



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118679242 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 20

(21) 申请号 202280091245.2

(22) 申请日 2022.12.23

(30) 优先权数据

10-2021-0187681 2021.12.24 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.08.08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2022/021212 2022.12.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/121399 KO 2023.06.29

(71) 申请人 梨花女子大学校产学协力团

地址 韩国

申请人 荷拉生物制药有限公司

(72) 发明人 李承晋 申智英 全庭和 金希定

(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 郑天松

(51) Int.Cl.

C12N 5/071 (2010.01)

A61K 35/36 (2015.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61K 8/98 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

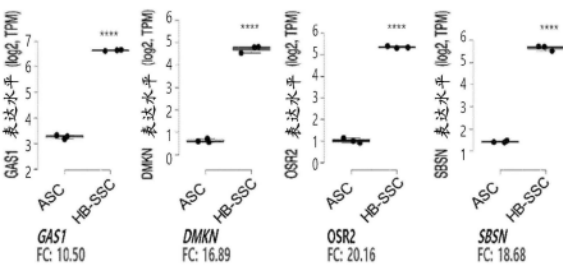
权利要求书1页 说明书10页 附图8页

(54) 发明名称

皮肤来源干细胞的培养方法及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种皮肤来源干细胞的培养方法及其用途,具体涉及一种皮肤来源干细胞的培养方法;通过所述方法制备的皮肤来源干细胞;以及用于皮肤再生或伤口治疗的药物组合物;一种准药品组合物;以及化妆品组合物,其含有制备的皮肤来源干细胞、所述皮肤来源干细胞的培养物或从所述皮肤来源干细胞分化的细胞作为活性成分。根据本发明的培养方法,可有效地从皮肤组织中分离和获得干细胞,所得到的皮肤来源干细胞具有优异的多能性和自我复制能力以及优异的皮肤再生和伤口治疗效果,可有效地用于皮肤再生和伤口治疗或改善。



1. 皮肤来源干细胞的培养方法,所述方法包括:
 - (a) 将皮肤组织包裹到水凝胶中,并培养所述皮肤组织以获得培养物;和
 - (b) 在获得的培养物中分解水凝胶,以回收已从皮肤组织迁移到水凝胶中并在水凝胶中增殖的干细胞。
2. 根据权利要求1所述的皮肤来源干细胞的培养方法,其中步骤(a)中的皮肤组织培养包括将皮肤片段包埋到水凝胶中并将皮肤片段培养3至20天。
3. 根据权利要求1所述的皮肤来源干细胞的培养方法,在步骤(a)之前包括皮肤组织的预处理步骤,所述皮肤组织的预处理步骤包括:

在50°C至70°C的温度下处理皮肤组织样品30至90秒;
将皮肤组织样本浸入酒精或表面活性剂中1至10分钟;及
进行清洗。
4. 根据权利要求1所述的皮肤来源干细胞的培养方法,其中所述皮肤来源干细胞具有选自下列中的一个以上基因的表达增加:GAS1、OSR2、DMKN或SBSN。
5. 根据权利要求1所述的皮肤来源干细胞的培养方法,其中所述皮肤来源干细胞具有如下免疫学特性:

CD29、CD44、CD73、CD90和CD105表达,
但CD14、CD34和CD45不表达。
6. 根据权利要求1所述的皮肤来源干细胞的培养方法,其中所述皮肤来源干细胞在组织培养和细胞分离后保持细胞形状和细胞大小直至第九代传代培养。
7. 皮肤来源干细胞,其通过根据权利要求1所述的方法制备。
8. 根据权利要求7所述的皮肤来源干细胞,其中所述皮肤来源干细胞具有选自下列中的一个以上基因的表达增加:GAS1、OSR2、DMKN或SBSN。
9. 根据权利要求7所述的皮肤来源干细胞,其中所述皮肤来源干细胞具有如下免疫学特性:

CD29、CD44、CD73、CD90和CD105表达,
但CD14、CD34和CD45不表达。
10. 用于皮肤再生或伤口治疗的药物组合物,其包含通过根据权利要求1所述的方法制备的皮肤来源干细胞、所述皮肤来源干细胞的培养物或从所述皮肤来源干细胞分化的细胞作为活性成分。
11. 用于皮肤再生或伤口改善的准药品组合物,其包含通过根据权利要求1所述的方法制备的皮肤来源干细胞、皮肤来源干细胞的培养物、或从皮肤来源干细胞分化的细胞作为活性成分。
12. 用于皮肤再生或伤口改善的化妆品组合物,其包含通过根据权利要求1所述的方法制备的皮肤来源干细胞、所述皮肤来源干细胞的培养物或从所述皮肤来源干细胞分化的细胞作为活性成分。

皮肤来源干细胞的培养方法及其用途

【技术领域】

[0001] 本发明涉及一种皮肤来源干细胞的培养方法及其用途,特别涉及一种皮肤来源干细胞的培养方法;通过所述方法制备的皮肤来源干细胞;以及用于皮肤再生或伤口治疗的药物组合物;一种准药品组合物;以及化妆品组合物,其含有制备的皮肤来源干细胞、所述皮肤来源干细胞的培养物或从所述皮肤来源干细胞分化的细胞作为活性成分。

【背景技术】

[0002] 干细胞是处于分化阶段的细胞,在分化为构成组织的相应细胞之前,并且是可在未分化状态下无限增殖并具有通过特异性分化刺激分化成各种组织细胞的潜力的细胞。

[0003] 干细胞根据分化潜力主要分为胚胎干细胞(ES细胞)和成体干细胞(组织特异性干细胞)。胚胎干细胞是从内细胞团(ICM)(受精卵形成但尚未植入子宫内膜的初始阶段,将发育成囊胚胚胎的胎儿)中分离出来的干细胞,并且是有可能分化成所有组织细胞的细胞。

[0004] 同时,组织特异性干细胞是在胚胎发育过程进行和胚胎的每个器官形成的阶段出现的对每个器官具有特异性的干细胞,并且它们的分化能力通常仅限于构成组织的细胞。具有代表性的组织特异性干细胞包括存在于骨髓中的造血干细胞和分化为血细胞以外的结缔组织细胞的间充质干细胞。造血干细胞分化成红细胞、白细胞等各种血细胞,间充质干细胞分化成成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、成肌细胞等。

[0005] 最近,自从成功地从人类中分离出胚胎干细胞以来,人们对其临床应用的兴趣在增加。最受关注的干细胞应用是利用干细胞作为细胞替代疗法的细胞源。

【发明概述】

【技术问题】

[0008] 现有的皮肤干细胞分离方法是一种利用胶原酶等的酶促分离方法(韩国专利公开 No.10-2014-0075469A),其缺点是由于对细胞表面蛋白质的损伤是不可避免的,因此需要研究皮肤干细胞的分离和培养方法。

[0009] 在此背景下,本发明人进行了各种研究以开发新的干细胞,结果发现,通过本发明的培养方法制备的皮肤来源干细胞具有优异的体外增殖能力、细胞性能和分化能力,并可用于皮肤再生和伤口治疗,从而完成了本发明。

【技术方案】

[0011] 本发明的目的在于提供一种利用皮肤组织和水凝胶进行的皮肤来源干细胞的培养方法。

[0012] 本发明的另一目的是提供通过所述方法制备的皮肤来源干细胞。

[0013] 本发明的又一目的是提供一种用于皮肤再生或伤口治疗的药物组合物,其含有皮肤来源干细胞、所述皮肤来源干细胞的培养物或从所述皮肤来源干细胞分化的细胞作为活性成分。

[0014] 本发明的又一目的在于提供一种用于皮肤再生或伤口改善的准药品组合物,其含有皮肤来源干细胞、所述皮肤来源干细胞的培养物或从所述皮肤来源干细胞分化的细胞作

为活性成分。

[0015] 本发明的又一目的在于提供一种用于皮肤再生或伤口改善的化妆品组合物,其含有皮肤来源干细胞、所述皮肤来源干细胞的培养物或从所述皮肤来源干细胞分化的细胞作为活性成分。

[0016] 本发明的又一目的在于提供一种用于皮肤来源干细胞培养的组合物,其含有皮肤组织和水凝胶。

[0017] 本发明的又一目的在于提供一种用于皮肤来源干细胞培养的试剂盒,其中包含用于干细胞培养的组合物。

[0018] **【有利效果】**

[0019] 根据本发明的培养方法,可有效地从皮肤组织中分离和获得干细胞,并且所得到的皮肤来源干细胞具有优异的多能性和自我复制能力以及优异的皮肤再生和伤口处理效果,可有效地用于皮肤再生和伤口的治疗或改善。

【附图说明】

[0020] 图1示出了本发明的HB-皮肤来源干细胞的组织培养结果(图1A)和细胞分离和培养的结果(图1B);

[0021] 图2示出了本发明的HB-皮肤来源干细胞的免疫表型检查结果;

[0022] 图3示出了在进行传代培养时检查本发明的HB-皮肤来源干细胞增殖能力的结果;

[0023] 图4示出了本发明的HB-皮肤来源干细胞(HB-SSC)的集落形成能力的检查结果;

[0024] 图5A示出了本发明的HB-皮肤来源干细胞在脂肪细胞中的分化能力的检查结果;

[0025] 图5B示出了本发明的HB-皮肤来源干细胞在骨细胞中的分化能力的检查结果;

[0026] 图6A示出了基于DB的皮肤再生功能相关基因String网络分析结果和鉴定HB-皮肤来源干细胞(HB-SSC)特异性皮肤再生功能基因的结果;

[0027] 图6B示出了本发明的HB-皮肤来源干细胞(HB-SSC)中特异性表达的皮肤再生功能基因与脂肪来源干细胞(ASC)中特异性表达的皮肤再生功能基因表达水平的比较分析结果;

[0028] 图6C示出了本发明的HB-皮肤来源干细胞(HB-SSC)中特异性表达的皮肤再生功能基因与脂肪来源干细胞(ASC)中特异性表达的皮肤再生功能基因表达水平的比较分析结果;

[0029] 图7A示出了本发明的HB-皮肤来源干细胞(HB-SSC)在小鼠模型中检测伤口愈合效果的结果;

[0030] 图7B示出了本发明的HB-皮肤来源干细胞(HB-SSC)在小鼠模型中检测伤口愈合效果的结果;和

[0031] 图8示出了本发明的HB-皮肤来源干细胞(HB-SSC)在小鼠伤口模型中的皮肤和皮肤结构再生能力的检查结果。

[0032] **【发明详述】**

[0033] 以下,将对本发明进行详细说明。同时,本发明所公开的各描述和各实施方式也可分别应用于其他描述和其它实施方式。也就是说,本发明中公开的各种元素的所有组合都落入本发明的保护范围。此外,本发明的保护范围不受以下具体描述的限制。

[0034] 本发明的一个方面旨在实现上述目的,提供一种利用皮肤组织和水凝胶进行的皮肤来源干细胞的培养方法,以及通过所述方法皮肤来源干细胞的培养方法。

[0035] 在本发明中,术语“皮肤来源干细胞”可包括来源于皮肤组织的所有干细胞,例如,可包括脂肪干细胞、表皮干细胞和真皮干细胞,但不限于此。

[0036] 具体地,培养皮肤组织来源干细胞的培养方法包括:(a) 将皮肤组织包埋在水凝胶中,并培养所述皮肤组织以获得培养物;(b) 在获得的培养物中分解水凝胶,以回收已从皮肤组织迁移到水凝胶中并在水凝胶中增殖的干细胞。

[0037] 在本发明中,所述水凝胶是指通过共价键或非共价键交联亲水性聚合物而形成的三维网络结构。由于皮肤组织被三维包埋到水凝胶中,因此水凝胶可为皮肤组织提供物理支持,同时提供使皮肤组织中存在的皮肤来源干细胞能够迁移到水凝胶中并在水凝胶中增殖的细胞外基质功能。

[0038] 为了水凝胶支持的三维培养,本发明的水凝胶优选为以溶液状态存在并能转化为溶胶和凝胶的相变水凝胶,并且可具体地选自下列中的一种以上:胶原蛋白、明胶、软骨素、透明质酸、海藻酸、基质胶TM、壳聚糖、肽、纤维蛋白、PGA(聚乙醇酸)、PLA(聚乳酸)、PEG(聚乙二醇)和聚丙烯酰胺,但不限于此。步骤(a)可包括将皮肤组织包埋到多层水凝胶中并进行培养。步骤(a)可具体包括将皮肤组织包埋到双层水凝胶中并进行培养,但不限于此。

[0039] 在步骤(a)中,将包裹到皮肤组织的水凝胶中的水凝胶的培养可在将包裹到其中的皮肤组织的水凝胶浸入本领域已知适合于干细胞培养的常规培养基中后进行。

[0040] 在步骤(a)中,皮肤组织的培养可涉及将皮肤片段包埋到水凝胶中,并将皮肤片段培养3至20天、3至18天或3至16天。培养可具体进行3至14天,但不限于此。

[0041] 在本发明的示例性实施方式中,收集健康成年人的皮肤,形成皮肤片段,并将皮肤片段包埋到水凝胶中并培养9天。

[0042] 作为步骤(a)之前的皮肤组织预处理步骤,该步骤在50℃至70℃的温度下处理皮肤组织样品30至90秒;将皮肤组织样本浸入酒精或表面活性剂中1至10分钟的步骤;并且可包括执行洗涤的步骤。

[0043] 此时,用于皮肤组织处理步骤的温度可为50℃至70℃、52℃至68℃、54℃至66℃、56℃至64℃、58℃至62℃或60℃,但不限于此。

[0044] 用于皮肤组织处理步骤的时间可为30秒至90秒、40秒至80秒、50秒至70秒、55秒至65秒、58至62秒、59秒、60秒或61秒,但不限于此。

[0045] 在将皮肤组织样品浸入预处理步骤中使用的醇或表面活性剂中,可包括具有1-4个碳原子的醇,具体可为乙醇、甲醇、丙醇、异丙醇等,但不限于此。

[0046] 所述表面活性剂可包括两性表面活性剂或非离子表面活性剂。

[0047] 两性表面活性剂可包括磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱等,但不限于此。

[0048] 所述非离子表面活性剂可包括甘油的脂肪酸酯、山梨糖醇的脂肪酸酯、Spans或Tweens等,可具体包括甘油单硬脂酸酯、甘油单月桂酸酯、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、脱水山梨糖醇单硬脂酸酯、脱水山梨糖醇三硬脂酸酯、吐温20、吐温40、吐温60、吐温80等,但不限于此。

[0049] 将皮肤组织样品浸入醇或表面活性剂中的步骤是用于去除皮肤组织的脂肪层,并

且包括通过本领域中使用的任何手段使组织与酒精或表面活性剂接触的任何方法,例如浸泡、喷涂或涂敷,并且没有特别限制。

[0050] 将皮肤组织样品浸入酒精或表面活性剂中的步骤时间可为1分钟至10分钟、2分钟至9分钟、3分钟至8分钟、4分钟至7分钟、4分钟30秒至6分30秒、5分钟至5分30秒、或5分钟,但不限于此。

[0051] 本技术领域中的预处理步骤中的洗涤步骤只要是可用本领域常用的清洗剂洗涤,就没有特别限制。

[0052] 作为具体示例,所述清洗剂可为PBS,洗涤次数可为1~10次、2~8次、3次、4次、5次、6次或7次,但洗涤步骤不限于此。

[0053] 皮肤组织样品可为利用从动物中摘取的皮肤组织制备的样品或人类捐赠的皮肤组织,但不限于此。

[0054] 在本发明的实施方式中,将皮肤组织作为样品,进行预处理步骤,将皮肤组织在约60℃下处理约1分钟以分离角质层,将皮肤组织浸入异丙醇中5分钟以去除皮肤的脂肪层,然后进行洗涤。

[0055] 在步骤(b)中,仅水凝胶可被选择性分解,以便回收在步骤(a)的水凝胶支持的三维培养后在水凝胶中迁移/增殖的毛囊来源干细胞。

[0056] 水凝胶可通过选自下列中的一种以上酶进行分解:胶原酶、明胶酶、尿激酶、链激酶、TPA(组织纤溶酶原激活剂)、纤溶酶和透明质酸酶。

[0057] 本发明的皮肤干细胞分离/培养技术是一种基于水凝胶的生态位保存自复制诱导分离技术,其为分离干细胞的技术,对应于允许皮肤组织在体外存活/培养,并无需酶处理而直接从组织中分离高纯度细胞的新技术。

[0058] 与现有方法不同,该分离方法具有以不同于现有的方式在体外增殖能力和细胞性能方面具有优越性的优点。

[0059] 通过现有方法分离的细胞在体外只能扩增多达2-3次传代(最多5次传代),但是通过本发明方法分离的细胞具有即使细胞传代培养8次以上也不会发生细胞衰老的优异的性能,并且可长时间传代培养,从而可用于细胞的大规模生产。

[0060] 已经发现,通过所述方法制备的皮肤来源干细胞在组织培养和细胞分离后即使第九次传代培养,也保持细胞形状和细胞大小。

[0061] 同时,通过本发明提供的皮肤来源干细胞的制备方法制备的皮肤来源干细胞表现出免疫学特性,其中CD29、CD44、CD73、CD90或CD105在细胞表面表达,但CD14、CD34或CD45不表达,并表现出可分化为脂肪细胞,骨细胞等的多能特性,但不限于此。

[0062] 所述皮肤来源干细胞可与通过本发明提供的皮肤来源干细胞制备方法制备的皮肤来源干细胞、本发明的皮肤来源干细胞、皮肤来源干细胞、HB-皮肤来源干细胞、本发明的HB-皮肤来源干细胞和HB-SSC互换使用。

[0063] 在本发明的实施方式中,可验证通过本发明的皮肤来源干细胞的制备方法制备的皮肤来源干细胞的增殖能力、分化能力和集落形成能力。

[0064] 在本发明的实施方式中,可验证通过本发明的皮肤来源干细胞的制备方法制备的皮肤来源干细胞的皮肤创伤治疗效果。

[0065] 在本发明的实施方式中,通过评估传代培养时细胞生长能力/细胞衰老(体外增殖

能力)和原代细胞的纯度,可进一步验证通过本发明的毛囊来源干细胞的制备方法制备的毛囊来源干细胞在体外具有较长的存活期和优异的活力。

[0066] 通过本发明提供的皮肤来源干细胞的制备方法制备的皮肤来源干细胞可表达特定的皮肤再生功能基因。

[0067] 此时,皮肤再生功能基因可具体地为选自下列的一个以上基因:OSR2(奇数跳过相关2)、DMKN(dermokine)、SBSN(Suprabasin)或GAS1(生长停滞特异性1),但不限于此,并且可包括任何已知为皮肤再生功能基因的基因。

[0068] 在本发明的实施方式中,发现通过皮肤来源干细胞的制备方法制备的皮肤来源干细胞中所述4种皮肤再生功能基因的表达水平是脂肪来源干细胞中的表达水平的10倍以上的显著的表达水平,可验证通过本公开的方法制备的皮肤来源干细胞表现出特定的皮肤再生功能基因。

[0069] 本发明的另一方面提供一种用于皮肤再生或伤口治疗的药物组合物,其含有皮肤来源干细胞、所述皮肤来源干细胞的培养物或从所述皮肤来源干细胞分化的细胞作为活性成分。

[0070] 在本发明中,术语“皮肤再生”可指皮肤组织对皮肤外部和内部原因引起的皮肤损伤的恢复过程,而由外部原因引起的损伤可为紫外线造成的损伤、污染物造成的损伤、创伤、外伤等,而内部原因可包括遗传和心理原因,但不局限于此。

[0071] 皮肤再生是可包括皮肤再生或皮肤细胞的增殖的概念,而皮肤细胞的增殖可包括促进皮肤细胞从休止期向生长期的转化,但不局限于此。

[0072] 在本发明中,术语“培养物”或“培养液”可指在培养基中或培养皮肤来源干细胞期间或之后获得的培养物,或其上清液、其浓缩物或其冻干产品。

[0073] 在本发明中,术语“药物组合物”是指为预防或治疗疾病而制备的产品,并且可在实际临床给药中以各种口服和肠胃外剂型给药,并且可使用常用的稀释剂或赋形剂(如填充剂、填充剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂和表面活性剂)配制。

[0074] 根据制剂的不同,可进一步包含药学上可接受的添加剂,并且此时,作为药学上可接受的添加剂,可使用:淀粉、糊化淀粉、微晶纤维素、乳糖、聚维酮、胶体二氧化硅、磷酸氢钙、乳糖、甘露糖醇、麦芽糖、阿拉伯树胶、预胶化淀粉、玉米淀粉、粉状纤维素、羟丙基纤维素、欧巴代、乙醇酸淀粉钠、巴西棕榈酸铅、合成硅酸铝、硬脂酸、硬脂酸镁、硬脂酸铝、硬脂酸钙、白糖、葡萄糖、山梨糖醇和滑石粉。根据本发明的药学上可接受的添加剂可含有0.1~90重量份的组合物。

[0075] 除了皮肤来源的间充质干细胞外,药物组合物还可含有一种以上常规的药学上可接受的惰性载体,例如,防腐剂、镇痛药、增溶剂、稳定剂等,在局部给药用制剂的情况下,还可含基剂、赋形剂、润滑剂、防腐剂等。

[0076] 本发明的药物组合物可作为单独的治疗剂给药或与其他治疗剂组合给药,并且可与常规治疗剂顺序或同时给药。本发明的药物组合物可单次给药或多次给药。重要的是,在考虑到所有因素的情况下,以能够承受最大效果并且不引起副作用的最小量施用本发明的药物组合物,可由本领域技术人员轻松确定。

[0077] 此外,本发明提供的药物组合物除了皮肤来源干细胞以外,还可含有有助于皮肤再生或伤口治疗,保持皮肤来源干细胞的活性,或促进皮肤来源干细胞的分化的各种成分,

例如,还可含有抗炎剂、干细胞动员因子、生长诱导因子等。

[0078] 在本发明中,术语“改善”可指通过向个体施用本发明的组合物来延缓皮肤损伤的进展或缓解症状的任何行为。

[0079] 在本发明中,术语“预防”可指通过向个体施用本发明的组合物来抑制或延缓皮肤损伤发生的任何行为。

[0080] 在本发明中,术语“治疗”可指通过向怀疑具有皮肤损伤的个体施用本发明的组合物来使皮肤损伤症状好转或变得有利的任何行动。

[0081] 本发明的又一目的在于提供一种用于皮肤再生或伤口改善或治疗的方法,其包括向个体施用含有皮肤来源干细胞、所述皮肤来源干细胞的培养物或从所述皮肤来源干细胞分化的细胞作为活性成分的组合物。

[0082] 所述皮肤来源干细胞、皮肤来源干细胞的培养物,或从所述皮肤来源干细胞分化的细胞,皮肤再生、伤口改善和治疗均如上所述。

[0083] 在本发明中,术语“给药”是指以适当的方式将组合物导入个体。具体地,含有本发明的皮肤来源干细胞、皮肤来源干细胞的培养物,或从皮肤来源干细胞分化的细胞作为活性成分的组合物,或含有所述组合物的药物组合物可施用于局部部位,例如,施用于受损或受伤的皮肤部位或作为注射剂给药,但不局限于此。

[0084] 所述组合物可与可用于治疗皮肤损伤或伤口的其它药物组合物组合使用。

[0085] 在本发明中,术语“个体”是指具有或可能发展为皮肤损伤或伤口的任何动物,例如大鼠、小鼠和牲畜,包括人类。该动物可为人类,也可需要预防或治疗与其类似的症状的哺乳动物,例如牛、马、绵羊、猪、山羊、骆驼、羚羊、狗或猫,但不限于此。

[0086] 本发明的组合物可以药学上有效的量给药。

[0087] 术语“药剂量”是指足以治疗疾病的量,具有适用于医学治疗的合理收益/风险比,有效剂量水平可根据包括个体的类型和严重程度、年龄、性别、药物活性、对药物的敏感性、给药时间、给药通路和排泄率,治疗时间,以及同时使用的药物,以及医学领域中众所周知的其他因素确定。

[0088] 所述组合物可作为单独的治疗剂给药或与其他治疗剂组合给药,并且可与常规治疗剂顺序或同时给药。所述组合物可单次给药或多次给药。考虑到所有因素,以能够承受最大效果并且不引起副作用的最小量施用组合物是很重要的,其可由本领域技术人员轻松确定。

[0089] 所述组合物可口服或肠胃外给药(例如,静脉内、皮下、腹膜内或局部给药),具体取决于所需的方法,并且剂量根据患者的状况和体重、疾病程度、药物形式以及给药的途径和时间而变化,但可由本领域的技术人员适当选择。作为具体示例,所述组合物通常可每天给药一次或数次,但是优选的剂量可由本领域技术人员根据个体的状况和体重、疾病程度、药物形式以及给药的途径和期间适当地选择。

[0090] 本发明的又一目的在于提供一种用于皮肤再生或伤口改善的准药品组合物,其含有皮肤来源干细胞、所述皮肤来源干细胞的培养物或从所述皮肤来源干细胞分化的细胞作为活性成分。

[0091] 在本发明中,术语“准药品组合物”是用于治疗、缓解、治愈或预防人类或动物疾病的物品,其对应于纺织品、橡胶制品或类似物品中的一种;对人体作用较弱或不直接作用于

人体且不是仪器、机器的物品及类似物品;以及用于灭菌、杀虫和类似目的预防感染的制剂,是指用于诊断、治疗、缓解、治愈或预防人类或动物疾病的物品,不包括非器械、机器或装置的物品和用于对人类或动物的结构和功能产生药理作用的物品,不包括非器械的物品,机器或设备,并且可为专门用于外用的皮肤制剂或个人护理产品。

[0092] 本发明的又一目的在于提供一种用于皮肤再生或伤口改善的化妆品组合物,其含有皮肤来源干细胞、所述皮肤来源干细胞的培养物或从所述皮肤来源干细胞分化的细胞作为活性成分。

[0093] 在本发明中,术语“化妆品组合物”可制备在任何常用的制剂中,例如,可配制成溶液、乳液、混悬浮液、糊剂、乳膏、化妆水、凝胶、粉末、喷雾剂、含表面活性剂的清洁产品、油、肥皂、液体洗涤剂、浴盐、粉底、化妆底、精华液、爽肤水、泡沫、包装、软化水、防晒霜或防晒油。

[0094] 本发明的又一目的在于提供一种用于皮肤来源干细胞培养的组合物,其含有皮肤组织和水凝胶,以及一种用于皮肤来源干细胞培养的试剂盒,含有所述组合物。

[0095] 此外,用于皮肤来源干细胞培养的试剂盒可包括用于干细胞培养的组合物和各种组分,例如用于培养干细胞所需的溶液和装置。

[0096] 本发明的又一目的在于提供含有皮肤来源干细胞、所述皮肤来源干细胞的培养物或从所述皮肤来源干细胞分化的细胞作为活性成分的组合物用于皮肤再生或伤口改善的用途。

【实施例】

[0097] 以下,将结合实施例对本发明进行更详细的描述。但是,这些实施例仅用于说明目的,本发明的保护范围并不局限于这些实施例。

[0098] 【实施例1.纤维蛋白水凝胶支持的皮肤组织的三维培养】

[0099] 以从动物摘取的皮肤组织或人类捐赠的皮肤组织作为样本,将皮肤组织在60℃下处理1分钟以分离角质层,在异丙醇中浸泡5分钟以去除皮肤的脂肪层,然后用PBS(Gibco)洗涤3次以对皮肤组织进行预处理。用镊子固定处理过的组织,用剃须刀片切成1至3mm²的片段,并用PBS洗涤3次。用DMEM(低葡萄糖,Gibco)洗涤一次后,除去上清液,加入5mL纤维蛋白原溶液(在DMEM中0.25%w/v纤维蛋白原(GC Biopharma)和200μg/mL氨甲环酸(Shin Poong Pharmaceutical))。加入等量的凝血酶溶液(在DMEM中0.5IU/mL凝血酶(GC Biopharma))后,立即将混合物转移到100mm培养容器中并轻轻滚动以均匀分布组织片段和水凝胶。必要时,使用镊子来固定组织片段间距。通过在室温下培养5分钟和在37℃下培养2小时,可获得充分的凝胶化。加入含有100μg/mL氨甲环酸的生长培养基(90%低DMEM:F12=1:1,10%胎牛血清,20ng/mL表皮生长因子,5ng/mL碱性成纤维细胞生长因子,10ng/mL胰岛素样生长因子和10mg/mL庆大霉素),每1h更换培养基而培养3h。之后,每2至3天更换一次生长培养基。

[0100] 【实施例2.迁移到纤维蛋白水凝胶中并在纤维蛋白水凝胶中生长的HB-皮肤来源干细胞的回收和扩增培养】

[0101] 通过实施例1中描述的方法将皮肤组织培养约10天。将水凝胶用温热的PBS洗涤3次3分钟后,加入30% FBS/DMEM,并在轨道振荡器(30rpm)上进行搅拌。1小时后除去上清液

后,加入10mL 30% FBS/低DMEM,补充有3,000单位尿激酶(GC Biopharma),并分解凝胶。当凝胶充分分解时,在静态条件下进行过夜培养,然后除去上清液,加入生长培养基,并以常规方式进行培养。生长培养基每2至3天更换一次,每4至6天进行一次传代培养。

[0102] 通过上述方法进行组织培养和细胞分离及培养的结果如图1所示。

[0103] 具体来说,当细胞在组织培养后分离和传代培养时,发现即使到第九次传代培养也一直保持细胞的形状和大小。

[0104] 【实施例3.分离和培养的HB-皮肤来源干细胞的免疫表型检查】

[0105] 为了检查通过实施例2的方法分离和培养的HB-皮肤来源干细胞的免疫表型,在T75烧瓶中培养的细胞用PBS洗涤一次,然后用3mL TrypleExpress (Gibco) 处理3分钟以剥离细胞。向剥离的细胞中加入6mL 10%小牛血清/PBS以抑制蛋白水解反应。离心(300g,5分钟)后,除去上清液,将细胞悬浮于3%牛血清白蛋白(SIGMA)/PBS中。

[0106] 将细胞悬浮液分成9等份,并在4℃下与以下抗体反应1小时:FITC偶联的CD29(Bio-rad,1:10)、CD44(Invitrogen,1:100)、CD90(Invitrogen,1:20)、CD14(Invitrogen,1:20)抗体、AlexaFluor488偶联的CD105(abcam,1:25)、PE偶联的CD73(Invitrogen,1:20)抗体、PerCP偶联的CD34(Santacruz,1:5)抗体或AlexaFluor594偶联的CD45(Novus,1:20)抗体。反应后,将反应混合物以300g离心5分钟,洗涤,悬浮于3% BSA/PBS中,并使用流式细胞仪(BD)进行测量(图2)。

[0107] 结果,从图2可看出,发现CD29、CD44、CD73、CD90和CD105在分离和培养的HB-皮肤来源干细胞表面表达,但CD14、CD34和CD45未表达。

[0108] 具体来说,发现间充质干细胞标志物CD29、CD44、CD90、CD73和CD105呈阳性表达(95%以上),而造血细胞标志物CD14、CD34和CD45呈阴性表达(小于5%)。

[0109] 【实施例4.分离和培养的HB-皮肤来源干细胞的增殖能力和集落形成能力的检查】

[0110] 为了检查实施例2中获得的分离和培养的HB-皮肤来源干细胞的增殖能力,通过在初始培养时以4000个细胞/cm²的密度接种细胞并每4天传代培养一次获得的细胞数量来测量根据传代次数的群倍增时间。

[0111] 通过台盼蓝染色计算未染色细胞的数量来测量细胞数,并且根据以下公式计算群倍增时间(PDTs),如图3所示: $PDT = [\text{天}/(\log N_2 - \log N_1)] / \log 2$, ($N_1 = 4,000$ 个细胞, $N_2 = 4$ 天后的细胞数)。

[0112] 为了检查实施例2中获得的分离和培养的HB-皮肤来源干细胞的集落形成能力,将人皮肤来源干细胞(4次传代)以20个细胞/孔接种在6孔板中。将细胞以每3天更换一次生长培养基而培养14天。用PBS洗涤细胞,并用4%多聚甲醛(4% PFA, Sigma)在室温下固定15分钟。固定细胞用PBS洗涤3次,然后在室温下用0.5%结晶紫/甲醇染色15分钟。在将剩余的溶液全部除去后,用蒸馏水洗涤三次,观察染色的菌落,结果如图4所示。

[0113] 如图3和图4所示,发现在通过实施例2的方法获得的HB-皮肤来源干细胞的情况下,当将HB-皮肤来源干细胞传代培养至第七代并确定群体倍增时间(PDT)时,观察到PDT平均为35小时±6小时,在进行传代培养时,增殖能力得以保持,集落形成能力也达到一定水平以上。

[0114] 【实施例5.HB-皮肤来源干细胞的分化能力的检查】

[0115] 为了评估获得的HB-皮肤来源干细胞分化为脂肪细胞的能力,将细胞以 1×10^4 个

细胞/cm²的浓度接种并在生长培养基中培养至达到80%汇合度,然后将培养基更改为StemPro™脂肪生成分化试剂盒(Gibco,cat.A1007001),每3天更换一次培养基而培养14天。将细胞用4% PFA固定15分钟,用60%异丙醇反应15分钟,然后除去所有溶液,将细胞彻底干燥。将细胞在室温下用60%油红O(SIGMA)/乙醇染色15分钟,以检查细胞质中是否存在脂肪蓄积(图5A)。

[0116] 为了评估HB-皮肤来源干细胞向骨细胞的分化能力,将细胞以 1×10^4 个细胞/cm²的浓度接种并在生长培养基中培养至达到80%汇合度,然后将培养基更改为StemPro™成骨分化试剂盒(Gibco,cat.A1007201),每3天更换一次培养基而培养14天。将细胞用4% PFA固定60秒,用BCIP/NBT底物溶液(Sigma)处理,并在光阻断条件下染色10分钟,以检查碱性磷酸酶(ALP)的活性(图5B)。

[0117] 换言之,从结果来看,验证了通过本公开的培养方法获得的HB-皮肤来源干细胞具有多能性。

[0118] 【实施例6.HB-皮肤来源干细胞中差别表达基因的检测】

[0119] 对于脂肪干细胞(ASC-1、ASC-2型、ASC-3)和HB-皮肤来源干细胞(HB-SSC-1、HB-SSC-2、HB-SSC-3),使用TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit根据制造商的方案构建了双端RNA文库,并在Macrogen(韩国首尔)进行了测序。预处理过程后,使用HISAT2程序(版本2.1.0,<https://ccb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml>)将基因定位到参考基因组(版本GRCh38),并使用StringTie程序(版本2.1.3b,<https://ccb.jhu.edu/software/stringtie/>)获取每个转录本的表达谱。基因表达水平通过取TPM(每千碱基百万转录本)值的对数进行处理。使用R程序(版本4.0)的edgeR包[1]获取对照组和比较组之间的差别表达基因(1.ROBINSON,Mark D.;MCCARTHY,Davis J.;SMYTH,Gordon K.edgeR:a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data.bioinformatics,2010,26.1:139-140)(图6B和6C)。为了构建标记基因参与的生物网络,利用String数据库(版本11.5)[2]构建了蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络[2](2.SZKLARCZYK,Damian,et al.STRING v11:protein-protein association networks with increased coverage,supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets.Nucleic acids research,2019,47.D1:D607-D613)。用于构建PPI网络的生物参考是智人(Homo sapiens)。作为构建网络的设置,根据实验结果、生物数据库和文献以及基因融合等证据将代表蛋白质的节点之间的连接边缘连接起来,并且将边缘得分0.4以上的认为是显著的。网络构建后,将删除其他节点之间没有连接的孤立节点。根据KEGG数据库[3],仅提取了具有统计学意义的节点群所属的生物学功能[3](3.KANEHISA,Minoru;GOTO,Susumu.KEGG:kyotoencyclopedia of genes and genomes.Nucleic acids research,2000,28.1:27-30)(误发现率<0.05)(图6A)。两组间显著性差异检验采用T检验法,P值<0.05时为显著性。分析程序提供的统计检验结果按原样使用,小于0.05的显著性水平被认为是显著的。在表示P值超过0.05的结果的情况下,P值单独表示。

[0120] 使用String DB,将HB-皮肤来源干细胞中表达的基因与皮肤再生相关基因网络进行分析,以确定相关的信号通路,发现四个皮肤再生功能基因(GAS1、OSR2、DMKN和SBSN)表达水平较高(图6A)。在HB-皮肤来源干细胞中,鉴定出73个与脂肪来源干细胞相比倍数变化

>10的基因,其中图6A中导出的4个皮肤再生功能基因(GAS1、OSR2、DMKN和SBSN)与脂肪来源干细胞相比确认到10倍以上的差别表达(图6B和6C)。

[0121] 已知这四个皮肤再生功能基因是与皮肤再生和伤口愈合相关的免疫调节和细胞增殖相关的基因,基于此,可推断出本发明的皮肤来源干细胞制备方法制备的皮肤来源干细胞的皮肤再生和伤口愈合效果。

[0122] 【实施例7.全层皮肤创伤小鼠模型及伤口愈合效果的检验】

[0123] 使作为实验动物的12周龄的BALB/c裸鼠(Central Laboratory Animal)通过吸入3%异氟烷(Hana Pharmaceuticals)麻醉,并用酒精棉签(Meditop)消毒手术部位。将带有尺子的贴纸贴在背部,然后用无菌手术剪刀将皮肤切成正方形(5mm×5mm,25mm²)形状直至皮下层,并分离皮下组织以形成全层皮肤伤口。为了防止伤口收缩,伤口周围的部位用缝合线(ProleneTM,EHICON,cat.W8566)固定。在100μL生理盐水(NS)中悬浮5×10⁵个细胞,并将悬浮液以25μL/部位(4个部位)皮下注射(胰岛素注射器,31号)到伤口周围的部位。创伤后,用酒精棉签对周围部位进行消毒,防止感染,各实验组分别观察。各组伤口部位在创伤后第0、1、3、5、7、12、14天同时使用数码相机拍摄,使用Image J软件(美国国立卫生研究院计划,美国)测量伤口面积。伤口面积计算为每个测量日的伤口面积基于创伤后立即的伤口面积的百分比(图7A和7B)。

[0124] 从结果来看,本发明的制备方法制备的HB-皮肤来源干细胞的伤口愈合效果得到了验证。

[0125] 【实施例8.全层皮肤伤口小鼠模型中皮肤和皮肤结构再生能力的检查】

[0126] 对于组织学分析,将皮肤组织在固定剂(4%甲醛,Sigma,USA)中固定24小时。此后,将组织石蜡包埋,将块切片至6μm,并进行H&E(苏木精和伊红)染色。在光学显微镜下观察各实验组的组织,并将结果相互比较(图8)。

[0127] 从结果来看,本发明的制备方法制备的HB-皮肤来源干细胞的皮肤和皮肤结构再生效果得到了验证。

[0128] 基于上述描述,本发明所涉及的本领域技术人员可理解,本发明可以其他特定形式实现,而不改变其技术精神或本质特征。因此,应该理解,上述实施例不是限制性的,而是在所有方面都具有说明性的。本发明的范围是由所附权利要求定义的,而不是由它们前面的描述定义的,因此,属于权利要求范围和界限或这种范围和界限的等同物的所有更改和修改都旨在被本发明的权利要求所包含。

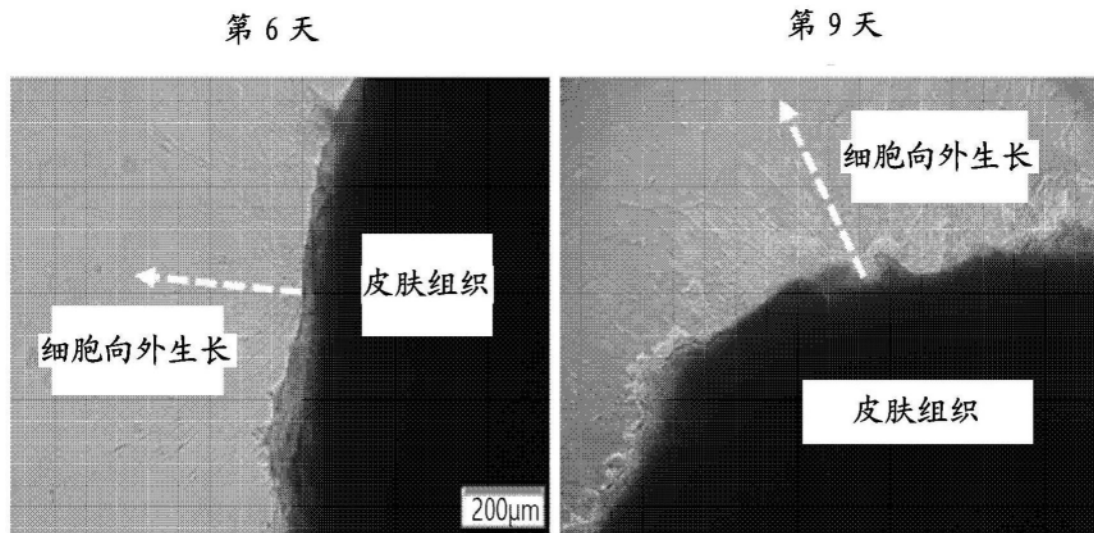


图1A

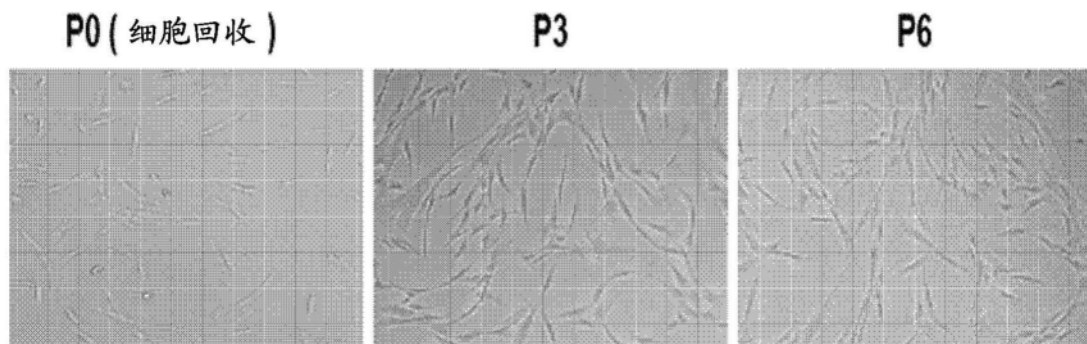


图1B

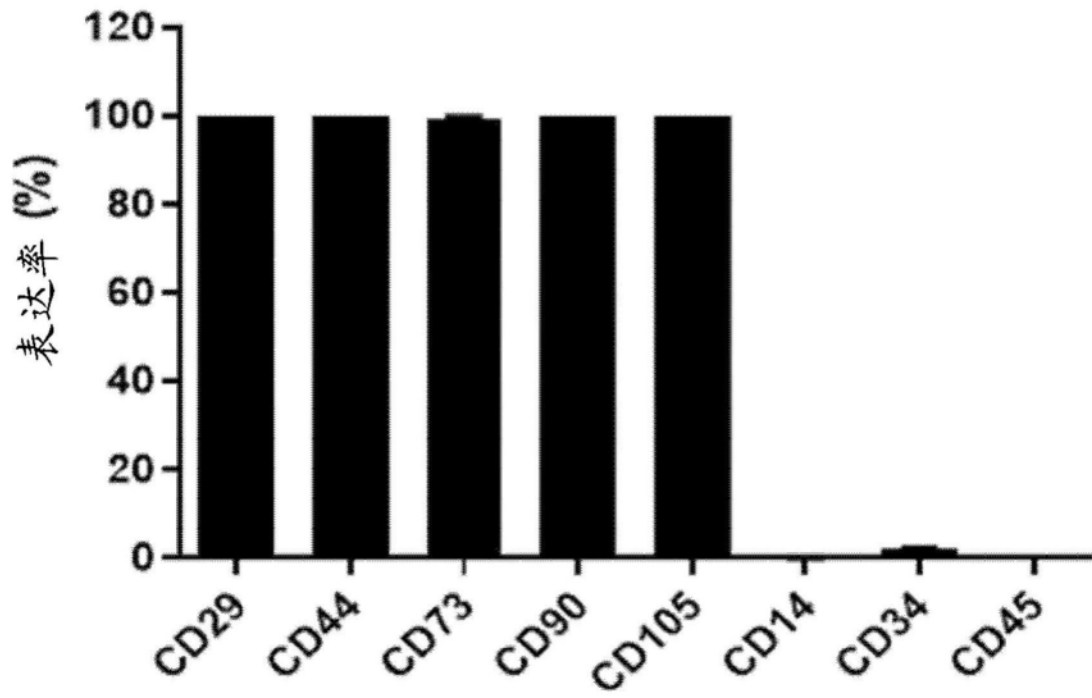


图2

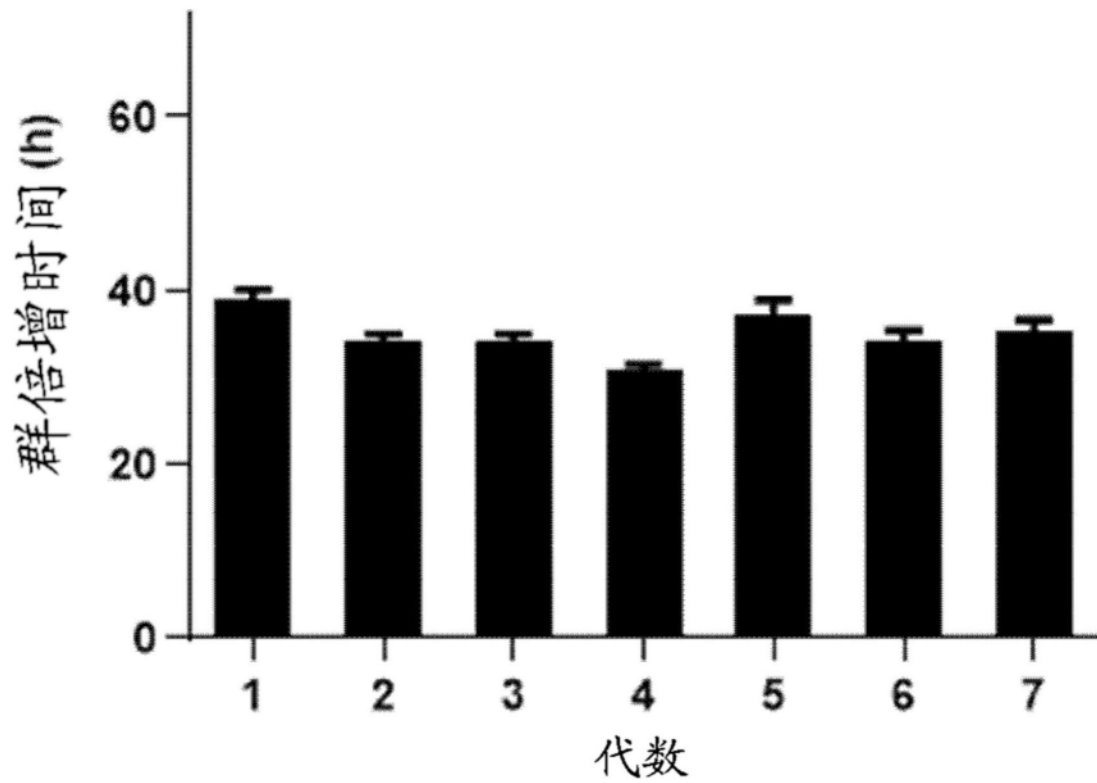


图3

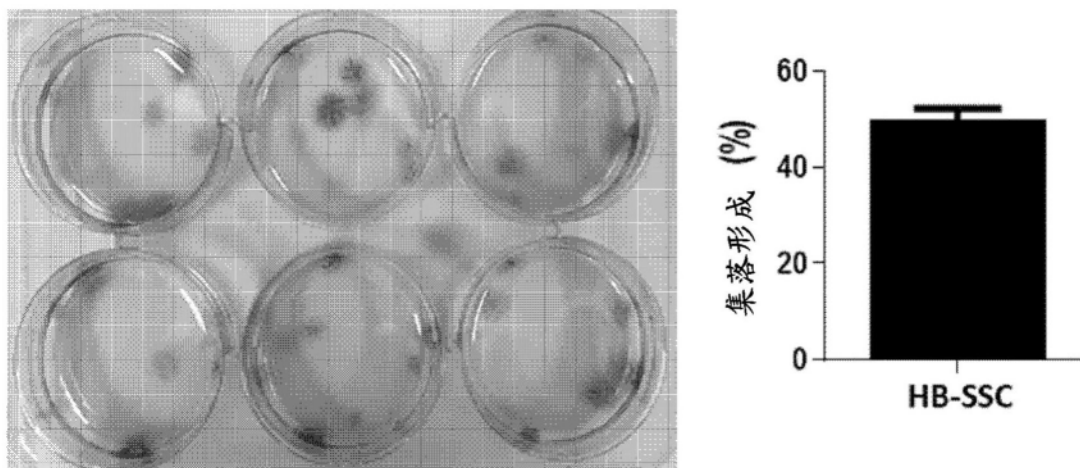


图4

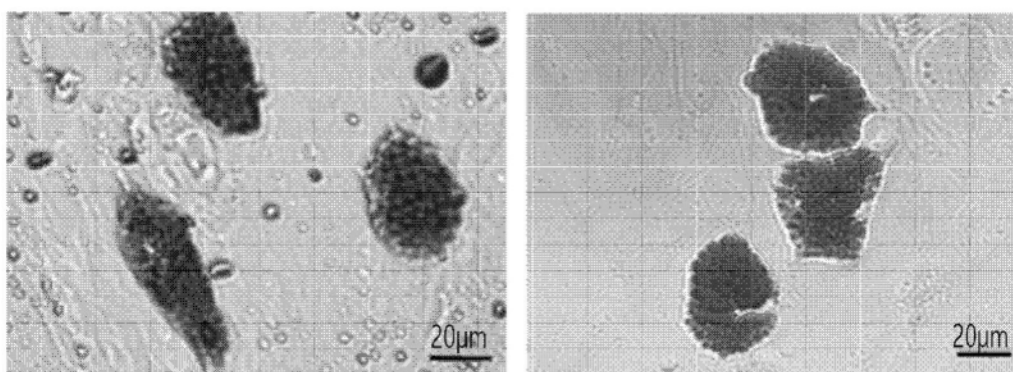


图5A

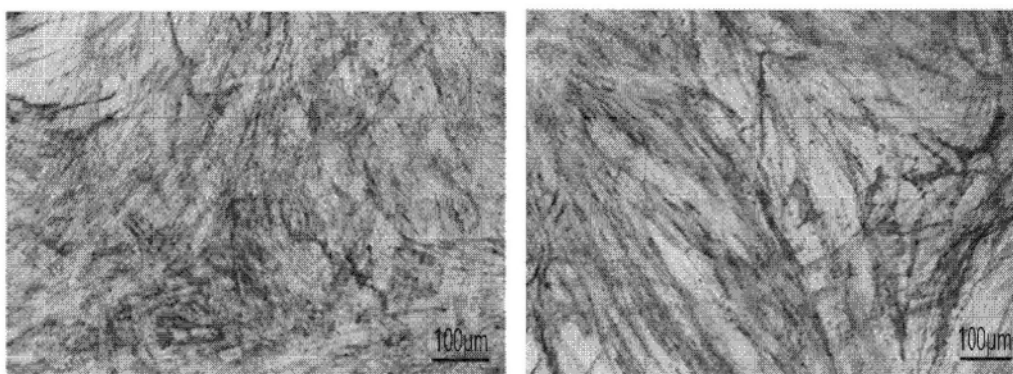


图5B

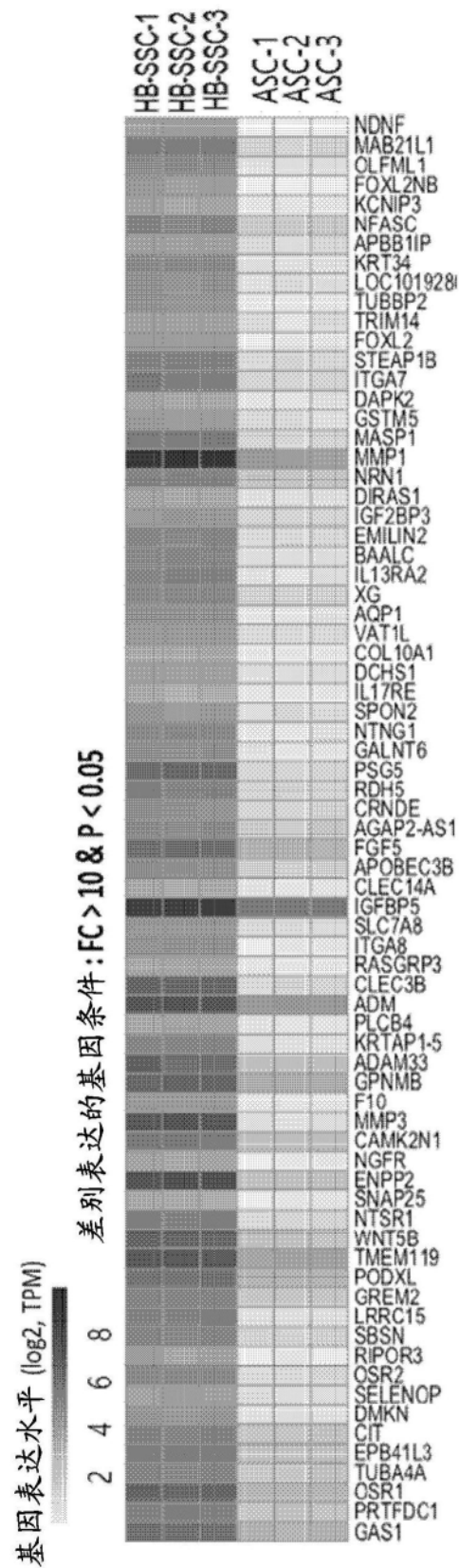


图6B

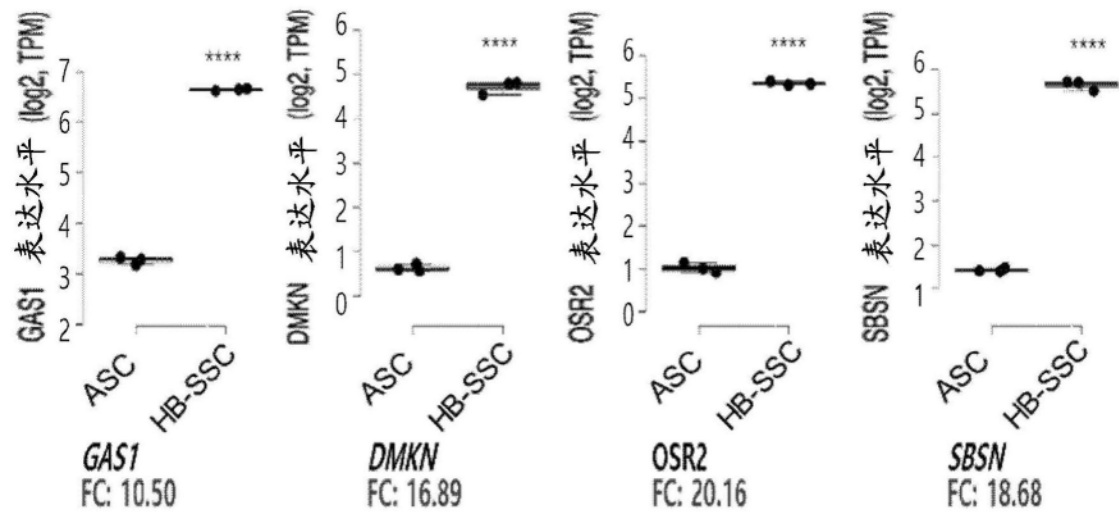


图6C

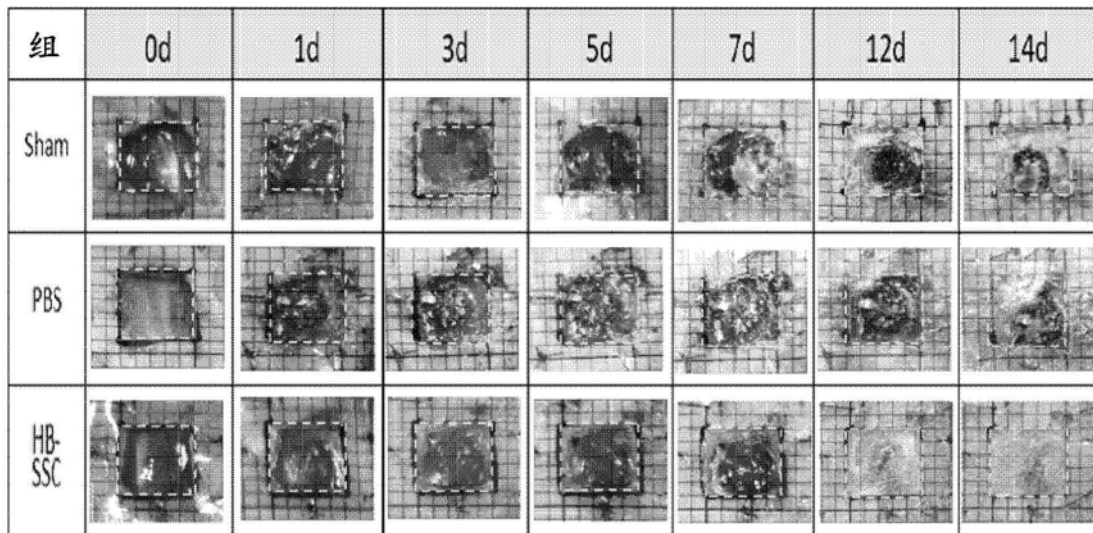


图7A

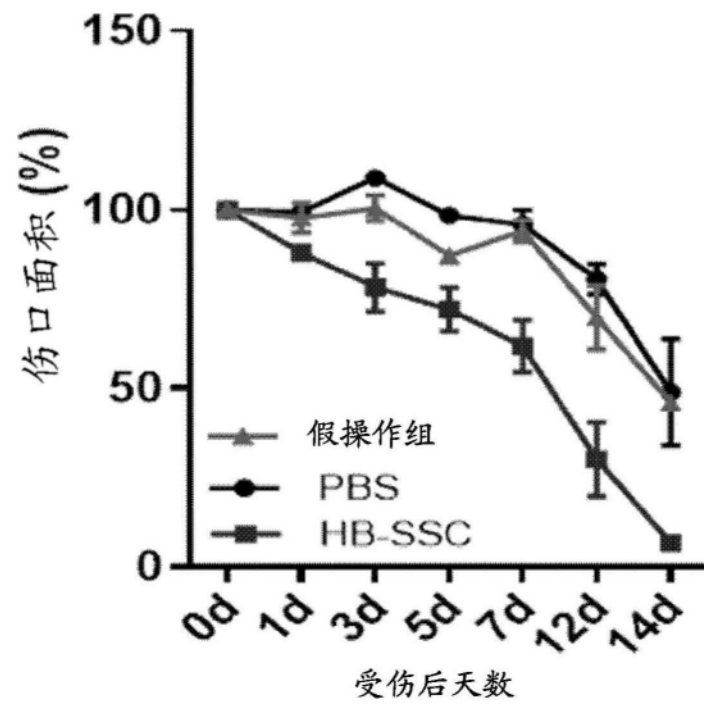


图7B

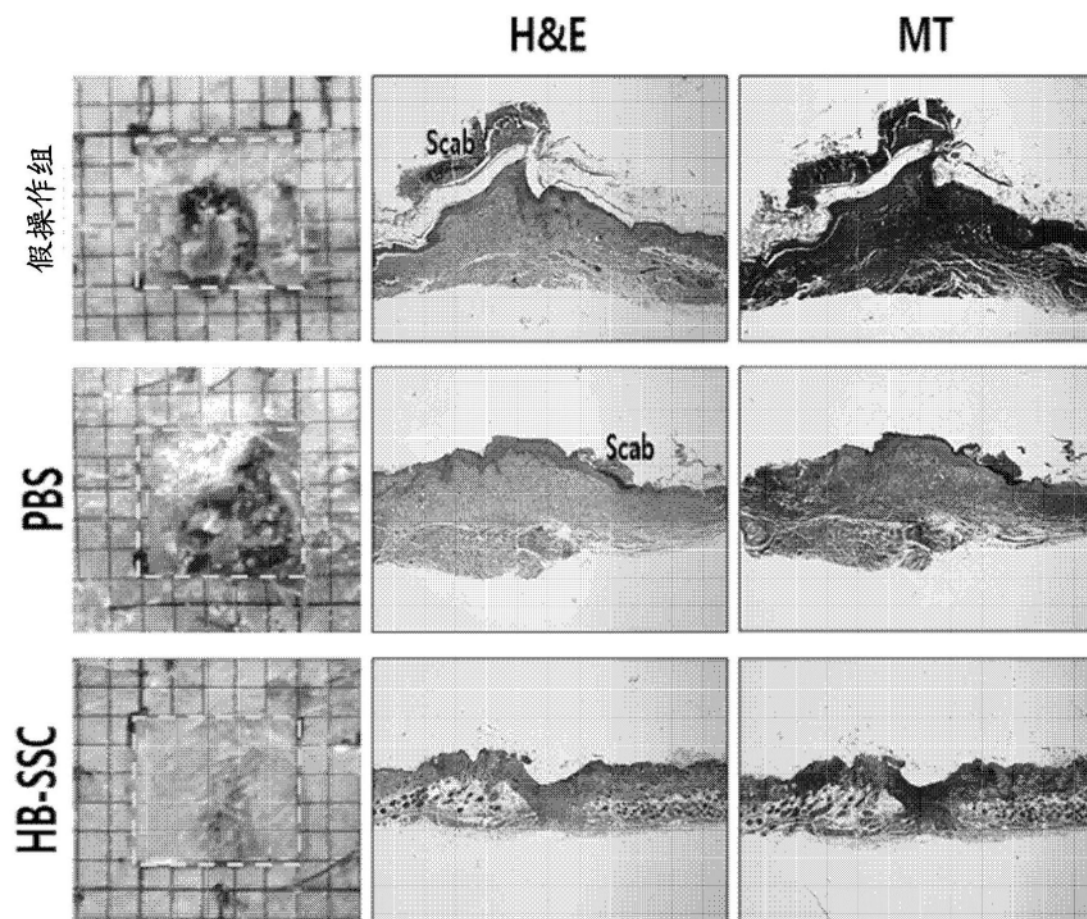


图8