지 약 20일, 약 20일 내지 약 25일, 또는 약 25일 내지 약 30일 동안 접촉되어 SC 전구체를 생성한다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포는 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 10일 동안 내지 약 15일 동안 접촉되어 SC 전구체를 생성한다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포는 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일,

약 8일, 약 9일, 약 10일, 약 11일, 약 12일, 약 13일, 약 14일, 약 15일, 약 16일, 약 17일, 약 18일, 약 19일, 약 20일, 약 21일, 약 22일, 약 23일, 약 24일, 약 25일, 약 26일, 약 27일, 약 28일, 약 29일, 또는 약 30일 동안 접촉되어 SC 전구체를 생성한다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포는 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 14일 동안 접촉되어 SC 전구체를 생성한다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포는 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 15일 동안 접촉되어 SC 전구체를 생성한다.

[0452]

소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 Wnt 활성화제와 접촉되어 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포 집단을 생성하며, 신경 능선 계통 세포 집단은 하나 이상의 Wnt 활성화제와 추가로 접촉된다. 따라서, 세포는 하나 이상의 Wnt 활성화제와 전체적으로 적어도 약 14일, 적어도 약 15일, 적어도 약 16일, 적어도 약 17일, 적어도 약 18일, 적어도 약 19일, 적어도 약 20일, 적어도 약 21일, 적어도 약 22일, 적어도 약 23일, 적어도 약 24일, 적어도 약 25일, 적어도 약 26일, 적어도 약 27일, 적어도 약 28일, 또는 적어도 약 29일, 적어도 약 30일, 적어도 약 31일, 적어도 약 32일, 적어도 약 33일, 적어도 약 34일, 적어도 약 35일, 적어도 약 36일, 적어도 약 37일, 적어도 약 38일, 적어도 약 39일, 또는 적어도 약 40일 동안 접촉될 수 있다. 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 Wnt 활성화제와 전체적으로 최대 약 15일, 최대 약 16일, 최대 약 17일, 최대 약 18일, 최대 약 19일, 최대 약 20일, 최대 약 21일, 최대 약 22일, 최대 약 23일, 최대 약 24일, 최대 약 25일, 최대 약 26일, 최대 약 27일, 최대 약 28일, 최대 약 29일, 최대 약 30일, 최대 약 31일, 최대 약 32일, 최대 약 33일, 최대 약 34일, 최대 약 35일, 최대 약 36일, 최대 약 37일, 최대 약 38일, 최대 약 39일, 최대 약 40일, 최대 약 41일, 최대 약 42일, 최대 약 43일, 최대 약 44일, 최대 약 45일, 최대 약 46일, 최대 약 47일, 최대 약 48일, 최대 약 49일, 최대 약 50일, 최대 약 51일, 최대 약 52일, 최대 약 53일, 최대 약 54일, 최대 약 55일, 최대 약 56일, 최대 약 57일, 최대 약 58일, 최대 약 59일, 또는 최대 약 60일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 Wnt 활성화제와 전체적으로 20일 내지 약 30일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 전체적으로 20일 내지 약 25일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 Wnt 활성화제와 전체적으로 25일 내지 약 30일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 전체적으로 약 14일, 약 15일, 약 16일, 약 17일, 약 18일, 약 19일, 약 20일, 약 21일, 약 22일, 약 23일, 약 24일, 약 25일, 약 26일, 약 27일, 약 28일, 약 29일, 약 30일, 약 31일, 약 32일, 약 33일, 약 34일, 약 35일, 약 36일, 약 37일, 약 38일, 약 39일, 약 40일, 약 41일, 약 42일, 약 43일, 약 44일, 약 45일, 약 46일, 약 47일, 약 48일, 약 49일, 약 50일, 약 51일, 약 52일, 약 53일, 약 54일, 약 55일, 약 56일, 약 57일, 약 58일, 약 59일 또는 약 60일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 Wnt 활성화제와 전체적으로 약 26일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 전체적으로 약 25일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 Wnt 활성화제와 전체적으로 약 24일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 Wnt 활성화제와 전체적으로 약 23일 동안 접촉된다.

[0453]

소정 구현예에서, 세포(예로, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포)는 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제와 약 1 nM 내지 100 nM, 약 1 nM 내지 20 nM, 약 1 nM 내지 15 nM, 약 1 nM 내지 10 nM, 약 1 nM 내지 5 nM, 약 5 nM 내지 10 nM, 약 5 nM 내지 15 nM, 약 15 nM 내지 20 nM, 약 20 nM 내지 30 nM, 약 30 nM 내지 40 nM, 약 40 nM 내지 50 nM, 약 50 nM 내지 60 nM, 약 60 nM 내지 70 nM, 약 70 nM 내지 80 nM, 약 80 nM 내지 90 nM, 또는 약 90 nM 내지 100 nM의 농도로 접촉되어, SC 전구체를 생성한다. 소정 구현예에서, 세포(예로, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포)는 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제와 약 5 nM 내지 15 nM의 농도로 접촉되어 SC 전구체를 생성한다. 소정 구현예에서, 세포(예로, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포)는 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제와 약 10 nM의 농도로 접촉되어 SC 전구체를 생성한다. 소정 구현예에서, 세포(예로, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포)는 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제와 매일, 2일마다 또는 이틀마다 상술된 농도 중 임의의 하나로 접촉되어 SC 전구체를 생성한다. 소정 구현예에서, 세포(예로, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포)는 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제와 매일 약 10 nM의 농도로 접촉되어 SC 전구체를 생성한다.

[0454]

소정 구현예에서, 세포(예로, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포)는 슈반 세포 분화를 유도하는 하나 이상의 분자와 약 1 ng/ml 내지 100 ng/ml, 약 1 ng/ml 내지 20 ng/ml, 약 1 ng/ml 내지 15 ng/ml, 약 1 ng/ml 내지 10 ng/ml, 약 1 ng/ml 내지 5 ng/ml, 약 5 ng/ml 내지 10 ng/ml, 약 5 ng/ml 내지 15 ng/ml, 약 15

ng/ml 내지 25 ng/ml, 약 15 ng/ml 내지 20 ng/ml, 약 20 ng/ml 내지 30 ng/ml, 약 30 ng/ml 내지 40 ng/ml, 약 40 ng/ml 내지 50 ng/ml, 약 50 ng/ml 내지 60 ng/ml, 약 60 ng/ml 내지 70 ng/ml, 약 70 ng/ml 내지 80 ng/ml, 약 80 ng/ml 내지 90 ng/ml, 또는 90 ng/ml 내지 100 ng/ml의 농도로 접촉되어 SC 전구체를 생성한다. 소정 구현예에서, 세포(예로, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포)는 슈반 세포 분화를 유도하는 하나 이상의 분자와 약 5 ng/ml 내지 15 ng/ml의 농도로 접촉되어 SC 전구체를 생성한다. 소정 구현예에서, 세포(예로, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포)는 슈반 세포 분화를 유도하는 하나 이상의 분자와 약 10 ng/ml의 농도로 접촉되어 SC 전구체를 생성한다. 소정 구현예에서, 세포(예로, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포)는 슈반 세포 분화를 유도하는 하나 이상의 분자와 매일, 2일마다 또는 이틀마다 상술된 농도 중 임의의 하나로 접촉되어 SC 전구체를 생성한다. 소정 구현예에서, 세포(예로, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포)는 슈반 세포 분화를 유도하는 하나 이상의 분자와 매일 약 10 ng/ml의 농도로 접촉되어 SC 전구체를 생성한다. 소정 구현예에서, 세포(예로, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포)는 슈반 세포 분화를 유도하는 하나 이상의 분자와 매일 약 10 ng/ml의 농도로 접촉되어 SC 전구체를 생성한다.

[0455] 소정 구현예에서, 세포(예로, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포)는 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 약 1 μM 내지 100 μM, 약 1 μM 내지 20 μM, 약 1 μM 내지 15 μM, 약 1 μM 내지 10 μM, 약 1 μM 내지 5 μM, 약 5 μM 내지 10 μM, 약 5 μM 내지 15 μM, 약 15 μM 내지 20 μM, 약 20 μM 내지 30 μM, 약 30 μM 내지 40 μM, 약 40 μM 내지 50 μM, 약 50 μM 내지 60 μM, 약 60 μM 내지 70 μM, 약 70 μM 내지 80 μM, 약 80 μM 내지 90 μM, 또는 약 90 μM 내지 100 μM의 농도로 접촉되어 SC 전구체를 생성한다. 소정 구현예에서, 세포(예로, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포)는 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 약 1 μM 내지 5 μM의 농도로 접촉되어 SC 전구체를 생성한다. 소정 구현예에서, 세포(예로, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포)는 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 약 3 μM의 농도로 접촉되어 SC 전구체를 생성한다. 소정 구현예에서, 세포(예로, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포)는 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 매일, 2일마다 또는 이틀마다 상술된 농도 중 임의의 하나로 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포(예로, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포)는 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 매일 약 3 μM의 농도로 접촉된다.

[0456] 소정 구현예에서, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포를 적어도 약 50% 포함하는 세포 집단은 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포로 분화되며, 여기서 세포 집단은 1종의 Wnt 활성화제(예로, CHIR99021, 예로, 3 μM CHIR99021), 1종의 FGF 활성화제(예로, FGF2, 예로, 10 nM FGF2), 및 1종의 SC 분화 유도제(예로, NRG1, 예로, 10 ng/ml NRG1)와 약 15일(예로, 약 14일 또는 약 15일) 동안 접촉된다.

[0457] 소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포로 분화되며, 여기서 세포는 1종의 TGF β/Activin-Nodal 신호전달의 억제제(예로, SB431542, 예로, 10 μM SB431542) 및 선택적으로 1종의 SMAD 억제제(예로, LDN193189, 예로, 100 nM LDN193189)와 약 10일(예로, 약 10일 또는 약 11일) 동안; 1종의 Wnt 활성화제(예로, CHIR99021, 예로, 3 μM CHIR99021)와 약 23일(예로, 약 23일 또는 약 24일) 동안; 및 1종의 FGF 활성화제(예로, FGF2, 예로, 10 nM FGF2) 및 1종의 SC 분화 유도제(예로, NRG1, 예로, 10 ng/ml NRG1)와 약 15일(예로, 약 14 또는 15일) 동안 접촉된다.

[0458] 소정 구현예에서, 세포는 Sonic Hedgehog(SHH) 신호전달의 활성화제에 노출되지 않는다. SHH 신호전달의 활성화제의 비제한적 예에는 sonic hedgehog(SHH), C25II, smoothened(SMO) 수용체 소분자 작용제(예로, 푸르모르파민), 이의 유도체, 및 이의 혼합물이 포함된다. 소정 구현예에서, 세포는 SHH에 노출되지 않는다.

### 1.3. 슈반 세포 전구체의 슈반 세포로의 시험관내 유도

[0459] 슈반 세포 전구체는 슈반 세포로 시험관내에서 추가 유도될 수 있다. 분화된 SC 전구체는 SC 전구체의 슈반 세포 집단으로의 성숙을 선호하는 조건을 거칠 수 있다. 슈반 세포는 미엘린화 슈반 세포 또는 비-미엘린화 슈반 세포일 수 있다.

[0460] 소정 구현예에서, 슈반 세포 전구체(SC 전구체)는 본원에서 기재된 하나 이상의 FGF 활성화제, 본원에서 기재된 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제와 접촉되어 SC 집단을 생성한다. 소정 구현예에서, 슈반 세포 전구체(SC 전구체)는 슈반 세포 분화를 증강시키는 하나 이상의 분자("SC 분화 증강제"로 언급됨)와 접촉된다. SC 분화 증강제의 비제한적 예에는 뉴레굴린, 사이클릭 아데노신 모노포스페이트(cAMP), 폴스콜린, LIF, 및 CNTF가 포함된다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 SC 분화 증강제는 선택된 cAMP이다. 소정 구현예에서, 슈반 세포 전구체(SC 전구체)는 1종의 FGF 활성화제 및 2종의 슈반 세포 분화 유도제와 접촉되어 SC 집단을 생성한다. 소정 구

현예에서, 2종의 슈반 세포 분화 유도제는 cAMP 및 NRG1이다.

[0462] 소정 구현예에서, SC 전구체는 세포 배양 배지 중에서 하나 이상의 FGF 활성화제 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 증강제와 접촉되어 SC를 생성한다. 소정 구현예에서, 세포 배양 배지는 L-글루타민이 보충된 NB 배지(예로, Gibco, 25030-164), N2(예로, Stem Cell Technologies, 07156), 및 B27(예로, Life Technologies, 17504044)이다.

[0463] 소정 구현예에서, SC 전구체는 슈반 세포 분화를 유도하는 하나 이상의 분자와 약 1 ng/ml 내지 100 ng/ml, 약 1 ng/ml 내지 20 ng/ml, 약 1 ng/ml 내지 15 ng/ml, 약 1 ng/ml 내지 10 ng/ml, 약 1 ng/ml 내지 5 ng/ml, 약 5 ng/ml 내지 10 ng/ml, 약 5 ng/ml 내지 15 ng/ml, 약 15 ng/ml 내지 25 ng/ml, 약 15 ng/ml 내지 20 ng/ml, 약 20 ng/ml 내지 30 ng/ml, 약 30 ng/ml 내지 40 ng/ml, 약 40 ng/ml 내지 50 ng/ml, 약 50 ng/ml 내지 60 ng/ml, 약 60 ng/ml 내지 70 ng/ml, 약 70 ng/ml 내지 80 ng/ml, 약 80 ng/ml 내지 90 ng/ml, 또는 약 90 ng/ml 내지 100 ng/ml의 농도로 접촉되어 SC를 생성한다. 소정 구현예에서, SC 전구체는 슈반 세포 분화를 유도하는 하나 이상의 분자와 약 15 ng/ml 내지 25 ng/ml의 농도로 접촉되어 SC를 생성한다. 소정 구현예에서, SC 전구체는 슈반 세포 분화를 유도하는 하나 이상의 분자와 약 20 ng/ml의 농도로 접촉되어 SC를 생성한다. 소정 구현예에서, SC 전구체는 슈반 세포 분화를 유도하는 하나 이상의 분자와 매일, 2일마다 또는 이틀마다 상술된 농도 중 임의의 하나로 접촉되어 SC를 생성한다. 소정 구현예에서, SC 전구체는 슈반 세포 분화를 유도하는 하나 이상의 분자와 매일 약 10 ng/ml의 농도로 접촉되어 SC를 생성한다.

[0464] 소정 구현예에서, SC 전구체는 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 증강제와 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 적어도 약 10일, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 또는 적어도 약 15일 동안 접촉되어 SC를 생성한다. 소정 구현예에서, SC 전구체는 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 3일 내지 약 40일, 약 3일 내지 약 35일, 약 3일 내지 약 30일, 약 3일 내지 약 25일, 약 3일 내지 약 20일, 약 3일 내지 약 15일, 약 10일 내지 약 40일, 약 10일 내지 약 20일, 약 20일 내지 약 40일, 약 20일 내지 약 30일, 또는 약 30일 내지 약 40일 동안 접촉되어 SC를 생성한다. 소정 구현예에서, SC 전구체는 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 3일 내지 약 15일 동안 접촉되어 SC를 생성한다. 소정 구현예에서, SC 전구체는 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 30일 내지 약 40일 동안 접촉되어 SC를 생성한다. 소정 구현예에서, SC 전구체는 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 10일 동안 접촉되어 SC를 생성한다. 소정 구현예에서, SC 전구체는 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 11일 동안 접촉되어 SC를 생성한다. 소정 구현예에서, SC 전구체는 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 35일 동안 접촉되어 SC를 생성한다.

[0465] 소정 구현예에서, SC 전구체는 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제와 약 1 nM 내지 100 nM, 약 1 nM 내지 20 nM, 약 1 nM 내지 15 nM, 약 1 nM 내지 10 nM, 약 1 nM 내지 5 nM, 약 5 nM 내지 10 nM, 약 5 nM 내지 15 nM, 약 15 nM 내지 20 nM, 약 20 nM 내지 30 nM, 약 30 nM 내지 40 nM, 약 40 nM 내지 50 nM, 약 50 nM 내지 60 nM, 약 60 nM 내지 70 nM, 약 70 nM 내지 80 nM, 약 80 nM 내지 90 nM, 또는 약 90 nM 내지 100 nM의 농도로 접촉되어 SC를 생성한다. 소정 구현예에서, SC 전구체는 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제와 약 5 nM 내지 15 nM의 농도로 접촉되어 SC 전구체를 생성한다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제와 약 10 nM의 농도로 접촉되어 SC를 생성한다. 소정 구현예에서, SC 전구체는 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제와 매일, 2일마다 또는 이틀마다 상술된 농도 중 임의의 하나로 접촉되어 SC를 생성한다. 소정 구현예에서, SC 전구체는 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제와 매일 약 10 nM의 농도로 접촉되어 SC를 생성한다.

[0466] 소정 구현예에서, SC 전구체의 SC로의 성숙을 선호하는 조건은 분화된 SC 전구체 세포를 3D 구형체로 옹집시키는 단계, 및 상기 3D 구형체를 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 증강제와 추가로 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 배양 배지는 혼탁 배양 배지이다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포를 적어도 약 50% 포함하는 세포 집단은 하나 이상의 슈반 세포 마커를 발현하는 세포로 분화되며, 여기서 세포 집단은 1종의 FGF 활성화제(예로, FGF2, 예로, 10 nM FGF2), 2종의 SC 분화 유도제(예로, NRG1(예로, 10 ng/ml NRG1) 및 cAMP(예로, 100

$\text{mM cAMP})$ )와 적어도 약 10일 동안 접촉된다.

[0467] 소정 구현예에서, 세포는 Sonic Hedgehog(SHH) 신호전달의 활성화제에 노출되지 않는다. SHH 신호전달의 활성화제의 비제한적 예에는 sonic hedgehog(SHH), C25II, smoothed(SMO) 수용체 소분자 작용제(예로, 푸르모르파민), 이의 유도체, 및 이의 혼합물이 포함된다. 소정 구현예에서, 세포는 SHH에 노출되지 않는다.

#### 1.4. 세포 배양 배지

[0469] 소정 구현예에서, 상술된 억제제, 활성화제, 유도제 및 증강제가 세포, 예로, 줄기 세포, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포, 하나 이상의 SC 전구체 마커를 발현하는 세포, 하나 이상의 SC 마커를 발현하는 세포, 또는 이의 조합을 포함하는 세포 배양 배지에 첨가된다. 적합한 세포 배양 배지에는 비제한적으로 Knockout<sup>®</sup> 혈청 대체("KSR") 배지, N2 배지, Essential 8<sup>®</sup>/Essential 6<sup>®</sup>("E8/E6") 배지, 및 신경기본(Neurobasal, NB) 배지(예로, N2 및 B-27<sup>®</sup> 보충물질이 보충된 NB 배지)가 포함된다. KSR 배지, N2 배지, E8/E6 배지 및 NB 배지는 상업적으로 이용 가능하다. 소정 구현예에서, 줄기 세포의 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포로의 시험관내 분화를 위한 배지는 KSR 배지, N2 배지, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 배지이다. 소정 구현예에서, 줄기 세포의 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포로의 시험관내 분화를 위한 배지는 E8/E6 배지이다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포의 하나 이상의 SC 전구체 마커를 발현하는 세포로의 시험관내 유도를 위한 배지는 NB 배지이다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 SC 전구체 마커를 발현하는 세포의 하나 이상의 SC 마커를 발현하는 세포로의 시험관내 유도를 위한 배지는 NB 배지이다.

[0470] KSR 배지는 배양에서 미분화 hESC 세포를 성장시키고 유지하기 위해 최적화된 정의된, 무혈청 제형물이다. KSR 배지의 성분은 WO2011/149762에 개시된다. 소정 구현예에서, KSR 배지는 녹아웃(Knockout) DMEM, 녹아웃 혈청 대체물질, L-글루타민, Pen/Strep, MEM, 및 13-메르캅토에탄올을 포함한다. 소정 구현예에서, 1리터의 KSR 배지는 820 mL의 녹아웃 DMEM, 150 mL의 녹아웃 혈청 대체물질, 10 mL의 200 mM L-글루타민, 10 mL의 Pen/Strep, 10 mL의 10 mM MEM, 및 55  $\mu\text{l}$ 의 13-메르캅토에탄올을 포함할 수 있다.

[0471] E8/E6 배지는 인간 다능성 줄기 세포의 성장 및 증식을 지지하는 영양세포-비함유 및 이물-비함유 배지이다. E8/E6 배지는 체세포 재프로그래밍을 지지하는 것으로 증명되었다. 또한, E8/E6 배지는 PSC의 배양을 위해 사재 배지의 제형화를 위한 기재로서 사용될 수 있다. E8/E6 배지의 일례는 그 전문이 참조로 포함되는 문헌[Chen et al., Nat Methods. 2011 May;8(5):424-9]에 기재된다. E8/E6 배지의 일례는 그 전문이 참조로 포함되는 WO15/077648에 개시된다. 소정 구현예에서, E8/E6 세포 배양 배지는 DMEM/F12, 아스코르브산, 셀레늄, 인슐린,  $\text{NaHCO}_3$ , 트랜스페린, FGF2 및 TGF $\beta$ 를 포함한다. E8/E6 배지는 E8/E6 배지에 활성 BMP 또는 Wnt 성분이 포함되지 않는다는 점에서 KSR 배지와 상이하다. 따라서, 소정 구현예에서, E8/E6 배지가 줄기 세포를 배양하기 위해 사용되는 경우, 하나 이상의 SMAD 억제제(예로, BMP를 억제하는 것들)는 E8/E6 배지에 첨가될 필요가 없다.

[0472] N2 보충물질은 배양에서 미분화 신경 줄기 및 전구체 세포의 증식을 위해 사용되는 화학적으로 정의된, 비-동물, 보충물질이다. N2 보충물질은 DMEM/F12 배지와 사용하기 위한 것이다. N2 배지의 성분은 WO2011/149762에 개시된다. 소정 구현예에서, N2 배지는 글루코스, 나트륨 바이카보네이트, 푸트레신, 프로게스테론, 나트륨 셀레나이트, 트랜스페린, 및 인슐린으로 보충된 DMEM/F12 배지를 포함한다. 소정 구현예에서, 1리터의 N2 배지는 DMEM/F12 분말, 1.55 g의 글루코스, 2.00 g의 나트륨 바이카보네이트, 푸트레신(100 mL의 중류수 중에 용해된 1.16 g의 100  $\mu\text{l}$  분취물), 프로게스테론(100 mL 100% 에탄올 중에 용해된 0.032 g의 20  $\mu\text{l}$  분취물), 나트륨 셀레나이트(중류수 중 0.5 mM 용액의 60  $\mu\text{l}$  분취물), 100 mg의 트랜스페린, 및 10 mL의 5 mM NaOH 중 25 mg의 인슐린을 함유하는 985 mL 중류수를 포함한다.

[0473] 소정 구현예에서, 줄기 세포는 KSR 배지에서 최초 배양되며, 이는 줄기 세포와 SC 분화 유도제 및 FGF 활성화제의 접촉 시까지 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉 후부터 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 또는 약 5일, 약 6일, 약 7일, 또는 약 8일에 증가하는 양의 N2 배지로 점차 대체된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 KSR 배지에서 최초 배양되며, 이는 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉 후 약 4일부터 10일까지 증가하는 양의 N2 배지로 점차 대체된다.

[0474] 본원에서 개시된 줄기 세포 집단의 배양을 위해 사용되는 세포 배양 배지는 세포와 접촉될 억제제(들), 활성화제(들), 유도제(들) 및 증강제(들)(예로, KSR 배지에 있어서, 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억

제제 및 하나 이상의 SMAD 억제제가 요구되며; E8/E6 배지에 있어서, 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제만 요구됨)을 결정할 뿐만 아니라 세포 배양 배지에 대한 억제제(들), 활성화제(들), 유도제(들) 및 증강제(들)의 첨가 순서를 결정한다.

[0475] 소정 구현예에서, 세포와 하나 이상의 Wnt 활성화제의 최초 접촉은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 4일 이하(예로, 함께(같은 날), 또는 약 1일 내지 약 4일, 예로, 약 1일, 약 2일, 약 3일, 또는 약 4일)이다.

[0476] 소정 구현예에서, 줄기 세포의 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포로의 시험관내 분화를 위한 세포 배양 배지는 KSR 배지이며, 세포와 하나 이상의 Wnt 활성화제의 최초 접촉은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 2일이다. 소정 구현예에서, 줄기 세포와 하나 이상의 SMAD 억제제의 최초 접촉은, 예로, SMAD 억제제(들) 및 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제(들)를 줄기 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 같은 날 최초 첨가함으로써, 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉과 같은 날이다. 소정 구현예에서, BMP 활성 제제는 E8/E6 배지에 첨가된다. 소정 구현예에서, BMP 활성 제제는 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 8일, 약 9일, 또는 약 10일 배양 후에 배지로부터 제거된다. 소정 구현예에서, BMP 활성 제제는 약 3일 배양 후에 배지로부터 제거된다. 소정 구현예에서, BMP 활성 제제는 약 0.5 내지 약 20 ng/ml, 또는 약 1 내지 약 15 ng/ml, 또는 약 2 내지 약 10 ng/ml, 또는 약 3 내지 약 5 ng/ml의 농도로 배양 배지에 존재한다. 소정 구현예에서, BMP 활성 제제는 약 5 ng/ml의 농도로 배양 배지에 존재한다. BMP 활성 제제의 비제한적 예에는 BMP1, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP10, BMP11, BMP15, 이의 유도체, 및 이의 혼합물이 포함된다.

[0477] 소정 구현예에서, 줄기 세포의 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포로의 시험관내 분화를 위한 세포 배양 배지는 E8/E6 배지이며, 세포와 하나 이상의 Wnt 활성화제의 최초 접촉은, 예로, Wnt 활성화제(들) 및 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제(들)를 줄기 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 같은 날 최초 첨가함으로써, 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉과 같은 날이다. 소정 구현예에서, BMP 활성 제제는 E8/E6 배지에 첨가된다. 소정 구현예에서, BMP 활성 제제는 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 8일, 약 9일, 또는 약 10일 배양 후에 배지로부터 제거된다. 소정 구현예에서, BMP 활성 제제는 약 3일 배양 후에 배지로부터 제거된다. 소정 구현예에서, BMP 활성 제제는 약 0.5 내지 약 20 ng/ml, 또는 약 1 내지 약 15 ng/ml, 또는 약 2 내지 약 10 ng/ml, 또는 약 3 내지 약 5 ng/ml의 농도로 배양 배지에 존재한다. 소정 구현예에서, BMP 활성 제제는 약 5 ng/ml의 농도로 배양 배지에 존재한다. BMP 활성 제제의 비제한적 예에는 BMP1, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b, BMP10, BMP11, BMP15, 이의 유도체, 및 이의 혼합물이 포함된다.

[0478] 소정 구현예에서, 하나 이상의 FGF 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 세포의 최초 접촉은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 20일 이하이다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 FGF 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 세포의 최초 접촉은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 적어도 약 5일이다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 FGF 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 세포의 최초 접촉은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 5일 내지 약 20일(예로, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 8일, 약 9일, 약 10일, 약 11일, 약 12일, 약 13일, 약 14일, 약 15일, 약 16일, 약 17일, 약 18일, 약 19일, 또는 약 20일)이다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 FGF 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 세포의 최초 접촉은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 10일이다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 FGF 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 세포의 최초 접촉은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 11일이다.

[0479] 소정 구현예에서, Wnt 활성화제(들), FGF 활성화제(들) 및 선택적으로 SC 분화 유도제(들)는 L-글루타민(예로, Gibco, 25030-164), N2(예로, Stem Cell Technologies, 07156), 및 B27(예로, Life Technologies, 17504044)이 보충된 NB 배지에 첨가되어(매일, 2일마다 또는 이틀마다) SC 전구체를 생성한다.

[0480] 소정 구현예에서, SC 분화 유도제(들), FGF 활성화제(들) 및 선택적으로 SC 분화 증강제(들)는 L-글루타민(예로, Gibco, 25030-164), N2(예로, Stem Cell Technologies, 07156), 및 B27(예로, Life Technologies, 17504044)이 보충된 NB 배지에 첨가되어(매일, 2일마다 또는 이틀마다) SC 전구체를 생성한다.

[0481] 소정 구현예에서, TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제(들), SMAD 억제제(들), Wnt 활성화제(들), SC 분화 유도제(들), FGF 활성화제(들), 및 선택적으로 SC 분화 증강제(들)는 줄기 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 매일(또는 2일마다 또는 이틀마다) 첨가된다.

[0482] 소정 구현예에서, 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제 및 하나 이상의 SMAD 억제제의 최초 접촉은 0일차이며, 세포와 하나 이상의 Wnt 활성화제의 최초 접촉은 2일차이고, 세포와 하나 이상의 FGF 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제의 최초 접촉은 11일차이고, 세포와 하나 이상의 SC 분

화 유도제와 및 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 증강제의 최초 접촉은 25일차이다. 소정 구현예에서, 0일 내지 10일에 대한 세포 배양 배지는 KSR 배지, N2 배지, 또는 이의 혼합물이다. 소정 구현예에서, 0일 내지 3일에 대한 세포 배양 배지는 KSR 배지이다. 소정 구현예에서, 4일 내지 10일에 대한 세포 배양 배지는 KSR 배지 및 N2 배지의 조합이다. 소정 구현예에서, 10일에 대한 세포 배양 배지는 N2 배지이다. 소정 구현예에서, 11일 및 이후에 대한 세포 배양 배지는 L-글루타민, N2, 및 B27이 보충된 NB 배지이다.

[0483] 소정 구현예에서, 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제 및 하나 이상의 Wnt 활성화제의 최초 접촉은 0일차이며, 세포와 하나 이상의 FGF 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제의 최초 접촉은 11일차(또는 2일마다 또는 이를마다)이고, 세포와 하나 이상의 SC 분화 유도제 및 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 증강제의 최초 접촉은 25일차이다. 소정 구현예에서, 0일 내지 10일에 대한 세포 배양 배지는 E8/E6 배지, N2 배지, 또는 이의 혼합물이다. 소정 구현예에서, 11일 및 그 이후에 대한 세포 배양 배지는 L-글루타민, N2, 및 B27이 보충된 NB 배지이다.

[0484] 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제 및 하나 이상의 SMAD 억제제와 약 10일 동안; 하나 이상의 Wnt 활성화제와 약 23일 동안; 및 하나 이상의 FGF 활성화제와 약 14일 동안, 그리고 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 14일 동안 접촉되어, SC 전구체를 생성한다. 소정 구현예에서, SC 전구체는 하나 이상의 SC 분화 유도제, 하나 이상의 FGF 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 증강제와 적어도 8일(예로, 10일 또는 35일) 동안 접촉되어 SC를 생성한다.

[0485] 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 약 10일 동안; 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 약 25일 동안; 및 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제와 약 14일 동안, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 14일 동안 접촉되어, SC 전구체를 생성한다. 소정 구현예에서, SC 전구체는 하나 이상의 SC 분화 유도제, 하나 이상의 FGF 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 증강제와 적어도 8일(예로, 10일 또는 35일) 동안 접촉되어 SC를 생성한다.

[0486] 슈반 세포(SC) 전구체(예로, 하나 이상의 초기 슈반 세포 마커를 발현하는 세포)는 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제(들)와의 최초 접촉으로부터 약 35일 미만, 약 34일 미만, 약 33일 미만, 약 32일 미만, 약 31일 미만, 약 30일 미만, 약 29일 미만, 약 28일 미만, 약 27일 미만, 약 26일 미만, 약 25일 미만, 약 24일 미만, 약 23일 미만, 약 22일 미만, 약 21일 미만, 또는 약 20일 미만에 줄기 세포로부터 분화될 수 있다. 소정 구현예에서, SC 전구체는 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제(들)와의 최초 접촉으로부터 약 25일 또는 그 이후에 줄기 세포로부터 분화된다.

### 1.5. 마커 및 리포터

[0488] 분화된 SC 전구체는 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현한다. 슈반 세포 전구체 마커의 비제한적 예에는 SOX10, GAP43, BLBP, 미엘린 단백질 제로(MPZ), Dhh, P75NTR, CD49D, TFAP2, CDH19, CD44, ERBB3, POU3F1, 아교 세포 원섬유 산성 단백질(GFAP), CALCB, GRP116, TSPYL5, ITPKA, SLC17A6, SYPL2, LOC100128252, ANGPTL7, LOC728978, ZNF502, SLC16A6, LPL, SLC30A2, SLC10A4, 및 표 1~4에 기재된 유전자가 포함된다.

[0489] SC는 하나 이상의 슈반 세포 마커를 발현한다. 슈반 세포 마커의 비제한적 예에는 류신 풍부 반복 막통과 뉴런 4(LRRTM4), 카드해린 1(CDH1), 지방산 결합 단백질 7(FABP7), 녹 유래 신경영양 인자(BDNF), UNCB5, 스클레로스틴 도메인 함유 1(SOSTDC1), 회소돌기아교세포 전사 인자 1(OLIG1), 플라스미노겐 활성화제(PLAT), 칼륨 내향-정류 채널 하위패밀리 J 구성원 10(KCNJ10), 소닉 헛지호그(sonic hedgehog, SHH), 네트린 1(NTN1), 아교 세포주 유래 신경영양 인자(GDNF), erb-b2 수용체 디로신 키나제 3(ERBB3), 성장 연관 단백질 43(GAP43), SOX10, S100, GFAP, POU3F1, PMP22, 미엘린 염기성 단백질(MBP), 아쿠아포린 4(AQP4), NGFR, NFATC4, MOG, IFNG, MAL, NTF3, TGFB1, MPZ, CD9, CD49D, CD49E, CD44, CD98, 및 CD81, TYRP1, ENTHD1, NT5E, HTR2B, NOV, IL8, SLC16A6, CDKN2A, PLP2, S100A6, AQP9, CDH19, 및 표 1~4에 기재된 유전자가 포함된다.

[0490] 분화된 SC 전구체 및 추가로 성숙된 SC는 하나 이상의 리포터를 추가로 발현할 수 있다. 리포터의 비제한적 예에는 형광 단백질(예컨대 녹색 형광 단백질(GFP), 청색 형광 단백질(EBFP, EBFP2, Azurite, mKalama1), 시안 형광 단백질(ECFP, Cerulean, CyPet, mTurquoise2), 및 황색 형광 단백질 유도체(YFP, Citrine, Venus, YPet, EYFP)),  $\beta$ -갈락토시다제(LacZ), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(cat), 네오마이신 포스포트랜스퍼라제(neo), 효소(예컨대 옥시다제 및 페옥시다제); 및 항원성 분자가 포함된다. 본원에서 사용되는 용어 "리포터 유전자" 또는 "리포터 작제물"은 쉽게 검출 가능하거나 쉽게 검정 가능한 단백질, 예컨대 유색 단백질, 형광 단백질, 예

컨대 GFP 또는 효소, 예컨대 베타-갈락토시다제(lacZ 유전자)를 인코딩하는 핵산을 포함하는 유전적 작제물을 나타낸다.

[0491] 분화된 SC 전구체 및 추가로 성숙된 SC는 분화 후, 예로 세포 배양 배지 중에서 정제될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "정제된", "정제하다", "정제", "단리된", "단리하다" 및 "단리"는 샘플로부터 적어도 하나의 오염물질의 양의 감소를 나타낸다. 예를 들어, 요망되는 세포 유형은 요망되지 않는 세포 유형의 양의 대응하는 감소와 함께 적어도 약 10% 만큼, 적어도 약 30% 만큼, 적어도 약 50% 만큼, 적어도 약 75% 만큼, 및 적어도 약 90% 초과 만큼 정제된다. 용어 "정제하다"는 샘플로부터 소정 세포(예로, 요망되지 않는 세포)의 제거를 나타낼 수 있다. 요망되지 않는 세포의 제거 또는 선택은 샘플에서 요망되는 SC 전구체 또는 SC의 백분율 증가를 일으킨다. 소정 구현예에서, SC 전구체는 혼합된 세포 집단을 적어도 하나의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포로 정렬함으로써 정제된다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커는 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, 및 SLC10A4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커는 표 1~4에 기재된 유전자로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커는 CALCB, GRP116, TSPYL5, ITPKA, SLC17A6, SYPL2, LOC100128252, ANGPTL7, LOC728978, 및 ZNF502로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0492] 본원에서 개시된 요지 사안은 또한 본원에서 개시된 시험관내 방법, 및 이러한 세포를 포함하는 조성물에 의해 생성되는 SC 전구체 및 SC 집단을 제공한다.

### 3. 슈반 세포 전구체 및 슈반 세포를 포함하는 조성물

[0494] 본원에서 개시된 요지 사안은 본원에서 기재된 시험관내 분화 방법에 의해 생성되는 분화된 SC 전구체 집단을 포함하는 조성물을 제공한다. 또한, 본원에서 개시된 요지 사안은 본원에서 기재된 시험관내에서 분화된 SC 전구체로부터 성숙되는 SC 집단을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0495] 또한, 본원에서 개시된 요지 사안은 시험관내에서 분화된 세포 집단을 포함하는 조성물을 제공하며, 세포 집단의 적어도 약 50%(예로, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99%)는 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, 및 SLC10A4로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 SC 전구체 마커를 발현하며, 세포 집단의 약 25% 미만(예로, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 약 1% 미만, 약 0.5% 미만, 또는 약 0.1% 미만)은 줄기 세포 마커, CNS 마커, 뉴런 세포 마커, 및 중간엽 전구체 마커로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커를 발현한다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커는 표 1~4에 기재된 유전자로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커는 표 1에 기재된 유전자로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커는 CALCB, GRP116, TSPYL5, ITPKA, SLC17A6, SYPL2, LOC100128252, ANGPTL7, LOC728978, 및 ZNF502로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0496] 또한, 본원에서 개시된 요지 사안은 시험관내에서 분화된 세포 집단을 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서 세포 집단의 적어도 약 50%(예로, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99%)는 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, 및 CDH19로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 SC 마커를 발현하며, 세포의 약 25% 미만(예로, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 약 1% 미만, 약 0.5% 미만, 또는 약 0.1% 미만)은 SC 전구체 마커, 줄기 세포 마커, CNS 마커, 뉴런 세포 마커, 및 중간엽 전구체 마커로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커를 발현한다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 SC 마커는 표 1~4에 기재된 유전자로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 하나 이상의 SC 마커는 TYRP1, CD44, ENTHD1, NT5E, HTR2B, NOV, IL8, SLC16A6, 및 CDKN2A로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0497] 줄기 세포 마커의 비제한적 예에는 OCT4, NANOG, SSEA4 및 SSEA3이 포함된다. CNS 마커의 비제한적 예에는 PAX6, NESTIN, 및 SOX1이 포함된다. 뉴런 세포 마커의 비제한적 예에는 TUJ1, MAP2, NFH, BRN3A, ISL1, TH,

ASCL1, CHAT, PHOX2B, PHOX2A, TRKA, TRKB, 및 TRKC가 포함된다. 중간엽 전구체 마커의 비제한적 예는 SMA, 및 CD73이다.

[0498] 소정 구현예에서, 조성물은 약  $1 \times 10^4$  내지 약  $1 \times 10^{10}$ , 약  $1 \times 10^4$  내지 약  $1 \times 10^5$ , 약  $1 \times 10^5$  내지 약  $1 \times 10^9$ , 약  $1 \times 10^5$  내지 약  $1 \times 10^6$ , 약  $1 \times 10^5$  내지 약  $1 \times 10^7$ , 약  $1 \times 10^6$  내지 약  $1 \times 10^7$ , 약  $1 \times 10^6$  내지 약  $1 \times 10^8$ , 약  $1 \times 10^7$  내지 약  $1 \times 10^8$ , 약  $1 \times 10^8$  내지 약  $1 \times 10^9$ , 약  $1 \times 10^8$  내지 약  $1 \times 10^{10}$ , 또는 약  $1 \times 10^9$  내지 약  $1 \times 10^{10}$ 의 집단을 포함하며, 본원에서 개시된 줄기-세포-유래 SC 전구체 또는 성숙된 SC는 대상체에 투여된다. 소정 구현예에서, 약  $1 \times 10^5$  내지 약  $1 \times 10^7$ 의 본원에서 개시된 줄기-세포-유래 SC 전구체 또는 성숙된 SC.

[0499] 소정 구현예에서, 상기 조성물은 냉동된다. 소정 구현예에서, 상기 조성물은 하나 이상의 동결보호제, 예를 들어, 비제한적으로 디메틸설폐사이드(DMSO), 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜, 수크로스, 트레할로스, 텍스트로스, 또는 이의 조합을 추가로 포함할 수 있다.

[0500] 소정의 비제한적 구현예에서, 조성물은 생체적합성 스캐폴드 또는 매트릭스, 예를 들어 세포가 대상체에 착상되거나 그래프팅되는 경우, 조직 재생을 촉진하는 생체적합성 3-차원 스캐폴드를 추가로 포함한다. 소정의 비제한적 구현예에서, 생체적합성 스캐폴드는 세포외 기질 물질, 합성 중합체, 사이토카인, 콜라겐, 폴리펩타이드 또는 단백질, 피브로네틴, 라미닌, 케라틴, 피브린, 피브리노겐, 히알루론산, 해파린 설페이트, 콘드로이틴 설페이트, 아가로스를 포함하는 다당류 또는 젤라틴, 및/또는 하이드로겔을 포함한다(예로, 그 각각의 내용의 전문이 참조로 포함되는 미국 공개 제2015/0159135호, 제2011/0296542호, 제2009/0123433호, 및 제2008/0268019호 참고).

[0501] 소정 구현예에서, 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물이다. 조성물은 말초 신경계(본원에서 이후 "PNS") 및/또는 중추 신경계(본원에서 이후 "CNS")의 재생, 미엘린 손상의 방지 및/또는 보수, 및/또는 슈반 세포 관련 장애, 예로, 말초 신경병증(예로, 당뇨병성 말초 신경병증)의 방지 및/또는 치료를 위해 사용될 수 있다.

[0502] 본원에서 개시된 요지 사안은 또한 본원에서 개시된 바와 같은, 분화된 세포 또는 이를 포함하는 조성물을 포함하는 장치를 제공한다. 장치의 비제한적 예에는 주사기, 미세 유리관, 정위 바늘 및 캐뉼라가 포함된다.

#### 4. 치료 방법

[0504] 시험관내에서 분화된 SC 전구체 및 SC는 말초 신경계(본원에서 이후 "PNS")의 재생을 위해 사용될 수 있다. 시험관내에서 분화된 SC 전구체 및 SC는 또한 중추 신경계(본원에서 이후 "CNS")의 재생을 위해 사용될 수 있다. 또한, 시험관내에서 분화된 SC 전구체 및 SC는 미엘린 손상의 방지 및/또는 치료/보수를 위해 사용될 수 있다. 미엘린은 PNS 미엘린, 또는 CNS 미엘린일 수 있다.

[0505] 시험관내에서 분화된 SC 전구체 및 SC는 또한 슈반 세포 관련 장애의 방지 및/또는 치료를 위해 사용될 수 있다. 슈반 세포 관련 장애의 비제한적 예에는 말초 신경병증, 슈반세포종, 샤르코 마리 투스병, 길랭 바레 증후군, 이염색 백색질장애, 신경섬유증증, 및 다발성 경화증(MS)이 포함된다. 소정 구현예에서, 말초 신경병증은 당뇨병성 말초 신경병증(DPN)이다.

[0506] 말초 아교 세포는 PNS 생리의 여러 중추적 양태를 조절한다. 이들은 뉴런에 대한 영양적 지지를 제공하고, 축삭을 미엘린화하고, 신경 보수를 촉진한다. 후근 신경절 및 자율 신경절의 위성 세포, 신경근육 접합부의 시냅스 주위 슈반 세포 및 말초 뉴런의 축삭을 피포하는 미엘린화 및 비-미엘린화 슈반 세포를 포함하는 말초 아교 세포의 여러 서브타입이 존재한다. 이를 서브타입은 배아 발생 동안 NC로부터 생성되는 것으로 알려져 있지만, 이의 특화 및 기능적 성숙을 조절하는 메커니즘은 잘 이해되어 있지 않다. 일차 원천으로부터 이를 배아 계통을 수득하는 데 있어서의 어려움은 인간에서 SC 형성 및 미엘린화 또는 비-미엘린화 운명의 획득을 지배하는 분자 및 세포 메커니즘을 분석하는 능력을 제한한다. 인간 다능성 줄기 세포로부터 이를 계통을 유도하기 위한 본원에서 개시된 방법은 이러한 제한을 우회하고 이러한 발생 공정의 철저한 조사를 가능하게 할 수 있다. 미엘린화의 시험관내 모델에 대한 접근은 인간 시스템에서 미엘린화 공정의 분자적 연구를 촉진할 수 있다.

[0507] 이러한 상당한 기본 질문을 해결하는 데 부가하여, 본원에서 기재된 hPSC-유래 SC는 또한 단백질 변역 연구에서 이용될 수 있다. SC는 유전적 돌연변이, 암 화학치료법 및 방사선 유도된 손상, 또는 대사적 문제, 예컨대 당뇨

병을 포함하는 다양한 요인에 의해 유도되는 여러 유형의 말초 신경병증에 관여된다.

- [0508] SC에 영향을 미치는 가장 우세한 유전 장애 중 하나는 샤르코 마리 투스 1A형(CMT1A)이다. 상기 질환은 PMP22 유전자의 이중화 또는 삼중화에 의해 유도된다(Lupski, 1998; Pareyson, 1999). PMP22는 조밀한 미엘린 구조의 일부이며, 미엘린 막 층 간의 물리적 연결 확립에 관여된다. CMT1A에서 증가된 유전자 투여량으로 인한 PMP22 단백질의 상승된 수준은 SC 막의 탈안정화 및 미엘린 취약성을 야기한다(Lupski, 1998). SC에서의 이러한 병리는 근육 쇠약 및 감각 손상과 같은 증상을 야기한다. CMT1A 환자-유래 iPSC로부터의 SC 생성 또는 hESC에서 PMP22 돌연변이의 도입 및 이의 미엘린화 SC로의 후속 분화로 인해 질환 발병기전에 대한 시견 및 잠재적인 치료 옵션을 제공하는 인간 모델 시스템에서 상기 미엘린화 결함의 통합적 연구를 가능하게 할 수 있다.
- [0509] 화학치료법 및 방사선 치료법은 SC 또는 말초 뉴런에 대한 이의 연관된 손상으로 인해 암 환자에서의 PNS 손상의 가장 일반적인 원인에 속한다(Quasthoff and Hartung). 이에 기반하여, SC는 PNS 보수의 매개에서 중요한 역할을 담당하며, SC의 이식은 이들 신경병증에 대한 잠재적인 치료 기회를 부여할 수 있다. 이식된 SC의 재생 가능성은 척추 부상의 맥락에서 매우 광범위하게 연구되었다(Williams and Bunge, 2012). 그러나, SC는 보통 척추에 존재하지 않으며, 생체외 증식된 SC의 자가 이식은 척추 보수에 유익한 것으로 보고되어 있다(Guest et al., 2013). 그러나, 이식된 SC가 재생된 축삭의 미엘린화에 직접 기여하는지 또는 이의 효과가 주로 영양적 지지를 통해 매개되는지 여부는 명확하지 않다. 이러한 이식 패러다임의 주요 장애는 대규모 SC의 수득 및 부상 당한 영역에서의 이식 후 이의 이동 능력에서의 한계에 있다(Kocsis and Waxman, 2007).
- [0510] hPSC로부터 SC의 분화는 규모 문제를 극복할 수 있으며, hPSC-유래 계통의 태아 성질은 보통 증강된 이동능과 연관된다(Master et al., 2007). 따라서, hPSC-SC는 PNS 및 CNS에서 재생을 촉진하는 세포 치료법 연구를 위한 새로운 가능성을 열어준다.
- [0511] 말초 신경병증의 주요 원인은 당뇨병이다(Martyn and Hughes, 1997). 당뇨병 환자에서 증상을 관리하고 내재하는 신경 손상을 방지하기 위한 효과적인 개입에 대해 충족되지 못한 필요성이 크게 존재한다. 광범위한 시도에도 불구하고, 현재까지 평가된 모든 후보 약물은 상이한 임상 시험 단계에서 실패하였다(Grewal et al., 2016). 이는 대부분 이들 약물이 최초 동정되거나 검증된 모델 시스템의 부적절성에 기인한다(Callaghan et al., 2012). 내재하는 대사 또는 세포 메커니즘의 더 우수한 이해가 당뇨병성 말초 신경병증(DPN)에서 신경 손상을 방지하기 위한 치료법의 합리적 설계를 위해 필요할 것이다.
- [0512] 본원에서 개시된 요지 사안은 PNS의 재생을 위한 방법을 제공한다. 본원에서 개시된 요지 사안은 CNS의 재생을 위한 방법을 제공한다. 본원에서 개시된 요지 사안은 미엘린 손상을 방지 및/또는 치료 또는 보수하는 방법을 제공한다. 본원에서 개시된 요지 사안은 슈반 세포 관련 장애를 방지 및/또는 치료하기 위한 방법을 추가로 제공한다.
- [0513] 소정 구현예에서, 방법은 이를 필요로 하는 대상체에 하기 중 하나 이상의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다:
- [0514] (a) 본원에서 기재된 분화된 슈반 세포 전구체 집단;
- [0515] (b) 이러한 분화된 슈반 세포 전구체를 포함하는 조성물;
- [0516] (c) 본원에서 기재된 슈반 세포 집단; 및
- [0517] (d) 이러한 슈반 세포를 포함하는 조성물.
- [0518] 또한, 본원에서 개시된 요지 사안은 PNS 및/또는 CNS의 재생, 미엘린 손상의 방지 및/또는 치료 또는 보수, 및/또는 슈반 세포 관련 장애의 방지 및/또는 치료를 위한 하기 중 하나 이상의 용도를 제공한다:
- [0519] (a) 본원에서 기재된 분화된 슈반 세포 전구체 집단;
- [0520] (b) 이러한 분화된 슈반 세포 전구체를 포함하는 조성물;
- [0521] (c) 본원에서 기재된 슈반 세포 집단; 및
- [0522] (d) 이러한 슈반 세포를 포함하는 조성물.
- [0523] 소정 구현예에서, 미엘린은 PNS 미엘린이다. 소정 구현예에서, 미엘린은 CNS 미엘린이다.
- [0524] 소정 구현예에서, 슈반 세포 관련 장애는 말초 신경병증, 슈반세포종, 샤르코 마리 투스병, 질郎 바례 증후군, 이염색 백색질장애, 신경섬유종증, 및 다발성 경화증(MS)으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 말초 신경병증은

당뇨병성 말초 신경병증(DPN)이다.

[0525]

본원에서 개시된 줄기-세포-유래 SC 전구체 또는 이를 포함하는 조성물, 성숙된 SC 또는 이를 포함하는 조성물은 대상체에 전신으로 또는 직접적으로 투여되거나 제공될 수 있다. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 줄기-세포-유래 SC 전구체 또는 이를 포함하는 조성물, 성숙된 SC 또는 이를 포함하는 조성물은 관심 기관(예로, 슈반 세포 결합 관련 장애(예로, 말초 신경병증)에 의해 영향을 받는 기관 내로 직접적으로 주사된다. 본원에서 개시된 줄기-세포-유래 SC 전구체 또는 이를 포함하는 조성물, 성숙된 SC 또는 이를 포함하는 조성물은 비제한적으로 뇌 및 척추를 포함하는, 유효 신경을 갖는 대상체의 임의의 신체 부위로 직접적으로 투여될(주사될) 수 있다.

[0526]

본원에서 개시된 줄기-세포-유래 SC 전구체 또는 이를 포함하는 조성물, 성숙된 SC 또는 이를 포함하는 조성물은 임의의 생리적으로 허용 가능한 비히클에서 투여될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체 및 본원에서 개시된 줄기-세포-유래 SC 전구체 또는 성숙된 SC를 포함하는 약학 조성물이 또한 제공된다. 본원에서 개시된 줄기-세포-유래 SC 전구체 또는 이를 포함하는 조성물, 성숙된 SC 또는 이를 포함하는 조성물, 또는 약학적으로 허용 가능한 담체는 국소화된 주사, 직교이방성(OT) 주사, 전신 주사, 정맥내 주사, 또는 비경구 투여를 통해 투여될 수 있다. 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 줄기-세포-유래 SC 전구체 또는 이를 포함하는 조성물, 성숙된 SC 또는 이를 포함하는 조성물은 국소화된 주사를 통해 대상체에 투여된다.

[0527]

본원에서 개시된 줄기-세포-유래 SC 전구체 또는 이를 포함하는 조성물, 성숙된 SC 또는 이를 포함하는 조성물은 멸균 액체 조제물, 예로, 등장성 수용액, 혼탁액, 애멀젼, 분산액, 또는 점성 조성물로서 편리하게 제공될 수 있고, 이는 선택된 pH로 완충될 수 있다. 액체 조제물은 보통 겔, 다른 점성 조성물, 및 고체 조성물에 비해 제조하기 더 쉽다. 추가적으로, 액체 조성물은 특히 주사에 의해, 투여하기가 다소 더 편리하다. 반면에, 점성 조성물은 특정 조직과의 더 긴 접촉 기간을 제공하도록 적절한 점도 범위 내에서 제형화될 수 있다. 액체 또는 점성 조성물은 담체를 포함할 수 있고, 이는 예를 들어, 물, 식염수, 인산염 완충 식염수, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 배지일 수 있다. 멸균 주사제 용액은, 본원에서 개시된 요지 사안의 조성물, 예로 본원에서 개시된 줄기-세포-유래 SC 전구체 또는 성숙된 SC를 포함하는 조성물을 요망되는 바에 따라 다양한 양의 다른 성분과 함께 요구되는 양의 적절한 용매 중에 포함시켜 제조될 수 있다. 이러한 조성물은 적합한 담체, 희석제, 또는 부형제, 예컨대 멸균수, 생리 식염수, 글루코스, 텍스트로스 등과의 혼합물로 있을 수 있다. 조성물은 또한 동결건조될 수 있다. 조성물은 요망되는 투여 및 제조 경로에 따라, 보조 성분, 예컨대 수화제, 분산제, 또는 유화제(예로, 메틸셀룰로스), pH 완충제, 겔화 또는 점도 증강 첨가제, 보존제, 풍미제, 착색제 등을 함유할 수 있다. 과도한 실험 없이, 적합한 조제물을 제조하기 위해 본원에 참조로 포함되는 표준 교과서, 예컨대 문헌["REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17th edition, 1985]를 참조할 수 있다.

[0528]

항균 보존제, 항산화제, 퀼레이트화제 및 완충제를 포함하는 조성물의 안정성 및 멸균성을 증강시키는 다양한 첨가제가 첨가될 수 있다. 미생물의 작용 방지는 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등에 의해 보장될 수 있다. 주사제 약학 형태의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 사용에 의해 일으킬 수 있다. 그러나 본원에서 개시된 요지 사안에 따르면, 사용되는 임의의 비히클, 희석제, 또는 첨가제는 본원에서 개시된 줄기-세포-유래 SC 전구체 또는 이를 포함하는 조성물, 및/또는 성숙된 SC 또는 이를 포함하는 조성물과 상용성이어야 할 것이다.

[0529]

당업자는 조성물의 성분이 화학적으로 불활성이도록 선택되어야 하며 본원에서 개시된 줄기-세포-유래 SC 전구체 또는 성숙된 SC의 생활성 또는 유효성에 영향을 미치지 않을 것임을 인식할 것이다. 이는 화학 및 약학 이론의 당업자에게 문제를 제공하지 않을 것이거나, 표준 교과서를 참조하여 또는 본 개시 및 본원에서 인용되는 문헌으로부터 단순한 실험에 의해(과도한 실험이 관여되지 않고) 문제가 쉽게 회피될 수 있다.

[0530]

소정의 비제한적 구현예에서, 본원에서 기재된 SC 전구체 및 SC는 생체적합성 스캐폴드 또는 매트릭스, 예를 들어, 세포가 대상체에착상되거나 그래프팅되는 경우, 조직 재생을 촉진하는 생체적합성 3차원 스캐폴드를 추가로 포함하는 조성물에 포함된다. 소정의 비제한적 구현예에서, 생체적합성 스캐폴드는 세포와 기질 물질, 합성 중합체, 사이토카인, 콜라겐, 폴리펩타이드 또는 단백질, 파이브로넥틴, 라미닌, 캐라틴, 피브린, 피브리노겐, 히알루론산, 헤파린, 콜라겐, 폴리펩타이드, 콘드로이틴, 아가로스를 포함하는 다당류 또는 젤라틴, 및/또는 하이드로겔을 포함한다(예로, 각각의 내용의 전문이 참조로 포함되는, 미국 공개 제2015/0159135호, 제2011/0296542호, 제2009/0123433호, 및 제2008/0268019호를 참고한다).

[0531]

"유효량"(또는 "치료 유효량")은 치료 시 유익하거나 요망되는 임상 결과에 영향을 미치기에 충분한 양이다. 유

효량은 하나 이상의 용량으로 대상체에 투여될 수 있다. 치료의 관점에서, 유효량은 슈반 세포 관련 장애(예로, DPN)의 진행을 일시적으로 억제하거나, 완화하거나, 안정화하거나, 역전시키거나, 느리게 하기에, 또는 달리 슈반 세포 관련 장애(예로, DPN)의 병리적 결과를 감소시키기에 충분한 양이다. 유효량은 일반적으로 케이스별 기준에 따라 의사에 의해 결정되며 당업자의 기술 수준 내이다. 유효량을 달성하기 위해 적절한 투여량을 결정하는 경우 몇몇 요인이 전형적으로 고려된다. 이들 요인에는 대상체의 연령, 성별 및 체중, 치료받는 상태, 상태의 중증도 및 투여되는 세포의 형태 및 유효 농도가 포함된다.

[0532] 소정 구현예에서, 본원에서 개시된 줄기-세포-유래 SC 전구체, 성숙된 SC의 유효량은 PNS 및/또는 CNS를 재생하기에 충분한 양, 미엘린 손상을 방지하기에 충분한 양, 미엘린 손상을 보수/치료하기에 충분한 양, 슈반 세포 관련 장애를 방지하기에 충분한 양, 및/또는 슈반 세포 관련 장애를 치료하기에(예로, 증상의 진행을 늦추고, 경감시키고, 및/또는 감소시키기에) 충분한 양이다. 투여될 본원에서 개시된 줄기-세포-유래 SC 전구체 또는 성숙된 SC의 양은 치료받는 대상체에 따라 변할 것이다. 소정 구현예에서, 약  $1 \times 10^4$  내지 약  $1 \times 10^{10}$ , 약  $1 \times 10^4$  내지 약  $1 \times 10^5$ , 약  $1 \times 10^5$  내지 약  $1 \times 10^9$ , 약  $1 \times 10^5$  내지 약  $1 \times 10^6$ , 약  $1 \times 10^5$  내지 약  $1 \times 10^7$ , 약  $1 \times 10^6$  내지 약  $1 \times 10^7$ , 약  $1 \times 10^6$  내지 약  $1 \times 10^8$ , 약  $1 \times 10^7$  내지 약  $1 \times 10^8$ , 약  $1 \times 10^8$  내지 약  $1 \times 10^9$ , 약  $1 \times 10^8$  내지 약  $1 \times 10^{10}$ , 또는 약  $1 \times 10^9$  내지 약  $1 \times 10^{10}$ 개의 본원에서 개시된 줄기-세포-유래 SC 전구체 또는 성숙된 SC가 대상체에 투여된다. 소정 구현예에서, 약  $1 \times 10^5$  내지 약  $1 \times 10^7$ 개의 본원에서 개시된 줄기-세포-유래 SC 전구체 또는 성숙된 SC가 대상체에, 예로, 말초 신경병증을 앓는 대상체에, 예로, DPN을 앓는 대상체에 투여된다. 무엇이 유효 용량으로 간주될 것인지에 대한 정확한 결정은 특정 대상체의 체격, 연령, 성별, 체중 및 상태를 포함하여, 각 대상체에 개별적인 요인에 기반할 수 있다. 투여량은 본 개시 및 당분야의 지식으로부터 당업자에 의해 쉽게 확인될 수 있다.

[0533] 소정 구현예에서, PNS 및/또는 CNS의 재생을 위해, 미엘린 손상의 방지 및/또는 치료/보수를 위해, 및/또는 슈반 세포 관련 장애(예로, 말초 신경병증)의 방지 및/또는 치료를 위해 대상체에 투여되는 세포는 본원에서 개시된 줄기-세포-유래 슈반 세포 전구체로부터 분화되는/성숙되는 성숙된 슈반 세포 집단이다.

#### 5. 키트

[0535] 본원에서 개시된 요지 사안은 신경 능선 계통 세포의 SC 전구체로의 분화를 유도하기 위한 키트를 제공한다. 소정 구현예에서, 키트는 본원에서 기재된 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제를 포함한다. 소정 구현예에서, 키트는 신경 능선 계통 세포(예로, 하나 이상의 신경 능선 계통 마커를 발현하는 세포)의 SC 전구체(예로, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포)로의 분화를 유도하기 위한 지침을 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 신경 능선 계통 세포를 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 적어도 약 10일, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 적어도 약 15일, 적어도 약 16일, 적어도 약 17일, 적어도 약 18일, 적어도 약 19일, 또는 적어도 약 20일 동안 접촉시켜, SC 전구체를 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 신경 능선 계통 세포를 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 10일 동안 접촉시켜 SC 전구체를 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 신경 능선 계통 세포를 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 최대 약 15일, 최대 약 16일, 최대 약 17일, 최대 약 18일, 최대 약 19일, 최대 약 20일, 최대 약 21일, 최대 약 22일, 최대 약 23일, 최대 약 24일, 최대 약 25일, 최대 약 26일, 최대 약 27일, 최대 약 28일, 최대 약 29일, 또는 최대 약 30일 동안 접촉시켜 SC 전구체를 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 신경 능선 계통 세포를 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 3일 내지 약 5일, 약 5일 내지 약 10일, 약 10일 내지 약 15일, 약 15일 내지 약 20일, 약 20일 내지 약 25일, 또는 약 25일 내지 약 30일 동안 접촉시켜 SC 전구체를 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 신경 능선 계통 세포를 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 10일 내지 약 15일 동안 접촉시켜 SC 전구체를 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 신경 능선 계통 세포를 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 8일, 약 9일, 약 10일, 약 11일, 약 12일, 약 13일, 약 14일, 약 15일, 약 16일, 약 17일, 약 18일, 약 19일, 약 20일, 약 21일, 약 22일, 약 23일, 약 24일, 약 25일, 약 26일, 약 27일, 약 28일, 약 29일, 또는 약 30일 동안 접촉시켜 SC 전구체를 생성하는 단계를 포함한다.

28일, 약 29일, 또는 약 30일 동안 접촉시켜 SC 전구체를 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 신경 능선 계통 세포를 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 14일 동안 접촉시켜 SC 전구체를 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 신경 능선 계통 세포를 하나 이상의 Wnt 활성화제, 하나 이상의 FGF 활성화제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 15일 동안 접촉시켜 SC 전구체를 생성하는 단계를 포함한다.

[0536] 본원에서 개시된 요지 사안은 또한 줄기 세포의 분화를 유도하기 위한 키트를 제공한다. 소정 구현예에서, 키트는 하나 이상의 전환 성장 인자 베타(TGF $\beta$ )/Activin-Nodal 신호전달의 억제제, 하나 이상의 wingless(Wnt) 신호전달의 활성화제, 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제, 및 선택적으로 슈반 세포 분화를 유도하는 하나 이상의 분자를 포함한다. 소정 구현예에서, 키트는 줄기 세포의 분화된 SC 전구체 집단, 예로, 하나 이상의 슈반 세포 전구체 마커를 발현하는 세포로의 분화를 유도하기 위한 지침을 추가로 포함한다.

[0537] 소정 구현예에서, 지침은 세포를 억제제(들), 활성화제(들) 및 유도제(들)와 특정 순서로 접촉시키는 단계를 포함한다. 억제제(들), 활성화제(들) 및 유도제(들)의 접촉 순서는 줄기 세포를 배양하기 위해 사용되는 세포 배양 배지에 의해 결정될 수 있다.

[0538] 소정 구현예에서, 지침은 세포를 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 세포를 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 15일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 세포를 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 14일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0539] 소정 구현예에서, 지침은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 4일 이하에(예로, 함께(같은 날), 예로, 약 1일 내지 약 4일, 예로, 약 1일, 약 2일, 약 3일, 또는 약 4일) 세포를 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 최초 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터/후 약 2일에 세포를 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 최초 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0540] 소정 구현예에서, 키트는 하나 이상의 SMAD(Small Mothers Against Decapentaplegic) 신호전달의 억제제를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 줄기 세포를 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제 및 하나 이상의 SMAD 신호전달의 억제제와 함께 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0541] 소정 구현예에서, 지침은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 20일 이하에 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 세포를 최초 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 적어도 약 5일에 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 세포를 최초 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 5일 및 약 20일(예로, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 8일, 약 9일, 약 10일, 약 11일, 약 12일, 약 13일, 약 14일, 약 15일, 약 16일, 약 17일, 약 18일, 약 19일, 또는 약 20일)에 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 세포를 최초 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0542] 소정 구현예에서, 지침은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 10일에 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 세포를 최초 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 줄기 세포와 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 11일에 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 세포를 최초 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0543] 소정 구현예에서, 지침은 줄기 세포를 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 적어도 약 10일, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 적어도 약 15일, 적어도 약 16일, 적어도 약 17일, 적어도 약 18일, 적어도 약 19일, 적어도 약 20일, 적어도 약 21일, 적어도 약 22일, 적어도 약 23일, 적어도 약 24일, 적어도 약 25일, 적어도 약 26일, 적어도 약 27일, 적어도 약 28일, 적어도 약 29일, 또는 적어도 약 30일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 줄기 세포를 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 최대 약 3일, 최대 약 4일, 최대 약 5일, 최대 약 6일, 최대 약 7일, 최대

약 8일, 최대 약 9일, 최대 약 10일, 최대 약 11일, 최대 약 12일, 최대 약 13일, 최대 약 14일, 최대 약 15일, 최대 약 16일, 최대 약 17일, 최대 약 18일, 최대 약 19일, 최대 약 20일, 최대 약 21일, 최대 약 22일, 최대 약 23일, 최대 약 24일, 최대 약 25일, 최대 약 26일, 최대 약 27일, 최대 약 28일, 최대 약 29일, 또는 최대 약 30일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 줄기 세포를 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 약 4일 내지 약 30일, 약 4일 내지 약 27일, 약 4일 내지 약 26일, 약 4일 내지 약 25일, 약 4일 내지 약 24일, 약 4일 내지 약 20일, 약 4일 내지 약 15일, 약 4일 내지 약 10일, 약 5일 내지 약 15일, 약 5일 내지 약 10일, 약 10일 내지 약 15일, 약 15일 내지 약 20일, 약 10일 내지 약 20일, 약 20일 내지 약 25일, 또는 약 25일 내지 약 30일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 줄기 세포를 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 10일 내지 약 15일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 줄기 세포를 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 8일, 약 9일, 약 10일, 약 11일, 약 12일, 약 13일, 약 14일, 약 15일, 약 16일, 약 17일, 약 18일, 약 19일, 약 20일, 약 21일, 약 22일, 약 23일, 약 24일, 약 25일, 약 26일, 약 27일, 약 28일, 약 29일, 또는 약 30일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 줄기 세포를 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 약 11일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 줄기 세포를 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제와 약 10일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0544]

소정 구현예에서, 지침은 줄기 세포를 하나 이상의 SMAD 신호전달의 억제제와 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 적어도 약 10일, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 적어도 약 15일, 적어도 약 16일, 적어도 약 17일, 적어도 약 18일, 적어도 약 19일, 적어도 약 20일, 적어도 약 21일, 적어도 약 22일, 적어도 약 23일, 적어도 약 24일, 적어도 약 25일, 적어도 약 26일, 적어도 약 27일, 적어도 약 28일, 적어도 약 29일, 또는 적어도 약 30일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 줄기 세포를 하나 이상의 SMAD 신호전달의 억제제와 최대 약 3일, 최대 약 4일, 최대 약 5일, 최대 약 6일, 최대 약 7일, 최대 약 8일, 최대 약 9일, 최대 약 10일, 최대 약 11일, 최대 약 12일, 최대 약 13일, 최대 약 14일, 최대 약 15일, 최대 약 16일, 최대 약 17일, 최대 약 18일, 최대 약 19일, 최대 약 20일, 최대 약 21일, 최대 약 22일, 최대 약 23일, 최대 약 24일, 최대 약 25일, 최대 약 26일, 최대 약 27일, 최대 약 28일, 최대 약 29일, 또는 최대 약 30일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 줄기 세포를 하나 이상의 SMAD 신호전달의 억제제와 약 4일 내지 약 30일, 약 4일 내지 약 27일, 약 4일 내지 약 26일, 약 4일 내지 약 25일, 약 4일 내지 약 24일, 약 4일 내지 약 20일, 약 4일 내지 약 15일, 약 4일 내지 약 10일, 약 5일 내지 약 15일, 약 5일 내지 약 10일, 약 10일 내지 약 15일, 약 10일 내지 약 20일, 약 20일 내지 약 25일, 또는 약 25일 내지 약 30일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 줄기 세포를 하나 이상의 SMAD 신호전달의 억제제와 10일 내지 약 15일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 줄기 세포를 하나 이상의 SMAD 신호전달의 억제제와 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 8일, 약 9일, 약 10일, 약 11일, 약 12일, 약 13일, 약 14일, 약 15일, 약 16일, 약 17일, 약 18일, 약 19일, 약 20일, 약 21일, 약 22일, 약 23일, 약 24일, 약 25일, 약 26일, 약 27일, 약 28일, 약 29일, 또는 약 30일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 줄기 세포를 하나 이상의 SMAD 신호전달의 억제제와 약 11일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 줄기 세포를 하나 이상의 SMAD 신호전달의 억제제와 약 10일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0545]

소정 구현예에서, 지침은 세포를 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 적어도 약 14일, 적어도 약 15일, 적어도 약 16일, 적어도 약 17일, 적어도 약 18일, 적어도 약 19일, 적어도 약 20일, 적어도 약 21일, 적어도 약 22일, 적어도 약 23일, 적어도 약 24일, 적어도 약 25일, 적어도 약 26일, 적어도 약 27일, 적어도 약 28일, 또는 적어도 약 29일, 적어도 약 30일, 적어도 약 31일, 적어도 약 32일, 적어도 약 33일, 적어도 약 34일, 적어도 약 35일, 적어도 약 36일, 적어도 약 37일, 적어도 약 38일, 적어도 약 39일, 또는 적어도 약 40일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 세포를 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 최대 약 15일, 최대 약 16일, 최대 약 17일, 최대 약 18일, 최대 약 19일, 최대 약 20일, 최대 약 21일, 최대 약 22일, 최대 약 23일, 최대 약 24일, 최대 약 25일, 최대 약 26일, 최대 약 27일, 최대 약 28일, 최대 약 29일, 최대 약 30일, 최대 약 31일, 최대 약 32일, 최대 약 33일, 최대 약 34일, 최대 약 35일, 최대 약 36일, 최대 약 37일, 최대 약 38일, 최대 약 39일, 최대 약 40일, 최대 약 41일, 최대 약 42일, 최대 약 43일, 최대 약 44일, 최대 약 45일, 최대 약 46일, 최대 약 47일, 최대 약 48일, 최대 약 49일, 최대 약 50일, 최대 약 51일, 최대 약 52일, 최대 약 53일, 최대 약 54일, 최대 약 55일, 최대 약 56일, 최대 약 57일, 최대 약 58일, 최대 약 59일

또는 최대 약 60일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 세포를 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 약 14일 내지 약 20일, 약 20일 내지 약 25일, 약 25일 내지 약 30일, 약 30일 내지 약 35일, 약 35일 내지 약 40일, 약 40일 내지 약 45일, 약 45일 내지 약 50일, 약 50일 내지 약 55일, 또는 약 55일 내지 약 60일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 세포를 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 20일 내지 약 30일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 세포를 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 25일 내지 약 30일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 세포를 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 약 14일, 약 15일, 약 16일, 약 17일, 약 18일, 약 19일, 약 20일, 약 21일, 약 22일, 약 23일, 약 24일, 약 25일, 약 26일, 약 27일, 약 28일, 약 29일, 약 30일, 약 31일, 약 32일, 약 33일, 약 34일, 약 35일, 약 36일, 약 37일, 약 38일, 약 39일, 약 40일, 약 41일, 약 42일, 약 43일, 약 44일, 약 45일, 약 46일, 약 47일, 약 48일, 약 49일, 약 50일, 약 51일, 약 52일, 약 53일, 약 54일, 약 55일, 약 56일, 약 57일, 약 58일, 약 59일 또는 약 60일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 세포를 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 약 26일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 세포를 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 약 25일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 세포를 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 약 24일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 세포를 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 약 23일 동안 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0546]

소정 구현예에서, 지침은 세포를 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 적어도 약 10일, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 적어도 약 15일, 적어도 약 16일, 적어도 약 17일, 적어도 약 18일, 적어도 약 19일, 또는 적어도 약 20일 동안 접촉시켜 SC 전구체를 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 세포를 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 적어도 약 10일 동안 접촉시켜 SC 전구체를 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 세포를 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 최대 약 15일, 최대 약 16일, 최대 약 17일, 최대 약 18일, 최대 약 19일, 최대 약 20일, 최대 약 21일, 최대 약 22일, 최대 약 23일, 최대 약 24일, 최대 약 25일, 최대 약 26일, 최대 약 27일, 최대 약 28일, 최대 약 29일, 또는 최대 약 30일 동안 접촉시켜 SC 전구체를 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 세포를 슈반 세포 분화를 유도하는 하나 이상의 분자 및 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제와 약 3일 내지 약 10일, 약 5일 내지 약 10일, 약 10일 내지 약 15일, 약 15일 내지 약 20일, 약 20일 내지 약 25일, 또는 약 25일 내지 약 30일 동안 접촉시켜 SC 전구체를 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 10일 내지 약 15일 동안 접촉되어 SC 전구체를 생성한다. 소정 구현예에서, 지침은 세포를 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 8일, 약 9일, 약 10일, 약 11일, 약 12일, 약 13일, 약 14일, 약 15일, 약 16일, 약 17일, 약 18일, 약 19일, 약 20일, 약 21일, 약 22일, 약 23일, 약 24일, 약 25일, 약 26일, 약 27일, 약 28일, 약 29일, 또는 약 30일 동안 접촉시켜 SC 전구체를 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, 지침은 세포를 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 14일 동안 접촉시켜 SC 전구체를 생성하는 단계를 포함한다.

[0547]

소정 구현예에서, 지침은 세포를 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제 및 하나 이상의 SMAD 신호전달의 억제제와 약 11일 동안; 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 약 23일 동안; 및 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 14일 동안 접촉시켜 SC 전구체를 생성하는 단계를 포함한다.

[0548]

소정 구현예에서, 지침은 세포를 하나 이상의 TGF $\beta$ /Activin-Nodal 신호전달의 억제제 및 하나 이상의 SMAD 신호전달의 억제제와 약 11일 동안; 하나 이상의 Wnt 신호전달의 활성화제와 약 25일 동안; 및 하나 이상의 FGF 신호전달의 활성화제 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 유도제와 약 14일 동안 접촉시켜 SC 전구체를 생성하는 단계를 포함한다.

[0549]

소정 구현예에서, 키트는 SC 분화를 증가시키는 하나 이상의 분화("SC 분화 증강제") 및 SC 전구체의 SC로의 성숙을 유도하기 위한 지침을 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, SC 전구체의 SC로의 성숙을 유도하기 위한 지침은 SC 전구체를 하나 이상의 FGF 활성화제, 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC

분화 증강제와 접촉시켜 SC를 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, SC 전구체의 SC로의 성숙을 유도하기 위한 지침은 SC 전구체를 하나 이상의 FGF 활성화제, 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 증강제와 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 적어도 약 10일, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 또는 적어도 약 15일 동안 접촉시켜 SC를 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, SC 전구체의 SC로의 성숙을 유도하기 위한 지침은 SC 전구체를 하나 이상의 FGF 활성화제, 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 3일 내지 약 40일, 약 3일 내지 약 35일, 약 3일 내지 약 30일, 약 3일 내지 약 25일, 약 3일 내지 약 20일, 약 3일 내지 약 15일, 약 10일 내지 약 40일, 약 10일 내지 약 20일, 약 20일 내지 약 40일, 약 20일 내지 약 30일, 또는 약 30일 내지 약 40일 동안 접촉시켜 SC를 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, SC 전구체의 SC로의 성숙을 유도하기 위한 지침은 SC 전구체를 하나 이상의 FGF 활성화제, 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 30일 내지 약 40일 동안 접촉시켜 SC를 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, SC 전구체의 SC로의 성숙을 유도하기 위한 지침은 SC 전구체를 하나 이상의 FGF 활성화제, 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 증강제와 10일 동안 접촉시켜 SC를 생성하는 단계를 포함한다. 소정 구현예에서, SC 전구체의 SC로의 성숙을 유도하기 위한 지침은 SC 전구체를 하나 이상의 FGF 활성화제, 하나 이상의 슈반 세포 분화 유도제, 및 선택적으로 하나 이상의 SC 분화 증강제와 약 35일 동안 접촉시켜 SC를 생성하는 단계를 포함한다.

[0550] 또한, 본원에서 개시된 요지 사안은 PNS 및/또는 CNS의 재생, 미엘린 손상의 방지 및/또는 보수를 위한, 및/또는 슈반 세포 관련 장애(예로, 말초 신경병증, 예로, DPN)의 치료 및/또는 방지를 위한 키트를 제공한다. 소정 구현예에서, 키트는 단위 투여량 형태로 본원에서 개시된 줄기-세포-유래 SC 전구체 집단 또는 이를 포함하는 조성물, 또는 성숙된 SC 또는 이를 포함하는 조성물의 유효량을 포함한다. 소정 구현예에서, 키트는 치료 조성물을 함유하는 멸균 용기를 포함한다; 이러한 용기는 상자, 앰플, 병, 바이알, 튜브, 백, 파우치, 블리스터-팩, 또는 당분야에 알려진 다른 적합한 용기일 수 있다. 이러한 용기는 플라스틱, 유리, 라미네이트지, 금속 호일, 또는 약제를 보유하기에 적합한 다른 물질로 제조될 수 있다.

[0551] 소정 구현예에서, 키트는 본원에서 개시된 줄기-세포-유래 SC 전구체 집단 또는 이를 포함하는 조성물, 또는 성숙된 SC 또는 이를 포함하는 조성물을 대상체, 예로, 슈반 세포 관련 장애(예로, 말초 신경병증, 예로, DPN)을 앓는 대상체에 투여하기 위한 지침을 포함한다. 지침은 PNS 및/또는 CNS의 재생, 미엘린 손상의 방지 및/또는 보수를 위한, 및/또는 슈반 세포 관련 장애(예로, 말초 신경병증, 예로, DPN)의 치료 및/또는 방지를 위한 세포 또는 조성물의 용도에 관한 정보를 포함할 수 있다. 소정 구현예에서, 지침은 하기 중 적어도 하나를 포함한다: 치료제의 설명; PNS 및/또는 CNS의 재생, 미엘린 손상의 방지 및/또는 보수를 위한, 및/또는 슈반 세포 관련 장애(예로, 말초 신경병증, 예로, DPN) 또는 이의 증상의 치료 및/또는 방지를 위한 투여량 일정 및 투여; 주의사항; 경고; 적응증; 역-적응증; 과용량 정보; 유해 반응; 동물 약리; 임상 연구; 및/또는 참고문헌. 지침은 (존재하는 경우) 용기 상에 직접적으로, 또는 용기에 적용되는 라벨로서, 또는 용기 내에 또는 용기와 함께 공급되는 별도 시트, 팜플렛, 카드, 또는 폴더로서 인쇄될 수 있다.

#### 실시예

[0553] 본원에서 개시된 요지 사안은 본원에서 개시된 요지 사안의 제한으로서가 아니라 예시로서 제공되는, 하기 실시예를 참조하여 더 잘 이해될 것이다.

#### 실시예 1

#### 요약

[0556] 본 발명자들은 인간 줄기 세포(예로, hPSC)로부터 유도되는 슈반 세포 전구체 및 슈반 세포의 고도로 효율적인 생성 및 전향적 단리 방법을 개발하였다. 줄기-세포-유래 SC는 hESC-유래 감각 뉴런을 시험관내에서 미엘린화하고 hESC-유래 운동 뉴런의 성숙을 가속화할 수 있었다. 줄기-세포-유래 SC는 또한 생체내 PNS 부상의 래트 모델에서 효율적인 그래프트화가 가능하였다. 래트의 부상 당한 좌골 신경에서 이식된 줄기-세포-유래 SC는 재생하는 숙주 축삭의 미엘린화에 기여하고 새로 미엘린화된 섬유의 적절한 이온 채널 국소화를 촉진하였다.

[0557] 방법 및 물질

[0558] 미분화 인간 배아 줄기 세포(hESC)의 배양

[0559] 2개의 독립적인 hiPSC 세포주(건강한 선천성 자율신경기능이상, 센다이-기반, OMSK(Cytotune))뿐만 아니라 hESC 세포주 H9(WA-09) 및 유도체(SOX10::GFP; SYN::ChR2-YFP; SYN::YFP; PHOX2B::GFP; EF1::RFP EDNRB/-/-)를 KSR(Life Technologies, 10828-028) 함유 hESC 배지(Chambers et. al., 2009)에서 마우스 배아 섬유아세포 (MEF, Global Stem, Rockville, MD) 상에서 유지하였다. 세포로 매월 간격으로 미코플라즈마 평가를 거쳤고, STR 프로필 분석하여 연구 개시 시의 세포 정체성을 확인하였다.

[0560] hESC로부터 신경 능선 유도 및 슈반 세포의 유도 및 증식

[0561] hESC를 10 nM FGF2(R&D Systems, 233-FB-001MG/CF) 함유 hESC 배지에서 매트리겔(BD Biosciences, 354234) 코팅된 디쉬( $10^5$  개 세포/cm<sup>2</sup>) 상에 배치하였다. 분화는 녹아웃 혈청 대체(KSR) 배지(KO DMEM + 15% KSR, L-글루타민(Life Technologies, 25030-081), LDN193189(100 nM, Stemgent, Cambridge, MA) 함유 NEAA(Life Technologies, 11140-050) 및 SB431542(10 μM, Tocris, Ellisville, MI)에서 개시하였다. KSR 배지를 전술된 바와 같이(Chambers et. al., 2009) 4일부터 10일까지 증가하는 양의 N2 배지로 점차적으로 대체하였다. 두개 NC(CNC) 유도를 위해, 세포를 2일부터 11일까지 LDN 및 SB에 부가하여 3 μM CHIR99021(Tocris Bioscience, 4423)로 처리하였다. 전술된 바와 같이(Chambers et al., 2009) 0일부터 11일까지 LDN 및 SB로의 처리에 의해 CNS 전구체 대조군 세포를 생성하였다. 실시예에 걸쳐, 0일에는 배지가 hESC 배지로부터 LDN 및 SB 함유 배지로 전환되었다. 텍스트 및 도면에서의 분화일은 다능성 단계(0일) 이후의 일수를 나타낸다.

[0562] 11일차에, NC 세포를 초저부착 6-웰 배양 플레이트(Fisher Scientific, 3471)에서 3D 구형체(5백만 개 세포/웰)로 응집되었고 L-글루타민(Gibco, 25030-164), N2(Stem Cell Technologies, 07156) 및 CHIR(3 μM, Tocris Bioscience, 4423) 및 FGF2(10nM, R&D Systems, 233-FB-001MG/CF)를 함유하는 B27(Life Technologies, 17504044) 및 NRG1(10 ng/ml, R&D 378-SM-025)이 보충된 신경기본(NB) 배지에서 배양하였다. 혼탁 배양 14일 후, 구형체를 NRG1(20 ng/ml, R&D 378-SM-025), FGF2(10 nM, R&D Systems, 233-FB-001MG/CF) 및 cAMP(100 mM, Sigma, D0260)(Lee G et. al., 2007)를 함유하는 L-글루타민(Gibco, 25030-164), N2(Stem Cell Technologies, 07156) 및 B27(Life Technologies, 17504044)이 보충된 신경기본(NB) 배지에서 폴리 오르니틴/라미닌/파이브로넥틴(PO/LM/FN) 코팅된 디쉬(전술된 바와 같이 제조됨) 상에 접종하였다. SC 전구체는 접종된 구형체 밖으로 이동하여 10일 내에 SC로 분화되었다. 장기 증식을 위해, 세포를 PO/LM/FN 코팅된 디쉬 상에서 슈반 세포 배지 (ScienCell, 1701)에서 배양하였다. 세포를 분화 25일, 35일 50일, 60일, 및 100일차에 면역염색을 위해 고정하거나 유전자 발현 분석을 위해 수확하였다.

[0563] FACS 및 면역형광(IF) 분석

[0564] IF를 위해, 세포를 20분 동안 4% 파라포름알데하이드(PFA, Affymetrix-USB, 19943)로 고정한 후, 1% 소 혈청 알부민(BSA, Thermo Scientific, 23209) 및 0.3% triton X-100(Sigma, T8787)을 사용하여 차단하고 투과화하였다. 이어서 세포를 4°C(섭씨)에서 하룻밤 동안 일차 항체 용액 중에 인큐베이션하고 1시간 동안 RT에서 형광단 콘주게이션된 이차 항체로 염색한 후, 염색된 세포를 DAPI(1 ng/ml, Sigma, D9542-5MG)와 인큐베이션하고, 수회 세척한 후 조영하였다. 유세포 측정 분석을 위해, 세포를 아큐타제(Accutase, Innovative Cell Technologies, AT104)로 해리하고 고정하고 BD Cytofix/Cytoperm(BD Bioscience, 554722) 용액을 사용하여 차단하고 투과화한 후, 제조업체의 지침에 따라 BD Perm/Wash 완충액(BD Bioscience, 554723)을 사용하여 세척하고, 차단하고, 투과화하였다. 이어서 세포를 일차(4에서 하룻밤 동안) 및 이차(실온에서 30분) 항체로 염색하고 유세포 측정장치(FlowJo 소프트웨어)를 사용하여 분석하였다. 일차 항체 및 희석도 목록을 표 5에 제공한다.

[0565] 표면 마커 스크리닝

[0566] 분화 80일차에 hESC-SC 상에서 BD Lyoplate 라이브리리<sup>®</sup>(BD, 560747)를 사용하여 특이적 표면 항원에 대한 스크리닝을 수행하였다. 세포를 96웰 플레이트(10,000개 세포/웰)에 접종하고 제조업체의 지침에 따라 일차 및 이차 항체로 염색하였다. 염색된 세포를 전체 플레이트 조영 및 정량을 위해 고정하였다. 전체 GFAP 중 이중 양성 세포의 백분율을 각각의 항체에 대해 정량하였다. 상위 히트(60% 초과 이중 양성)를 유세포 측정을 사용하여 추가 검정하였다.

[0567] 유전자 발현 분석

[0568] RNA 서열분석을 위해, 전체 RNA를 RNeasy RNA 정제 키트(Qiagen, 74106)를 사용하여 추출하였다. qRT-PCR 검정을 위해, 전체 RNA 샘플을 Superscript II 역전사효소(Life Technologies, 18064-014)를 사용하여 cDNA로 역전사시켰다. Quant iTect SYBR Green PCR 믹스(Qiagen, 204148)를 사용하여 qRT-PCR 반응을 설정하였다. 각각의 데이터 포인트는 3회의 독립적인 생물학적 반복을 나타낸다. RNA-seq 판독을 TopHat v2.0을 사용하여 인간 참조 게놈(hg19)으로 맵핑하였다. 커버율 검색을 제외하고 디폴트 파라미터로 TopHat을 구동시켰다. 이어서 HTSeq를 사용하여 정렬을 정량하고 두개 신경 능선 샘플에 대해 정상화된 DESeq를 사용하여 차별적인 유전자 발현을 계산하였다.

[0569] 생활성 검정

[0570] SC의 생활성을 모니터링하기 위해, CytoTox 96 세포독성 검정 키트(Promega, G1780)를 사용하여 LDH 활성에 대해 세포를 검정하였다. 간략하게, 세포를 30,000개 세포/cm<sup>2</sup>로 96웰 플레이트에 접종한다. 상청액 및 세포 용해액을 24시간 후 수확하고 플레이트 판독장치(490 nm 흡광도)를 사용하여 LDH 활성에 대해 검정하였다. 전체 LDH 신호(용해액 + 상청액으로부터)로 용해액의 LDH 신호를 나눠서 생활성을 계산하였다. 세포는 검정 동안 PO/LM/FN 코팅된 디쉬 상에서 슈반 세포 배지(Scicell, 1701)에서 배양하였다.

[0571] 칼슘 조영

[0572] MN-SC 공동-배양으로 전술된 바와 같이(Barreto-Chang and Dolmetsch, 2009) 공동 배양-후 40일 및 70일차에 칼슘 조영을 거쳤다. 간략하게, 세포를 조영 전에 37°C에서 30분 동안 5 μM Fluo-4(Life Technologies)와 인큐베이션하였다. 커버슬립을 FCS2 조영 챔버(Bioptechs)에 실장하고, 세포를 0.1% BSA w/v을 첨가하여 전술된 바와 같이 일반 Tyrode 식염수 용액으로 관류시켰다. 활성화를 위해, 세포를 글루타메이트(50 또는 100 μM)를 함유하는 Tyrode 용액으로 관류시켰다. 이미지를 40 × 1.3 수치 개구의 오일 침지 대물렌즈(Zeiss)로 Axiovert 200M 도립 현미경을 사용하여 340 nm 및 380 nm 파장에서 5초마다 획득하였다. Metamorph 소프트웨어(Molecular Devices)를 사용하여 방사선 연대측정 분석을 수행하였다.

[0573] 래트 좌골 신경 및 조직학적 평가에서 hESC-SC의 이식

[0574] 모든 절차는 NIH 가이드라인을 따라 수행하였고, 현지 기관 동물 관리 및 사용 위원회(IACUC)의 승인을 받았다. 래트를 이소플루란 기체 마취 하에 두고 양쪽 좌골 신경을 모두 좌골 절흔 아래까지 노출시키고 같은 위치에서 2번 30초 동안 Dumont #5 족집게를 사용하여 압제시켰다. 그 직후,  $3 \times 10^4$ 개 hES 세포/μl 슈반 세포의 세포 혼탁액을 유리 마이크로피펫으로 압제 부위 근위 및 원위에서 약 3~4 μl을 주사하여 이식하였다. 생존 시간은 2 내지 8주 범위였다. 면역조직화학 래트를 4% 파라포름알데하이드 0.1 M PBS의 심장내 관류를 통해 고정하였다. 좌골 신경을 압제 병소 및 이식 후 2, 3, 4, 8주차에 래트로부터 절제하였다. 절제 후, 좌골 신경을 하룻밤 동안 0.1 M PBS 중 30% 수크로스에 배치하고 냉동보존을 위해 OCT 블록에 포매하거나 신경다발막을 제거하고 저온 0.1 M 인산염 완충액(pH 7.4) 중에 티징처리하여 좌골 신경을 제조하였다. 일부 신경을 관류 후 티징처리하고 면역염색하여 개별 축삭을 조사하였다. 압제 부위에서 원위의 재생된 축삭을 분석하였다.

[0575] 통계 분석

[0576] 데이터는 평균 ± SEM으로 나타내며 적어도 3회의 독립 실험으로부터 유도되었다. 반복(n) 상의 데이터는 도면 주석에 제공한다. 스튜던트 t-평가(2개 그룹을 비교함) 또는 ANOVA와 함께 Dunnett 평가(대조군 대비 여러 그룹을 비교함)를 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 미가공 데이터의 분포는 정상성을 평가하기 위해 충분한 수의 반복을 갖는 데이터에 대한 정상 분포와 근사하였다(Kolmogorov Smirnov 정상성 평가). log 순위(Mantel-Cox) 평가를 사용하여 생존 분석을 수행하였다. 일차 히트에 대한 Z-스코어는  $Z = (x - \mu) / \sigma$ 로 계산하였다. X는 이동 스코어 값이고, 모든 히트 화합물에 대해 3이다. μ는 평균 이동 스코어 값이며 σ는 모든 화합물 및 DMSO 대조 군에 대한 표준 편차이다.

[0577] 결과

[0578] hESC로부터 SC 계통의 유도 및 전향적 단리

[0579] DPN 인간 감각 뉴런 및 SC에서 감각 신경 손상의 세포 유형 특이적 메커니즘을 분석하기 위해 hPSC를 생성하였다. hESC로부터 감각 뉴런을 유도하는 방법은 문헌[Cai et al., 2016; Chambers et al., 2012]에 기재되어 있지만, SC의 유도는 여전히 규명될 필요가 있다. 따라서, DPN에 대한 hESC 모델을 확립하는 첫 번째 단계로서,

hESC를 SC로 분화시키기 위해 유효한 전략을 확립하였다.

[0580]

SC를 유도하는 데 있어서 본 발명자들의 과거 시도는 작은 비율의 신경아교 세포를 수득하기 위해 NC-농축된 전구체 세포의 연장된 2~3개월 배양에 의존하였다(Lee et al., 2007). 보다 최근의 연구는 hPSC로부터 SC-유사 세포의 유도에 대해 보고하였으나, 핵심 계통 마커, 예컨대 SOX10의 발현을 나타내지 않았고, 기능적 미엘린화를 실증하지 못했다(Liu et al., 2012; Ziegler et al., 2011). 배아 발생 동안, SC는 단계식 공정에서 SOX10<sup>+</sup> NC 세포로부터 생성되는 것으로 여겨졌다. 마우스 및 닭 배아에서의 연구에 기반하여, NC는 처음에 발생 중인 신경에서 뉴런 번들과 연합되는 SC 전구체를 생성한다. 연합된 뉴런은 NRG1을 발현하며 이의 ERBB3 수용체를 활성화함으로써 SC 전구체의 생존 및 추가 분화를 촉진한다(Newbern and Birchmeier, 2010). 마우스 발생 E13.5 경에, SC 전구체는 SOX10의 발현을 유지하면서 계통 마커, 예컨대 GFAP, S100 및 POU3F1을 상향조절하는 미성숙 SC를 생성한다. SC의 미엘린화 및 비-미엘린화 운명으로의 말단 분화는 출생 후까지 계속된다(Jessen et al., 2015).

[0581]

초기 hESC-기반 NC 분화 프로토콜은 p75<sup>+</sup> 및/또는 HNK1<sup>+</sup> NC 전구체의 전향적 단리와 조합된 신경상피 계통으로부터 추정 NC 세포의 배엽분리에 의존하였다(Bajpai et al., 2010; Lee et al., 2007). 이들 프로토콜은 다양한 NC-유래 계통을 산출하지만, SOX10 발현 수준은 일반적으로 낮다. 대조적으로, WNT 신호전달의 활성화제에 대한 적시 노출에 기반하는 더 유도된 NC 유도 프로토콜은 분화 11일경 대부분의 세포에서 SOX10의 강력한 유도를 나타낸다(Fattah et al., 2016; Menendez et al., 2011; Mica et al., 2013). 추가 배양 시, 이들 hESC-유래 NC 세포는 SOX10<sup>+</sup> 멜라닌세포로 유도될 수 있지만(Mica et al., 2013) 또한 SOX10<sup>-</sup> 중간엽 및 뉴런 전구체를 생성할 수 있다(Mica et al., 2013). SOX10 발현은 발생을 통해 SC 계통에서 유지되는 핵심 마커이므로, 본 발명자들은 먼저 SOX10<sup>+</sup> 전구체를 아교 세포 운명으로 지시하기 전에 이들을 배양 중 유지하기 위한 조건을 확립하는데 초점을 맞췄다. 본 발명자들은 EGF, FGF, WNT, Notch, TGFβ, BMP, NRG 및 엔도텔린(Endothelin) 3 신호전달의 조절제의 존재 하에 2D 또는 3D NC 배양에서 SOX10<sup>+</sup> 세포의 백분율을 결정하였다. FGF2 및 NRG1 처리에 부가하여 CHIR99021에 의한 Wnt 신호전달의 활성화 및 3D 응집 단계의 조합은 SOX10 발현의 유지(도 4a) 및 25일 경 S100 및 다른 초기 SC 마커의 유도를 일으켰다(도 1a~1c). 상기 단계에서, 추가 10일 동안 FGF2, NRG1 및 cAMP로의 25일차 배양 전구체의 처리는 몇몇 SC 마커, 예컨대 GFAP, POU3F1, PMP22, MBP, AQP4, MPZ의 강력한 유도 및 특히 GDNF, ERBB3, 및 GAP43을 포함하는 뉴런 상호작용 및 지지에 관여되는 유전자의 상향조절을 촉진하였다(도 1a~1d). 더 장기 배양은 GFAP<sup>+</sup> 세포의 농축을 일으켜서, S100, MBP 및 GFAP의 발현에 기반하여(도 1e, 1f 및 1i) 60~90일경 거의 균일한 SC 집단을 산출하였다(도 4b). 이들 hESC-유래 집단은 높은 백분율의 S100, MBP 및 GFAP 발현 SC를 유지하면서 추가 수 주 동안 증식할 수 있다(도 1e, 1f, 및 1i).

[0582]

분화 동안 hESC-SC의 전향적 단리를 가능하게 하기 위해, 본 발명자들은 GFAP<sup>+</sup> SC를 특이적으로 표시하는 표면 항원에 대한 242개 항체의 라이브러리를 스크리닝하였다(도 5a). CD44, CD49e, CD81 및 CD98은 GFAP<sup>+</sup> 세포 집단을 표지하는 것으로 결정되었다(도 5b). 추가 검정에서는 CD98이 60일 SC에서 특이적으로 발현되는 유일한 마커지만, 이전에 초기 SOX10<sup>+</sup> NC 계통을 표지하는 것으로 나타난(Fattah et al., 2016) 마커인 CD49D를 발현하는 11일 NC 또는 25일 SCP 세포에서는 그렇지 않음을 드러내었다(도 5c). 정제된 세포의 RNA 서열분석은 25일 hESC-유래 SCP가 초기 NC 세포와 밀접하게 관련되지만, 50일 그리고 특히 100일 SC는 일차 성체 인간 SC와 밀접하게 매칭되는 유전자 발현 패턴을 나타냄을 실증하였다(도 1g). 유전자 발현 데이터는 또한 25일 및 100일 세포를 11일 NC와 비교함으로써 신규한 후보 SCP 및 SC 마커를 산출하였다(도 1h). 각각의 계통에 있어서 상위 200개의 농축된 전사체 목록을 표 1~4에 제공한다.

[0583]

hESC-SC가 시험관내에서 뉴런 성숙 및 미엘린화를 촉진하며 생체내 부상 당한 래트 좌골 신경 내로 그레프팅됨

[0584]

아교 세포의 핵심 기능은 뉴런과 상호작용하여 이의 기능을 조절하고 미엘린을 생성하는 것이다. 본 발명자들은 생성된 hESC-유래 감각(Chambers et al., 2012) 및 이전에 보고된 방법(Calder et al., 2015)을 사용하여 운동 뉴런과의 공동-배양을 확립함으로써 hESC-SC에서 상기 능력을 평가하였다(도 2a). 60일 RFP-표지된 hESC-SC를 50일 GFP-표지된 hESC 감각 뉴런과 혼합하고, 공동-배양의 개시 72시간 후 모니터링하였다. SC는 뉴런 섬유와 긴밀하게 연합되고 정렬하여, 이들이 축삭 막 상에서 발현되는 신호전달 단서에 적절히 반응하기 위해 요구되는 수용체를 가짐을 시사한다(도 2b).

[0585]

hESC-유래 계통에서의 긴 기능적 성숙 공정은 현재 분화 시스템에서의 주요 장애이다. 아교 세포는 hESC-유래

CNS 계통의 공동-배양에서 뉴런의 기능적 성숙을 촉진하는 것으로 나타난다(Tang et al., 2013). hESC-SC가 상기 문제를 극복하는 데 기여할 수 있는지 여부를 평가하기 위해, 운동 뉴런의 기능적 성숙에 대한 이의 영향을 연구하였다. 본 발명자들은 60일 hESC-SC 및 25일 hESC-유래 운동 뉴런의 공동-배양 시스템을 설정하였다. 감각 뉴런과의 공동-배양과 유사하게, hESC-SC는 뉴런 섬유와 정렬하는 경향을 크게 나타내었다(도 2d). hESC-유래 계통에서 연장된 인간 세포 성숙 공정은 당분야에서의 중요 장애이다. 아교 세포, 예컨대 별아교세포는 hESC-유래 CNS 뉴런에서 기능적 성숙을 촉진하는 것으로 나타났다(Tang et al., 2013). 공동-배양된 운동 뉴런의 기능적 성숙을 모니터링하기 위해, 운동 뉴런 분화의 40일 및 70일차(공동-배양의 개시 후 15일 및 55일)에 칼슘 조영을 수행하였다. 공동-배양된 hESC-유래 운동 뉴런은 40일만큼 초기에 글루타메이트 및 KCl 자극에 반응하는 능력을 나타낸 반면, 운동 뉴런 단일 배양은 동일한 시점에 이러한 칼슘 반응을 나타내지 않았다(도 2e - 왼쪽 패널). 글루타메이트 및 KCl 자극에 대한 공동-배양된 운동 뉴런의 반응성은 70일차에 추가 증가되었으며, 운동 뉴런 단독 배양에 비해 현저히 더 높았다(도 2e - 오른쪽 패널).

[0586]

hESC-유래 SC가 미엘린을 형성할 수 있는지 여부를 평가하기 위해, 본 발명자들은 hESC-감각 뉴런과 hESC-SC의 장기 공동-배양을 확립하였으며, 특징적인, 미엘린화된 구조를 투과 전자 현미경(TEM)에 의해 관찰하였다(도 2c). 이들 발견은 hESC-SC가 미엘린을 생성하고 시험관내에서 뉴런 거동을 조정하는 능력을 검증한다. SC는 또한 부상에 대해 반응하여 신경 보수를 촉진하는 데 있어서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(Jessen and Mirsky, 2016; Jessen et al., 2015; Webber et al., 2011). 이는 대부분 손상된 축삭에서 보수 공정을 가이드하는 영양 인자를 분비하는 이의 능력에 기인한다(Arthur-Farraj et al., 2012; Bunge, 1994; Webber et al., 2011). SC의 이식은 몇몇 실험 시스템, 예컨대 척추 좌상 모델에서 신경 재생을 증강시키는 것으로 실증되었고(Lavdas et al., 2008; Rodrigues et al., 2012; Williams and Bunge, 2012; Kocsis and Bunge, 2014); 자가 SC는 현재 SCI 환자에서 평가되고 있다(NCT01739023; NCT02354625). 이러한 세포 치료법 접근에서의 주된 장애는 대규모로 표현형이 안정한 일차 SC를 수득하는 데에서의 한계에 있다. hESC는 이러한 재생 적용을 위한 인간 SC의 무제한적인 대안적 공급을 제공한다. hESC-SC의 재생 잠재력의 평가에 대한 첫 번째 단계로서, 본 발명자들은 이들 세포가 좌골 신경 부상의 래트 모델에서 이식 후 생존하고 그래프트화될 수 있는지 여부를 평가하였다.

[0587]

상기 모델에서, 좌골 신경을 기계적으로 압제시키고 hESC-SC를 부상 부위에 즉시 주사하였다(도 3a). 이식된 hESC-SC는 인간 특이적 핵 마커 SC101에 대한 염색에 의해 주사 8주 후 이식된 신경에서 쉽게 검출 가능하였다(도 3b). 이식된 hESC-SC는 숙주 뉴런 섬유와 긴밀히 접촉하였으며(도 3c) 미엘린 마커, 예컨대 MAG 및 P0을 발현하였다(도 3d). 성숙한 미엘린화된 섬유에서, 나트륨 채널은 란비어 결절에 국소화된다. 상기 영역에는 축삭 막이 CASPR로 명명되는 특이적 단백질에 의해 미엘린 막으로 부착되는 도메인이 인접한다. CASPR 발현 영역 다음으로, 칼륨 채널을 함유하는 막 도메인이 존재한다. RFP-표지된 hESC-SC에 싸여있는 축삭에서 이들 마커의 발현을 평가하였으며, 이들은 이의 적절한 막 도메인에 국소화되어 있음이 확인되었다(도 3e). 이들 연구는 그래프트화되고 부상 당한 성체 말초 신경에서 신경 섬유 및 란비어 결절과 적절히 연관되는 미엘린을 생성하는 hESC-SC의 능력을 실증한다.

[0588]

종합하면, hPSC-SC에 대한 이러한 시험관내 및 생체내 연구는 이의 SC 정체성 및 기능을 확인시켜 준다.

[0589]

### 논의

[0590]

SC는 말초 신경 발생, 기능 및 보수에서 중요한 역할을 담당한다. 그러나, 이의 발생 및 기능은 일차 조직으로부터 작업 가능한 수로 이들을 수득하는 데 있어서의 한계로 인해, 인간에서 별로 이해되어 있지 않다. 다른 연구자들이 이전에 P75+/HNK1+ NC 전구체의 장기 유지 후 hPSC로부터 슈반-유사 세포를 보고하였으나(Lee et al., 2007), 이들 연구는 낮은 유도 효율, 및 수 개월의 시험관내 배양, 지연된 분화, 제한된 SC 성숙 및 미엘린화 데이터의 부재라는 한계를 갖는다(Lee et al., 2007; Liu et al., 2012; Ziegler et al., 2011). 다른 연구자들에 의한 인간 SC를 유도하려는 시도도 낮은 수율, 제한된 표현형 특성규명 및 시험관내 또는 생체내 미엘린화의 부재를 야기하였다(Li et al., 2015; Mica et al., 2013). 잘 특성규명되고 순수한 인간 SC 집단의 생성을 위해 고도로 효율적인 접근을 확립하였고, 이는 향후의 심도 깊은 발생 연구 및 적용 용도, 예컨대 질환 모델링, 및 세포 치료법을 위한 발판을 설정한다.

[0591]

본 발명자들의 hESC-기반 플랫폼의 중요한 특색은 확장 가능성 및 생성되는 SC의 순도 그리고 SC 특성의 소실 없이 연장된 기간 동안 세포를 배양하는 능력이다. 대조적으로, 일차 SC는 슈반 세포 배양의 섬유아세포-유사 세포로의 오염을 증가시키는 연장된 배양 시 이의 특성을 빠르게 소실하는 경향이 있다. 현재 상기 신규한 분화 기술을 사용해서 접근 가능한 중요한 발생학적 질문에는 다능 NC 줄기 세포로부터 수임된 SC로의 전이를 제어하

는 메커니즘 및 멜라닌 세포 및 부교감 뉴런이 모두 초기 SC-계통으로부터 유도될 수 있음을 제시하는 마우스에서 주어진 최근 데이터에 대한 인간 가소성의 연구(Adameyko et al., 2009; Espinosa-Medina et al., 2014)가 포함된다. 수입된 SC의 전향적 단리를 위한 표면 마커로서의 CD98의 동정은 이러한 연구를 위한 강력한 도구를 나타낸다. 본원에서 제시되는 데이터에 기반하여, SC-매개된 뉴런 성숙 및 미엘린화에 대한 연구가 다른 초점 영역이 될 것이다. PNS 병리의 모델링이 특히 관심의 대상일 수 있다. 배양되는 hESC-유래 슈반 세포의 놀라운 특색은 슈반 세포 정체성을 확인시켜줄 뿐만 아니라 다능성-유래 세포가 성체 슈반 세포의 발현 패턴과 매칭됨을 제시하는 이의 유전자 발현 패턴에 있다. 이는 대부분의 다른 시험관내에서 유도된 hPSC-계통, 예컨대 태아 단계 마커를 발현하는 뉴런과 대조적이다(Studer et al., 2015). 자가 SC는 현재 PNS 및 CNS 장애 모두를 표적으로 하는 재생 의약에서의 적용을 위해 평가되고 있다(Lavdas et al., 2008; Rodrigues et al., 2012). 이식 데이터는 외상성 신경 부상 모델에서 hESC-SC의 강력한 그래프트화를 실증한다. 본원에서 제시되는 결과는 척추 부상을 포함하는 재생 의약에서 hESC-SC의 적용을 위한 강력한 기반을 설정한다.

[0592]

확장 가능한 SC 집단에 대한 접근은 인간 SC 발생에서 오래 지속되어온 질문, 예컨대 초기 신경형성 전구체로부터 수입된 신경절 상으로의 전이 및 미엘린화 세포 단계로의 추가 진행을 연구하기 위한 새로운 방법을 열어준다. hPSC-SC는 또한 PNS에서 뉴런 기능 및 성숙의 조절에서 아교 세포의 역할을 결정하기 위해 채택될 수 있다. 불량한 뉴런 성숙은 대부분의 현재 hPSC-기반 분화 프로토콜의 한계이다. SC는 PNS 및 CNS에서 재생 의약에서의 다양한 적용을 위해 이용되고 있다(Lavdas et al., 2008; Rodrigues et al., 2012). 인간 SC의 대규모 생성 및 부상 당한 성체 신경에서 그래프트화하는 이의 능력은 재생 의약에서 이의 적용을 위한 기반을 확립한다.

[0593]

결론적으로, 본 연구는 보건 및 질환에서 인간 SC 계통의 생물학을 탐색하고 DPN을 위한 신규한 치료법을 개발하기 위해 이들에 접근하기 위한 효과적인 틀을 제공한다. hPSC의 유도된 분화는 기본 및 적용 연구에 광범위하게 연루된 인간 SC의 대규모 유도를 위해 효과적인 접근을 나타낸다. 상기 틀은 PNS 생물학 및 질환에서 아교 세포의 역할에 대한 심층 연구를 위한 새로운 가능성을 제공하며 향후 말초 신경병증에 대한 새로운 치료제의 개발에 기여한다. 상기 작업은 인간 SC-기반 연구를 재생 의약 및 인간 질환 모델링에서의 적용을 위해 일상적으로 만들게 된다.

**표 1**

hESC-유래 슈반 세포 전구체(25일) 대 hESC-유래 NC(11일)에서  
상위 200개 상향조절된 유전자

유전자 ID	log2 배율변화
<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>EEFIA2</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>OPCT</i>	6.54
<i>C12orf69</i>	6.42
<i>CACNG5</i>	6.33
<i>BAAT</i>	6.30
<i>AGBL4</i>	6.28

[0594]

<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
<i>P2RX3</i>	5.93
<i>PLA2G4C</i>	5.87
<i>CAV1</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

[0595]

<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>RUND C3B</i>	5.21
<i>XLOC_010607</i>	5.21
<i>C5ARI</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
<i>TMEM132D</i>	5.07
<i>KLHDC7B</i>	5.04
<i>GMPR</i>	5.03
<i>CMKLRI</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>GDAPIL1</i>	4.86
<i>INHBA</i>	4.85
<i>CHSY3</i>	4.85

<i>PPYRI</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
<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>HECWI</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>HIGDIB</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>C3ARI</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>HIGDIB</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

[0598]

**표 2**

hESC-유래 슈반 세포 전구체(50일) 대 hESC-유래 NC(11일)에서  
상위 200개 상향조절된 유전자

유전자 ID	log2 배율변화
<i>STT3B</i>	11.85
<i>CTAGE5</i>	11.30
<i>KBTBD6</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>TRAPP9</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
<i>COX20</i>	6.64
<i>PIK3CB</i>	6.63
<i>HAX1</i>	6.58

[0599]

<i>KITLG</i>	6.58
<i>CNTD1</i>	6.54
<i>ETNK2</i>	6.47
<i>LRRK57</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>RUNXI</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

[0600]

<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
<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>SPARCLI</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

[0601]

<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
<i>GLTPD2</i>	4.60
<i>LSMD1</i>	4.58
<i>SAMD11</i>	4.58
<i>BCARI</i>	4.58
<i>ENTHD1</i>	4.57
<i>PTTGIIIP</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>DRI</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>CAPZAI</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

[0602]

<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>AP2SI</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

[0603]

**표 3**

hESC-유래 슈반 세포(100일) 대 hESC-유래 NC(11일)에서  
상위 200개 상향조절된 유전자

유전자 ID	Log2배율변화
<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

[0604]

<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
<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

[0605]

<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
<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

[0606]

<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
<i>LYL1</i>	5.51
<i>SLC6A15</i>	5.49
<i>SYK</i>	5.49

[0607]

<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>BMPR1B</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>LGALSI</i>	5.13
<i>XLOC_008985</i>	5.31
<i>LGALSI</i>	5.13

[0608]

**표 4**인간 일차 슈반 세포 대 hESC-유래 NC(11일)에서 상위 200개의 상향조절된 유전자

유전자 ID	log2배율변화
<i>KBTBD6</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

[0609]

<i>XLOC_008617</i>	9.53
<i>TRIM3</i>	9.32
<i>SPINT2</i>	9.08
<i>PLP2</i>	9.05
<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>NYAPI</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>FAMI23B</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

[0610]

<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>PPPIR8</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
<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>CNKSRI</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

[0611]

<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>RLBPI</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
<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

[0612]

<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
<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>COGI</i>	5.25
<i>TMEM200C</i>	5.25
<i>TBRG1</i>	5.24
<i>PPFIA1</i>	5.23

[0613]

**표 5**

일차 항체 및 작업 희석도 목록

항체	공급처	희석도
CD49D	Biolegend	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

[0614]

Kv1.2	Joel Black	1:200
CASPR	Joel Black	1:1000
SC101	Stem Cell Tech	1:1000
항체	공급처	희석도

[0615]

참고문헌

- [0616] 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.
- [0617] 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.
- [0618] 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.
- [0619] Barreto-Chang, O.L., and Dolmetsch, R.E. (2009). Calcium imaging of cortical neurons using Fura-2 AM. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- [0620] Bunge, R.P. (1994). The role of the Schwann cell in trophic support and regeneration. *J. Neurol.* 242, S19-21.
- [0621] 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.
- [0622] 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.
- [0623] 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.
- [0624] 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.
- [0625] 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.
- [0626] Eckersley, L. (2002). Role of the Schwann cell in diabetic neuropathy. *Int. Rev. Neurobiol.* 50, 293-321.
- [0627] 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.
- [0628] Fattah, 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.
- [0629] 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.

[0630] Gordois, 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.

[0631] 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.

[0632] 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.

[0633] Jessen, K.R., and Mirsky, R. (2016). The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *J. Physiol.* 594, 3521-3531.

[0634] 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.

[0635] Kocsis, J.D., and Bunge, M.B. (2014). Transplantationof Schwann cells and olfactory ensheathing cells as a therapeutic strategy in spinal cord injury. In *Textbook of Neural Repair and Rehabilitation*: M. Selzer, S. Clarke, L. Cohen, G. Kwakkel, and R. Miller, eds. (Cambridge: Cambridge University Press).

[0636] Kocsis, J.D., and Waxman, S.G. (2007). Schwann cells and their precursors for repair of central nervous system myelin. *Brain* 130, 1978-1980.

[0637] 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.

[0638] Lavdas, A.A., Papastefanaki, F., Thomaidou, D., and Matsas, R. (2008). Schwann cell transplantation for CNS repair. *Curr. Med. Chem.* 15, 151-160.

[0639] 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.

[0640] 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.

[0641] 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.

[0642] Lupski, J.R. (1998). Charcot-Marie-Tooth disease: lessons in genetic mechanisms. *Mol. Med.* 4, 3-11.

[0643] Menendez, L., Yatskiewych, 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.

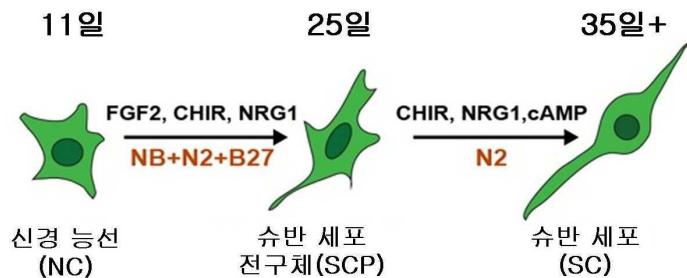
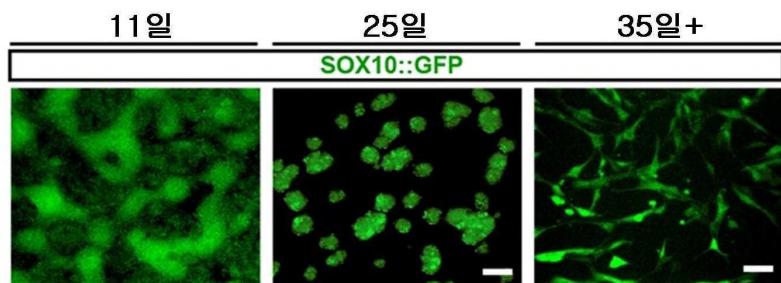
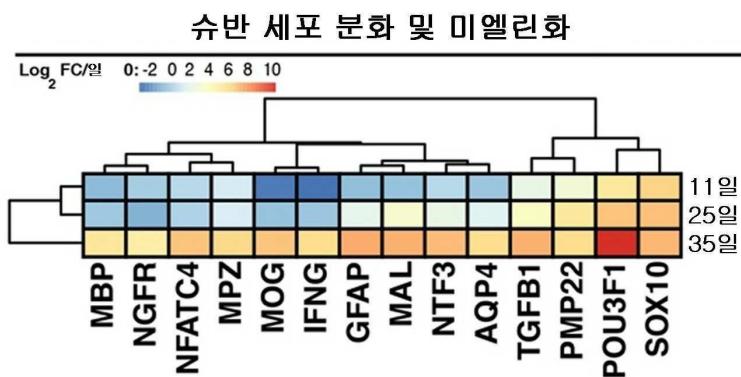
[0644] Martyn, C.N., and Hughes, R.A. (1997). Epidemiology of peripheral neuropathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 62, 310-318.

[0645] 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.

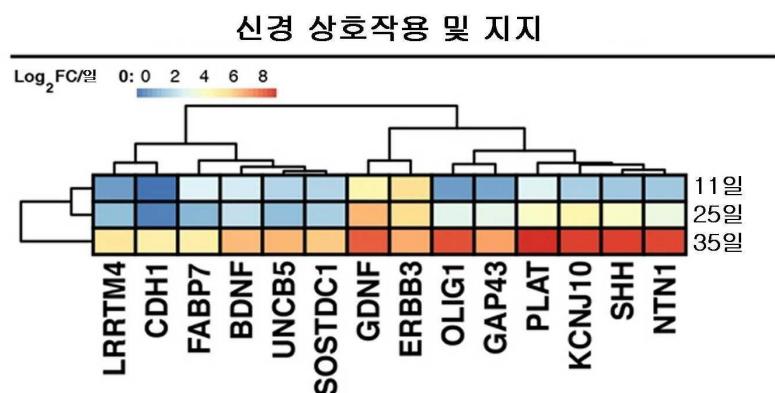
[0646] Mica, Y., Lee, G., Chambers, S.M., Tomishima, M.J., and Studer, L. (2013). Modeling neural crest induction, melanocyte specification, and disease-related pigmentation defects in hESCs and patient-

specific iPSCs. *Cell Rep.* 3, 1140–1152.

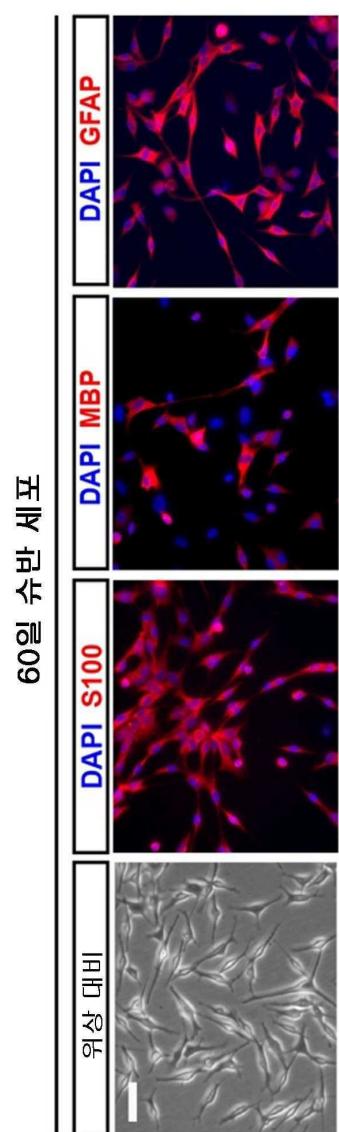
- [0647] Mizisin, A.P. (2014). Mechanisms of diabetic neuropathy: Schwann cells. *Handb. Clin. Neurol.* 126, 401–428.
- [0648] Mizisin, A.P., and Powell, H.C. (1993). Schwann cell injury is attenuated by aldose reductase inhibition in galactose intoxication. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 52, 78–86.
- [0649] Newbern, J., and Birchmeier, C. (2010). Nrg1/ErbB signaling networks in Schwann cell development and myelination. *Seminars in cell & developmental biology* 21, 922–928.
- [0650] Oates, P.J. (2002). Polyol pathway and diabetic peripheral neuropathy. *Int. Rev. Neurobiol.* 50, 325–392.
- [0651] 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.
- [0652] Pareyson, D. (1999). Charcot–marie–tooth disease and related neuropathies: molecular basis for distinction and diagnosis. *Muscle Nerve* 22, 1498–1509.
- [0653] Quasthoff, S., and Hartung, H.P. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *J. Neurol.* 249, 9–17.
- [0654] 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.
- [0655] Simmons, Z., and Feldman, E.L. (2002). Update on diabetic neuropathy. *Current opinion in neurology* 15, 595–603.
- [0656] 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.
- [0657] 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.
- [0658] 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.
- [0659] 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.
- [0660] Williams, R.R., and Bunge, M.B. (2012). Schwann cell transplantation: a repair strategy for spinal cord injury? *Prog. Brain Res.* 201, 295–312.
- [0661] Zochodne, D.W. (2007). Diabetes mellitus and the peripheral nervous system: manifestations and mechanisms. *Muscle Nerve* 36, 144–166.
- [0662] 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.

**도면****도면1a****도면1b****도면1c**

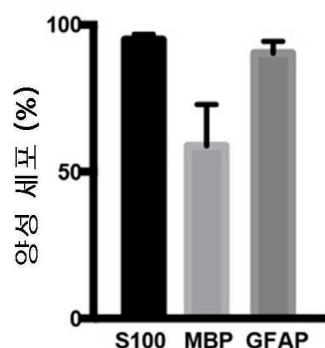
도면 1d



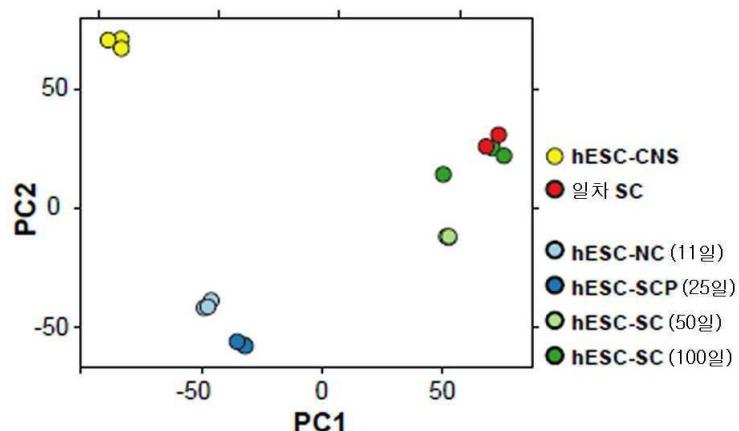
도면 1e



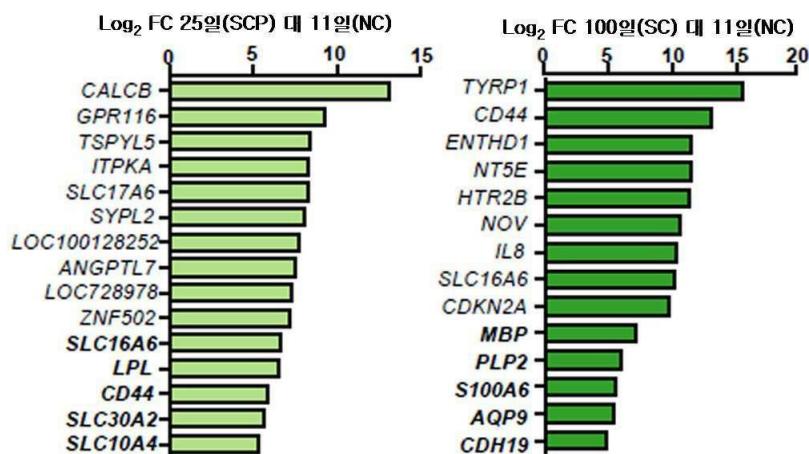
## 도면1f



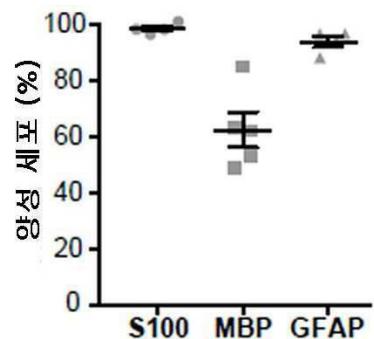
## 도면1g



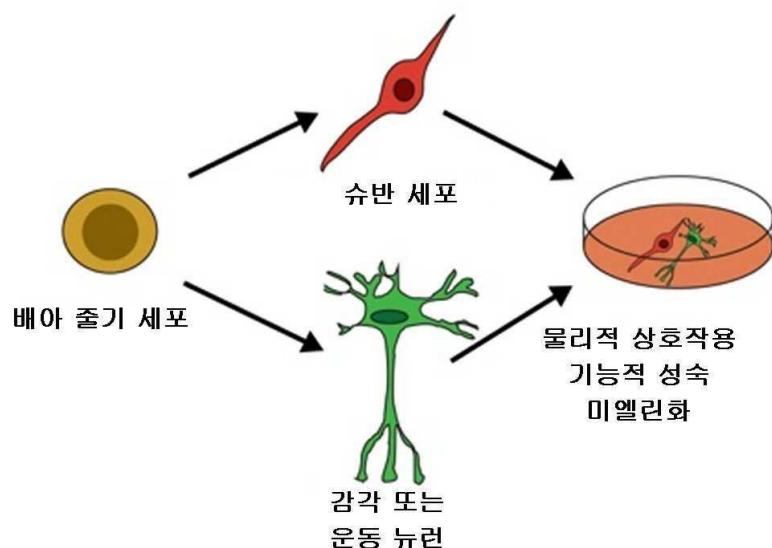
## 도면1h



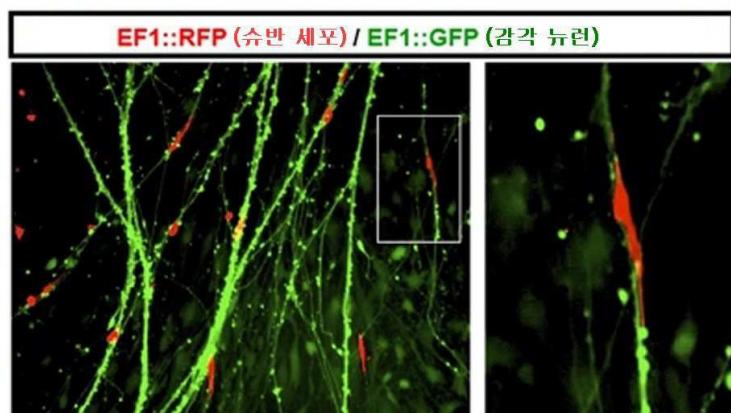
도면1*i*



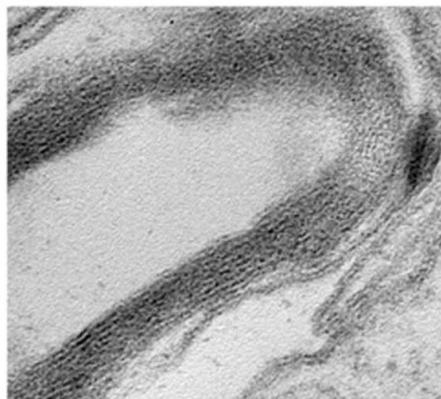
도면2*a*



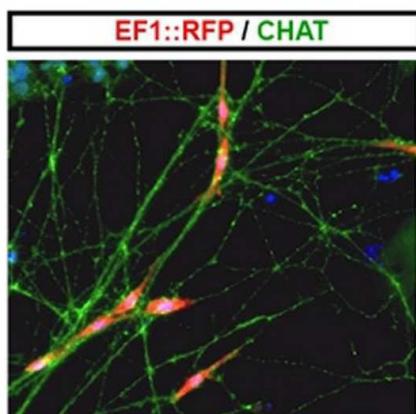
도면2*b*



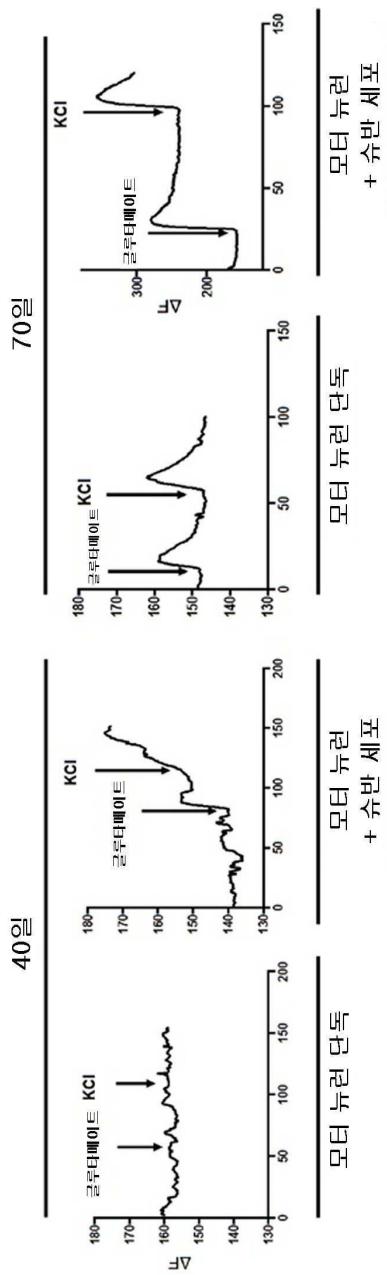
도면2c



도면2d



## 도면2e

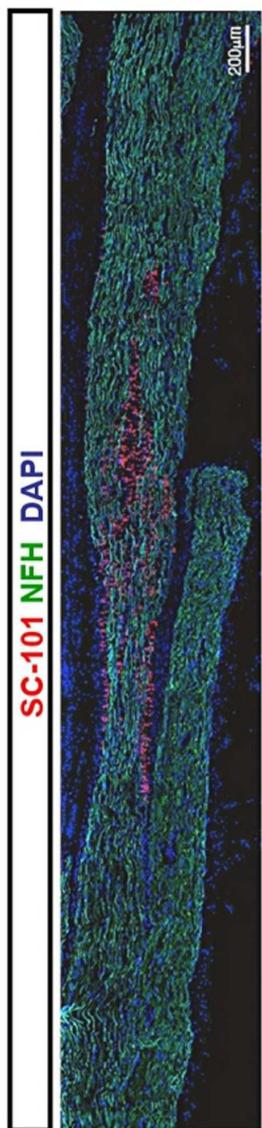


## 도면3a

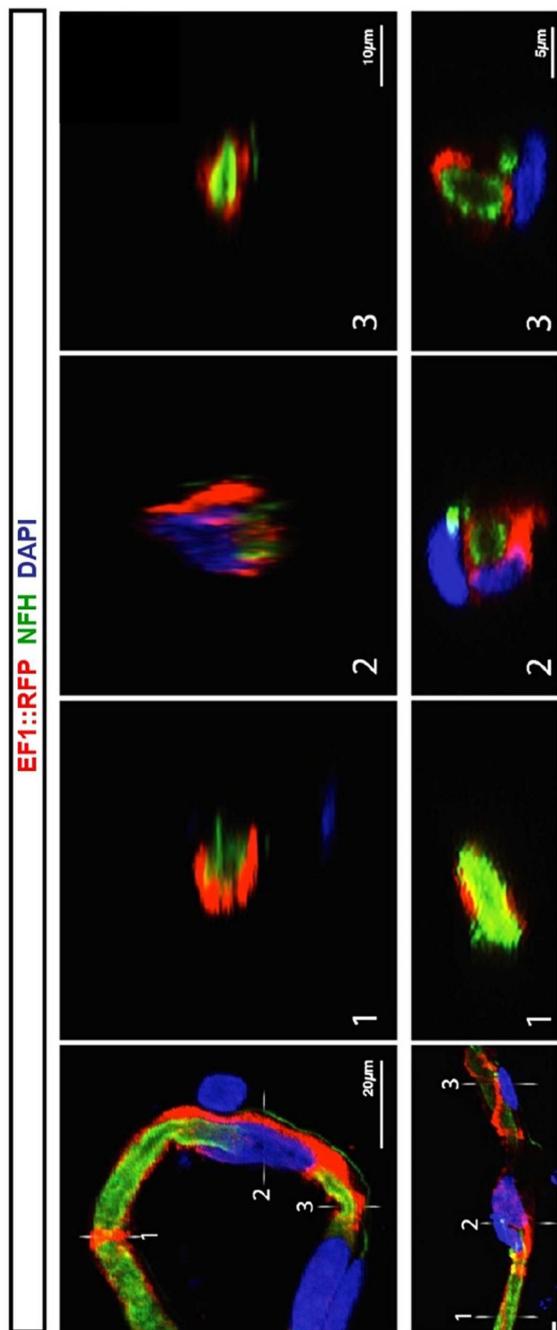


좌골 신경 압계 부상

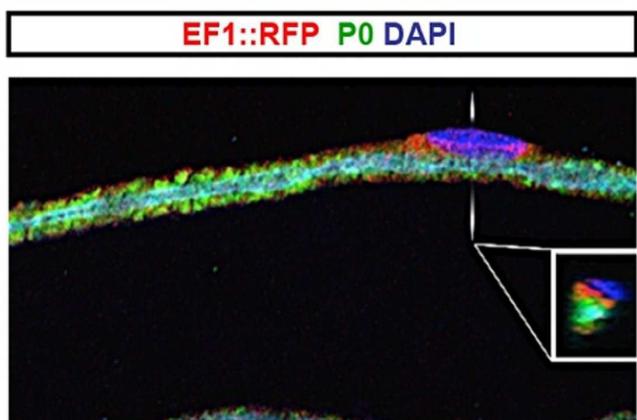
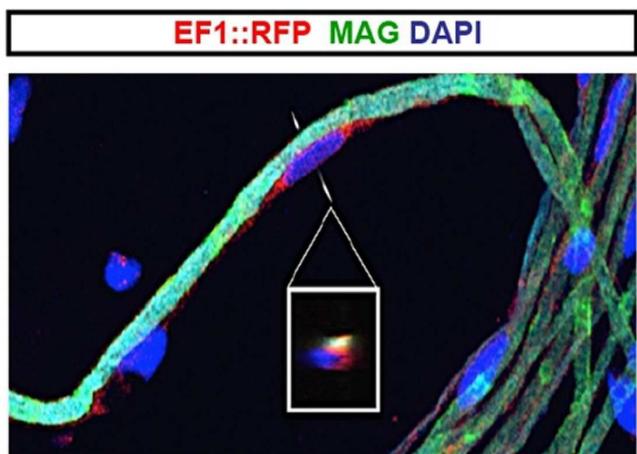
도면3b



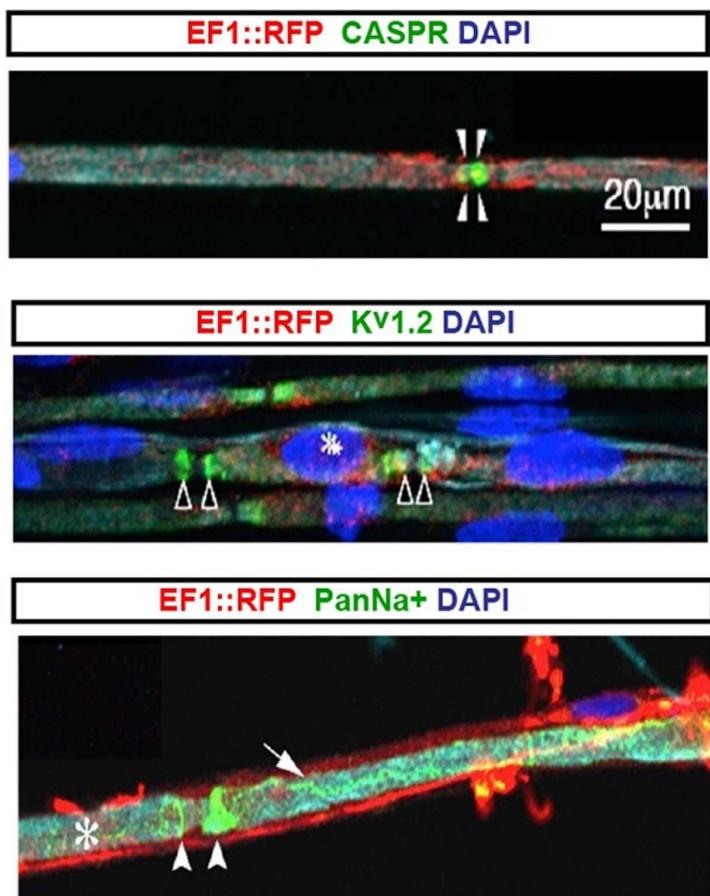
도면3c



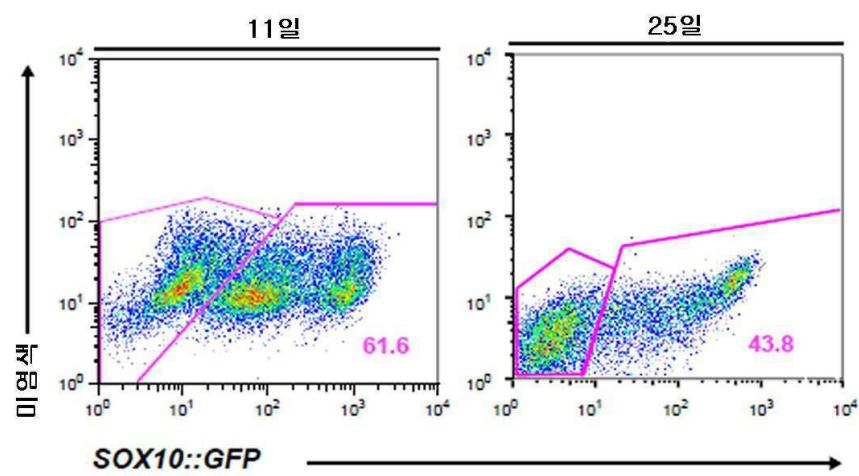
도면3d



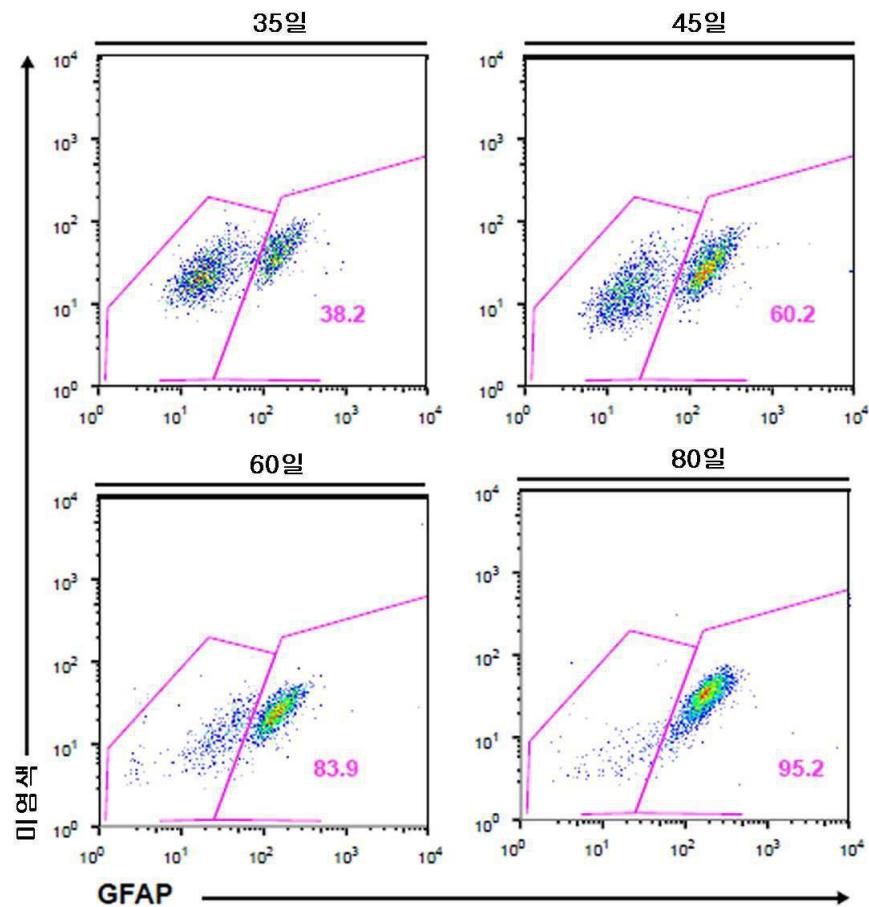
도면3e



도면4a



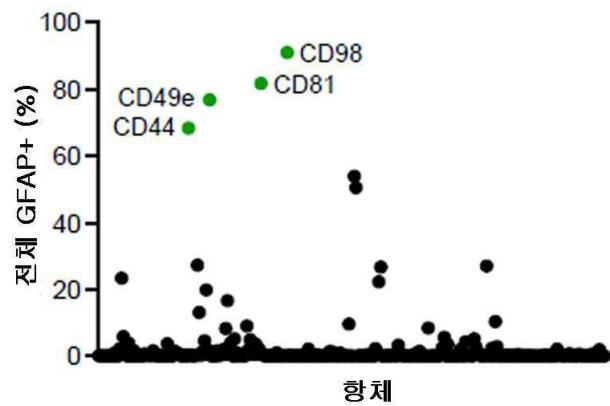
도면4b



도면5a



도면5b



도면5c

