(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120060141 A
(43)申请公布日 2025.05.30

(21)申请号 202510214051.2

(22)申请日 2020.01.23

(30)优先权数据
62/796,077 2019.01.23 US

(62)分案原申请数据
202080016840.0 2020.01.23

(71)申请人 阿斯特里亚斯生物疗法股份有限公司
地址 美国

(72)发明人 K·奥尼施 N·C·曼雷
C·R·哈尔贝施塔特
E·M·怀特利

(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 李程达

(51)Int.Cl.
C12N 5/079(2010.01)
C12N 5/0735(2010.01)
C12N 5/10(2006.01)

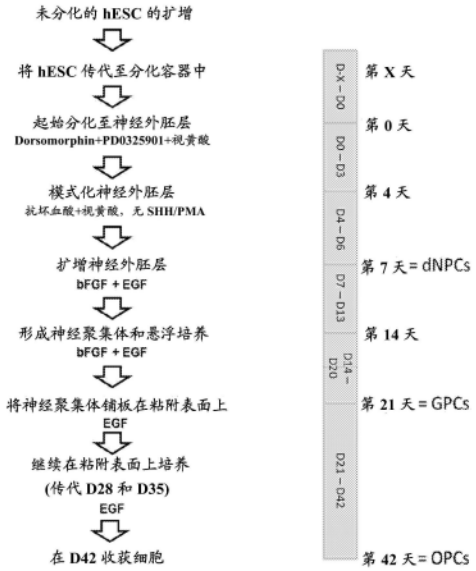
权利要求书1页 说明书32页 附图6页

(54)发明名称

来自人多能干细胞的背源性少突胶质祖细胞

(57)摘要

提供了使用BMP信号传导和MAPK/ERK信号传导的抑制剂将人多能干细胞分化为背神经外胚层祖细胞以及进一步分化为神经胶质祖细胞和少突胶质祖细胞(OPC)的方法。还提供了通过此类方法获得的细胞和细胞组合物,以及此类细胞的用途。进一步提供了在不存在腹侧形态发生素SHH或SHH信号传导活化剂的情况下将人多能干细胞有效分化为OPC的方法和方案。本公开内容的方法在分化过程的第7天可再现地产生背神经外胚层祖细胞,在分化过程的第21天可再现地产生神经胶质祖细胞,和在分化过程的第42天可再现地产生OPC。



CN 120060141 A

1.包含配对盒6(PAX6)阳性的背神经祖细胞(dNPC)的分化的细胞群,其中所述背神经祖细胞通过包括以下步骤的方法获得:

a)获得未分化的人多能干细胞的培养物;

b)在丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶(MAPK/ERK)的至少一种抑制剂、骨形态发生蛋白(BMP)信号传导的至少一种抑制剂和视黄酸的存在下将所述未分化的人多能干细胞贴壁培养第一时间段,从而诱导分化为神经外胚层;和

c)在存在视黄酸且不存在sonic hedgehog(SHH)或SHH信号传导活化剂的情况下,将来自b)的细胞贴壁培养第二时间段,从而获得背神经祖细胞。

2.权利要求1的分化的细胞群,其中dNPC表达选自配对盒3(PAX3)、配对盒7(PAX7)和活化蛋白2(AP2)的一种或多种标志物。

3.包含少突胶质祖细胞(OPC)的分化的细胞群,其中所述OPC根据包括下列步骤的方法获得:

a)根据权利要求1的方法获得背神经祖细胞(dNPC);

b)收获来自a)的细胞,将它们重新铺板在基底上,并在碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和表皮生长因子(EGF)的存在下将细胞贴壁培养另外的一段时间,从而扩增神经祖细胞;

c)收获来自b)的细胞,并在bFGF和EGF的存在下将细胞作为悬浮液中的聚集体培养另外的一段时间,直到细胞成熟为背神经胶质祖细胞;和

d)将来自c)的聚集体铺板在基底上,并在表皮生长因子(EGF)的存在下将细胞贴壁培养另外的一段时间,任选不时地分开细胞,直到细胞成熟为OPC;

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

来自人多能干细胞的背源性少突胶质祖细胞

[0001] 本申请是申请号为202080016840.0的专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求于2019年1月23日提交的美国临时申请62/796,077的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0004] 本公开内容涉及将多能干细胞例如人胚胎干细胞首先分化为具有背脊髓祖细胞表型的神经外胚层祖细胞,然后进一步分化为神经胶质祖细胞,并且进一步分化为少突胶质祖细胞的新方法。还提供了通过此类方法获得的细胞和细胞组合物,以及此类细胞的用途。本公开内容进一步涉及通过根据本发明的方法产生的表达一种或多种标志物的细胞。

背景技术

[0005] 少突胶质祖细胞(OPC)是中枢神经系统(CNS)中神经胶质细胞的亚型,其出现在大脑和脊髓的脑室区中,并在成熟为少突胶质细胞之前迁移到整个发育中的CNS。成熟的少突胶质细胞产生髓鞘,其使神经元轴突绝缘并使其中已丢失髓鞘的CNS病变再形成髓鞘。少突胶质细胞还通过其他机制促成神经保护,包括产生促进神经元存活的神经营养因子(Wilkins等人,2001Glia 36(1):48-57;Dai等人,2003JNeurosci.23(13):5846-53;Du和Dreyfus,2002J Neurosci Res.68(6):647-54)。与大多数祖细胞不同,OPC在成人CNS中保持丰富,在那里它们保留产生新的少突胶质细胞的能力。因此,OPC和来源于OPC的成熟少突胶质细胞是脱髓鞘和髓鞘形成障碍病症(例如多发性硬化症、肾上腺脑白质营养不良和肾上腺脊髓神经病)、其他神经退行性病症(例如阿尔茨海默病、肌萎缩侧索硬化和亨廷顿病)和急性神经系统损伤(例如中风和脊髓损伤(SCI))的重要治疗靶点。

[0006] 已经开发了几种方案用于将人多能干细胞例如胚胎干细胞(ESC)和诱导多能干细胞(iPSC)分化成可用于细胞治疗的OPC。迄今为止,从人多能干细胞生成少突胶质祖细胞的方案已经概括了发育中的脊髓的腹侧运动神经元祖细胞(pMN)域,其已知在体内产生大多数脊髓OPC(Rowitch,2004Nat Rev Neurosci.5(5):409-19;Ravanelli和Appel,2015Genes Dev.29(23):2504-15)。产生腹源性OPC的腹侧神经祖细胞的诱导需要活化sonic hedgehog(SHH)信号传导。(Ericson等人,1996Cell 87:661-673;Orentas等人,1999Development 126(11):2419-29)。因此,现有的用于从多能干细胞产生OPC的体外方案依赖于胚状体形成作为刺激内源性SHH活化的手段(Nistor等人,2005Glia49(3):385-96)或SHH的直接添加或SHH信号传导的活化剂(Stacpoole等人,2013Stem Cell Reports 1(5):437-50;Douvaras和Fossati,2015Nat Protoc.10(8):1143-54;Piao等人,2015Cell Stem Cell16(2):198-210;Wang等人,2013Cell Stem Cell 12(2):252-64;Rodrigues等人,2017Stem Cell Reports 8(6):1770-1783;和Yamashita等人,2017PLoS One 12(2):e0171947)。前一种方法可能有问题,因为它依赖于胚状体内的自发分化,并且可能在分化过程结束时导致不需要的细胞类型(Priest等人,2015Regen Med.10(8):939-58;Manley等人,2017Stem Cells

Transl Med.6(10):1917-1929)。后者的定向分化代表了目前用于产生多能干细胞来源的OPC的方法。虽然这些方法已经成功地从人多能干细胞产生OPC以用于研究目的,但在将现有方案转化为临床商业规模生产过程相关的产品的质量、可扩展性和成本方面仍然存在挑战。

[0007] 在小鼠中,独立于SHH信号传导在背脊髓中产生OPC的较小的次级波(Cai等人,2005Neuron 45(1):41-53;Vallstedt等人,2005Neuron 45(1):55-67)。这些背源性小鼠OPC成熟为少突胶质细胞,其在发育和髓鞘再生过程中响应于局灶性髓鞘形成损伤促成轴突髓鞘形成(Zhu等人,2011Glia 59(11):1612-21)。关于在人类中推定的背源性OPC群体知之甚少。最近,据报道,由多种细胞类型组成并使用OLIG2-GFP敲入hPSC报告系生成的人脑区域特异性前脑类器官(背侧前脑类器官和腹侧前脑类器官)可以分化为功能性神经元和少突胶质细胞。(Kim等人,可获自https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2018/11/04/460907.full.pdf)。然而,迄今为止,还没有关于通过人多能干细胞的定向分化获得的可以产生适用于下游细胞治疗应用的目标谱系特异性细胞群的背源性OPC的报道。

[0008] 需要改进的将多能干细胞分化为OPC的方法。理想情况下,此类方法应易于扩展以产生足够数量的OPC以用于细胞治疗应用,同时一致且可再现地产生具有所需质量属性的目标细胞OPC。

发明内容

[0009] 在本文所述的各种实施方案中,本公开内容尤其提供了用于将人多能干细胞例如ESC和iPSC分化为背神经外胚层祖细胞(dNPC)并进一步分化为神经胶质祖细胞和OPC的稳健、可靠的方案。

[0010] 本公开内容部分基于以下发现:在不存在由SHH信号传导介导的神经外胚层限制性祖细胞的腹侧化的情况下,人多能干细胞可以容易且有效地分化为脊髓OPC。

[0011] 在本公开内容的某些方面,具有背脊髓表型的神经外胚层前体细胞是通过使人多能干细胞接触与骨形态发生蛋白(BMP)信号传导的一种或多种抑制剂和视黄酸组合的丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶(MAPK/ERK)信号传导的一种或多种抑制剂而获得的。这种方法与目前诱导神经外胚层的方法形成对比,后者依赖于转化生长因子β(TGFβ)/活化素/Nodal信号传导抑制剂以及BMP信号传导抑制剂的组合添加(也称为双重SMAD抑制)(Chambers等人,2009Nat.Biotechnol 27(3):275-280;Douvaras和Fossati,2015Nat Protoc.10(8):1143-54;Piao等人,2015Cell Stem Cell 16(2))。

[0012] 令人惊讶的是,发现根据上述方案获得且未暴露于腹侧形态发生素SHH或SHH信号传导活化剂的背神经外胚层祖细胞可以容易地分化为脊髓OPC。还发现,与活化SHH信号传导的分化方案相比,本公开内容的方法产生显著更多数量的分化细胞。由于细胞扩增和细胞产率的显著增加,本公开内容的方法提供可扩展和可再现的过程以产生大量的OPC和其他神经外胚层谱系细胞用于细胞治疗和其他应用。

[0013] 本公开内容的方法在分化过程的第7天可再现地产生具有背脊髓表型的神经外胚层祖细胞,在分化过程的第21天可再现地产生神经胶质祖细胞,和在分化过程的第42天可再现地产生OPC。根据本公开内容产生的第42天OPC(就其整体标志物表达谱而言)与使用当

前在临床测试中用于治疗脊髓损伤的替代方法产生的OPC相当(Priest等人,2015Regen Med.10(8):939-58;Manley等人,2017Stem Cells Transl Med.6(10):1917-1929),除了根据本公开内容产生的OPC表达较低水平的非OPC标志物,包括与体外上皮包囊形成相关的标志物。

[0014] 在一个优选的实施方案中,根据本发明的方法产生的OPC表达一种或多种选自神经/神经胶质抗原2(NG2)、血小板衍生生长因子受体A(PDGFRα)和神经节苷脂GD3(GD3)的标志物。在进一步优选的实施方案中,细胞的特征可以在于单一标志物或标志物的组合的表达。例如,根据本发明的方法产生的OPC的特征可以在于单独的NG2、PDGFRα或GD3,或具有标志物NG2、PDGFRα和GD3中的两个或三个的标志物组合。在一个优选的实施方案中,根据本发明的方法产生的细胞的至少90%表达NG2和/或PDGFRα。在进一步优选的实施方案中,至少50%的细胞进一步表达GD3。

[0015] 在进一步优选的实施方案中,产生细胞的过程包括将细胞冷冻保存到中间库中然后解冻细胞以继续分化过程直至获得最终产品的一个或多个步骤。例如,中间细胞库可以在该过程的第14天、第28天和/或第35天进行冷冻保存。

[0016] 在另一个实施方案中,根据本发明产生的OPC被制备为用于治疗患者的即用型(RTA)OPC细胞治疗组合物。还提出了配制用于在解冻后直接施用至受试者的人OPC和配制用于冷冻保存并在解冻后将冷冻保存的组合物施用至受试者的OPC细胞治疗组合物的方法。在另一方面,RTA组合物可配制成解冻和注射(TAI)组合物,由此组合物在解冻后通过注射施用,而无需OPC的进一步加工。

[0017] 在一个实施方案中,本公开内容提供了一种用于从未分化的人多能干细胞获得包含背神经祖细胞(dNPC)的细胞群的方法。在某些实施方案中,该方法包括:a)获得未分化的人多能干细胞的培养物;b)在丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶(MAPK/ERK)的至少一种抑制剂、骨形态发生蛋白(BMP)信号传导的至少一种抑制剂和视黄酸的存在下将所述未分化的人多能干细胞贴壁培养第一时间段,从而诱导分化为神经外胚层;和c)在存在视黄酸且不存在sonic hedgehog(SHH)或SHH信号传导活化剂的情况下,将来自b)的细胞贴壁培养第二时间段,从而获得背神经祖细胞。

[0018] 在某些实施方案中,第一时间段是约3至4天。在某些实施方案中,第二时间段是约3至4天。

[0019] 在某些实施方案中,该方法还包括附加步骤:收获来自c)的细胞,将所收获的细胞重新铺板在基底上并在碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和表皮生长因子(EGF)的存在下将细胞贴壁培养另外的一段时间,从而扩增细胞。在某些实施方案中,基底是细胞粘附肽。在其他实施方案中,基底是细胞外基质蛋白。在某些实施方案中,基底是重组人层粘连蛋白-521。在其他实施方案中,基底是玻连蛋白或层粘连蛋白-511E8片段。在其他实施方案中,基底是合成基底,例如,**Synthemax®-II**SC基底。

[0020] 在进一步的实施方案中,该方法包括附加步骤:收获扩增的细胞并将它们作为悬浮液中的聚集体在bFGF和EGF的存在下培养另外的一段时间,直到细胞成熟为神经胶质祖细胞。在某些实施方案中,培养在动态悬浮液中进行。在某些实施方案中,将细胞悬浮培养约五至十天。在一个实施方案中,将细胞悬浮培养约7天。

[0021] 在更进一步的实施方案中,该方法包括附加步骤:将包含神经胶质祖细胞的聚集

体铺板在基底上并在表皮生长因子(EGF)的存在下将细胞贴壁培养另外的一段时间,任选不时地分开细胞,直到细胞成熟为少突胶质祖细胞(OPC)。在某些实施方案中,培养基另外包含血小板衍生生长因子AA(PDGF-AA)。在某些实施方案中,在将包含神经胶质祖细胞的聚集体铺板后,将细胞培养约2至4周。在一个实施方案中,在将包含神经胶质祖细胞的聚集体铺板后,将细胞培养21天。在某些实施方案中,基底是细胞粘附肽。在其他实施方案中,基底是细胞外基质蛋白。在某些实施方案中,基底是重组人层粘连蛋白-521。在其他实施方案中,基底是玻连蛋白或层粘连蛋白-511E8片段。在其他实施方案中,基底是合成基底,例如,**Synthemax®-II** SC基底。

[0022] 在另一个实施方案中,在该过程的一些部分中在没有包被的情况下培养细胞。在另一个实施方案中,使用悬浮液的包被或未包被的微载体代替培养皿。

[0023] 在某些实施方案中,MAPK/ERK的至少一种抑制剂选自PD0325901、AZD6244、GSK1120212、PD184352和考比替尼(Cobimetinib)。在其他实施方案中,MAPK/ERK抑制剂是PD0325901。

[0024] 在某些实施方案中,BMP信号传导的至少一种抑制剂是活化素受体样激酶2(ALK2)的抑制剂。在某些实施方案中,BMP信号传导的至少一种抑制剂选自Dorsomorphin、DMH-1、K02288、ML347、LDN193189和Noggin蛋白。在其他实施方案中,BMP信号传导抑制剂是Dorsomorphin。

[0025] 另一个实施方案是分化的细胞群,其包含根据本公开内容获得的配对盒6(PAX6)阳性背神经祖细胞(dNPC)。在某些实施方案中,PAX6阳性dNPC进一步表达一种或多种选自配对盒3(PAX3)、配对盒7(PAX7)和活化蛋白2(AP2)的标志物。

[0026] 在另一个实施方案中,本公开内容提供了一种从未分化的人多能干细胞获得包含神经/神经胶质抗原2(NG2)阳性少突胶质祖细胞(OPC)的细胞群的方法,该方法包括:a)获得未分化的人多能干细胞的培养物;b)在丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶(MAPK/ERK)的至少一种抑制剂、骨形态发生蛋白(BMP)信号传导的至少一种抑制剂和视黄酸的存在下将所述未分化的人多能干细胞贴壁培养第一时间段,从而诱导分化为神经外胚层;c)在存在视黄酸且不存在sonic hedgehog(SHH)或SHH信号传导活化剂的情况下,将来自b)的细胞贴壁培养第二时间段,从而获得背神经祖细胞;d)收获来自c)的细胞,将所收获的细胞重新铺板在基底上并在碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和表皮生长因子(EGF)的存在下将细胞贴壁培养另外的一段时间,从而扩增神经祖细胞;e)收获来自d)的细胞,并将所述细胞作为悬浮液中的聚集体在bFGF和EGF的存在下培养另外的一段时间,直到细胞成熟为背神经胶质祖细胞;和f)将来自e)的聚集体铺板在基底上,并在表皮生长因子(EGF)的存在下将细胞贴壁培养另外的一段时间,任选不时地分开细胞,直到细胞成熟为OPC。在某些实施方案中,步骤f)中的培养基另外包含血小板衍生生长因子AA(PDGF-AA)。在某些实施方案中,在聚集体铺板后将细胞培养约2至4周。在一个实施方案中,在聚集体铺板后将细胞培养约二十一天。在某些实施方案中,基底是细胞粘附肽。在其他实施方案中,基底是细胞外基质蛋白。在某些实施方案中,基底是重组人层粘连蛋白-521。在其他实施方案中,基底是玻连蛋白或层粘连蛋白-511E8片段。在其他实施方案中,基底是合成基底,例如,**Synthemax®-II** SC基底。

[0027] 另一个实施方案是包含根据本公开内容获得的NG2阳性OPC的分化的细胞群。在某

些实施方案中,分化的细胞群包含至少60％的NG2阳性细胞。在某些实施方案中,分化的细胞群包含至少70％的NG2阳性细胞。在某些实施方案中,分化的细胞群包含至少80％的NG2阳性细胞。在其他实施方案中,分化的细胞群包含至少90％的NG2阳性细胞。在某些实施方案中,分化的细胞群包含至少98％的NG2阳性细胞。

[0028] 在某些实施方案中,分化的细胞群包含至少60％的PDGFRα阳性细胞。在某些实施方案中,分化的细胞群包含至少70％的PDGFRα阳性细胞。在某些实施方案中,分化的细胞群包含至少80％的PDGFRα阳性细胞。在其他实施方案中,分化的细胞群包含至少90％的PDGFRα阳性细胞。在某些实施方案中,分化的细胞群包含至少98％的PDGFRα阳性细胞。

[0029] 在某些实施方案中,分化的细胞群包含至少50％的GD3阳性细胞。在某些实施方案中,分化的细胞群包含至少60％的GD3阳性细胞。在某些实施方案中,分化的细胞群包含至少70％的GD3阳性细胞。在某些实施方案中,分化的细胞群包含至少80％的GD3阳性细胞。在其他实施方案中,分化的细胞群包含至少90％的GD3阳性细胞。在某些实施方案中,分化的细胞群包含至少98％的GD3阳性细胞。

[0030] 在另一个实施方案中,分化的细胞群包含在上述百分比内的NG2和PDGFRα阳性细胞。在另一个实施方案中,分化的细胞群包含在上述百分比内的NG2和GD3阳性细胞。在另一个实施方案中,分化的细胞群包含在上述百分比内的PDGFRα和GD3阳性细胞。在另一个实施方案中,分化的细胞群包含在上述百分比内的NG2、PDGFRα和GD3阳性细胞。

[0031] 在某些实施方案中,人多能干细胞是人胚胎干细胞。在其他实施方案中,人多能干细胞是人诱导多能干细胞。

[0032] 在另一个实施方案中,将根据本发明制备的细胞冷冻保存,然后解冻以用于递送给患者。在优选的实施方案中,细胞在递送给患者之前不需要进一步处理。一旦解冻,根据本发明制备的细胞可立即递送给患者。在优选的实施方案中,细胞可以通过注射递送。注射体积可以是例如约100微升,其中细胞浓度为每毫升100,000,000个活细胞。

附图简要说明

[0034] 图1是描绘根据本公开内容的人多能干细胞分化成背神经外胚层祖细胞(dNPC)并进一步分化成神经胶质祖细胞(GPC)和少突胶质祖细胞(OPC)的图。在第7天左右获得具有背脊髓表型的神经外胚层祖细胞,并且其可以容易地分化为GPC(第21天)并进一步分化为OPC(第42天)。测试了MAPK/ERK信号传导(PD0325901以外的)和BMP信号传导(Dorsomorphin以外的)的几种另外的小分子抑制剂,发现它们在诱导分化为背神经外胚层方面同样有效(实施例7)。

[0035] 图2A-2C显示了描述不存在SHH或SHH信号传导激动剂的情况下对细胞产率的影响的代表性数据。图2A显示了所测试的小分子处理的多种不同组合中第7天至第14天的产率。“+PMA”和“-PMA”分别指在分化过程的第4-6天期间SHH激动剂Purmorphamine的存在或不存在。条件A、条件B和条件E的黑条对应于使用包含MAPK/ERK抑制剂PD0325901、BMP抑制剂Dorsomorphin和视黄酸的分化混合物衍生的神经外胚层细胞,而条件C、条件D和条件F的灰条对应于使用其他信号传导调节剂衍生的神经外胚层细胞。图2B示出了与包括PMA的分化过程(先前过程(+PMA))相比,根据本公开内容中公开的分化方案的两个代表性运行(运行1和运行2)的不同时间点的步进产率。图2C描绘了根据本公开内容的两个代表性运行(运行1

和运行2)的一个uhESC的总体理论产率,并与包括PMA的分化过程(先前过程(+PMA))进行了比较。

[0036] 图3显示了根据本公开内容产生并通过免疫细胞化学染色的背神经外胚层祖细胞的代表性显微照片。针对DAPI、PAX7、PAX3和PAX6(上图,从左到右)以及DAPI和AP2(下图,从左到右)对背神经外胚层祖细胞进行染色。染色的细胞在IN Cell Analyzer 2000上成像。比例尺代表200μm,并适用于图中的所有图像。

[0037] 图4显示了根据本公开内容产生并通过免疫细胞化学染色的神经胶质祖细胞的聚集体的代表性显微照片。针对DAPI、PAX7、PAX3和PAX6(上图,从左到右)和DAPI、AP2和NG2(下图,从左到右)对神经胶质祖细胞进行染色。染色的细胞在IN Cell Analyzer 2000上成像。比例尺代表200μm,并适用于图中的所有图像。

[0038] 图5显示了根据本公开内容产生并通过免疫细胞化学染色的少突胶质祖细胞的代表性显微照片。针对DAPI和NG2(上图,从左到右)以及DAPI和AP2(下图,从左到右)对少突胶质祖细胞进行免疫细胞化学染色。染色的细胞在IN Cell Analyzer 2000上成像。比例尺代表200μm,并适用于图中的所有图像。

[0039] 图6显示了使用不同小分子组合分化成背神经外胚层祖细胞(dNPC)的uhESC的第7天基因表达谱的相关图。每个相关图显示了用PD0325901加Dorsomorphin处理的细胞的第7天基因表达谱与每个图的y轴上指示的替代小分子组合的比较。对于每个图,数据点代表通过Fluidigm qPCR评估并如实施例7中所述计算为标准化ΔCT的96个基因中的每一个。R平方值显示在每个图的左上角,并使用JMP软件(SAS,Cary,NC,USA)基于最佳拟合线计算。

发明详述

[0041] 本描述并非旨在成为可以实施本公开内容的所有不同方式或可以添加到本公开内容的所有特征的详细目录。例如,关于一个实施方案举例说明的特征可以并入到其他实施方案中,并且关于特定实施方案举例说明的特征可以从该实施方案中删除。因此,本公开内容预期在本公开内容的一些实施方案中,可以排除或省略在此阐述的任何特征或特征的组合。此外,根据本公开内容,对本文提出的各种实施方案的许多变化和添加对于本领域技术人员来说将是明显的,其没有脱离本公开内容。在其他情况下,为了避免不必要地混淆本发明,没有详细示出众所周知的结构、接口和过程。意图本说明书的任何部分都不被解释为影响对本发明全部范围的任何部分的否定。因此,以下描述旨在举例说明本公开内容的一些特定方面,而不是详尽地指定其所有排列、组合和变化。

[0042] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开内容所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。本文公开的描述中使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并且不旨在限制本公开内容。

[0043] 本文引用的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献均通过引用整体并入。

[0044] 除非上下文另有说明,否则特别意图本文描述的本公开内容的各种特征可以以任何组合使用。此外,本公开内容还设想在本公开内容的一些实施方案中,可以排除或省略本文阐述的任何特征或特征的组合。

[0045] 本文公开的方法可包括用于实现所述方法的一个或多个步骤或动作。在不脱离本发明的范围的情况下,方法步骤和/或动作可以彼此互换。换言之,除非该方面的正确操作

需要步骤或动作的特定顺序,否则在不脱离本发明的范围的情况下可以修改特定步骤和/或动作的顺序和/或使用。

[0046] 如在本公开内容的描述和所附权利要求中使用的,单数形式“一个”、“一种”和“该”也旨在包括复数形式,除非上下文另有明确指示。

[0047] 如本文所用,“和/或”是指并且涵盖一个或多个相关所列项目的任何和所有可能组合,以及当以替代方式(“或”)解释时缺少组合。

[0048] 如本文所用的术语“约”和“大约”在提及可测量值例如百分比、密度、体积等时,意在包括指定量的±20%、±10%、±5%、±1%、±0.5%或甚至±0.1%的变化。

[0049] 如本文所用,诸如“在X与Y之间”和“在约X与Y之间”的短语应被解释为包括X与Y。如本文所用,诸如“在约X与Y之间”的短语意指“在约X与约Y之间”以及诸如“从约X到Y”的短语意指“从约X到约Y”。

[0050] 如本文所用,“少突胶质祖细胞”(OPC)是指在中枢神经系统中发现的细胞,其属于神经外胚层/神经胶质谱系,表达特征性标志物神经/神经胶质抗原2(NG2)并且能够分化为少突胶质细胞。

[0051] 术语“神经胶质谱系细胞”、“神经胶质祖细胞”和“神经胶质细胞”在本文中可互换使用并且指源自神经外胚层/神经祖细胞的非神经元CNS细胞。神经胶质祖细胞可以进一步分化为OPC/少突胶质细胞或星形胶质细胞。在某些实施方案中,本公开内容的神经胶质祖细胞表达一种或多种选自钙电压门控通道辅助亚基γ4(CACNG4)、脂肪酸结合蛋白7(FABP7)和轴突导向因子(netrin)-1受体(DCC)的标志物。

[0052] 术语“神经外胚层”、“神经外胚层细胞”、“神经外胚层前体”、“神经外胚层祖细胞”、“神经祖细胞”和“神经前体”在本文中可互换使用并且指可沿神经前体途径分化并且能够形成中枢神经系统神经元、少突胶质细胞、星形胶质细胞和室管膜细胞的细胞。在某些实施方案中,本公开内容的神经外胚层细胞表达一种或多种选自配对盒6(PAX6)、Hes家族BHLH转录因子5(HES5)和含锌指和BTB结构域16(ZBTB16)的标志物。

[0053] 如本文所用,术语“背侧”和“腹侧”是指从沿着发育中的脊髓中的神经管的背腹轴排列成空间离散域的祖细胞出现的不同神经细胞亚型。这个过程(被称为背腹模式化)由划分神经祖细胞的分泌信号控制。BMP和Wnt信号传导从背神经管起始模式化(Lee和Jessell,1999Annu.Rev.Neurosci.22:261-294),而SHH的分泌在建立腹侧神经元细胞命运中起关键作用(Chiang等人,1996Nature 383:407-413;Ericson等人,1996Cell 87:661-683;Briscoe等人,2001Mol.Cell7:1279-1291)。

[0054] 术语“背神经外胚层祖细胞”、“背神经祖细胞”和“dNPC”在本文中可互换使用,并且是指具有背脊髓表型并已通过在没有外源性SHH或SHH信号传导活化剂的情况下将多能干细胞分化为神经外胚层限制性前体而获得的神经祖细胞。在某些实施方案中,dNPC表达一种或多种选自配对盒3(PAX3)、配对盒7(PAX7)和活化蛋白2(AP2)的标志物。

[0055] 如本文所用,术语“胚状体”(EB)是指源自多能干细胞的三维细胞聚集体,其经历了向所有三个胚层的自发分化。当从抑制分化的培养条件中移出多能干细胞时,形成EB。例如,在人胚胎干细胞的情况下,从培养基中去除碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和转化生长因子β(TGFβ)导致向所有三个胚层的自发分化和EB的形成。

[0056] 如本文所用,术语“BMP信号传导抑制剂”是指能够下调沿骨形态发生蛋白(BMP)信

号传导途径的信号传导的小分子或蛋白质调节剂。在某些实施方案中,BMP信号传导抑制剂直接靶向活化素A受体I型(ACVR1),也称为活化素受体样激酶2(ALK2)。在某些实施方案中,BMP信号传导抑制剂选自Dorsomorphin、DMH-1、K02288、ML347、LDN193189和Noggin蛋白。

[0057] 如本文所用,术语“MAPK/ERK抑制剂”是指抑制MAPK/ERK激酶的小分子或蛋白质调节剂。在某些实施方案中,MAPK/ERK抑制剂选自PD0325901、AZD6244、GSK1120212、PD184352和考比替尼。

[0058] 术语“SHH信号传导活化剂”、“SHH信号传导激动剂”、“SHH活化剂”和“SHH激动剂”在本文中可互换使用并且指能够活化Sonic Hedgehog(SHH)信号传导途径的小分子或蛋白质调节剂。SHH信号传导活化剂的非限制性实例包括Purmorphamine(PMA)、Smoothened Agonist(SAG,CAS 364590-63-6)和Sonic Hedgehog(SHH)蛋白。

[0059] 如本文所用,术语“不需要的细胞类型”是指神经外胚层谱系之外的细胞,其可在植入后导致异位组织的形成,或导致在包囊测定中一个或多个包囊的形成,如本文所述。在一个实施方案中,“不需要的细胞类型”可以包括上皮谱系细胞,例如CD49f(神经祖细胞和上皮细胞表达的标志物)阳性的细胞或CLDN6或EpCAM(多能细胞和上皮细胞表达的两种标志物)阳性的细胞。

[0060] 如本文所用,“植入”或“移植”是指使用合适的递送技术(例如,使用注射装置)将细胞群施用到目标组织中。

[0061] 如本文所用,“受试者”是指动物或人。

[0062] 如本文所用,“有此需要的受试者”是指中枢神经系统组织受损的动物或人。在一个实施方案中,动物或人正在经历运动功能的丧失。

[0063] 术语“中枢神经系统”和“CNS”在本文中可互换使用,并且是指控制身体的一种或多种活动的神经组织复合体(包括但不限于脊椎动物的脑和脊髓)。

[0064] 如本文所用,关于病况或疾病的“治疗”或“医治”是用于获得有益的或期望的结果(优选包括在患者中出现病况或疾病之后的临床结果)的方法。关于疾病的有益或期望的结果包括但不限于以下一项或多项:改善与疾病相关的病况、治愈疾病、减轻疾病的严重性、延缓疾病的进展、减轻与疾病相关的一个或多个症状、提高患有疾病的人的生活质量、延长存活以及它们的任何组合。同样,出于本公开内容的目的,关于病况的有益或期望的结果包括但不限于以下一项或多项:改善病况、治愈病况、减轻病况的严重性、延缓病况的进展、减轻与病况相关的一个或多个症状、提高患有病况的人的生活质量、延长存活以及它们的任何组合。

[0065] 未分化多能干细胞的增殖和培养

[0066] 可以使用任何合适的多能干细胞作为起始材料进行根据本公开内容的多能干细胞的分化。在一个实施方案中,一种方法可以对人胚胎干细胞(hESC)系进行。在另一个实施方案中,一种方法可以使用诱导多能干细胞(iPSC)进行。在另一个实施方案中,一种方法可以使用源自H1、H7、H9、H13或H14细胞系的细胞进行。在另一个实施方案中,一种方法可以对灵长类多能干(pPS)细胞系进行。在又一个实施方案中,一种方法可以使用源自孤雌生殖体(其是受刺激以产生hESC而无需受精的胚胎)的未分化的干细胞进行。

[0067] 未分化的多能干细胞的增殖和培养的方法之前已经描述过。关于多能干细胞的组织和细胞培养,读者可能希望参考本领域可获得的众多出版物中的任何一种,例如

Teratocarcinomas and Embryonic Stemcells:A Practical Approach(E.J.Robertson, Ed.,IRL Press Ltd.1987);Guide to Techniques in Mouse Development (P.M.Wasserman等人,Eds.,Academic Press 1993);Embryonic Stem Cell Differentiation in Vitro(M.V.Wiles,Meth.Enzymol.225:900,1993);Properties and Uses of Embryonic Stem Cells:Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy(P.D.Rathjen等人,Reprod.Fertil.Dev.10:31,1998;和R.I.Freshney, Culture of Animal Cells,Wiley-Liss,New York,2000)。

[0068] 未分化的多能干细胞可以在不添加饲养细胞的情况下维持在未分化状态(参见,例如,(2004)Rosler等人,Dev.Dynam.229:259)。无饲养层培养物通常由含有促进细胞增殖而不分化的因子的营养培养基支持(参见例如美国专利号6,800,480)。在一个实施方案中,可以使用含有这些因子的条件培养基。条件培养基可以通过将分泌这些因子的细胞与培养基培养来获得。合适的细胞包括但不限于经辐照(~4,000Rad)的原代小鼠胚胎成纤维细胞、端粒化小鼠成纤维细胞或源自pPS细胞的成纤维细胞样细胞(美国专利号6,642,048)。培养基可以通过在无血清培养基(例如补充有20%血清替代品和4ng/mL bFGF的敲除DMEM)中铺板饲养细胞来进行条件化。已条件化1-2天的培养基可以补充另外的bFGF,并用于支持pPS细胞培养物1-2天(参见,例如,WO01/51616;Xu等人,(2001)Nat.Biotechnol.19:971)。

[0069] 可替代地,可以使用新鲜或非条件培养基,其已经补充有促进未分化形式的细胞增殖的添加的因子(例如成纤维细胞生长因子或毛喉素)。非限制性实例包括基础培养基,例如补充有40-80ng/mL的bFGF并任选地包含SCF(15ng/mL)或Flt3配体(75ng/mL)的X-VIVO™10(Lonza,Walkersville,Md.)或QBSF™-60(Quality Biological Inc.Gaithersburg,Md.)(参见,例如,Xu等人,(2005)Stem Cells23(3):315)。这些培养基配方的优点是支持速度是其他系统的2-3倍的细胞生长(参见,例如,WO03/020920)。在一个实施方案中,未分化的多能细胞例如hES细胞可以在包含bFGF和TGFβ的培养基中培养。bFGF的非限制性实例浓度包括约80ng/ml。TGFβ的非限制性实例浓度包括约0.5ng/ml。在又一个实施方案中,未分化的多能干细胞可以保存在市售的完全培养基例如mTeSR™(Stem Cell Technologies,Vancouver,Canada)中。

[0070] 未分化的多能细胞可以在饲养细胞(通常是来自胚胎或胎儿组织的成纤维细胞)层上培养(Thomson等人,(1998)Science 282:1145)。饲养细胞可以来源于人或鼠来源。人饲养细胞可以从各种人组织中分离,或者可以通过人胚胎干细胞分化为成纤维细胞而衍生(参见,例如,WO01/51616)。可以使用的人饲养细胞包括但不限于胎盘成纤维细胞(参见,例如Genbacev等人,(2005)Fertil.Steril.83(5):1517),输卵管上皮细胞(参见,例如,Richards等人,(2002)Nat.Biotechnol.,20:933),包皮成纤维细胞(参见,例如,Amit等人,(2003)Biol.Reprod.68:2150),和子宫内膜细胞(参见,例如,Lee等人,(2005)Biol.Reprod.72(1):42)。

[0071] 各种固体表面可用于培养未分化的多能细胞。这些固体表面包括但不限于标准的市售组织培养瓶或细胞培养板,例如6孔、24孔、96孔或144孔板。其他固体表面包括但不限于微载体和圆盘。适用于培养未分化的多能细胞的固体表面可由多种物质制成,包括但不限于玻璃或塑料,例如聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚碳酸酯、聚四氟乙烯、melinex、thermanox或其组合。合适的表面可包含一种或多种聚合物,例如一种或多种丙烯酸酯。固体表面的形状

可以是三维的。三维固体表面的非限制性示例先前已经描述过,例如在美国专利公开号2005/0031598中。

[0072] 未分化的干细胞也可以在无饲养层的条件下在生长基底上生长。生长基底可以是**Matrigel®**基质(例如**Matrigel®**、**Matrigel®** GFR)、重组层粘连蛋白、层粘连蛋白-511重组片段E8或玻连蛋白。在本公开内容的某些实施方案中,生长基底是重组人层粘连蛋白-521(Biolamina,Sweden,由Corning Inc.,Corning,NY分销)。在其他实施方案中,基底是合成基底,例如**Synthemax®-II** SC基底。

[0073] 未分化的干细胞可以使用各种方法(例如使用胶原酶,或例如手工刮取)传代或继代培养。未分化的干细胞可以通过产生单细胞悬浮液的酶促手段(例如使用**Accutase®**(由Sigma Aldrich,MO分销)或类似的胰蛋白酶)进行继代培养。可替代地,未分化的干细胞可以使用非酶促手段(例如在PBS中的0.5mM EDTA,或例如使用ReLeSR™(Stem Cell Technologies,Vancouver,Canada))进行继代培养。

[0074] 在一个实施方案中,以允许细胞在约三至约十天内达到汇合的接种密度接种或继代培养多个未分化的干细胞。在一个实施方案中,接种密度的范围可以从约$6.0x10^3$个细胞/cm^2至约$5.0x10^5$个细胞/cm^2,例如约$1.0x10^4$个细胞/cm^2,例如约$5.0x10^4$个细胞/cm^2,例如约$1.0x10^5$个细胞/cm^2,或例如约$3.0x10^5$个细胞/cm^2的生长表面。在另一个实施方案中,接种密度的范围可以从约$6.0x10^3$个细胞/cm^2至约$1.0x10^4$个细胞/cm^2的生长表面,例如约$6.0x10^3$个细胞/cm^2至约$9.0x10^3$个细胞/cm^2,例如约$7.0x10^3$个细胞/cm^2至约$1.0x10^4$个细胞/cm^2,例如约$7.0x10^3$个细胞/cm^2至约$9.0x10^3$个细胞/cm^2,或例如约$7.0x10^3$个细胞/cm^2至约$8.0x10^3$个细胞/cm^2的生长表面。在又一个实施方案中,接种密度的范围可以从约$1.0x10^4$个细胞/cm^2至约$1.0x10^5$个细胞/cm^2的生长表面,例如约$2.0x10^4$个细胞/cm^2至约$9.0x10^4$个细胞/cm^2,例如约$3.0x10^4$个细胞/cm^2至约$8.0x10^4$个细胞/cm^2,例如约$4.0x10^4$个细胞/cm^2至约$7.0x10^4$个细胞/cm^2,或例如约$5.0x10^4$个细胞/cm^2至约$6.0x10^4$个细胞/cm^2的生长表面。在一个实施方案中,接种密度的范围可以从约$1.0x10^5$个细胞/cm^2至约$5.0x10^5$个细胞/cm^2的生长表面,例如约$1.0x10^5$个细胞/cm^2至约$4.5x10^5$个细胞/cm^2,例如约$1.5x10^5$个细胞/cm^2至约$4.0x10^5$个细胞/cm^2,例如约$2.0x10^5$个细胞/cm^2至约$3.5x10^5$个细胞/cm^2,或例如约$2.5x10^5$个细胞/cm^2至约$3.0x10^5$个细胞/cm^2的生长表面。

[0075] 根据本公开内容的方法,可以使用多种合适的细胞培养和继代培养技术中的任一种来培养干细胞。例如,培养基可以每天完全更换,在细胞的继代培养后约2天开始。在一个实施方案中,当培养物达到约90%的集落覆盖率时,可以使用一种或多种合适的试剂(例如,**Accutase®**)将细胞分离以获得用于定量的单细胞悬浮液并接种以进行后续培养。在一个实施方案中,未分化的干细胞然后可以在以允许细胞在合适的时间段内(例如,在约三至十天内)达到汇合的接种密度在合适的生长基底(例如重组人层粘连蛋白-521)上接种细胞之前进行继代培养。在一个实施方案中,未分化的干细胞可以使用胶原酶IV进行继代培养并在重组层粘连蛋白上扩增。在另一个实施方案中,未分化的干细胞可以使用胶原酶IV进行继代培养并在**Matrigel®**上扩增。在一个实施方案中,未分化的干细胞可以使用ReLeSR™进行继代培养并在重组人层粘连蛋白-521上扩增。

[0076] 对于接种未分化的干细胞,接种密度的范围可以从约$6.0x10^3$个细胞/cm^2至约

5.0x10^{5}个细胞/cm^2,例如约1.0x10^{4}个细胞/cm^2,例如约5.0x10^{4}个细胞/cm^2,例如约1.0x10^{5}个细胞/cm^2,或例如约3.0x10^{5}个细胞/cm^{2}的生长表面。在另一个实施方案中,接种密度的范围可以从约6.0x10^{3}个细胞/cm^{2}至约1.0x10^{4}个细胞/cm^{2}的生长表面,例如约6.0x10^{3}个细胞/cm^{2}至约9.0x10^{3}个细胞/cm^2,例如约7.0x10^{3}个细胞/cm^{2}至约1.0x10^{4}个细胞/cm^2,例如约7.0x10^{3}个细胞/cm^{2}至约9.0x10^{3}个细胞/cm^2,或例如约7.0x10^{3}个细胞/cm^{2}至约8.0x10^{3}个细胞/cm^{2}的生长表面。在又一个实施方案中,接种密度的范围可以从约1.0x10^{4}个细胞/cm^{2}至约1.0x10^{5}个细胞/cm^{2}的生长表面,例如约2.0x10^{4}个细胞/cm^{2}至约9.0x10^{4}个细胞/cm^2,例如约3.0x10^{4}个细胞/cm^{2}至约8.0x10^{4}个细胞/cm^2,例如约4.0x10^{4}个细胞/cm^{2}至约7.0x10^{4}个细胞/cm^2,或者例如约5.0x10^{4}个细胞/cm^{2}至约6.0x10^{4}个细胞/cm^{2}的生长表面。在一个实施方案中,接种密度的范围可以从约1.0x10^{5}个细胞/cm^{2}至约5.0x10^{5}个细胞/cm^{2}的生长表面,例如约1.0x10^{5}个细胞/cm^{2}至约4.5x10^{5}个细胞/cm^2,例如约1.5x10^{5}个细胞/cm^{2}至约4.0x10^{5}个细胞/cm^2,例如约2.0x10^{5}个细胞/cm^{2}至约3.5x10^{5}个细胞/cm^2,或例如约2.5x10^{5}个细胞/cm^{2}至约3.0x10^{5}个细胞/cm^{2}的生长表面。

[0077] 人多能干细胞分化为背神经外胚层祖细胞,并进一步分化为背源性神经胶质祖细胞和少突胶质祖细胞

[0078] 本公开内容提供了使用BMP信号传导的小分子和蛋白质调节剂和MAPK/ERK激酶的抑制剂的组合将人多能干细胞分化为具有背脊髓表型的神经外胚层并进一步分化为神经胶质祖细胞和少突胶质祖细胞的方法。不受任何特定理论的束缚,本发明人已经发现,根据本公开内容的方法获得的人背神经外胚层祖细胞可以在不存在SHH信号传导的活化的情况下容易且有效地分化成脊髓OPC。令人惊讶的是,这种早期背侧表型(尽管不是体内早期OPC生成的区域)在分化过程的第21天产生神经胶质祖细胞,并在分化过程的第42天产生OPC。根据本公开内容产生的第42天OPC表达经典OPC标志物NG2和PDGFRα,并且与使用当前在临床测试中用于治疗脊髓损伤的替代方法产生的OPC相当(就它们的整体标志物表达谱而言)。

[0079] 此外,本发明人已经发现,与其中活化SHH信号传导的分化方案相比,本公开内容的方法产生显著更多数量的分化的细胞,从而提供用于产生大量背神经外胚层祖细胞和他们的后代例如神经胶质祖细胞或OPC以用于下游应用的可扩展过程。

[0080] 在一个实施方案中,一种方法包括使人多能干细胞接触与骨形态发生蛋白(BMP)信号传导的一种或多种抑制剂相结合的丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶(MAPK/ERK)的一种或多种抑制剂。在某些实施方案中,MAPK/ERK抑制剂是小分子。在其他实施方案中,MAPK/ERK抑制剂是蛋白质,例如使MAPK/ERK激酶去磷酸化的磷酸酶。在某些实施方案中,BMP信号传导的抑制剂是小分子。在其他实施方案中,BMP信号传导的抑制剂是蛋白质。在一些实施方案中,BMP信号传导的抑制剂的直接靶标是ALK2,也称为活化素A受体I型(ACVR1)。在某些实施方案中,在MAPK/ERK和BMP信号传导抑制之后,在尾化剂视黄酸的存在下培养细胞,从而获得具有背脊髓表型的神经外胚层限制性祖细胞。

[0081] 在某些实施方案中,MAPK/ERK抑制剂可以选自PD0325901、AZD6244、GSK1120212、PD184352和考比替尼及其衍生物。在某些实施方案中,BMP信号传导的抑制剂可选自Dorsomorphin、DMH-1、K02288、ML347、LDN193189和Noggin蛋白。

[0082] 在一个实施方案中,一种方法包括获得保持未分化状态的未分化的人多能干细

胞;在小分子PD0325901和Dorsomorphin和视黄酸的存在下将未分化的人多能干细胞贴壁培养第一时间段;并且随后在存在视黄酸且不存在SHH信号传导活化剂的情况下将细胞贴壁培养第二时间段,从而获得背神经外胚层细胞,如图1所示。在一个实施方案中,第一时间段和第二时间段可以各自为约一至约六天,例如约一天,例如约两天,例如约三天,例如约四天,例如约五天,或例如约六天。

[0083] 在一个实施方案中,一种方法包括在浓度范围为约1μM至约100μM,例如约2μM,例如约3μM,例如约4μM,例如约5μM,例如约6μM,例如约7μM,例如约8μM,例如约9μM,例如约10μM,例如约11μM,例如约12μM,例如约13μM,例如约14μM,例如约15μM,例如约20μM,例如约30μM,例如约40μM,例如约50μM,或例如约60μM、70μM、80μM或90μM的PD0325901的存在下培养未分化的人多能干细胞。在另一个实施方案中,一种方法包括在约10μM浓度的PD0325901的存在下培养未分化的人多能干细胞。

[0084] 在一个实施方案中,一种方法包括在浓度范围为约1μM至约100μM,例如约2μM,例如约3μM,例如约4μM,例如约5μM,例如约6μM,例如约7μM,例如约8μM,例如约9μM,例如约10μM,例如约11μM,例如约12μM,例如约13μM,例如约14μM,例如约15μM,例如约20μM,例如约30μM,例如约40μM,例如约50μM,或例如约60μM、70μM、80μM或90μM的AZD6244的存在下培养未分化的人多能干细胞。在另一个实施方案中,一种方法包括在约10μM浓度的AZD6244的存在下培养未分化的人多能干细胞。

[0085] 在一个实施方案中,一种方法包括在浓度范围为约1μM至约100μM,例如约2μM,例如约3μM,例如约4μM,例如约5μM,例如约6μM,例如约7μM,例如约8μM,例如约9μM,例如约10μM,例如约11μM,例如约12μM,例如约13μM,例如约14μM,例如约15μM,例如约20μM,例如约30μM,例如约40μM,例如约50μM,或例如约60μM、70μM、80μM或90μM的GSK1120212或PD0325901的存在下培养未分化的人多能干细胞。在另一个实施方案中,一种方法包括在约10μM浓度的GSK1120212的存在下培养未分化的人多能干细胞。

[0086] 在一个实施方案中,一种方法包括在浓度范围为约1μM至约100μM,例如约2μM,例如约3μM,例如约4μM,例如约5μM,例如约6μM,例如约7μM,例如约8μM,例如约9μM,例如约10μM,例如约11μM,例如约12μM,例如约13μM,例如约14μM,例如约15μM,例如约20μM,例如约30μM,例如约40μM,例如约50μM,或例如约60μM、70μM、80μM或90μM的PD184352的存在下培养未分化的人多能干细胞。在另一个实施方案中,一种方法包括在约10μM浓度的PD184352的存在下培养未分化的人多能干细胞。

[0087] 在一个实施方案中,一种方法包括在浓度范围为约1μM至约100μM,例如约2μM,例如约3μM,例如约4μM,例如约5μM,例如约6μM,例如约7μM,例如约8μM,例如约9μM,例如约10μM,例如约11μM,例如约12μM,例如约13μM,例如约14μM,例如约15μM,例如约20μM,例如约30μM,例如约40μM,例如约50μM,或例如约60μM、70μM、80μM或90μM的考比替尼的存在下培养未分化的人多能干细胞。在另一个实施方案中,一种方法包括在约10μM浓度的考比替尼的存在下培养未分化的人多能干细胞。

[0088] 在一个实施方案中,一种方法包括在浓度范围为约0.2μM至约20μM,例如约0.5μM,例如约0.8μM,例如约1μM,例如约1.5μM,例如约2μM,例如约2.5μM,例如约3μM,例如约3.5μM,例如约4μM,例如约4.5μM,例如约5μM,例如约5.5μM,例如约6μM,例如约6.5μM,例如约7μM,例如约7.5μM,例如约8μM,例如约8.5μM,例如约9μM,例如约10μM,例如约11μM,例如约12μ

M,例如约13μM,例如约14μM,例如约15μM,例如约16μM,例如约17μM,例如约18μM,或例如约19μM的Dorsomorphin的存在下培养未分化的人多能干细胞。在另一个实施方案中,一种方法包括在浓度范围为约0.2μM至约1μM,例如约0.2μM至约0.9μM,例如约0.3μM至约0.8μM,例如约0.4μM至约0.7μM,或例如约0.5μM至约0.6μM的Dorsomorphin的存在下培养未分化的人多能干细胞。在又一个实施方案中,一种方法包括在浓度范围为约1μM至约10μM,例如约1μM至约9μM,例如约2μM至约8μM,例如约3μM至约7μM,或例如约4μM至约6μM的Dorsomorphin的存在下培养未分化的人多能干细胞。在一个实施方案中,一种方法包括在浓度范围为约10μM至约20μM,例如约10μM至约19μM,例如约12μM至约18μM,例如约13μM至约17μM,或例如约14μM至约16μM的Dorsomorphin的存在下培养未分化的人多能干细胞。在一个实施方案中,一种方法包括在约2μM浓度的Dorsomorphin的存在下培养未分化的人多能干细胞。

[0089] 在一个实施方案中,一种方法包括在浓度范围为约1nM至约20μM,例如约10nM、约50nM、约100nM、约150nM、约200nM、约500nM、约1μM、约5μM、约10μM或约15μM的ALK2抑制剂的存在下培养未分化的人多能干细胞。

[0090] 在一个实施方案中,一种方法包括在浓度范围为约1μM至约10μM的DMH-1的存在下培养未分化的人多能干细胞。在一个实施方案中,一种方法包括在约2μM的DMH-1的存在下培养未分化的人多能干细胞。

[0091] 在一个实施方案中,一种方法包括在浓度范围为约1μM至约10μM的K02288的存在下培养未分化的人多能干细胞。在一个实施方案中,一种方法包括在约2μM的K02288的存在下培养未分化的人多能干细胞。

[0092] 在一个实施方案中,一种方法包括在浓度范围为约1μM至约10μM的ML347的存在下培养未分化的人多能干细胞。在一个实施方案中,一种方法包括在约2μM的ML347的存在下培养未分化的人多能干细胞。

[0093] 在一个实施方案中,一种方法包括在浓度范围为约1μM至约10μM的LDN193189的存在下培养未分化的人多能干细胞。在一个实施方案中,一种方法包括在约2μM的LDN193189的存在下培养未分化的人多能干细胞。

[0094] 根据本公开内容,适用于贴壁细胞培养的任何组织培养容器均可用于获得背神经外胚层祖细胞。合适的生长基底包括例如重组层粘连蛋白、玻连蛋白、层粘连蛋白-511重组片段E8或**Matrigel®**基质(例如**Matrigel®**、**Matrigel®**GFR)。在本公开内容的某些实施方案中,生长基底是重组人层粘连蛋白-521(Biolamina,Sweden,由Corning Inc.,Corning,NY分销)。在其他实施方案中,基底是合成基底,例如**Synthemax®-II**SC基底。

[0095] 在一个实施方案中,可以收获根据本公开内容获得的背神经外胚层祖细胞并在bFGF和EGF的存在下作为悬浮培养物中的聚集体进一步培养直到细胞成熟为神经胶质祖细胞。在一个实施方案中,进一步培养期的范围可以从约五天至十五天,例如约五天、约六天、约七天、约八天、约九天、约十天、约十一天、约十二天、约十三天、约十四天或约十五天。在一个实施方案中,进一步培养期为约7天。

[0096] 在一个实施方案中,贴壁培养的背神经外胚层祖细胞可以通过酶促手段收获,例如使用TrypLE™Select(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)、**Accutase®**(Sigma Aldrich,MO)或类似的胰蛋白酶。可替代地,贴壁培养的背神经外胚层祖细胞可以使用非酶促手段收获,例如使用PBS中的0.5mM EDTA,或例如使用ReLeSR™(Stem Cell

Technologies,Vancouver,Canada)。

[0097] 适用于悬浮培养的任何细胞培养容器或反应器均可用于本公开内容中考虑的非贴壁培养步骤。容器壁通常是惰性的或对培养细胞的粘附有抵抗性。对于动态悬浮,也有防止细胞沉降的手段,例如搅拌机构,例如磁力或机械驱动的搅拌棒或桨、摇动机构(通常从外部连接到容器)或反转机构(即旋转容器以改变细胞上的重力方向的装置)。

[0098] 适合用于工艺开发的悬浮培养的容器包括通常范围的可商购获得的旋转器、旋转瓶、摇袋或摇瓶。适合商业生产的示例性生物反应器包括VerticalWheel™生物反应器(PBS Biotech,Camarillo,CA)。

[0099] 也可以在动态悬浮之前形成聚集体。例如,细胞可以放置在AggreWell™板上以生成均匀的细胞聚集体。大约三天后,细胞聚集体可以转移到动态悬浮液中。

[0100] 在一个实施方案中,根据本公开内容获得的神经胶质祖细胞可以被收获、铺板并在表皮生长因子(EGF)的存在下贴壁培养另外的一段时间,直到细胞成熟为少突胶质祖细胞。在某些实施方案中,培养基另外包含血小板衍生生长因子AA(PDGF-AA)。在一个实施方案中,进一步培养期的范围可以从约十天至三十天,例如约十天、约十五天、约二十天、约二十五天或者约三十天。在一个实施方案中,进一步培养期的范围为约十五至二十五天,例如约十五天、约十六天、约十七天、约十九天、约二十天、约二十一天、约二十二天、约二十三天、约二十四天或约二十五天。在一个实施方案中,进一步培养期为约二十一天。

[0101] OPC组合物

[0102] 本公开内容的方法可用于获得适合于细胞疗法的包含少突胶质祖细胞(OPC)的组合物。根据本公开内容获得的OPC表达高水平的OPC特征性的蛋白多糖NG2、PDGFRα和/或GD3和低水平的与不需要的细胞类型相关的非OPC相关标志物,例如CD49f,其可由神经祖细胞和上皮细胞表达并与体外包囊形成有关(Debnath J,Muthuswamy SK,Brugge JS.Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10Amammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures.2003Methods.3:256-68),或CLDN6和EpCAM,其是由多能细胞和上皮细胞表达的两种标志物(Lin D,Guo Y,Li Y,Ruan Y,Zhang M,Jin X,Yang M,Lu Y,Song P,Zhao S,Dong B,Xie Y,Dang Q,Quan C.Bioinformatic analysis reveals potential properties of human Claudin-6regulation and functions.Oncol Rep.2017Aug;38(2):875-885;Huang L,Yang Y,Yang F,Liu S,Zhu Z,Lei Z,Guo J.Functions of EpCAM in physiological processes and diseases (Review).Int J Mol Med.2018Oct;42(4):1771-1785)。

[0103] 在某些实施方案中,根据本公开内容产生的OPC是人多能干细胞的体外分化后代。在某些实施方案中,根据本公开内容获得的OPC是人胚胎干细胞的体外分化后代。在其他实施方案中,根据本公开内容获得的OPC是诱导多能干(iPS)细胞的体外分化后代。

[0104] 获得的OPC群体的一个或多个特征可以通过使用流式细胞术定量各种细胞标志物来确定,例如,以确定对特定标志物或标志物组阳性的细胞群体的百分比或鉴定OPC群体中存在的不需要的细胞类型。

[0105] 根据本公开内容获得的OPC群体可包含约30%至约100%的NG2阳性细胞,例如至少约35%,例如至少约40%,例如至少约45%,例如至少约50%,例如至少约55%,例如至少约60%,例如至少约65%,例如至少约70%,例如至少约75%,例如至少约80%,例如至少约

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

[0106] 根据本公开内容获得的OPC群体可包含约30％至约100％的PDGFRα阳性细胞,例如至少约35％,例如至少约40％,例如至少约45％,例如至少约50％,例如至少约55％,例如至少约60％,例如至少约65％,例如至少约70％,例如至少约75％,例如至少约80％,例如至少约85％,例如至少约90％,例如至少约95％,例如至少约98％,例如至少约99％,例如至少约99.5％,例如至少约99.8％,或例如至少约99.9％的PDGFRα阳性细胞。在某些实施方案中,根据本公开内容获得的OPC群体可包含约45％至约75％的PDGFRα阳性细胞,例如约45％至约50％,例如约50％至约55％,例如约55％至约60％,例如约60％至约65％,例如约65％至约70％,例如约70％至约75％,例如约50％至约70％,例如约55％至约65％,或例如约58％至约63％的PDGFRα阳性细胞。在其他实施方案中,根据本公开内容获得的OPC群体可包含约60％至约90％的PDGFRα阳性细胞,例如约60％至约65％,例如约65％至约70％的阳性细胞。

[0107] 根据本公开内容获得的OPC群体可包含约30％至约100％的GD3阳性细胞,例如至少约35％,例如至少约40％,例如至少约45％,例如至少约50％,例如至少约55％,例如至少约60％,例如至少约65％,例如至少约70％,例如至少约75％,例如至少约80％,例如至少约85％,例如至少约90％,例如至少约95％,例如至少约98％,例如至少约99％,例如至少约99.5％,例如至少约99.8％,或例如至少约99.9％的GD3阳性细胞。在某些实施方案中,根据本公开内容获得的OPC群体可包含约45％至约75％的GD3阳性细胞,例如约45％至约50％,例如约50％至约55％,例如约55％至约60％,例如约60％至约65％,例如约65％至约70％,例如约70％至约75％,例如约50％至约70％,例如约55％至约65％,或例如约58％至约63％的GD3阳性细胞。在其他实施方案中,根据本公开内容获得的OPC群体可包含约60％至约90％的GD3阳性细胞,例如约60％至约65％,例如约65％至约70％的阳性细胞。

[0108] 在一个实施方案中,根据本公开内容获得的OPC群体能够在如本公开内容的实施例8中所述的包囊测定中每100,000个细胞形成少于或等于四个上皮包囊。在另一个实施方案中,根据本公开内容获得的OPC群体能够在包囊测定中每100,000个细胞形成少于或等于三个上皮包囊。在另一个实施方案中,根据本公开内容获得的OPC群体能够在包囊测定中每100,000个细胞形成少于或等于两个上皮包囊。在又一个实施方案中,根据本公开内容获得的OPC群体能够在如本公开内容的实施例8中所述的包囊测定中每100,000个细胞形成少于或等于一个上皮包囊。

[0109] 不需要的细胞类型

[0110] 根据本公开内容获得的OPC群体包含低水平的不需要的细胞类型,如例如通过流式细胞术对与不需要的细胞类型相关的标志物进行量化来测量的。在一个非限制性实例中,根据本公开内容获得的第42天OPC可以含有低水平的表达上皮细胞相关标志物EpCAM、CD49f和CLDN6的细胞。

[0111] 与不需要的细胞类型相关的标志物可包含小于约20%的不需要的细胞类型,例如小于约19%,例如小于约18%,例如小于约17%,例如小于约16%,例如小于约15%,例如小于约14%,例如小于约13%,例如小于约12%,例如小于约11%,例如小于约10%,例如小于约9%,例如小于约8%,例如小于约7%,例如小于约6%,例如小于约5%,例如小于约4%,例如小于约3%,例如小于约2%,例如小于约1%,例如小于约0.5%,例如小于约0.1%,例如小于约0.05%,或例如小于约0.01%的不需要的细胞类型。在另一个实施方案中,细胞群可包含约15%至约20%的不需要的细胞类型,例如约19%至约20%,例如约18%至约20%,例如约17%至约20%,例如约16%至约20%,例如约15%至约19%,或例如约16%至约18%的不需要的细胞类型。在又一个实施方案中,细胞群可包含约10%至约15%的不需要的细胞类型,例如约14%至约15%,例如约13%至约15%,例如约12%至约15%,例如约11%至约15%,或例如约12%至约14%的不需要的细胞类型。在一个实施方案中,细胞群可包含约1%至约10%的不需要的细胞类型,例如约2%至约10%,例如约1%至约9%,例如约2%至约8%,例如约3%至约7%,或例如约4%至约6%的不需要的细胞类型。在一个实施方案中,细胞群可包含约0.1%至约1%的不需要的细胞类型,例如约0.2%至约1%,例如约0.1%至约0.9%,例如约0.2%至约0.8%,例如约0.3%至约0.7%,或例如约0.4%至约0.6%的不需要的细胞类型。在一个实施方案中,细胞群可包含约0.01%至约0.1%的不需要的细胞类型,例如约0.02%至约0.1%,例如约0.01%至约0.09%,例如约0.02%至约0.08%,例如约0.03%至约0.07%,或例如约0.04%至约0.06%的不需要的细胞类型。在一个实施方案中,低水平的不需要的细胞类型可以表示存在少于约15%的不需要的细胞类型。

[0112] 在一个实施方案中,不需要的细胞类型可以包括表达选自CD49f、CLDN6或EpCAM的一种或多种标志物的细胞。

[0113] 冷冻保存

[0114] 在收获之后,可以以特定的治疗剂量(例如,细胞数量)配制OPC的扩增的群体并冷冻保存以运送到诊所。然后可以在解冻后直接施用即用型(RTA)OPC治疗组合物而无需进一步处理。适用于冷冻保存的培养基的实例包括但不限于90%人血清/10%DMSO、培养基310%(CS10)、培养基2 5%(CS5)和培养基1 2%(CS2)、Stem Cell Banker、PRIME XV® FREEZIS、HYPOTHERMASOL®、CSB、海藻糖等。

[0115] 在一些实施方案中,在冷冻保存培养基中储存约0至约8小时的过滤后的细胞的存活百分比为至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在其他实施方案中,在冷冻保存培养基中储存约0至约8小时的过滤后的细胞的回收百分比为至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0116] 在进一步的实施方案中,在中和培养基中储存约0至约8小时然后在冷冻保存培养基中储存约0至约8小时的过滤后的细胞的存活百分比为至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在其他实施方案中,在中和培养基中储存约0至约8小时然后在冷冻保存培养基中储存约0至约8小时的过滤后的细胞的回收百分比为至少约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0117] 在其他实施方案中,在中和培养基中储存约0至约8小时然后在冷冻保存培养基中

储存约0至约8小时的过滤后的细胞在冷冻保存的组合物解冻后的存活百分比为至少约75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％。在其他实施方案中,在中和培养基中储存约0至约8小时然后在冷冻保存培养基中储存约0至约8小时的过滤后的细胞在冷冻保存的组合物解冻后的回收百分比为至少约70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％。

[0118] 在一些实施方案中,在中和培养基中储存约0至约8小时然后在冷冻保存培养基中储存约0至约8小时的过滤后的OPC在冷冻保存的组合物解冻后能够分泌饰胶蛋白聚糖。在其他实施方案中,在中和培养基中储存约0至约8小时然后在冷冻保存培养基中储存约0至约8小时的过滤后的OPC在冷冻保存的组合物解冻后能够被扩增。

[0119] 在一些实施方案中,在室温下在中和培养基中储存约0至约8小时的过滤后的OPC的存活百分比为至少约70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％。在一些实施方案中,在室温下在冷冻保存培养基中储存约0至约8小时的过滤后的OPC的存活百分比为至少约70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％。在进一步的实施方案中,在室温下在中和溶液中储存约0至约8小时然后在室温下在冷冻保存培养基中储存约0至约8小时的过滤后的细胞的存活百分比为至少约75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％。在更进一步的实施方案中,在室温下在中和溶液中储存约0至约8小时然后在室温下在冷冻保存培养基中储存约0至约8小时的过滤后的细胞的回收百分比为至少约75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％、100％、105％、110％、115％、120％、125％、130％、140％、150％。

[0120] 在适用于解冻后即用型(RTA)应用的冷冻保存培养基中配制的OPC可以包含悬浮在腺苷、葡聚糖-40、乳糖酸、HEPES(N-(2-羟乙基)哌嗪-N’-(2-乙磺酸))、氢氧化钠、L-谷胱甘肽、氯化钾、碳酸氢钾、磷酸钾、葡萄糖、蔗糖、甘露醇、氯化钙、氯化镁、氢氧化钾、氢氧化钠、二甲基亚砜(DMSO)和水中的OPC。这种冷冻保存培养基的一个实例可以商品名**CRYOSTOR®**商购获得并且由BioLife Solutions,Inc.制造。

[0121] DMSO可用作冷冻保护剂以防止冰晶的形成,冰晶可在冷冻保存过程中杀死细胞。在一些实施方案中,可冷冻保存的OPC治疗组合物包含约0.1％至约2％的DMSO(v/v)。在一些实施方案中,RTA OPC治疗组合物包含约1％至约20％的DMSO。在一些实施方案中,RTA OPC治疗组合物包含约10％的DMSO。在一些实施方案中,RTA OPC细胞治疗组合物包含约5％的DMSO。

[0122] 在一些实施方案中,在适合于解冻后即用型(RTA)应用的冷冻保存培养基中配制的OPC疗法可以包括悬浮在不含DMSO的冷冻保存培养基中的OPC。例如,RTA OPC治疗细胞组合物可包含悬浮于不含DMSO(二甲基亚砜、$(CH_3)_2SO$)或任何其他偶极非质子溶剂的Trolox、Na+、K+、Ca2+、Mg2+、c1-、H2PO4-、HEPES、乳糖酸盐、蔗糖、甘露醇、葡萄糖、葡聚糖-40、腺苷、谷胱甘肽中的OPC。这种冷冻保存培养基的一个实例可以以商品名**HYPOTHERMOSOL®**或**HYPOTHERMOSOL®-FRS**商购获得,并且也由BioLife Solutions,Inc.制造。在其他实施方案中,在适用于解冻后即用型应用的冷冻保存培养基中配制的OPC组合物可以包括悬浮在海藻糖中的OPC。

[0123] RTA OPC治疗组合物可任选地包含支持OPC植入、整合、存活、效力等的附加因子。

在一些实施方案中,RTA OPC治疗组合物包含本文所述的OPC制剂的功能活化剂。

[0124] 在一些实施方案中,RTA OPC治疗组合物可以在包含通过清除自由基、pH缓冲、膨胀/渗透支持和维持离子浓度平衡来降低冷冻和解冻过程中的分子细胞应激的成分的培养基中配制。

[0125] 在一些实施方案中,在适用于解冻后即用型应用的冷冻保存培养基中配制的OPC疗法可包含一种或多种免疫抑制化合物。在某些实施方案中,在适用于解冻后即用型应用的冷冻保存培养基中配制的OPC疗法可以包含一种或多种免疫抑制化合物,其被配制用于一种或多种免疫抑制化合物的缓慢释放。与本文所述的制剂一起使用的免疫抑制化合物可能属于以下免疫抑制药物类别:糖皮质激素、细胞抑制剂(例如烷化剂或抗代谢物)、抗体(多克隆或单克隆)、作用于免疫亲和素的药物(例如环孢菌素、他克莫司或西罗莫司)。其他药物包括干扰素、阿片类药物、TNF结合蛋白、霉酚酸酯和小生物制剂。免疫抑制药物的实例包括:间充质干细胞、抗淋巴细胞球蛋白(ALG)多克隆抗体、抗胸腺细胞球蛋白(ATG)多克隆抗体、硫唑嘌呤、BAS1L1 X**1MAB®**(抗IL-2Ra受体抗体)、环孢菌素(环孢菌素A)、**DACLIZUMAB®**(抗IL-2Ra受体抗体)、依维莫司、霉酚酸、RITUX**1MAB®**(抗CD20抗体)、西罗莫司、他克莫司、Tacrolimus和/或吗替麦考酚酯。

[0126] 制剂

[0127] 根据本公开内容的OPC组合物可以进一步包含药学上可接受的载体。在一个实施方案中,药学上可接受的载体可以包含二甲亚砜(DMSO)。在一个实施方案中,药学上可接受的载体不包含二甲亚砜。如上所述,组合物可进一步经调整以适于在-80℃至-195℃或低于-80℃至-195℃下冷冻保存。

[0128] 根据本公开内容的OPC组合物可以被配制用于通过直接注射到受试者的脊髓来施用。在一个实施方案中,根据本公开内容的OPC组合物可以被配制用于向受试者脑内、脑室内、鞘内、鼻内或脑池内施用。在一个实施方案中,根据本公开内容的OPC组合物可以被配制用于通过直接注射到受试者的脑中的梗塞腔中或紧邻受试者的脑中的梗塞腔的注射施用。在一个实施方案中,根据本公开内容的组合物可以配制用于通过植入施用。在一个实施方案中,根据本公开内容的组合物可以配制成溶液。

[0129] 根据本公开内容的OPC组合物可包含约1x 10^6至约5x 10^8个细胞/毫升,例如约1x 10^6个细胞/毫升,例如约2x 10^6个细胞/毫升,例如约3x 10^6个细胞/毫升,例如约4x 10^6个细胞/毫升,例如约5x 10^6个细胞/毫升,例如约6x 10^6个细胞/毫升,例如约7x 10^6个细胞/毫升,例如约8x 10^6个细胞/毫升,例如约9x 10^6个细胞/毫升,例如约1x 10^7个细胞/毫升,例如约2x 10^7个细胞/毫升,例如约3x 10^7个细胞/毫升,例如约4x 10^7个细胞/毫升,例如约5x 10^7个细胞/毫升,例如约6x 10^7个细胞/毫升,例如约7x 10^7个细胞/毫升,例如约8x 10^7个细胞/毫升,例如约9x 10^7个细胞/毫升,例如约1x 10^8个细胞/毫升,例如约2x 10^8个细胞/毫升,例如约3x 10^8个细胞/毫升,例如约4x 10^8个细胞/毫升,或例如约5x 10^8个细胞/毫升。在另一个实施方案中,根据本公开内容的组合物可包含约1x 10^8至约5x 10^8个细胞/毫升,例如约1x 10^8至约4x 10^8个细胞/毫升,例如约2x 10^8至约5x 10^8个细胞/毫升,例如约1x 10^8至约3x 10^8个细胞/毫升,例如约2x 10^8至约4x 10^8个细胞/毫升,或例如约3x 10^8至约5x 10^8个细胞/毫升。在又一个实施方案中,根据本公开内容的组合物可包含约1x 10^7至约1x 10^8个细胞/毫升,例如约2x 10^7至约9x 10^7个细胞/毫升,例如约3x 10^7至约8x 10^7

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

[0130] 在一个实施方案中,根据本公开内容的OPC组合物可包含约4×10^7至约2×10^8个细胞/毫升。

[0131] 在又一个实施方案中,根据本公开内容的OPC组合物的体积可以为约10微升至约5毫升,例如约20微升,例如约30微升,例如约40微升,例如如约50微升,例如约60微升,例如约70微升,例如约80微升,例如约90微升,例如约100微升,例如约200微升,例如约300微升,例如约400微升,例如约500微升,例如约600微升,例如约700微升,例如约800微升,例如约900微升,例如约1毫升,例如约1.5毫升,例如约2毫升,例如约2.5毫升,例如约3毫升,例如约3.5毫升,例如约4毫升,或例如约4.5毫升。在一个实施方案中,根据本公开内容的组合物的体积可以为约10微升至约100微升,例如约20微升至约90微升,例如约30微升至约80微升,例如约40微升至约70微升,或例如约50微升至约60微升。在另一个实施方案中,根据本公开内容的组合物的体积可以为约100微升至约1毫升,例如约200微升至约900微升,例如约300微升至约800微升,例如约400微升至约700微升,或例如约500微升至约600微升。在又一个实施方案中,根据本公开内容的组合物的体积可以为约1毫升至约5毫升,例如约2毫升至约5毫升,例如约1毫升至约4毫升,例如约1毫升至约3毫升,例如约2毫升至约4毫升,或例如约3毫升至约5毫升。在一个实施方案中,根据本公开内容的OPC组合物可具有约20微升至约500微升的体积。在另一个实施方案中,根据本公开内容的OPC组合物可具有约50微升至约100微升的体积。在又一个实施方案中,根据本公开内容的OPC组合物可具有约50微升至约200微升的体积。在另一个实施方案中,根据本公开内容的OPC组合物可具有约20微升至约400微升的体积。在一个实施方案中,根据本公开内容的OPC组合物可以在被配置用于冷冻保存或施用至有此需要的受试者的容器中。在一个实施方案中,容器可以是预装注射器。

[0132] 使用方法

[0133] 根据本公开内容获得的OPC组合物可用于细胞疗法以改善需要治疗的受试者的一种或多种神经功能。在一个实施方案中,可以将根据本公开内容的OPC细胞群注射或植入到有此需要的受试者中。在一个实施方案中,可以将根据本公开内容的细胞群植入到有此需要的受试者中用于治疗脊髓损伤、中风或多发性硬化症。

[0134] 在一个实施方案中,根据本公开内容的细胞群能够在受试者的植入位点处诱导裸

露的轴突的髓鞘形成。在一个实施方案中,根据本公开内容的方法产生的细胞群可以表现出改善的移植和迁移能力。在一个实施方案中,根据本公开内容的方法产生的细胞群能够改善受试者中神经组织的损伤后修复或再生。

[0135] 根据本公开内容的细胞群能够在将细胞群植入受试者后改善需要治疗的受试者的感觉功能。可以使用国际脊髓损伤神经学分类标准(ISNCSCI)检查来评估感觉功能的改善,例如确定右侧和左侧的针刺和轻触感的感觉水平。根据本公开内容的细胞群能够在将细胞群植入受试者后改善需要治疗的受试者的运动功能。可以使用ISNCSCI检查评估改善的运动功能,例如确定右侧和左侧对于完全麻痹、明显或可见收缩、主动运动、对抗重力的全方位运动以及足够的阻力的运动水平。

[0136] 根据本公开内容的细胞群能够在12个月或更短的时间内减少损伤诱导的中枢神经系统实质空洞化的体积。在一个实施方案中,根据本公开内容的细胞群能够在6个月或更短、5个月或更短、4个月或更短、3个月或更短、2个月或更短或短于1个月的时间内减少受试者中损伤诱导的中枢神经系统实质空洞化的体积。

[0137] 现在已经大体描述了本发明,通过参考以下实施例将更容易理解这些内容,这些实施例以举例说明的方式提供并且不旨在限制本公开内容,除非另有说明。

实施例

[0138] 实施例1-未分化的人胚胎干细胞的培养和扩增

[0139] 来自从H1系(WA01;Thomson JA,Itskovitz-Eldor J,Shapiro SS,Waknitz MA,Swiergiel JJ,Marshall VS,Jones JM.Embryonic stemcell lines derived from human blastocysts.Science.1998Nov 6;282(5391):1145-7)生成的工作细胞库(WCB)的未分化的人胚胎干细胞(uhESC)在重组人层粘连蛋白-521(rhLn-521,Corning#354224)包被的组织培养物处理的聚苯乙烯T-75培养瓶(Corning#431082)上在完全mTeSR™-1培养基(Stem Cell Technologies#85850)中培养。每天完全更换培养基直到细胞达到约80-90%的汇合度,然后使用ReLeSR™试剂(Stem Cell Technologies#05872)对uhESC进行传代。将ReLeSR™抬升的uhESC细胞接种在新的rhLn-521包被的225cm^{2}培养瓶中,并在接种后两天恢复每日培养基更换。在如实施例2中所述分化成神经外胚层祖细胞之前,取决于实验,来自WCB的培养的uhESC以这种方式扩增2至5代。

[0140] 实施例2-将人胚胎干细胞分化为具有背脊髓祖细胞表型的神经外胚层祖细胞的方法

[0141] 将扩增的uhESC接种在rhLn-521包被的容器上,并培养直到达到40-70%汇合度,此时分化起始。

[0142] 第0-3天:通过完全去除mTeSR™-1培养基并添加补充有10μMMAPK/ERK抑制剂PD0325901(PD;Sigma-Aldrich目录号PZ0162)、2μM BMP信号传导抑制剂Dorsomorphin(Dorso;Sigma-Aldrich目录号P5499)和1μM视黄酸(RA;Sigma-Aldrich目录号R2625)的神经胶质祖细胞培养基(GPM;由补充有2% B27补充剂(Gibco目录号17504-044)和0.04μg/mL三碘甲状腺原氨酸(Sigma-Aldrich目录号T5516-1MG)的DMEM/F12(Gibco目录号10565-018)组成)来启动分化。每天补充该培养基。

[0143] 第4-6天:在第4天,将培养基切换为补充有1μM RA和150μM抗坏血酸(Sigma-

Aldrich目录号A4544)的GPM并每天补充。

[0144] 第7天:在第7天,收获细胞用于扩增和如实施例3中所述进一步分化为神经胶质祖细胞。收集细胞的子集用于通过定量PCR(qPCR;如实施例6中所述)、流式细胞术(如实施例5中所述)分析,并且当可用时,将设置用于分析的单独孔板准备用于免疫细胞化学(ICC)(如实施例5中所述)。在第7天,这些细胞表现出与背脊髓祖细胞一致的标志物表达(表2,图3)。

[0145] 实施例3-将人胚胎干细胞分化为神经胶质谱系细胞的方法

[0146] 第7-13天:如实施例2中所述进行uhESC向神经外胚层祖细胞(特别是具有背侧表型)的分化。在第7天,使用TrypLE™Select(Thermo Fisher,目录号A12859-01)抬升细胞,计数,并以2.7x10^{4}个细胞/cm^{2}的接种密度在补充有20ng/mL人碱性成纤维细胞生长因子(hbFGF,Thermo Fisher,目录号PHG0263)、10ng/mL表皮生长因子(EGF,Thermo Fisher,目录号PHG0311)和10μM Rho激酶抑制剂(RI,Tocris目录号1254)的GPM中接种到rhLn-521包被的容器上。每天通过抽吸用过的培养基并用新鲜的GPM+hbFGF+EGF替换来补充培养基。

[0147] 第14-21天:在第14天,使用TrypLE™Select抬升细胞,计数,重悬于GPM+hbFGF+EGF+RI中,并以1.83x10^{6}个活细胞/mL的密度重新接种到PBS-0.1L或PBS-0.5L微型生物反应器系统(PBS Biotech)中的动态悬浮培养物中。收集第14天的细胞的子集用于流式细胞术(实施例5)、ICC(实施例5)和qPCR(实施例6)分析。PBS0.1L和PBS0.5L微型生物反应器分别设置为以35RPM和28RPM旋转。通过允许聚集体沉降,去除70-80％用过的培养基,并用等体积的GPM+bhFGF+EGF替换,来每天补充培养基。在第15天,PBS0.1L和PBS0.5L微型生物反应器的旋转速度分别增加到45RPM和32RPM。

[0148] 在第21天,收集聚集体的子集用于ICC(实施例5)和qPCR(实施例6)。到第21天,分化的细胞表达与神经胶质限制性细胞一致的标志物(表2,图4)。

[0149] 实施例4-将人胚胎干细胞分化为少突胶质祖细胞的方法

[0150] 第21-42天:将实施例3中获得的神经胶质限制性祖细胞进一步分化为少突胶质祖细胞(OPC)。如实施例2和3中所述进行第0-20天的分化方案。在第21天,将聚集体从动态悬浮液转移到rhLn-521包被的培养容器中。例如,从总体积为60mL的1xPBS-0.1L微型生物反应器开始,将60mL培养物分离到2xT75培养瓶中,每个培养瓶的体积为30mL。随后,每隔一天给细胞喂食补充有20ng/mL EGF和10ng/mL血小板衍生生长因子AA(PDGFAA;PeproTech,目录号AF-100-13A)的GPM。每7天(即第28天和第35天),用TrypLE™Select抬升细胞、计数并以4x10^{4}个活细胞/cm^{2}的接种密度重新接种到新鲜的rhLn-521包被的培养容器中。

[0151] 在第42天收获分化的细胞。使用TrypLE™ Select将细胞从容器分离、计数并在冷冻保存之前在CryoStor10(BioLife Solutions,目录号210102)中重新配制。收集细胞的子集用于通过流式细胞术(实施例5)、ICC(实施例5)和qPCR(实施例6)分析。到第42天,分化的细胞表达OPC特征性的标志物,如通过三种分析方法所测量的(表1、表2、图5)。

[0152] 实施例5-通过免疫细胞化学和流式细胞术表征分化的细胞群

[0153] 流式细胞术和免疫细胞化学(ICC)可用于检测和表征细胞群中蛋白质标志物表达的不同方面。虽然流式细胞术可用于量化表现出给定蛋白质标志物谱的群体中个体细胞的百分比,但ICC提供有关每个蛋白质标志物的亚细胞定位的附加信息,并可应用于单个细胞或细胞聚集体。通过使用这些蛋白质分析方法中的一种或两种,我们追踪了根据本公开内容的方法的人胚胎干细胞向神经外胚层祖细胞、神经胶质祖细胞和少突胶质祖细胞的分

化。

[0154] 对于分化为神经外胚层祖细胞和神经胶质祖细胞的人胚胎干细胞,分化的第7天和第21天细胞中的蛋白质标志物表达由ICC表征。在室温(RT)下,贴壁细胞和细胞聚集体在4%多聚甲醛(PFA)中固定30分钟。固定的细胞和聚集体用磷酸缓冲盐水(PBS)洗涤,然后将固定的聚集体依次放入浓度递增的蔗糖溶液(10%、20%和30%重量/体积)中,分别在室温下30分钟,在室温下30分钟,和在4℃下过夜。蔗糖置换后,将聚集体包埋在Tissue-Tek Optimal Cutting Temperature(OCT)溶液(Sakura Finetek USA#4583)中并在-80℃下冷冻。将OCT包埋的聚集体加热至-20℃,使用低温恒温器(型号CM3050 S,Leica Biosystems,Buffalo Grove,IL,USA)切成30μm的切片,并安装在聚L-赖氨酸(Sigma-Aldrich#P4707)包被的载玻片上。为进行免疫细胞化学染色,将固定的贴壁细胞和载玻片安装的聚集体切片透化和在由PBS中的0.1%Triton™X-100/2%正常山羊血清/1%牛血清白蛋白组成的封闭液中在室温(RT)下封闭2小时。透化和封闭后,贴壁细胞和聚集体切片在4℃下在不含Triton™ X-100且含有对感兴趣的蛋白质标志物具有特异性的一抗(包括PAX6(BD Pharmingen#561462或BioLegend#901301)以检测神经外胚层祖细胞和AP2(发育研究杂交瘤库-DSHB#3B5)、PAX3(DSHB#Pax3)和PAX7(DSHB#Pax7)以检测背脊髓祖细胞)的封闭溶液中孵育过夜。然后用PBS洗涤贴壁细胞和聚集体切片3次,然后在不含Triton™X-100的封闭液中与特异于所选一抗的二抗和4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)复染液一起在室温下避光孵育1小时。贴壁细胞和聚集体切片用PBS洗涤3次,并使用IN Cell Analyzer 2000(GE Healthcare,Pittsburgh,PA,USA)成像。

[0155] 图3显示了表现出背脊髓祖细胞表型的第7天神经外胚层祖细胞的代表性ICC数据。分化7天后,来自两个代表性实验的贴壁细胞群表达PAX6,其是神经外胚层祖细胞特征性的蛋白标志物(Lippmann ES,Williams CE,Ruhl DA,Estevez-Silva MC,Chapman ER,Coon JJ,Ashton RS.Deterministic HOX patterning in human pluripotent stemcell-derived neuroectoderm.Stem Cell Reports.2015Apr14;4(4):632-44;Kim DS,Lee DR,Kim HS,Yoo JE,Jung SJ,Lim BY,Jang J,Kang HC,You S,Hwang DY,Leem JW,Nam TS,Cho SR,Kim DW.Highly pure and expandable PSA-NCAM-positive neural precursors from human ESC and iPSC-derived neural rosettes.PLoS One.2012;7(7):e39715),并且还表达背脊髓祖细胞标志物AP2、PAX3和PAX7(Le Dréau G,MartíE.Dorsal-ventral patterning of the neural tube:a tale of three signals.Dev Neurobiol.2012Dec;72(12):1471-81;Marklund U,Alekseenko Z,Andersson E,Falci S,Westgren M,Perlmann T,Graham A,**Sundström**E,Ericson J.Detailed expression analysis of regulatory genes in the early developing human neural tube.Stem Cells Dev.2014Jan1;23(1):5-15)。

[0156] 图4显示了第21天神经胶质祖细胞的代表性ICC数据。将聚集体切片并针对背侧祖细胞标志物AP2、PAX3和PAX7以及泛神经祖细胞标志物PAX6进行染色。虽然这些早期祖细胞在第21天仍然存在,但还存在表达少突胶质祖细胞标志物NG2的独特神经胶质细胞群(Zhang Y,Chen K,Sloan SA,Bennett ML,Scholze AR,O'Keeffe S,Phatnani HP,Guarnieri P,Caneda C,Ruderisch N,Deng S,Liddelow SA,Zhang C,Daneman R,Maniatis T,Barres BA,Wu JQ.An RNA-sequencing transcriptome and splicing

database of glia,neurons,and vascular cells of the cerebral cortex.J Neurosci.2014Sep3;34(36):11929-47)。

[0157] 对于通过第42天分化为少突胶质祖细胞的人胚胎干细胞,通过流式细胞术和ICC两者表征所得单细胞群中的蛋白质标志物的表达。

[0158] 为了通过ICC表征少突胶质祖细胞的蛋白质标志物表达,如上所述对载玻片安装的聚集体切片进行染色,不同的是在室温下用100%甲醇进行2分钟的透化,并且封闭溶液由PBS中的10%胎牛血清组成。

[0159] 图5显示了第42天少突胶质祖细胞的代表性ICC数据。来自两个代表性实验的所得单细胞群表达少突胶质祖细胞标志物NG2(Zhang Y,Chen K,Sloan SA,Bennett ML,Scholze AR,O'Keeffe S,Phatnani HP,Guarnieri P,Caneda C,Ruderisch N,Deng S,Liddelow SA,Zhang C,Daneman R,Maniatis T,Barres BA,Wu JQ.An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia,neurons,and vascular cells of the cerebral cortex.J Neurosci.2014Sep 3;34(36):11929-47)和背脊髓祖细胞标志物AP2的表达减少(比较图3和5)。

[0160] 为了通过流式细胞术在第42天量化细胞表面标志物,将细胞在解冻培养基(DMEM培养基中的10%胎牛血清)中解冻,离心并重悬于染色缓冲液(PBS中的2%胎牛血清/0.05%叠氮化钠)中。将细胞与对感兴趣的标志物具有特异性的一抗(包括NG2(Invitrogen#37-2300)、PDGFRα(BD Biosciences#563575)、GD3(Millipore#MAB2053)、A2B5(BD#563775)、CD49f(Millipore#CBL458P)、EpCAM(Dako#M080401-2)和CLDN6(Thermo Fisher#MA5-24076))以及它们的同种型对照在冰上孵育30分钟。用染色缓冲液洗涤细胞以去除未结合的抗体;在未缀合的抗体的情况下,然后将细胞与适当的荧光团缀合的二抗在冰上孵育30分钟。洗涤细胞,然后加入碘化丙啶以区分死细胞。在一些情况下,将细胞在包被有Matrigel(Corning#356231)的组织培养容器中在37℃/5%CO_2下培养过夜,以回收对实施例4中描述的第42天收获程序表现出敏感性的蛋白质标志物,然后用TrypLE™ Select(Thermo Fisher#A12859-01)收获并如上所述染色用于流式细胞术分析。在Attune NxT(Thermo Fisher,Waltham,MA,USA)流式细胞仪上分析所有细胞。为了计算表达给定蛋白质标志物的细胞百分比,对用碘化丙啶染色的死细胞进行门控,并将与相应抗体结合的活细胞数表示为校正表现出与同种型对照抗体的非特异性结合的细胞的数量后所分析的细胞总数的分数。

[0161] 表1显示了根据实施例5中描述的方法产生的第42天少突胶质祖细胞的代表性流式细胞术数据。如两个代表性运行所示,所得细胞群中的高比例细胞表达特征性少突胶质细胞标志物,包括NG2和PDGFRα(Zhang Y,Chen K,Sloan SA,Bennett ML,Scholze AR,O'Keeffe S,Phatnani HP,Guarnieri P,Caneda C,Ruderisch N,Deng S,Liddelow SA,Zhang C,Daneman R,Maniatis T,Barres BA,WuJQ.An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia,neurons,and vascular cells of the cerebral cortex.J Neurosci.2014Sep 3;34(36):11929-47)和GD3(Gallo V,Zhou JM,McBain CJ,Wright P,Knutson PL,Armstrong RC.Oligodendrocyte progenitor cell proliferation and lineage progression are regulated by glutamate receptor-mediated K+channel block.J Neurosci.1996Apr15;16(8):2659-70),以及OPC前体(pre-

OPC)标志物A2B5(Keirstead HS,Nistor G,Bernal G,Totoiu M,Cloutier F,Sharp K,Steward O.Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury.J Neurosci.2005May 11;25(19):4694-705)。此外,在所得群体中检测到最低限度的非OPC标志物,包括神经祖细胞/上皮标志物CD49f(Krebsbach PH,Villa-Diaz LG.The Role of Integrinα6(CD49f)in Stem Cells:More than a Conserved Biomarker.Stem Cells Dev.2017Aug 1;26(15):1090-1099)和上皮标志物CLDN6(Lin D,Guo Y,Li Y,Ruan Y,Zhang M,Jin X,Yang M,Lu Y,Song P,Zhao S,Dong B,Xie Y,Dang Q,Quan C.Bioinformatic analysis reveals potential properties of human Claudin-6regulation and functions.Oncol Rep.2017Aug;38(2):875-885)和EpCAM(Huang L,Yang Y,Yang F,Liu S,Zhu Z,Lei Z,Guo J.Functions of EpCAM in physiological processes and diseases(Review).Int J Mol Med.2018Oct;42(4):1771-1785)。

[0162] 表1.通过根据本公开内容的方法产生的少突胶质祖细胞的代表性流式细胞术数据。

[0163]

	OPC/OPC 前体标志物				非 OPC 标志物		
	NG2	PDGFRα	GD3	A2B5	CD49f	CLDN6	EpCAM
运行 1	92%	85%	66%	39%	3%	0%	0%
运行 2	98%	95%	63%	89%	0%	0%	2%

[0164] 与目前在临床测试中用于治疗脊髓损伤并且使用另一种方法生成的OPC(Priest CA,Manley NC,Denham J,Wirth ED 3rd,LebkowskiJS.Preclinical safety of human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors supporting clinical trials in spinal cord injury.Regen Med.2015Nov;10(8):939-58;Manley NC,Priest CA,Denham J,Wirth ED 3rd,Lebkowski JS.Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells:Preclinical Efficacy and Safety in Cervical Spinal Cord Injury.Stem Cells Transl Med.2017Oct;6(10):1917-1929)相比,通过本公开内容中描述的方法产生的细胞群导致更高比例的少突胶质祖细胞标志物NG2阳性细胞,和减少的非OPC标志物CD49f、CLDN6和EpCAM的表达。

[0165] 实施例6-通过基因表达谱分析表征分化的细胞群

[0166] 基因表达谱分析可用于表征起始多能细胞群和每个分化阶段的细胞表型,包括神经外胚层祖细胞、神经胶质祖细胞和少突胶质祖细胞的产生。基因表达谱分析包括使用诸如微阵列和RNA-seq的方法进行的全局转录组谱分析,以及使用增加的灵敏度的方法诸如定量实时PCR(qPCR)进行的靶向基因谱分析。

[0167] 为了进行基因表达谱分析,将细胞在Qiagen RLT裂解缓冲液(Qiagen#79216)中裂解,并根据制造商的指南使用Qiagen RNeasy Mini Kit(Qiagen#74106)纯化RNA。对于基于qPCR的分析,然后根据制造商的指南,使用Invitrogen Superscript IV VILO Mastermix(Thermo Fisher Scientific#11756050)根据标准方法将纯化的RNA转化为cDNA。然后根据制造商的指南,使用基因特异性引物-探针组(Applied Biosystems Taqman Gene Expression Assays,Thermo Fisher Scientific#4331182)量化目标基因和参考管家基因

的相对表达水平。为了确定一组给定目标基因的相对表达水平,在ABI 7900HT实时序列检测系统(Applied Biosystems)、BioMark HD系统(Fluidigm)或等效物上进行PCR反应。每个目标基因都被标准化至一个或多个参考基因,例如GAPDH,以确定其相对表达水平。

[0168] 表2显示了来自测量由根据本公开内容的方法产生的细胞群中多能性基因、神经外胚层祖细胞基因、神经胶质祖细胞基因、背脊髓祖细胞基因、腹脊髓祖细胞基因和少突胶质祖细胞基因的表达的两个代表性实验的qPCR结果。在以下时间点收集RNA样品:分化前(第0天)、分化成神经外胚层祖细胞后(第7天)、分化成神经胶质祖细胞后(第21天)和分化成少突胶质祖细胞后(第42天)。使用上文所述的方法对RNA样品进行处理以用于qPCR。对指示每种分化状态的所选基因组进行量化,包括:三个多能性基因(NANOG、LIN28A、SOX2)、三个神经外胚层祖细胞基因(PAX6、HES5、ZBTB16)、三个神经胶质祖细胞基因(CACGN4、DCC、FABP7)和三个少突胶质祖细胞基因(CSPG4、PDGFRα、DCN)。对于每个基因,使用五个管家基因(ACTB、GAPDH、EP300、PGK1、SMAD1)的平均值计算标准化的ΔCT值,并使用ΔΔCT方法计算相对于基线(低于定量限的表达)的倍数表达。

[0169] 表2.根据本公开内容分化为OPC的H1 uhESC中针对多能性、神经外胚层祖细胞(NPC)、背脊髓祖细胞、腹脊髓祖细胞、神经胶质祖细胞(GPC)和少突胶质祖细胞(OPC)的基因标志物的qPCR分析。

[0170]

	运行1 第0天 uhESC	运行2 第0天 uhESC	运行1 第7天 NEPC	运行2 第7天 NEPC	运行1 第21天 GPC	运行2 第21天 GPC	运行1 第42天 OPC	运行2 第42天 OPC
多能性基因								
NANOG	158	119	4	3	2	1	2	1
LIN28A	650	1684	233	626	5	1	2	1
SOX2	480	325	532	243	767	262	2	3
神经外胚层祖细胞(NPC)基因								
PAX6	1	1	305	250	218	32	2	2
HES5	1	1	65	71	275	298	6	1
ZBTB16	1	1	110	120	50	31	2	1
背脊髓祖细胞基因								
TFAP2A	1	1	67	84	169	215	69	20
PAX3	1	1	100	300	91	118	2	7
PAX7	1	1	74	178	104	89	19	6
腹脊髓祖细胞基因								
OLIG2	1	1	1	1	2	1	2	1
NKX2-2	1	1	1	1	2	1	2	1
神经胶质祖细胞(GPC)基因								
CACNG4	18	11	61	48	268	317	32	15
DCC	1	2	17	51	34	324	2	5
FABP7	6	10	7	9	17	51	2	4
少突胶质祖细胞(OPC)基因								
CSPG4	5	3	5	10	6	49	126	111
PDGFRα	1	2	19	20	23	185	584	481
DCN	1	1	1	2	285	302	1080	1136

[0171] 参考表2,通过根据本公开内容的方法使uhESC分化7天导致与神经外胚层祖细胞

一致的基因表达谱,包括NANOG的下调和LIN28A、SOX2、PAX6、HES5和ZBTB16的表达(Patterson M,Chan DN,Ha I,Case D,Cui Y,Van Handel B,Mikkola HK,Lowry WE.Defining the nature of human pluripotent stem cell progeny.Cell Res.2012Jan;22(1):178-93;Lippmann ES,Williams CE,Ruhl DA,Estevez-Silva MC,Chapman ER,Coon JJ,Ashton RS.Deterministic HOX patterning in human pluripotent stem cell-derived neuroectoderm.Stem Cell Reports.2015Apr 14;4(4):632-44;Woo SM,Kim J,Han HW,Chae JI,Son MY,Cho S,Chung HM,Han YM,Kang YK.Notch signaling is required for maintaining stem-cell features of neuroprogenitor cells derived from human embryonic stem cells.BMC Neurosci.2009Aug 17;10:97;Avantaggiato V,Pandolfi PP,Ruthardt M,Hawe N,Acampora D,Pelicci PG,Simeone A.Developmental analysis of murine Promyelocyte Leukemia Zinc Finger(PLZF)gene expression:implications for the neuromeric model of the forebrain organization.J Neurosci.1995Jul;15(7Pt1):4927-42)。

[0172] 此外,分化7天后产生的神经外胚层祖细胞表现出与基于背侧标志物TFAP2A(也称为AP2)、PAX3和PAX7的表达的背脊髓祖细胞一致的表型(Le Dréau G,MartíE.Dorsal-ventral patterning of the neural tube:a tale of three signals.Dev Neurobiol.2012Dec;72(12):1471-81;Marklund U,Alekseenko Z,Andersson E,Falci S,Westgren M,Perlmann T,Graham A,**Sundström** E,Ericson J.Detailed expression analysis of regulatory genes in the early developing human neural tube.Stem Cells Dev.2014Jan 1;23(1):5-15)。作为背脊髓祖细胞表型的进一步证据,所得的神经外胚层祖细胞不表达腹脊髓祖细胞标志物OLIG2或NKX2-2,其表达需要活化sonic hedgehog信号传导途径(Le Dréau G,MartíE.Dorsal-ventral patterning of the neural tube:a tale of three signals.Dev Neurobiol.2012Dec;72(12):1471-81;Marklund U,Alekseenko Z,Andersson E,Falci S,Westgren M,Perlmann T,Graham A,**Sundström** E,Ericson J.Detailed expression analysis of regulatory genes in the early developing human neural tube.Stem Cells Dev.2014Jan1;23(1):5-15)。

[0173] 分化21天后,所得细胞群表现出与神经胶质祖细胞一致的基因表达谱,包括多能性和神经外胚层祖细胞标志物的下调和CACNG4、DCC(也称为轴突导向因子受体)和FABP7的诱导(Zhang Y,Chen K,Sloan SA,Bennett ML,Scholze AR,O'Keeffe S,Phatnani HP,Guarnieri P,Caneda C,Ruderisch N,Deng S,Liddelow SA,Zhang C,Daneman R,Maniatis T,Barres BA,Wu JQ.An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia,neurons,and vascular cells of the cerebral cortex.J Neurosci.2014Sep 3;34(36):11929-47;Fitzgerald DP,Cole SJ,Hammond A,Seaman C,Cooper HM.Characterization of neogenin-expressing neural progenitor populations and migrating neuroblasts in the embryonic mouse forebrain.Neuroscience.2006Oct 27;142(3):703-16;Rosenzweig S,Carmichael ST.The axon-glia unit in white matter stroke:mechanisms of damage and recovery.Brain Res.2015Oct14;1623:123-34;Petit A,Sanders AD,Kennedy TE,Tetzlaff W,Glattfelder KJ,Dalley RA,Puchalski RB,Jones AR,Roskams AJ.Adult

spinal cord radial glia display a unique progenitor phenotype.PLoS One.2011;6(9):e24538)。作为神经胶质祖细胞表型的进一步证据,除了其在神经外胚层祖细胞/神经祖细胞中的表达(Woo SM,Kim J,Han HW,Chae JI,Son MY,Cho S,Chung HM,Han YM,Kang YK.Notch signaling is required for maintaining stem-cell features of neuroprogenitor cells derived from human embryonic stem cells.BMC Neurosci.2009Aug 17;10:97)以外,所得的第21天细胞还表现出HES5的持续表达,HES5也被证明在哺乳动物的发育中的中枢神经系统中促进神经到神经胶质祖细胞的转换(Bansod S,Kageyama R,Ohtsuka T.Hes5 regulates the transition timing of neurogenesis and gliogenesis in mammalian neocortical development.Development.2017Sep1;144(17):3156-3167)。此外,所得的第21天神经胶质祖细胞表现出背脊髓祖细胞标志物TFAP2A、PAX3和PAX7的持续表达,从而提供了来自背侧模式神经祖细胞的衍生的进一步证据。

[0174] 根据本公开内容中描述的方法分化42天后,所得细胞群表达与少突胶质祖细胞一致的标志物,包括早期谱系标志物和背脊髓祖细胞标志物的下调,以及CSPG4(也称为NG2)、PDGFRα和DCN的诱导(Zhang Y,Chen K,Sloan SA,Bennett ML,Scholze AR,O'Keeffe S,Phatnani HP,Guarnieri P,Caneda C,Ruderisch N,Deng S,Liddelow SA,Zhang C,Daneman R,Maniatis T,Barres BA,Wu JQ.An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia,neurons,and vascular cells of the cerebral cortex.J Neurosci.2014Sep3;34(36):11929-47)。

[0175] 实施例7-使用MAPK/ERK和BMP信号转导的替代小分子抑制剂将人胚胎干细胞分化为背神经外胚层祖细胞

[0176] 除了实施例2中使用的小分子抑制剂(PD0325901和Dorsomorphin)之外,还测试了MAPK/ERK和BMP信号传导的替代小分子抑制剂将人胚胎干细胞分化成背神经外胚层祖细胞的能力。表3列出了测试的替代小分子抑制剂。在6孔组织培养板的一式两份孔中测试每种条件。

[0177] 表3.用于将人胚胎干细胞分化成背神经外胚层祖细胞的小分子抑制剂。

[0178]

抑制剂	测试的浓度	主要结合靶标	供应商目录#
MEK-ERK 抑制剂			

[0179]

PD0325901	10 μM	MEK1、MEK2	ApexBio # A3013
AZD6244	10 μM	MEK1、MEK2	ApexBio # A8207
GSK1120212	10 μM	MEK1、MEK2	ApexBio # A3018
PD184352	10 μM	MEK1、MEK2	ApexBio # A1792
考比替尼	10 μM	MEK1、MEK2	ApexBio # A3321
BMP 抑制剂			
Dorsomorphin	2 μM	ALK2、ALK3、ALK6	Sigma-Aldrich # P5499
ML347	2 μM	ALK2、ALK1	ApexBio # B3688

[0180] 在分化第7天,收集细胞并如实施例6中所述处理用于RNA提取和通过qPCR进行基因表达谱分析。对于每个基因,计算相对于五个管家基因(ACTB、GAPDH、EP300、PGK1、SMAD1)的平均值的标准化ΔCT值和使用ΔΔCT方法计算相对于基线(低于定量限的表达)的倍数表达。表4显示了每个小分子组合的生物学重复的平均倍数表达值(相对于基线)。参考表4,用测试的小分子组合中的每一种使uhESC分化7天导致多能性标志物NANOG的下调和与神经外胚层祖细胞表型相关的基因(包括LIN28A、SOX2、PAX6、HES5和ZBTB16)的类似程度的维持的表达或诱导。此外,基于背侧标志物TFAP2A、PAX3和PAX7的表达以及腹侧标志物OLIG2和NKX2-2的表达缺失,测试的小分子组合中的每一种导致背脊髓祖细胞表型。

[0181] 为了获得用每种小分子组合处理后得到的第7天细胞表型的更全面比较,使用96基因组进行Fluidigm qPCR,该96基因组由多能性、神经外胚层祖细胞、神经管模式化、神经胶质祖细胞、少突胶质祖细胞、神经嵴细胞、神经元、星形胶质细胞、周细胞、雪旺氏细胞和上皮细胞的已知标志物组成。参考图6,通过标准化ΔCT值的回归图将每个替代小分子组合的第7天细胞表型与用PD0325901加Dorsomorphin处理产生的细胞表型进行比较,表明测试的小分子组合中的每一种可以实现相似的总体细胞表型。综上所述,表4和图6中显示的结果支持以下各种组合:(i)MAPK/ERK抑制剂,以及(ii)BMP信号传导抑制剂,(iii)在不存在SHH信号传导活化剂的情况下,可以用于使用本公开内容的方法将uhESC分化为背神经外胚层祖细胞,并进一步分化为神经胶质祖细胞和少突胶质祖细胞。

[0182] 表4.使用小分子抑制剂的不同组合分化为NPC的H1 uhESC中的多能性和神经外胚层祖细胞(NPC)的基因标志物的qPCR分析。

[0183]

	PD0325901+ Dorso	AZD6244+ Dorso	GSK1120212+ Dorso	PD184352+ Dorso	考比替尼+ Dorso	PD0325901+ ML347
多能性基因						
NANOG	1	4	1	1	1	1
LIN28A	548	618	606	635	504	488
SOX2	370	484	254	401	201	202
神经外胚层祖细胞基因						
PAX6	363	539	258	417	173	156
HES5	97	100	68	91	36	36
ZBTB16	135	149	145	171	134	120
背脊髓祖细胞基因						
TFAP2A	67	61	84	43	100	166
PAX3	112	99	180	84	193	158
PAX7	156	106	186	100	148	209
腹脊髓祖细胞基因						
OLIG2	1	1	1	1	1	1
NKX2-2	1	1	1	1	1	1

[0184] 实施例8-使用体外包囊测定评估分化的OPC群体中外来上皮谱系细胞的存在

[0185] 使用体外包囊测定测试根据本公开内容产生的OPC群体中不需要的上皮谱系细胞的存在。包囊测定基本上是根据Debnath等人的方案进行的(Debnath J,Muthuswamy SK,Brugge JS.Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures.2003Methods.3:256-68)。简而言之,OPC在3D培养系统中在已知刺激上皮包囊形成的因子的存在下生长20天。除了包囊的视觉检测外,还使用免疫细胞化学评估了包含上皮标志物CD49f的基底外侧蛋白表达的囊性结构的存在。

[0186] OPC以21.9x10^3个细胞/cm^2的密度在支持包囊的培养基中接种到**Matrigel®**(Corning)垫上(总共将0.5x10^6个细胞接种在24孔板的12个孔中)。细胞培养20天。在第20天,进行活包囊计数,使用细胞回收溶液(Corning#354253)溶解**Matrigel®**,将细胞在4%多聚甲醛(PFA)中在冰上固定5分钟,并在封闭缓冲液中透化过夜。随后,对包囊进行针对CD49f(ITGA6)、鬼笔环肽的染色,并用DAPI复染。使用IN Cell Analyzer 2000(GE Healthcare Life Sciences)对包囊进行成像,并使用IN Cell Developer Software(GE Healthcare Life Sciences)和MATLAB™(Mathworks)量化包囊频率、尺寸和染色强度。参考表5,使用根据本公开内容的方法从两次代表性运行产生并在体外包囊测定中测试的OPC每

100,000个细胞没有产生可检测的包囊。相比之下,通过先前发现在体内引起上皮包囊形成的替代方法(Manley NC,Priest CA,Denham J,Wirth ED 3rd,Lebkowski JS.Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells:Preclinical Efficacy and Safety in Cervical Spinal Cord Injury.Stem Cells Transl Med.2017Oct;6(10):1917-1929)产生的三个对照批次的OPC(对照A、对照B和对照C)确实在测定中产生了包囊。

[0187] 表5.通过根据本公开内容的方法产生的少突胶质祖细胞的代表性包囊测定结果。

[0188]

	对照 A	对照 B	对照 C	运行 1	运行 2
包囊 /100,000 个细胞输入	6.2	16.8	25.6	0	0

[0189] 实施例9-在SHH信号传导活化剂的存在相对不存在下分化的细胞产率的比较

[0190] 在测试各种小分子分化方案时,发现从分化过程中去除SHH信号传导活化剂例如Purmorphamine(PMA)始终导致第7天和第14天之间细胞的步进产率的增加(图2A)。因为PMA和其他SHH信号传导激动剂驱动早期脊髓祖细胞的脑室化(ventrilization)(Kutejova E,Sasai N,Shah A,Gouti M,Briscoe J.Neural Progenitors Adopt Specific Identities by Directly Repressing All Alternative Progenitor Transcriptional Programs.Dev Cell.2016Mar 21;36(6):639-53),这表明从第7天到第14天存在的培养条件有利于具有更多背侧表型的神经祖细胞的扩增。令人惊讶的是,发现这种早期背侧表型(尽管不是体内早期OPC生成的区域)仍在第42天产生OPC细胞(图5)。

[0191] 进一步测试并量化了从根据本公开内容的分化过程中去除SHH信号传导活化剂的影响。在从分化过程中去除SHH激动剂PMA的两个代表性实验(运行1和运行2)中,与包含PMA的运行相比,从第7天到第14天的步进产率增加(图2B)。这导致总体理论细胞产率的大幅增加(图2C)。

[0192] 实施例10-体外功能生物测定(饰胶蛋白聚糖分泌和迁移测定)

[0193] 饰胶蛋白聚糖是一种天然存在的富含亮氨酸的细胞外小蛋白多糖TGF-β1/2拮抗剂,它通过与细胞外基质(ECM)的成分相互作用来调节多种细胞功能。中枢神经系统中的神经元和星形胶质细胞表达的饰胶蛋白聚糖通过其抗疤痕作用(通过降解和抑制其合成来显著降低疤痕衍生的轴突生长抑制剂的滴度的积累)减弱疤痕组织、阻断空洞化并促进伤口愈合[Ahmed,Z.,等人,Decorin blocks scarring and cystic cavitation in acute and induces scar dissolution in chronic spinal cord wounds.Neurobiol Dis,2014.64:p.163-76]。当外源性添加时,人重组蛋白本身显示出在脊髓损伤动物模型中具有有益作用[Wu,L.,等人,Combined transplantation of GDAs(BMP)and hr-decorin in spinal cord contusion repair.Neural Regen Res,2013.8(24):p.2236-48]。

[0194] 三个制造的GPOR-OPC1临床批次的长期稳定性数据表明~15-30ng/ml的分泌水平。

[0195] 在该体外测定中,使用商业制造的固相夹心ELISA试剂盒测量由OPC1细胞产生的饰胶蛋白聚糖。用于效力测定的测试材料是通过解冻一瓶或多瓶OPC1药物产品细胞、培养

细胞48小时、收获条件培养基(CM)并将这些CM上清液冷冻储存直至通过ELISA测试而产生的上清液。正在进行的OPC1工艺开发研究表明,改良工艺OPC1细胞的体外培养48小时后饰胶蛋白聚糖分泌的水平与GPOR-OPC1批次(如上所述)相似,并且在~20-35ng/ml的范围内。

[0196] 如大鼠颈椎SCI模型所示例的,体内OPC1活性的标志之一是OPC1细胞从一个或多个注射部位体内迁移到脊髓中空洞化的损伤和周围区域。迁移测定基于OPC1细胞响应不同趋化因子(例如PDGFαα和PDGFββ)的迁移的体外测量[Armstrong,R.C.,L.Harvath和M.E.Dubois-Dalcq,Type 1astrocytes and oligodendrocyte-type 2astrocyte glial progenitors migrate toward distinct molecules.J Neurosci Res,1990.27(3):p.400-7;Milner,R.,等人,Contrasting effects of mitogenic growth factors on oligodendrocyte precursor cell migration.Glia,1997.19(1):p.85-90;Sanchez-Rodriguez,M.A.等人,The endocannabinoid2-arachidonoylglycerol regulates oligodendrocyte progenitor cell migration.Biochem Pharmacol,2018.157:p.180-188]。

[0197] 在该体外测定中,将OPC-1细胞接种在transwell系统(Corning™Transwell™聚碳酸酯膜插入物,8μm孔径)的各个孔中。细胞暴露于下方孔中的培养基,该培养基含有或不含化学引诱因子(PDGFββ)。过夜孵育后,收集迁移通过transwell的细胞并计数以确定迁移的输入细胞的百分比,然后将其报告为迁移的百分比。该方法目前处于研究阶段,并且正在进行进一步研究以评估和改进方法的性能。正在进行的OPC1过程开发研究表明,响应于16-24小时的PDGFββ化学引诱因子刺激,OPC1细胞的体外迁移百分比在~15-50%的范围内。

[0198] 使用饰胶蛋白聚糖分泌和迁移生物测定对OPC1体外功能的评估表明,对于表现出更高纯度(生物标志物表达的流式细胞术分析)、更好产率和优异形态学评估的改进工艺OPC1批次,观察到更高的饰胶蛋白聚糖分泌和更高的迁移百分比,反之亦然;对于表现出较低纯度、较低产量和较差形态学评估的OPC1批次,观察到较低的饰胶蛋白聚糖分泌和较低的迁移百分比。

[0199] 例如,表6提供了通过标志物数据、饰胶蛋白聚糖分泌和迁移生物测定表征的第42天最终产品的总结。

[0200]

表 6

第 42 天-最终产品

方案 #	CD24 PE	Claudin 6	EpCAM DL488	GD3	NG2	PDGFRα	%迁移 (+PDGFββ)	饰胶蛋白聚糖 (ng/ml)
运行 #1	15.8	1	1.35	69	91	96.9	40%	32.20
运行 #2	8.77	0.8	0.55	47.7	81.4	93.7	46%	31.80

[0201] 虽然已经参考特定实施方案描述了本公开内容,但是本领域技术人员将理解,在不脱离本公开内容的范围的情况下,可以做出各种改变并且可以用等同物替代其元素。此外,在不脱离本公开内容的范围的情况下,可以进行许多修改以使特定情况或材料适应本公开内容的教导。

[0202] 因此,本公开内容意图不限于作为预期用于实施本公开内容的最佳模式公开的特定实施方案,而是本公开内容将包括落入所附权利要求的范围和精神内的所有方面。

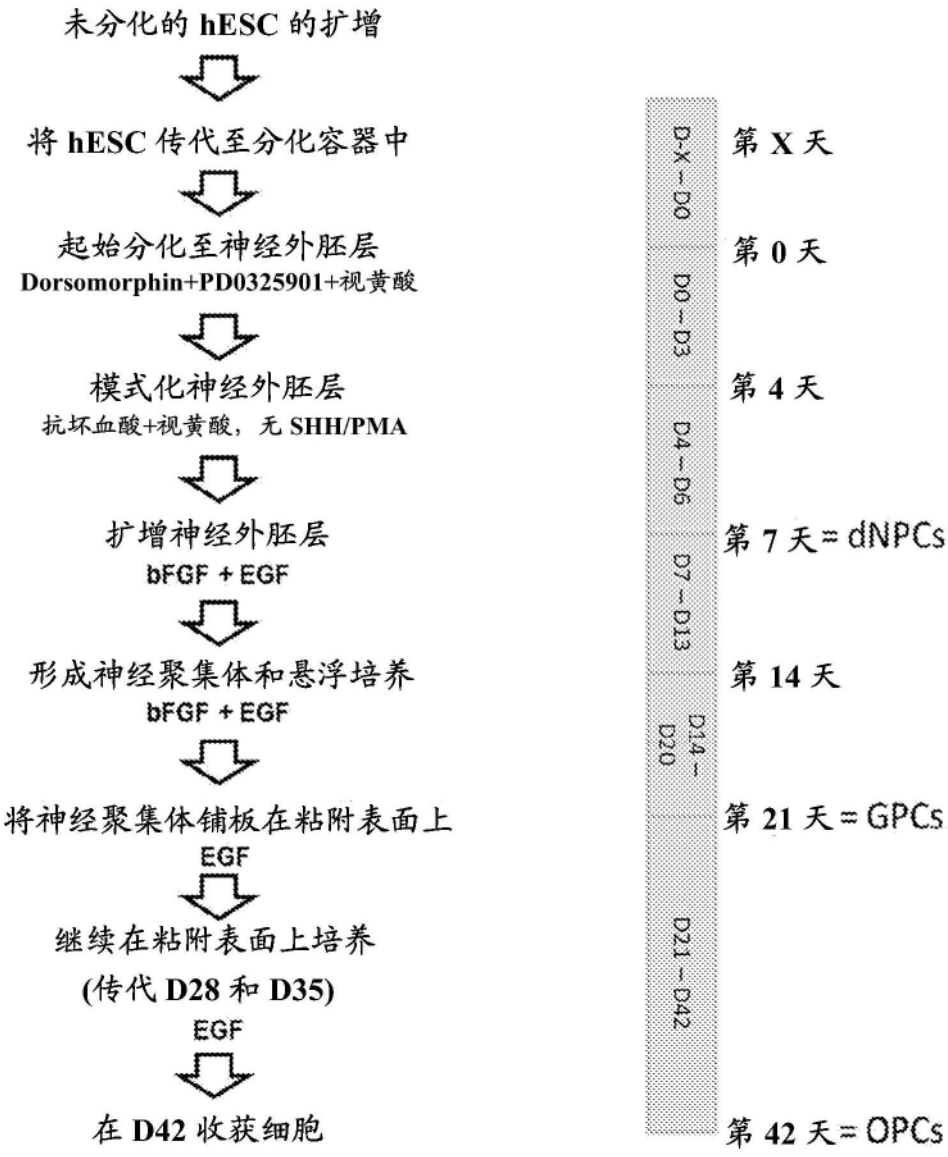

未分化的 hESC 的扩增
将 hESC 传代至分化容器中
起始分化至神经外胚层
Dorsomorphin+PD0325901+视黄酸
模式化神经外胚层
抗坏血酸+视黄酸，无 SHH/PMA
扩增神经外胚层
bFGF + EGF
形成神经聚集体和悬浮培养
bFGF + EGF
将神经聚集体铺板在粘附表面上
EGF
继续在粘附表面上培养
(传代 D28 和 D35)
EGF
在 D42 收获细胞
D-X – D0
D0 – D3
D4 – D6
D7 – D13
D14 – D20
D21 – D42
第 X 天
第 0 天
第 4 天
第 7 天 = dNPCs
第 14 天
第 21 天 = GPCs
第 42 天 = OPCs

图1

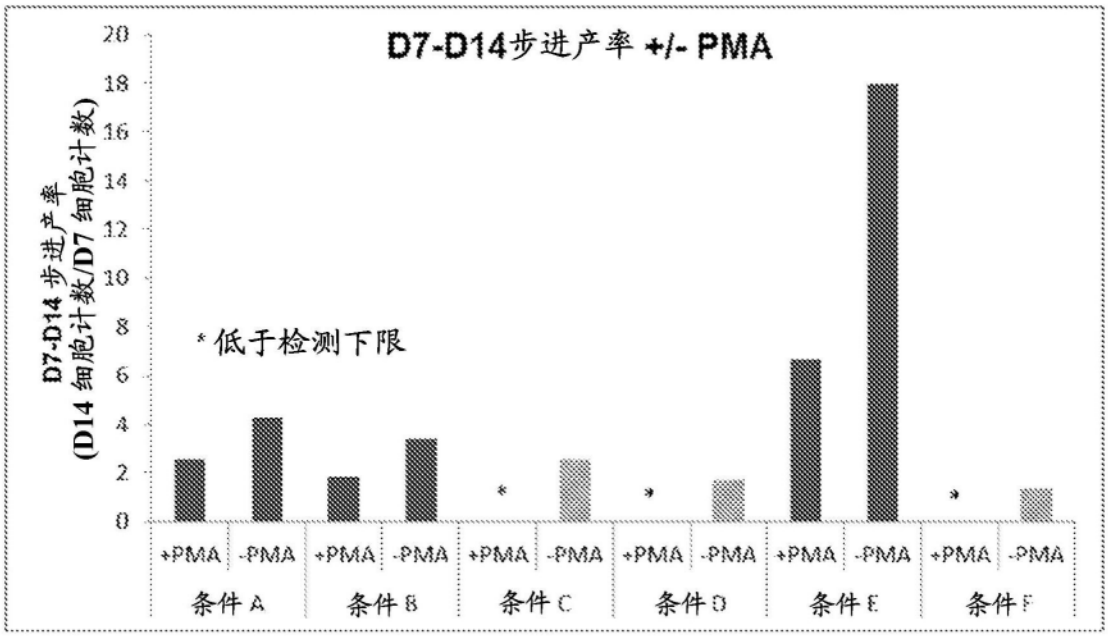

D7-D14步进产率 +/- PMA
D7-D14 步进产率
(D14 细胞计数/D7 细胞计数)
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
* 低于检测下限
+PMA
-PMA
条件 A
条件 B
条件 C
条件 D
条件 E
条件 F

图2A

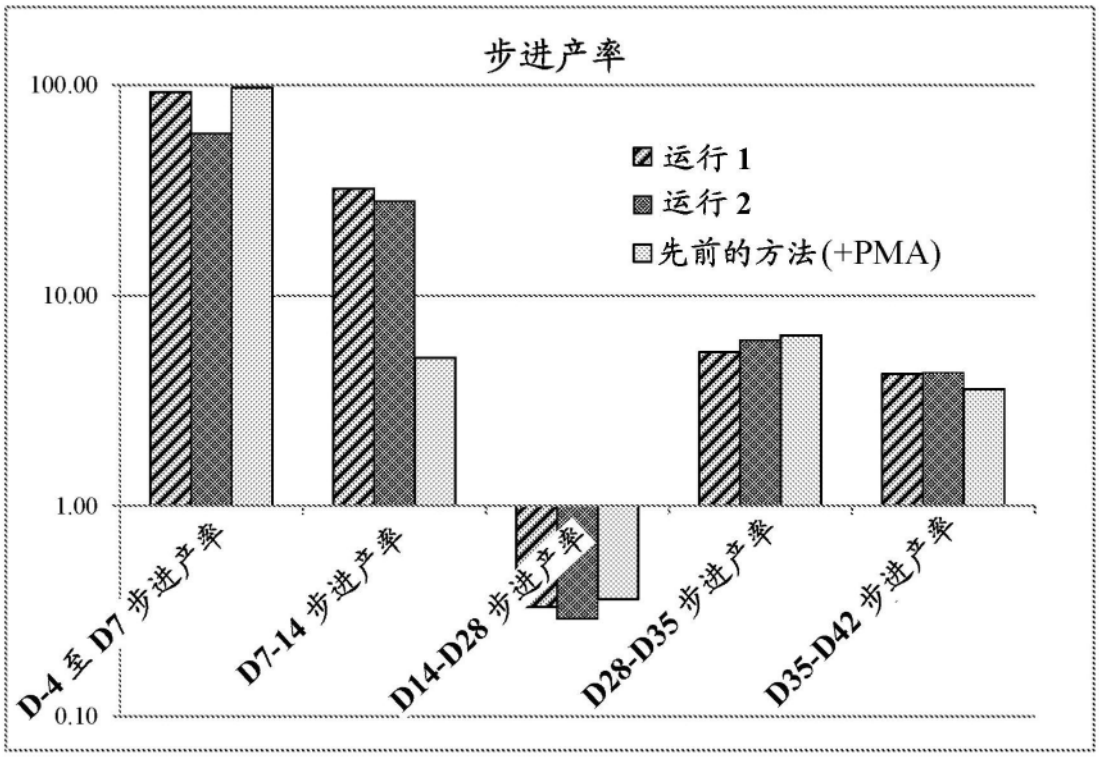

步进产率
100.00
10.00
1.00
0.10
运行 1
运行 2
先前的方法(+PMA)
D-4 至 D7 步进产率
D7-14 步进产率
D14-D28 步进产率
D28-D35 步进产率
D35-D42 步进产率

图2B

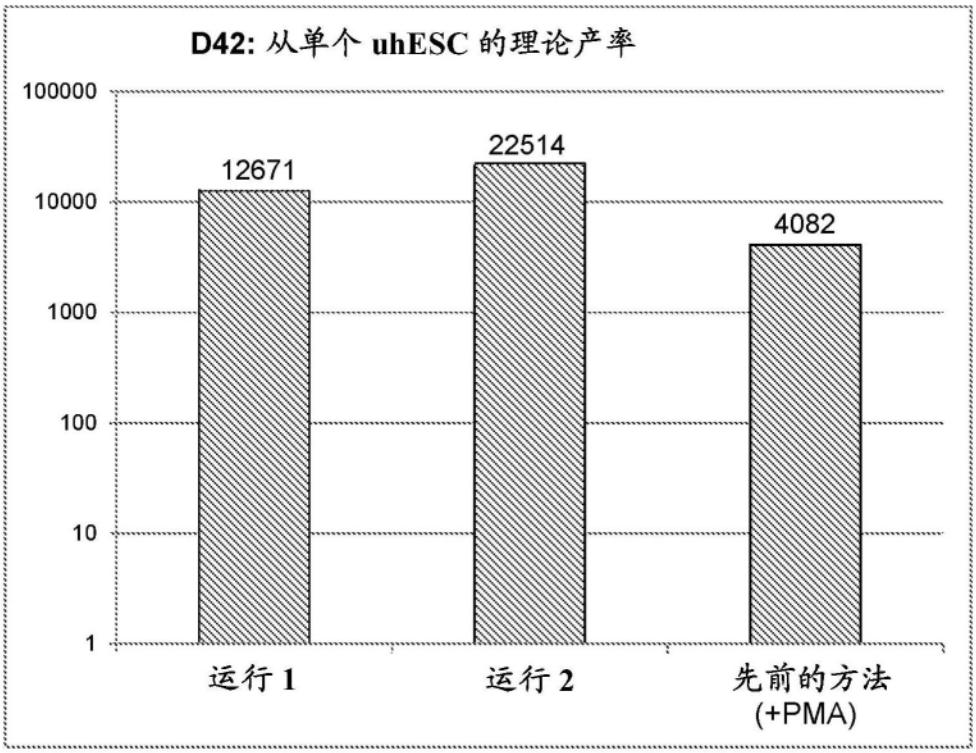

D42: 从单个 uhESC 的理论产率
100000
10000
1000
100
10
1
12671
22514
4082
运行 1
运行 2
先前的方法
(+PMA)

图2C

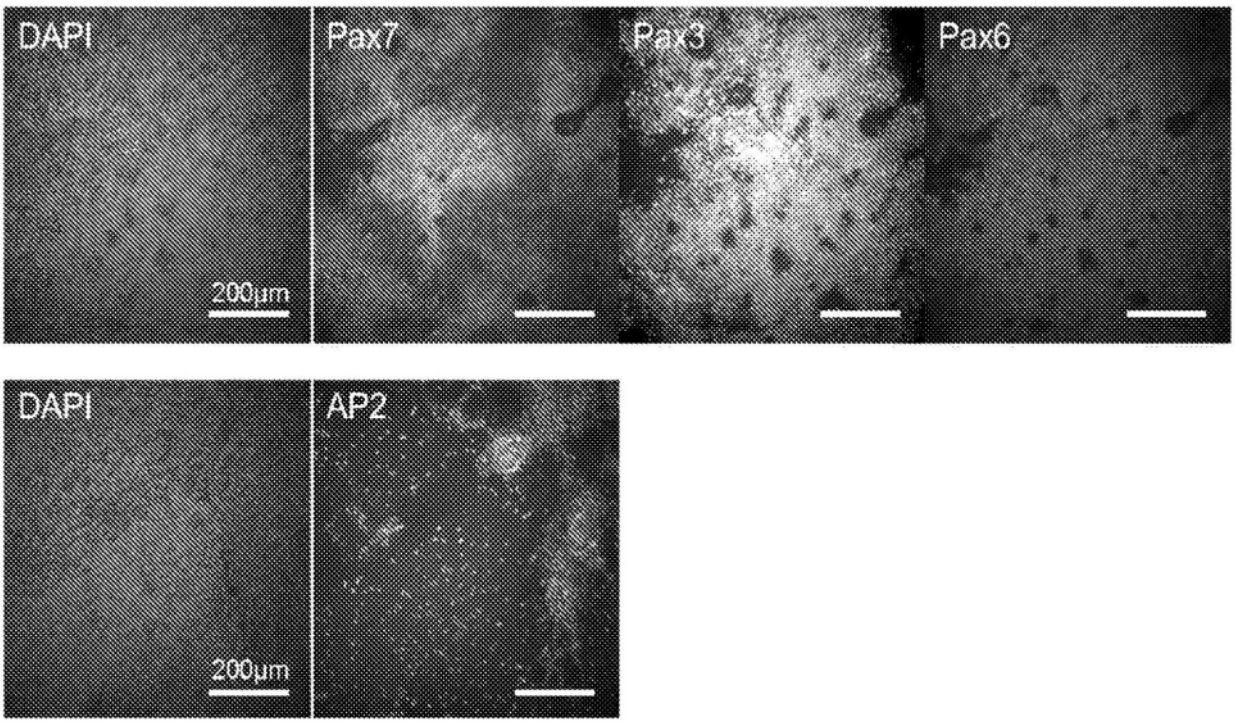

DAPI
Pax7
Pax3
Pax6
200μm
DAPI
AP2
200μm

图3

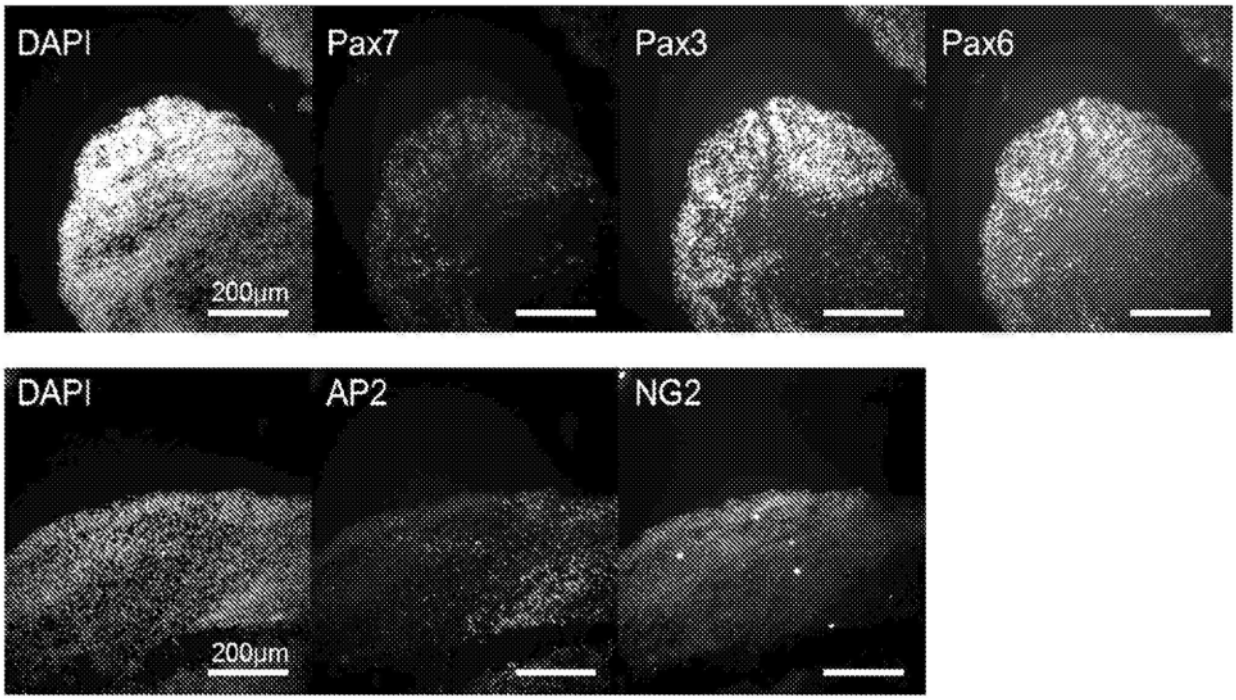


图4

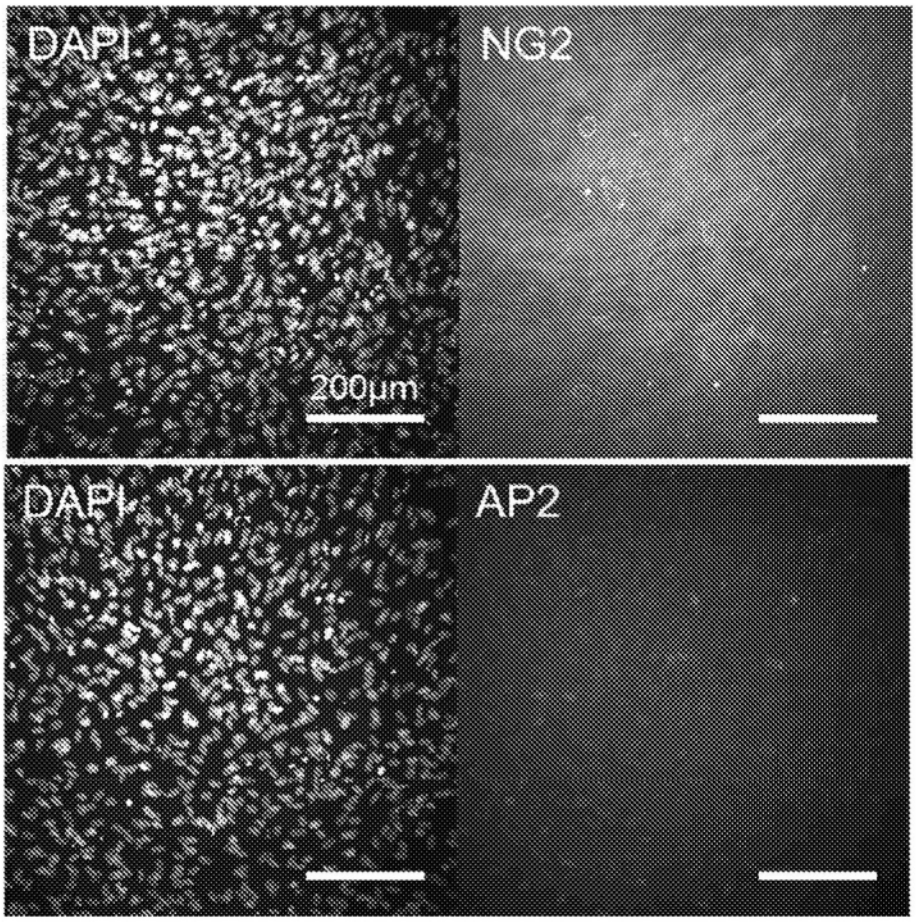


图5

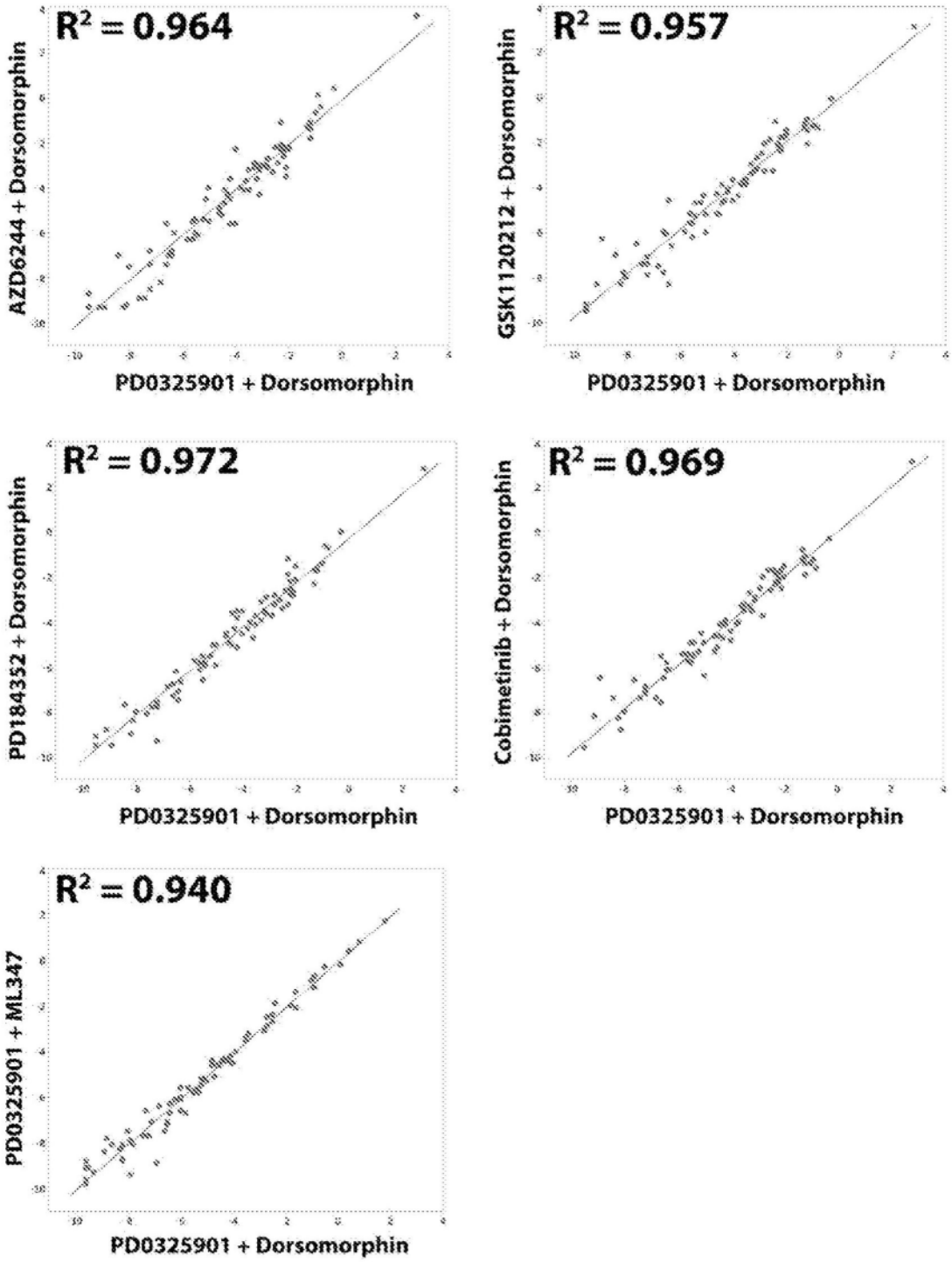

R² = 0.964
AZD6244 + Dorsomorphin
PD0325901 + Dorsomorphin
R² = 0.957
GSK1120212 + Dorsomorphin
PD0325901 + Dorsomorphin
R² = 0.972
PD184352 + Dorsomorphin
PD0325901 + Dorsomorphin
R² = 0.969
Cobimetinib + Dorsomorphin
PD0325901 + Dorsomorphin
R² = 0.940
PD0325901 + ML347
PD0325901 + Dorsomorphin

图6