



(10) 授权公告号 CN 111601881 B

(45) 授权公告日 2024. 06. 21

(21) 申请号 201980007408.2

(22) 申请日 2019.01.07

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111601881 A

(43) 申请公布日 2020.08.28

(30) 优先权数据
10-2018-0001979 2018.01.05 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.07.03

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2019/000181 2019.01.07

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/135645 KO 2019.07.11

(73) 专利权人 财团法人峨山社会福祉财团
地址 韩国首尔
专利权人 蔚山大学校产学协力团

(72) 发明人 金秀 刘珍虎

(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 5/0775 (2010.01)
A61K 8/98 (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 102014934 A, 2011.04.13
CN 110072534 A, 2019.07.30
WO 2016048107 A1, 2016.03.31
CN 102321576 A, 2012.01.18
胡国文等. 人诱导多能干细胞定向分化为间充质干细胞的方法研究. 上海交通大学学报 (医学版). 2014, 第34卷 (第10期), 第1429页左栏第1段.

审查员 赵文莉

权利要求书1页 说明书15页
序列表1页 附图9页

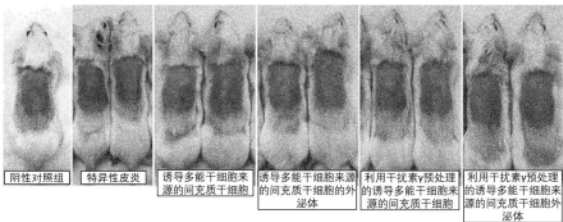
(54) 发明名称

包含利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞及来源于其的外泌体的用于改善、预防或治疗皮肤疾病的组合物

(57) 摘要

本发明涉及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞 (IFN γ -iMSC) 的生产方法、包含通过上述方法制备的利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞、其培养物或从其分离的外泌体 (IFN γ -iMSC-exo) 作为有效成分的用于预防或治疗皮肤疾病的药剂学组合物及用于预防或改善皮肤疾病的化妆品组合物。在利用发明的组合物的情况下, 可提供相比于现有的间充质干细胞, 具有得到改善的免疫调节功能的用于皮肤疾病的组合物及

干细胞治疗剂。



1. 利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞或其培养物在制造用于治疗皮肤疾病的药剂学组合物中的用途,其中所述皮肤疾病是特应性皮炎。

2. 利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞或其培养物在制造用于改善皮肤疾病的化妆品组合物中的用途,其中所述皮肤疾病是特应性皮炎。

3. 用于治疗皮肤疾病的药剂学组合物,其包含从利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的培养物中分离的外泌体作为有效成分,其中所述皮肤疾病是特应性皮炎。

4. 用于改善皮肤疾病的化妆品组合物,其包含从利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的培养物中分离的外泌体作为有效成分,其中所述皮肤疾病是特应性皮炎。

5. 从利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的培养物中分离的外泌体在用于治疗皮肤疾病的组合物的生产中的用途,其中所述外泌体通过包括下列步骤的方法产生:

步骤(a),在包含干扰素 γ 的细胞培养基中培养诱导多能干细胞来源的间充质干细胞;

步骤(b),在清洗所培养的间充质干细胞后,在细胞培养基中进一步培养;以及

步骤(c),从间充质干细胞的培养液中分离外泌体,

其中所述皮肤疾病是特应性皮炎。

6. 根据权利要求5所述的用途,其中所述细胞培养基包含去除外泌体的胎牛血清。

7. 根据权利要求5所述的用途,其中所述步骤(a)中的细胞培养基含有1~100ng/ml干扰素 γ 。

包含利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞及来源于其的外泌体的用于改善、预防或治疗皮肤疾病的组合物

技术领域

[0001] 本发明还在韩国科学技术信息通信部的支持下通过课题编号 NRF-2015K1A4A3046807 完成,上述课题的研究管理专门机构为韩国研究财团,研究事业名为“海外优秀研究机构招商业务”,研究课题名为“峨山-明尼苏达移植创新中心”,主管机构为“首尔峨山医院”,研究时间为2015年09月01日~2021年08月31日。

[0002] 本申请要求于2018年1月5日向韩国专利厅提交且申请号为第10-2018-0001979号的韩国专利申请的优先权,上述专利申请的公开内容插入于本说明书作为参照。

[0003] 本发明涉及包含利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞 (IFN γ -iMSC)、其培养物和/或来源于利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞或利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞培养物的外泌体的用于改善、预防或治疗皮肤疾病的组合物。

背景技术

[0004] 以特异性湿疹周知的特应性皮炎 (Atopic dermatitis, AD) 为常见的炎症性皮肤病,众所周知,在全球范围内,在5~20%的儿童中发病。据报告,急性特异性皮炎的发病机制与将以CD4+T细胞及嗜酸性粒细胞的皮肤渗透、免疫球蛋白E (IgE) 及Th2细胞因子的分泌增加作为介导的Th2炎症反应相关。对于特异性皮炎,目前为止没有周知的直接具体治疗方法,急需研发用于治疗特异性皮炎的新的治疗方法。

[0005] 间充质干细胞 (mesenchymal stem cells) 为具有可分化为骨、软骨及脂肪等的多能性的高增殖性的附着性细胞,以具有抗炎症及免疫调节能力而周知。间充质干细胞具有如T细胞和B细胞的增殖及分化抑制、树突状细胞 (dendritic cell)、自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞及巨噬细胞 (macrophage) 的免疫细胞的功能抑制等免疫抑制效果。最近,据报告,具有将间充质干细胞与造血干细胞一同移植来增加造血干细胞的移植存活率的研究,在移植物抗宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD)、胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA)、实验性变态反应性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)、系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE)、败血症、急性胰腺炎 (acute pancreatitis, AP)、大肠炎、多发性硬化症 (multiple sclerosis, MS) 及类风湿性关节炎等的疾病中,间充质干细胞减少炎症并抑制自身免疫性过度反应。

[0006] 外泌体 (Exosome) 为由脂质双层构成的囊泡 (vesicle),为向细胞外分泌细胞的物质的结构体。为了执行细胞间通讯 (cell-cell communication) 及干预细胞性免疫的功能性作用,外泌体起到输送 (搬运) 作为细胞中的生物分子的蛋白质、生物活性脂质及核糖核酸 (RNA) (miRNA) 的作用。这种外泌体还作为阿尔茨海默病等神经疾病的生物标记被研究,选择性渗透性高,能够透射分离脑脊髓液和血液的血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB),

因此,还用于研发如特定药物的纳米载体(nanocarrier)的药物传递系统。

[0007] 另一方面,从间充质干细胞分泌的外泌体参与细胞间通讯,具有干细胞所具有的再生医学治疗功效,最近,积极进行如下的研究,即,不使用间充质干细胞本身,利用间充质干细胞所分泌的外泌体的多种疾病的治疗效果。

[0008] 本发明人努力研究研发利用间充质干细胞及其外泌体的特应性皮炎治疗剂。结果,相比于现有的间充质干细胞,利用干扰素 γ (IFN- γ)预处理的来源于诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell,iPSC)的间充质干细胞(mesenchymal stem cell,MSC)[IFN γ -iMSC]具有得到改善的抗炎活性,查明了上述利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞及其外泌体(IFN γ -iMSC-exo)具有皮肤疾病的改善效果,从而完成了本发明。

发明内容

[0009] 技术问题

[0010] 本发明的目的在于,提供利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞[IFN γ -iMSC]的生产方法。

[0011] 本发明的再一目的在于,提供利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞。

[0012] 本发明的另一目的在于,提供利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞和/或来源于其的外泌体(IFN γ -iMSC-derived exosome,IFN γ -iMSC-exo)的用于预防或治疗皮肤疾病的药剂学组合物。

[0013] 本发明的还有一目的在于,提供包含利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞和/或来源于其的外泌体的用于预防或改善皮肤疾病的化妆品组合物。

[0014] 本发明的又一目的在于,提供从利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞或其培养物中分离的外泌体。

[0015] 本发明的又一目的在于,提供从利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞分离的外泌体的生产方法。

[0016] 本发明的又一目的在于,提供包含利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞和/或利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体的干细胞治疗剂。

[0017] 技术方案

[0018] 根据本发明的一实施方式,本发明提供利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的生产方法,包括在包含干扰素 γ 的细胞培养基中培养诱导多能干细胞来源的间充质干细胞(iMSC)的步骤。

[0019] 本发明人努力研发抗炎活性得到强化的间充质干细胞。结果,确认相比于现有的间充质干细胞,利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞具有得到改善的抗炎活性,利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞及其外泌体具有皮肤疾病的改善效果。

[0020] 在本说明书中,术语“诱导多能干细胞”是指如下的细胞,即,在如体细胞的已分化的细胞诱导脱分化(dedifferentiation),返回至初始的未分化的状态,从而具有多能性

(pluripotency)。上述脱分化可通过导入特定基因(例如, Sox2, c-Myc, Klf4, Oct-4等)来表达或注入在导入特定基因的上述细胞制备的脱分化诱导蛋白来诱导。上述多能性为能够分化为起源于构成生物体的3种胚层(germ layer), 即, 内胚层(endoderm)、中胚层(mesoderm)及外胚层(ectoderm)的组织或器官的能力。

[0021] 本发明的诱导多能干细胞包含来源于人、猴、猪、马、牛、羊、狗、猫、鼠、兔等所有哺乳动物的诱导多能干细胞, 优选地, 为来源于人的诱导多能干细胞。

[0022] 在本说明书中, 术语“间充质干细胞”是指具有能够分化为脂肪、软骨、骨、肌肉、皮肤、神经等的细胞的多能性(multipotent)的干细胞。上述间充质干细胞可从诱导多能干细胞分化或从骨髓、脂肪组织、脐带组织、脐带血、骨骼肌、外周血、润滑膜、羊水等分离。

[0023] 在本说明书中, 术语“诱导多能干细胞来源的间充质干细胞”是指从诱导多能干细胞分化的间充质干细胞。

[0024] 在本发明的一实例中, 相比于从体内(例如, 骨髓、脂肪组织、脐带组织、脐带血、骨骼肌、外周血、润滑膜、羊水等)分离的间充质干细胞, 上述诱导多能干细胞来源的间充质干细胞具有如下的特征, 即, (i) 吡啶胺2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase)的表达增加, (ii) 炎症细胞因子的分泌减少。

[0025] 上述炎症细胞因子为选自由白细胞介素19(IL-19)、白细胞介素22(IL-22)、白细胞介素1 β (IL-1 β)、白细胞介素6(IL-6)及白细胞介素6 α (IL-6 α)组成的组中的至少一种炎症细胞因子。

[0026] 在本说明书中, 术语“外泌体”是指向细胞外分泌细胞或具有由存在于细胞中的脂质双层构成的膜结构的膜囊(membrane vesicle), 存在于几乎所有真核生物的体液。外泌体的直径为30~1000nm左右, 当多泡体(multivesicular bodies)与细胞膜融合时, 从细胞释放或直接从细胞膜释放。为了执行凝固、细胞间通讯及仲裁细胞性免疫的功能性作用, 外泌体起到输送作为细胞中的生物体分子的蛋白、生物体活性脂质及核糖核酸(miRNA)的作用。在本发明中, 上述外泌体为包括微泡(microvesicle)的概念。外泌体的标记蛋白有CD63、CD81等, 除此之外, 还有如表皮生长因子受体(EGFR)的细胞表面的受体、与信号传递相关的分子、与细胞附着相关的蛋白、与间充质干细胞(MSC)相关的抗原、热激蛋白(heat shock protein)、与囊泡形成相关的Alix等的蛋白。

[0027] 在本发明的一实例中, 上述诱导多能干细胞来源的间充质干细胞为在细胞外基质包被的培养容器中培养并分化诱导多能干细胞的间充质干细胞。

[0028] 在本说明书中, 术语“细胞外基质(extracellular matrix)”是指如下的物理环境, 即, 储存细胞生长且分化所需的生化因子(biochemical factors), 在适当地供给的同时细胞可识别。

[0029] 在本发明的一实例中, 上述细胞外基质为细胞外基质蛋白。

[0030] 在本发明的另一实例中, 上述细胞外基质蛋白包括玻连蛋白(vitronectin)、纤连蛋白(fibronectin)、层粘连蛋白(laminin)、弹性蛋白(elastin)、胶原蛋白(collagen)等, 但并不限于此。

[0031] 在本发明的特定实例中, 上述细胞外基质蛋白为玻连蛋白。

[0032] 本发明的利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的生产方法包括在包含干扰素 γ 的细胞培养基中培养诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的步骤。

[0033] 本发明的在诱导多能干细胞来源的间充质干细胞预处理的干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ , IFN γ) 为通过活性化的T细胞或NK细胞、CD4及CD8阳性淋巴细胞生成的细胞因子,上述干扰素 γ 为分裂促进因子或生长因子,参与包括T淋巴细胞在内的多种细胞的活性化与增殖分化、提高抗原递呈细胞主要组织相容性复合体(MHC)表达的作用,在免疫及炎症反应中起到重要作用。

[0034] 在本说明书中,术语“预处理”是指如下的过程,即,在培养诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的过程中,将添加有干扰素 γ 的细胞培养基与诱导多能干细胞来源的间充质干细胞相接触。

[0035] 本发明的用于生产利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的细胞培养基可利用通常利用于培养动物细胞的任一培养基,例如,可利用达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基(DMEM,Dulbecco's modification of Eagle's medium)、达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基和F12的混合物、Eagle最低基础培养基(Eagles's MEM,Eagle's minimum essential medium)、 α -MEM、Iscove's MEM)、199培养基、CMRL 1066、RPMI 1640、F12、F10、Way-mouth's MB752/1、McCoy's 5A及MCDB系列等。

[0036] 在本发明的一实例中,上述干扰素 γ 以1ng/ml至100ng/ml的浓度包含于细胞培养基中。

[0037] 在本发明的另一实例中,上述干扰素 γ 以1ng/ml至90ng/ml、1ng/ml至80ng/ml、1ng/ml至70ng/ml、1ng/ml至60ng/ml、1ng/ml至50ng/ml、1ng/ml至40ng/ml、1ng/ml至30ng/ml、10ng/ml至90ng/ml、10ng/ml至80ng/ml、10ng/ml至70ng/ml、10ng/ml至60ng/ml、10ng/ml至50ng/ml、10ng/ml至40ng/ml及10ng/ml至30ng/ml的浓度包含于细胞培养基中。

[0038] 在本发明的一实例中,上述培养执行6小时至48小时。

[0039] 在本发明的另一实例中,上述培养执行6小时至42小时、6小时至36小时、6小时至30小时、6小时至27小时、12小时至48小时、12小时至42小时、12小时至36小时、12小时至30小时、12小时至27小时、18小时至48小时、18小时至42小时、18小时至36小时、18小时至30小时、18小时至27小时、21小时至48小时、21小时至42小时、21小时至36小时、21小时至30小时或21小时至27小时。

[0040] 根据本发明的再一实施方式,本发明提供利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞。

[0041] 在本发明的一实例中,上述间充质干细胞通过上述利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的生产方法生产。

[0042] 根据本发明的另一实施方式,本发明提供包含利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞或其培养物作为有效成分的用于预防或治疗皮肤疾病的药剂学组合物。

[0043] 在本说明书中,术语“培养物”是指在培养基中培养利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞而获取的培养液或上述培养液的干燥物、稀释物、过滤物和/或浓缩物。上述培养物可包含或不包含诱导多能干细胞来源的间充质干细胞。

[0044] 在本说明书中,术语“包含……作为有效成分”是指本发明包含利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞、其培养物或由此分离的外泌体充分达成皮肤疾病的改善、预防或治疗活性的充分量。

[0045] 在本说明书中,术语“皮肤疾病”是指在皮肤中发生的非正常状态或症状。

[0046] 在本发明的一实例中,上述皮肤疾病为炎症性皮肤疾病。上述炎症性皮肤疾病为示出以免疫细胞介导的炎症反应引起的如发痒、红斑等的症状的皮肤疾病。

[0047] 在本发明的另一实例中,上述炎症性皮肤疾病为选自:特应性皮炎、接触性皮炎及银屑病的皮肤疾病。

[0048] 在本说明书中,术语“特应性皮炎”是指慢性复发的伴随严重的瘙痒症的皮肤湿疹疾病,为皮炎的一种。

[0049] 在本发明中使用的术语“预防”是指通过给药本发明的组合物来抑制皮肤疾病或疾病或者延迟皮肤疾病或疾病的发展速度的所有行为。

[0050] 在本说明书中使用的术语“治疗”是指 (a) 抑制皮肤疾病或疾病的发展; (b) 减轻皮肤疾病或疾病; 以及 (c) 去除皮肤疾病或疾病。

[0051] 本发明的组合物可制备为药剂学组合物。

[0052] 根据本发明的优选实例,本发明的组合物为 (a) 如上所述的本发明的利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞或其培养物的药剂学有效量; 以及 (b) 包含药剂学上可接受的载体的药剂学组合物。在本说明书中,术语“药剂学有效量”是指达成如上所述的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞或其培养物的功效或活性的充分量。

[0053] 在本发明的组合物制备为药剂学组合物的情况下,本发明的药剂学组合物包含药剂学上可接受的载体。本发明的药剂学组合物所包含的药剂学上可接受的载体包括通常用于制剂的乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯树胶、磷酸钙、海藻酸盐、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羧基苯甲酸甲酯、羧基苯甲酸丙酯、滑石粉、硬脂酸镁及矿物油等,但并不限于此。除上述成分之外,本发明的药剂学组合物还可包括润滑剂、保湿剂、甜味剂、调味剂、乳化剂、悬浮剂、防腐剂等。在雷明登氏药理学全书(Remington's Pharmaceutical Sciences) (19th ed., 1995) 详细记载了适合的药剂学上可接受的载体及制剂。

[0054] 本发明的药剂学组合物可口服给药或肠胃外给药,例如,可通过静脉注射、皮下注射、肌肉注射、腹腔注射、局部给药、鼻腔给药、肺内给药、直肠内给药、鞘内给药、眼部给药、皮肤给药及经皮给药等方法给药。

[0055] 本发明的药剂学组合物的适合剂量可根据制剂化方法、给药方式、患者年龄、体重、性别、病态、饮食、给药时间、给药路径、排泄速度及反应灵敏度的因素处方的不同。本发明的药剂学组合物的常规剂量以成人基准在0.0001 ~ 1000mg/kg的范围以内,但并不限于此。

[0056] 在本发明的一实例中,本发明的药剂学组合物的剂量可以为0.001 ~ 1000mg/kg、0.01 ~ 1000mg/kg、0.1 ~ 1000mg/kg、1 ~ 1000mg/kg、5 ~ 1000mg/kg、10 ~ 1000mg/kg、20 ~ 1000mg/kg、30 ~ 1000mg/kg、50 ~ 1000mg/kg、100 ~ 1000mg/kg、0.0001 ~ 100mg/kg、0.001 ~ 100mg/kg、0.01 ~ 100mg/kg、0.1 ~ 100mg/kg、1 ~ 100mg/kg、5 ~ 100mg/kg、10 ~ 100mg/kg、20 ~ 100mg/kg、30 ~ 100mg/kg或50 ~ 100mg/kg,更具体地,可以为1mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、35mg/kg、40mg/kg、45mg/kg、50mg/kg、55mg/kg、60mg/kg、65mg/kg、70mg/kg、75mg/kg、80mg/kg、85mg/kg、90mg/kg、95mg/kg、100mg/kg、150mg/kg、200mg/kg、250mg/kg、300mg/kg、350mg/kg、400mg/kg、450mg/kg、500mg/kg、750mg/kg或

1000mg/kg。

[0057] 本发明的药剂学组合物可根据本发明所属技术领域的普通技术人员容易实施的方法利用药剂学上可接受的载体和/或赋形剂来制剂化,从而以单位容量形态制备或向多容量容器内添加来制备。在此情况下,剂型可以为油介质或水性介质中的溶液、悬浮液、糖浆剂或乳化液形态或提取剂、散剂、粉末剂、颗粒剂、片剂或胶囊剂形态,还可包括分散剂或稳定化剂。

[0058] 根据本发明的还有一实施方式,本发明提供包含利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞或其培养物作为有效成分的用于预防或改善皮肤疾病的化妆品组合物。

[0059] 本发明的用于预防或改善皮肤疾病的化妆品组合物的有效成分及目标疾病与上述用于预防或治疗皮肤疾病的药剂学组合物的有效成分及目标疾病相同,因此,为了避免本说明书过于复杂,将省略两者之间相同的内容的记载。

[0060] 在本发明中使用的术语“改善”是指通过给药本发明的组合物使皮肤疾病或疾病好转或变为有利情况的所有行为。

[0061] 本发明的组合物可制备为化妆品组合物。在包含本发明的利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞或其培养物作为有效成分的用于预防或改善皮肤疾病的组合物制备为化妆品组合物的情况下,除作为有效成分的利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞或其培养物之外,包含通常利用于化妆品组合物的成分,例如,包含如稳定剂、溶解剂、维生素、颜料及香料的常规助剂以及载体。

[0062] 本发明的化妆品组合物可制备为在该领域中通常制备的任一剂型,例如,可剂型化为溶液、悬浮液、乳浊液、浊液、膏、凝胶、霜、乳液、密粉、香皂、含表面活性剂的洗面奶、油、粉末状粉底液、乳液状粉底液、蜡状粉底液及喷剂等,但并不限于此。更详细地,可制备为弹性化妆水、营养化妆水、营养霜、按摩霜、精华素、眼霜、卸妆膏、洗面奶、卸妆水、面膜、喷剂或蜜粉的剂型。

[0063] 在本发明的剂型为膏、霜或凝胶的情况下,作为载体成分,可利用动物性油、植物性油、蜡、石蜡、淀粉、胺黄树胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅、膨润土、二氧化硅、滑石粉或氧化锌等。

[0064] 本发明的剂型为蜜粉或喷剂的情况下,作为载体成分,可利用乳糖、滑石粉、二氧化硅、氢氧化铝、硅酸钙或聚酰胺粉,尤其,在喷剂的情况下,还可包含如氯氟烃、丙烷/丁烷或二甲醚的推进剂。

[0065] 在本发明的剂型为溶液或乳浊液的情况下,作为载体成分,可利用溶剂、溶解剂或乳化剂,例如,可利用水、乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁基乙二醇油、甘油脂肪酯、聚乙二醇或山梨醇酐脂肪酯。

[0066] 在本发明的剂型为悬浮液的情况下,作为载体成分,可利用如水、乙醇或丙二醇的液状稀释剂、如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇酯及聚氧乙烯山梨糖醇酐酯的悬浮剂、微晶纤维素、甲基氢氧化铝、膨润土、琼脂或lakanto等。

[0067] 在本发明的剂型为含表面活性剂洗面奶的情况下,作为载体成分,可利用脂肪醇硫酸盐、脂肪醇醚硫酸盐、磺基琥珀酸单酯、羟乙基磺酸盐、咪唑啉衍生物、甲基牛磺酸盐、肌氨酸盐、脂肪酸酰胺醚硫酸盐、烷基酰胺甜菜碱、脂肪族醇、脂肪酸甘油酯、脂肪酸二乙醇

酰胺、植物性油、羊毛脂衍生物或乙氧基化甘油脂肪酸酯等。

[0068] 根据本发明的又一实施方式,本发明提供从利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞或其培养物中分离的外泌体。

[0069] 本发明的上述利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞为与现有的间充质干细胞或与未利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞不同的具有细胞学(免疫学)特征的间充质干细胞。如在本发明的实施例所证明,对本发明的利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞与常规间充质干细胞及本发明的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞及吲哚胺2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)的表达量进行比较的结果,相比于间充质干细胞,诱导多能干细胞来源的间充质干细胞中吲哚胺2,3-双加氧酶表达量高(为示出数据),相比于诱导多能干细胞来源的间充质干细胞,利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞中的吲哚胺2,3-双加氧酶的表达量高(图3)。并且,经确认,在分别回收诱导多能干细胞来源的间充质干细胞和利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的培养液后比较与炎症相关的细胞因子蛋白分泌量的结果,相比于诱导多能干细胞来源的间充质干细胞,本发明的利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞呈现白细胞介素19、白细胞介素20、白细胞介素1 β 、白细胞介素6及白细胞介素6R α 的分泌显著减少(图4)。

[0070] 根据本发明的又一实施方式,本发明提供包含从利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞或其培养物中分离的外泌体作为有效成分的用于预防或治疗皮肤疾病的药剂学组合物。

[0071] 根据本发明的又一实施方式,本发明提供包含从利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞或其培养物中分离的外泌体作为有效成分的用于预防或改善皮肤疾病的化妆品组合物。

[0072] 在本发明的包含从利用干扰素 γ 预处理的间充质干细胞或其培养物中分离的外泌体作为有效成分的用于预防或治疗的药剂学组合物及用于预防或改善皮肤疾病的化妆品组合物中,包含之前记载的从利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞或其培养物中分离的外泌体作为有效成分,目标疾病与如上所述的药剂学组合物相同,因此,为了避免本说明书过于复杂,将省略两者之间相同的内容。

[0073] 根据本发明的一实施方式,本发明提供皮肤疾病的治疗方法,包括向需要治疗的对象给药组合物的步骤,上述组合物包含利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞或其培养物或者从利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞或其培养物中分离的外泌体作为有效成分。

[0074] 根据本发明的再一实施方式,本发明提供皮肤疾病的改善方法,包括向需要改善的对象给药组合物的步骤,上述组合物包含利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞或其培养物或者从利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞或其培养物中分离的外泌体作为有效成分。

[0075] 作为本发明的治疗方法或改善方法的目标疾病的皮肤疾病通过与上述药剂学组合物的治疗对象疾病相关来定义。

[0076] 在本发明的一实例中,上述对象为哺乳动物或人。

[0077] 本发明皮肤疾病的治疗方法或改善方法为使用与如上所述的包含利用干扰素 γ

预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞或其培养物或者从利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞或其培养物中分离的外泌体作为有效成分的组合物的有效成分的方法,因此,为了避免本说明书的过于复杂,将省略重复内容的记载。

[0078] 根据本发明的另一实施方式,本发明提供从利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞分离的外泌体的生产方法,包括:步骤(a),在包含干扰素 γ 的细胞培养基中培养诱导多能干细胞来源的间充质干细胞;步骤(b),在清洗培养的间充质干细胞后,在细胞培养基中进一步培养;以及步骤(c),从间充质干细胞的培养液中分离外泌体。

[0079] 本发明的从利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞分离的外泌体的生产方法与从利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞中生产外泌体的方法相同,上述利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞通过上述内容中记载的利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的生产方法来生产,因此,为了避免本说明书过于复杂,将省略两者之间的相同记载。

[0080] 在本发明的一实例中,上述步骤(c)可通过实施离心分离来从间充质干细胞的培养液中分离外泌体。

[0081] 更具体地,以200~400xg的条件对上述间充质干细胞的培养基进行5分钟至20分钟的离心分离,来去除剩余的细胞和细胞残留物,之后,取出上清液并以9000~12000xg的条件进行60分钟~80分钟的高速离心分离,之后,再次取出上清液并以90000~120000xg的条件进行80分钟~100分钟的超高速离心分离,由此去除上清液,从而可获取留在底层的外泌体。根据本发明的特定实例,回收间充质干细胞培养基,以300xg条件进行10分钟的离心分离来去除剩余的细胞和细胞残留物,取出上清液并利用0.22 μ m的过滤器进行过滤,之后,利用高速离心机(high speed centrifuge)在10000xg、4℃的条件下进行70分钟的离心分离。再次取出离心分离的上清液并利用超高速离心机(ultracentrifuge)在100000xg、4℃的条件下进行90分钟的离心分离,通过去除上清液来分离留在底层的外泌体。

[0082] 根据本发明的还有一实施方式,本发明提供包含从利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞或其分离的外泌体(iMSC-exo)作为有效成分的干细胞治疗剂。

[0083] 在本说明书中,术语“干细胞治疗剂”是指包含干细胞作为有效成分的药剂学组合物,干细胞治疗剂用于调节组织再生、器官功能恢复或免疫细胞的功能。

[0084] 在本发明的一实例中,上述干细胞治疗剂为可通过间充质干细胞的多能性期待恢复的用于预防或治疗疾病(例如,心脏、肝、关节、与神经系统或免疫相关的疾病)的药剂学组合物。

[0085] 上述干细胞治疗剂的组成成分与如上所述的本发明的包含利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞、其培养物或由此分离的外泌体的药剂学组合物、化妆品组合物的组成成分相同,因此,为了避免本说明书过于复杂,将省略两者之间相同的内容的记载。

[0086] 发明的效果

[0087] 本发明的特征及优点如下。

[0088] (a) 本发明提供利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的生产方法、通过上述方法制备的利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞

及包含其作为有效成分的用于预防或治疗皮肤疾病的药剂学组合物及用于预防或改善皮肤疾病的化妆品组合物。

[0089] (b) 本发明提供包含从利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞或其培养物中分离的外泌体作为有效成分的用于预防或治疗皮肤疾病的药剂学组合物及用于预防或改善皮肤疾病的化妆品组合物。

[0090] (c) 在利用本发明的组合物的情况下,可提供具有比现有的间充质干细胞得到改善的免疫调节功能的用于皮肤疾病的组合物及干细胞治疗剂。

附图说明

[0091] 图1以图示化的方式示出利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞及来源于上述间充质干细胞的外泌体的制备过程。

[0092] 图2示出诱导多能干细胞来源的间充质干细胞及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的表面抗原的分析结果。

[0093] 图3示出确认诱导多能干细胞来源的间充质干细胞及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的吲哚胺2,3-双加氧酶表达程度的结果。

[0094] 图4示出确认诱导多能干细胞来源的间充质干细胞及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的细胞因子分泌量的结果。

[0095] 图5示出确认从诱导多能干细胞来源的间充质干细胞分离的外泌体及从利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞分离的外泌体地平均大小的结果。

[0096] 图6示出确认诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的外泌体及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体的CD63及CD9的表达的结果。

[0097] 图7以图示化的方式示出特应性皮炎动物模型的制备过程。

[0098] 图8示出确认对于特应性皮炎动物模型的特应性病变的利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体的影响的结果。

[0099] 图9示出在特应性皮炎动物模型中处理利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体的皮肤临床分数结果。

[0100] 图10示出在特应性皮炎动物模型中处理利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体的处理的经皮水分丢失程度。

[0101] 图11示出在特应性皮炎动物模型中处理利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体的皮肤组织的变化,比例尺为200 μm 。

[0102] 图12示出在特应性皮炎动物模型中处理利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体的血中免疫球蛋白E浓度。

[0103] 图13示出在特应性皮炎动物模型中处理利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌

体的淋巴细胞的白细胞介素17a分泌量。

具体实施方式

[0104] 以下,通过实施例更详细地说明本发明。这些实施例仅用于具体说明本发明,根据本发明的主旨,本发明的范围并不限于这些实施例,这对本技术领域的普通技术人员而言是显而易见的。

[0105] 在本说明书全文中,在未另行提及的情况下,在用于示出特定物质的浓度的“%”中,固体/固体为(重量/重量)%、固体/液体为(重量/体积)%及液体/液体为(体积/体积)%。

[0106] 实施例1:制备及分析诱导多能干细胞来源的间充质干细胞

[0107] 在未使用脂质细胞(培养辅助细胞)的状态下,将在包含KnockOut无基因血清替代物、谷氨酰胺、非必需氨基酸、 β -巯基乙醇、抗生素及碱性成纤维细胞生长因子(bFGF,basic fibroblast growth factor)的达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基/F-12培养基中培养的诱导多能干细胞(在首尔峨山医院干细胞中心中建立的起源于成纤维细胞(fibroblast)、外周血单个核细胞(Peripheral Blood Mononuclear Cell,PBMC)、间充质干细胞的诱导多能干细胞(iPSC)细胞株)附着在事先利用玻连蛋白包被的培养盘(dish),之后,利用添加10%的胎牛血清(FBS)(v/v)、5ng/ml的碱性成纤维细胞生长因子(basic FGF)、0.1mM的最低必需培养基非必需氨基酸(MEM NEAA,Minimum Essential Media Non-Essential Amino Acids)、 β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol)(1X)、100unit/ml的青霉素及100 μ g/ml的链霉素的达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基培养液来在37℃的温度条件下诱导分化为间充质干细胞。在培养第7天,通过利用稳定型胰蛋白酶替代酶(TrypLE express)(1X)处理来解体为单一细胞,之后,向细胞培养盘移动细胞,进一步培养7天。每2天更换培养基,并观察分化为呈现扁平且长长的外形的间充质干细胞。若14天的向间充质干细胞的分化诱导结束,则以20ng/ml浓度对干扰素 γ (IFN- γ)进行24小时的处理。在24小时后,利用磷酸缓冲盐溶液(PBS)清洗细胞并进一步培养(图1)。

[0108] 利用流式细胞术(Flow cytometry)分别确认利用干扰素 γ 预处理的间充质干细胞的特异性表面抗原标记的CD34阴性表达和CD73、CD90及CD105的阳性表达。结果确认,诱导多能干细胞来源的间充质干细胞具有CD34(BD生物科学(BD Biosciences),Catalog No.:348053)阴性表达、CD73(BD生物科学,Catalog No.:550257)、CD90(BD生物科学,Catalog No.:555596)及CD105(BD生物科学,Catalog No.:560839)阳性表达的典型间充质干细胞的特征(图2)。

[0109] 并且,利用实时(real-time)逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)在上述诱导多能干细胞来源的间充质干细胞及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞中对吡啶胺2,3-双加氧酶进行定量。结果确认,相比于诱导多能干细胞来源的间充质干细胞,利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞中的吡啶胺2,3-双加氧酶的表达量高(图3)。

[0110] 表1

[0111] 吡啶胺2,3-双加氧酶检测用引物序列

[0112]	正向引物(Forward primer)(序列1)	5'-GCCCTTCAAGTGTTTCACCAA-3'
--------	---------------------------	-----------------------------

反向引物(Reverse primer) (序列2)	5'-GCCTTTCCAGCCAGACAAATAT-3'
----------------------------	------------------------------

[0113] 上述吡啶胺2,3-双加氧酶为将色氨酸转换为犬尿氨酸(kynurenine)的酶,使细胞周围部的色氨酸枯竭并妨碍免疫细胞的增殖,从而抑制炎症反应及免疫反应。因此可知,相比于诱导多能干细胞来源的间充质干细胞,吡啶胺2,3-双加氧酶表达量高的本发明的利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的免疫反应抑制活性高。

[0114] 并且,分别回收诱导多能干细胞来源的间充质干细胞及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的培养液,测定并比较与炎症相关的细胞因子(白细胞介素1 β 、白细胞介素19、白细胞介素22、白细胞介素6及白细胞介素6R α)蛋白分泌量。

[0115] 从上述结果可知,相比于现有的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞,本发明的利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞为具有不同的细胞学特征(免疫学特征)的间充质干细胞。

[0116] 根据磁性Luminex®筛选分析(Magnetic Luminex® Screening Assay)实验方法测定与炎症相关的细胞因子。首先,对间充质干细胞及诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的培养液进行涡流(vortexing)后离心分离,利用稀释剂(diluent)将上清液稀释为1/2,由此,准备了各自的试样。在常温条件下,将其与微珠-抗体混合物(bead-Ab Mixture)反应2小时,反应结束后,利用Luminex仪器(Luminex,奥斯汀(Austin),得克萨斯州(TX),美国(USA))测定。试样中的各个被分析物分别独立地与粘附于特定编号微珠(bead)的相应抗体进行反应,通过检测抗体和2' (链霉亲和素-藻红蛋白) (2' (streptavidin-PE)) 反应(夹心法(sandwich assay))结果测定与各个被分析物的量成比的粘附于相微珠的表面的藻红蛋白(Phycoerythrin, PE)的荧光量。Luminex仪器在每次流出一个微珠的同时测定所流出的微珠是第几个微珠或其微珠表面的藻红蛋白的荧光强度,从而获取了各个被分析物的反应结果值(MFI)。计算各个标准(standard)浓度的反应测定值(MFI),在“MasterPlex QT 2010 (MiraiBio,日立(Hitachi),CA,美国(USA))”软件(software)通过最佳匹配(best fit)方法求得标准曲线(standard curve),以标准曲线为基准反映稀释倍数来计算相应试样的结果浓度值。

[0117] 结果可知,相比于现有的未利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞,本发明的利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞为具有不同的细胞学特征(免疫学特征)的间充质干细胞。

[0118] 实施例2:根据是否利用干扰素 γ 预处理的来源于诱导多能干细胞分化间充质干细胞的外泌体的分离及确认

[0119] 在添加10%的去除外泌体的胎牛血清(Exosome-depleted FBS)的培养基进一步培养诱导多能干细胞来源的间充质干细胞及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞。在培养72小时后,回收诱导多能干细胞来源的间充质干细胞培养基,以300xg的条件进行10分钟的离心分离,由此去除剩余的细胞和细胞残留物。利用0.22 μ m的过滤器对上清液进行过滤,之后,利用高速离心机在10000xg、4℃的条件进行70分钟的离心分离。利用超高速离心机在100000xg、4℃的条件下对离心分离的上清液实施90分钟的离心分离来去除上清液,利用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline)稀释留在底层的外泌体并使用。

[0120] 在从诱导多能干细胞来源的间充质干细胞及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干

细胞来源的间充质干细胞的培养液分别分离的外泌体中,分别通过纳米粒子跟踪分析(nanoparticle tracking assay, NanoSight NS300, 马尔文(Malvern))确认了外泌体的数量和大小分布(图5)。通过免疫印迹确认了外泌体特异性表面抗原的CD9及CD63的表达(图6)。

[0121] 因此可确认,与利用干扰素 γ 处理无关地,分别从诱导多能干细胞来源的间充质干细胞和本发明的利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞分离的外泌体具有作为外泌体的相同特性。

[0122] 实施例3:制备诱发特异性疾病的小鼠并给药

[0123] 用于实验的动物如下,即,购入8周龄雌性BALB/c小鼠(Orientbio Inc., 韩国),经过一周的驯化时间后,在9周龄用于实验。为了诱发特应性皮炎,利用剃毛机剃掉BALB/c小鼠的背侧上部分为止的毛。在 $1 \times 1\text{cm}^2$ 的剃掉毛的背部皮肤组织,以24小时为间隔总共涂敷5天40 μg 的烟曲霉菌(Af, *Aspergillus fumigatus*)提取物)。在2周的休止期后,在第19天以24小时的间隔反复涂敷5次,从而制备特异性皮炎动物模型。

[0124] 在制备特异性皮炎动物模型后,向皮下(subcutaneous)注入诱导多能干细胞来源的间充质干细胞、利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞、诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的外泌体及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体。每只诱导多能干细胞来源的间充质干细胞或利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的注射量为 2×10^6 个,每只诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的外泌体或利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体的注射量为12 μg 。在注射后,第5天牺牲小鼠并进行分析(图7)。

[0125] 实施例4:评价利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞和来源于其的外泌体的特应性皮炎治疗活性

[0126] ①改善特异性症状

[0127] 为了确认利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体的特异性改善水平,观察并比较未诱发特应性皮炎的阴性对照组(CONTROL, 利用生理盐水处理)、诱发特应性皮炎的阳性对照组(特异性皮炎, 利用烟曲霉菌处理)、诱导多能干细胞来源的间充质干细胞处理组,利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞处理组,诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的外泌体处理组及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体处理组。结果,利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞处理组及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体处理组示出与阴性对照组相似水平的特异性改善效果(图8)。

[0128] ②皮肤临床分数及经皮水分丢失评价

[0129] 皮肤临床分数分为干燥(dryness)、收缩(scaling)、糜烂(erosion)、表皮脱落(excoriation)及出血5种项目并评价。在各个项目中,没有病变的状态为0分、轻症为1分、中等症状为2分、重症为3分,并合计其来计算皮肤临床分数。结果确认,相比于阳性对照组(特异性皮炎)、阴性对照组(CONTROL)、诱导多能干细胞来源的间充质干细胞处理组及诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的外泌体处理组,利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞处理组和利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细

胞外泌体处理组具有进一步得到改善的皮肤临床分数,尤其,利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体处理组示出与阴性对照组相似水平的皮肤临床分数,使得特异性症状好转(表2及图9)。

[0130] 表2

[0131]	阴性对照组 (CONTROL)	特异性皮炎(AD)	诱导多能干细胞来源的间充质干细胞(iMSC)	诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的外泌体(iMSC-exo)	利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞(IFN γ -iMSC)	利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体(IFN γ -iMSC-exo)
	0.1	4.1	1.56	1.8	1.4	0.15

[0132] 并且,为了在相同给药组中评价皮肤屏障损伤,利用 VapometerSWL-3® (Delfin technologies)测定经皮水分丢失(transepidermal water loss,TEWL)。结果确认,利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞处理组和利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体处理组示出与阴性对照组相似水平的经皮水分丢失水平,使得特异性症状好转(表3及图10)。

[0133] 表3

[0134]	阴性对照组	特异性皮炎	诱导多能干细胞来源的间充质干细胞	诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的外泌体	利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞	利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体
	3.4	13.3	4.2	4.4	3.3	3

[0135] 因此,可知,本发明的利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体改善皮肤临床症状显著减少经皮水分丢失程度,因此,具有优秀的白山或治疗包括特应性皮炎在内的皮肤疾病的功效。

[0136] ③观察皮肤组织

[0137] 为了确认特应性皮炎的改善效果,分离了阴性对照组、阳性对照组、诱导多能干细胞来源的间充质干细胞处理组、诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的外泌体处理组、利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞处理组及利用干扰素 γ 预处理

的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体处理组的皮肤组织。在利用10%的福尔马林溶液固定所分离的皮肤组织并制备石蜡块后,以5 μ m间隔将皮肤组织切片化为纵截面。为了观察皮肤组织的变化和炎症细胞浸润,利用苏木精(hematoxylin)及伊红(eosin)染色皮肤切片,通过400倍倍率的显微镜观察。结果,相比于阳性对照组,利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞处理组及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体处理组改善角质层的损伤,减少表皮层及真皮层的厚度(图11)。

[0138] 因此,可知,本发明的利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体改善皮肤角质层的损伤,减少表皮层及真皮层的厚度,因此,具有优秀的改善或治疗包括特应性皮炎在内的皮肤疾病的功效。

[0139] ④测定血清免疫球蛋白E

[0140] 在对阴性对照组、阳性对照组、诱导多能干细胞来源的间充质干细胞处理组、诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的外泌体处理组、利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞处理组及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体处理组的小鼠进行开腹并插入针,在后腔静脉抽血0.5~0.7mL左右。在分离的血液中,进行离心分离后分离血清。利用酶联免疫吸附试验(ELISA)实验试剂盒(eBioscience)测定所分离的血清的总免疫球蛋白E。结果,相比于阳性对照组,诱导多能干细胞来源的间充质干细胞处理组的血清免疫球蛋白E水平减少,但是,诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的外泌体处理组的血清免疫球蛋白E水平没有变化,相比于诱导多能干细胞来源的间充质干细胞处理组及诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的外泌体处理组,利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞处理组及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体处理组的血清免疫球蛋白E的减少幅度更小(图12)。

[0141] 当以上述结果及如上所述的实施例的临床症状改善效果为基础进行判断时,本发明的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞、诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的外泌体、利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞或利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体的皮肤疾病的改善功效并不是主要以免疫球蛋白E为媒介。

[0142] ⑤确认T细胞免疫反应

[0143] 为了确认通过利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体的T细胞免疫反应,在阴性对照组、阳性对照组、诱导多能干细胞来源的间充质干细胞处理组、诱导多能干细胞来源的间充质干细胞的外泌体处理组、利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞处理组及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体处理组的小鼠的淋巴结分离淋巴细胞。利用CD3/CD28刺激所分离的淋巴细胞并提取培养液,并通过酶联免疫吸附试验试剂盒(eBioscience)测定细胞因子分泌。在Th17中生成的主要细胞因子的白细胞介素17a的情况下,相比于阳性对照组,利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞处理组及利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体处理组以与阴性对照组相似的水平显著减少(图13)。

[0144] 当以上述结果及如上所述的实施例的临床症状改善效果及血清免疫球蛋白E水平变化为基础判断时,本发明的利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞、利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体的皮肤疾病的改善功效并不是主要以免疫球蛋白E为媒介,而是通过抑制白细胞介素17A等T细胞的免疫反应来介导。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> THE ASAN FOUNDATION
- [0003] University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
- [0004] <120> 包含利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞及来源于其的外泌体的用于改善、预防或治疗皮肤疾病的组合物
- [0005] <130> PP180064
- [0006] <160> 2
- [0007] <170> KoPatentIn 3.0
- [0008] <210> 1
- [0009] <211> 21
- [0010] <212> DNA
- [0011] <213> 人工序列
- [0012] <220>
- [0013] <223> 用于检测人吡咯胺2,3-二加氧酶基因的正向引物
- [0014] <400> 1
- [0015] gcccttcaag tgtttcacca a 21
- [0016] <210> 2
- [0017] <211> 22
- [0018] <212> DNA
- [0019] <213> 人工序列
- [0020] <220>
- [0021] <223> 用于检测人吡咯胺2,3-二加氧酶基因的反向引物
- [0022] <400> 2
- [0023] gcctttccag ccagacaaat at 22

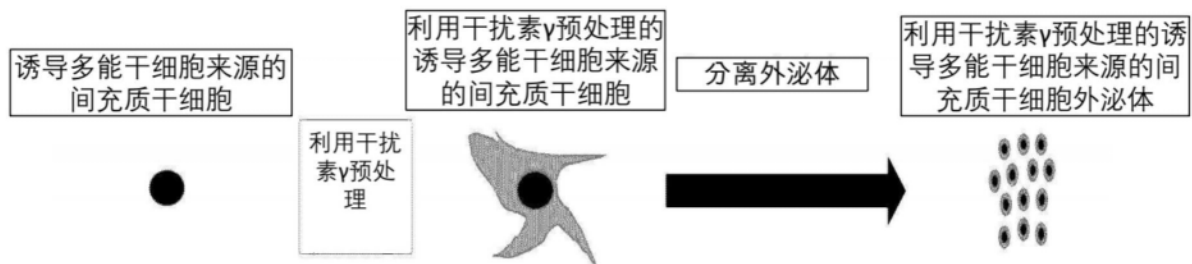


图1

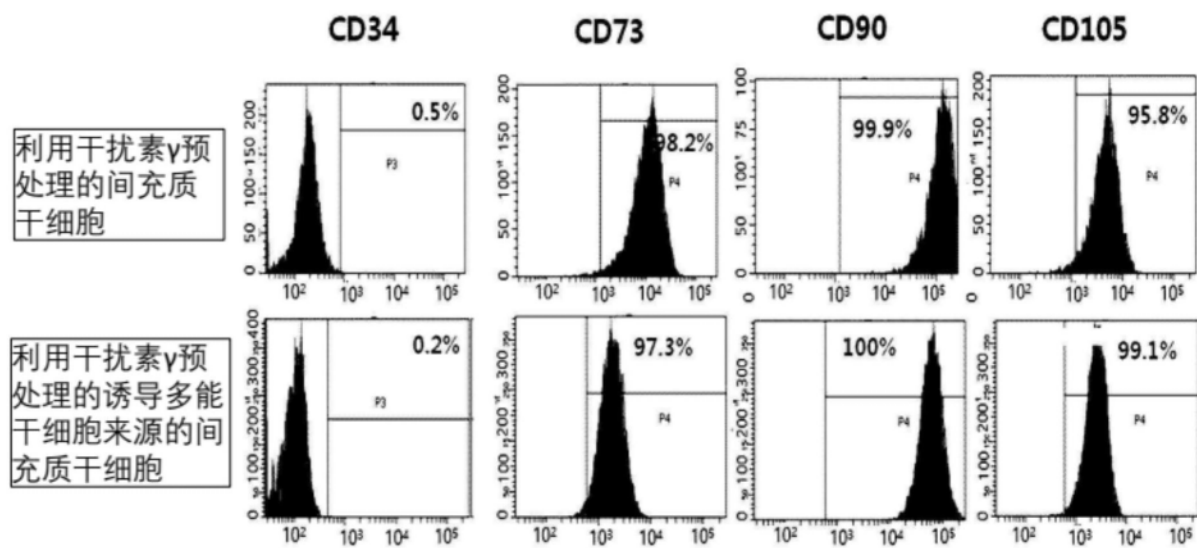


图2

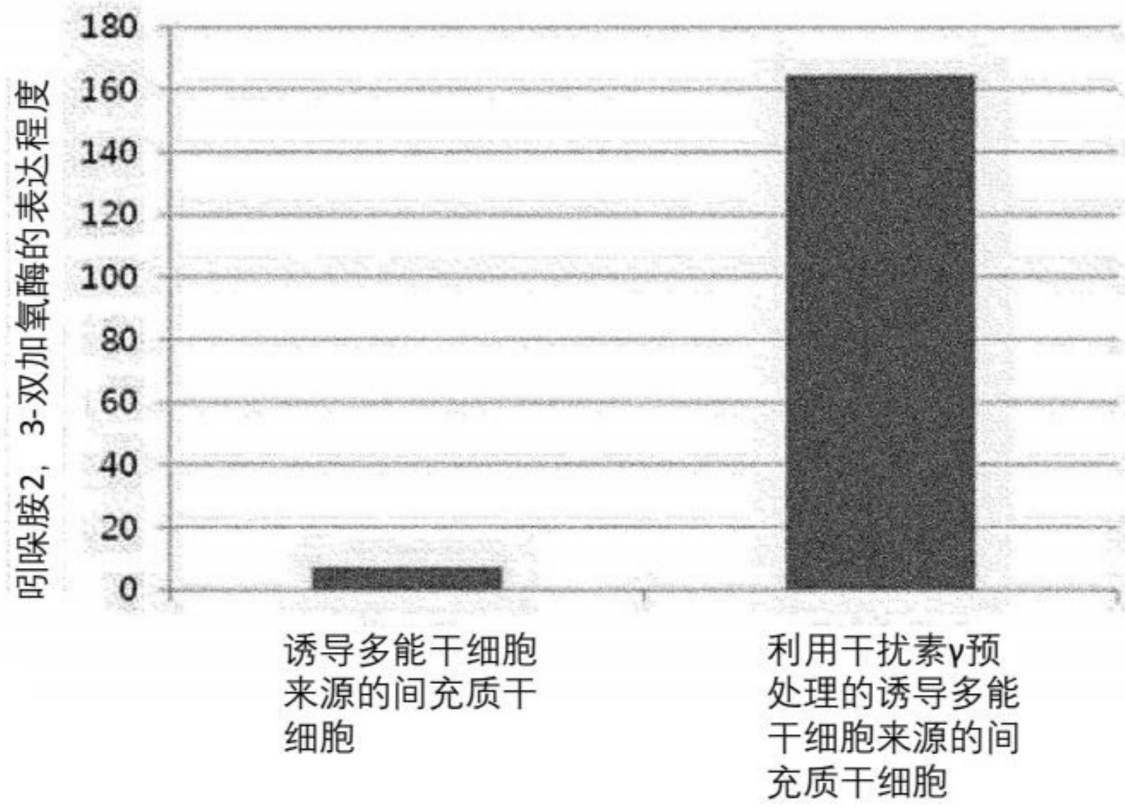


图3

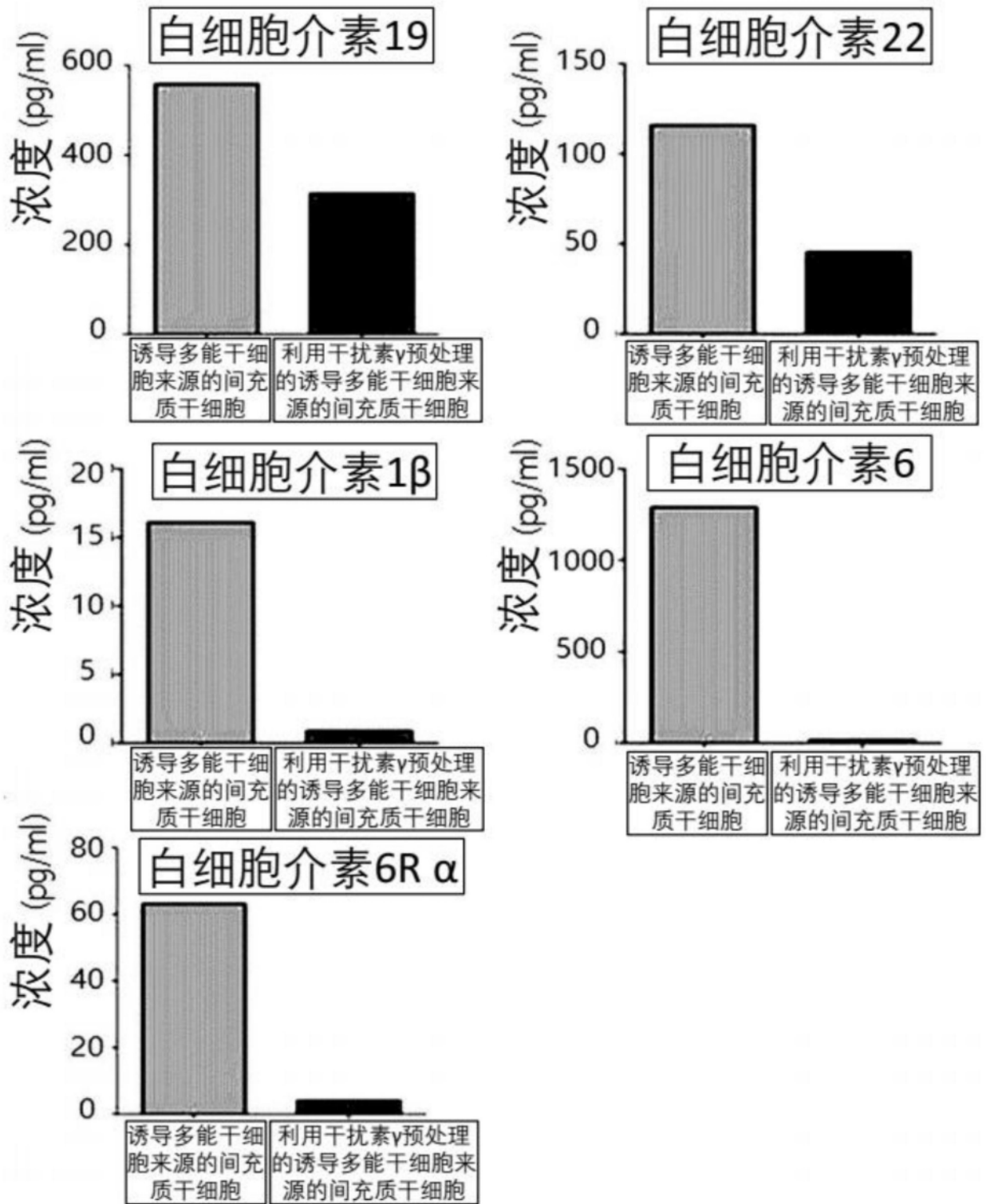
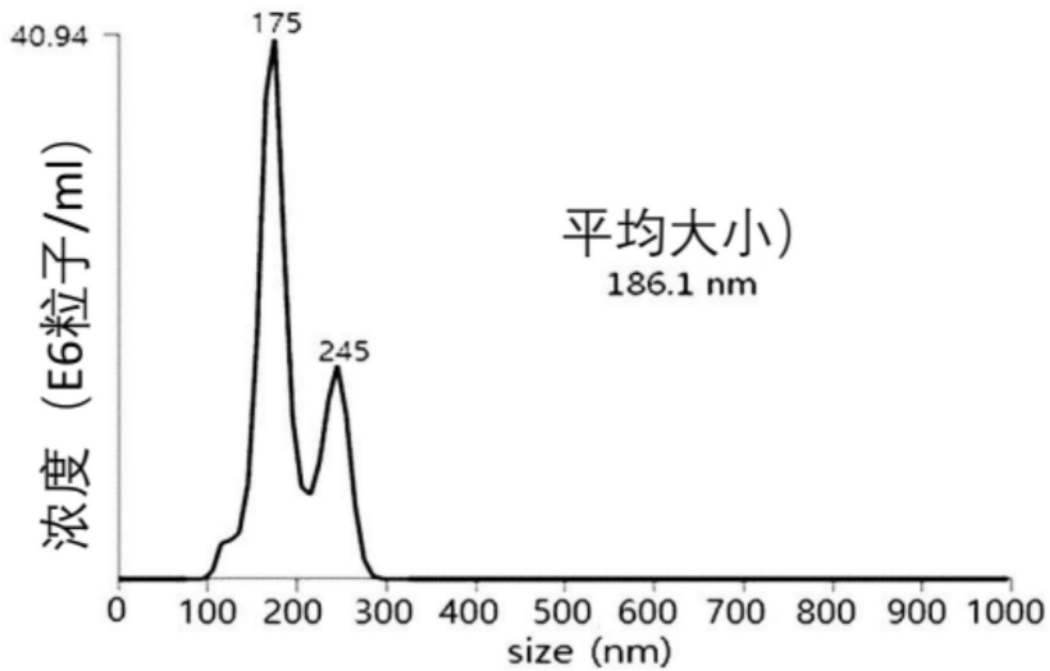
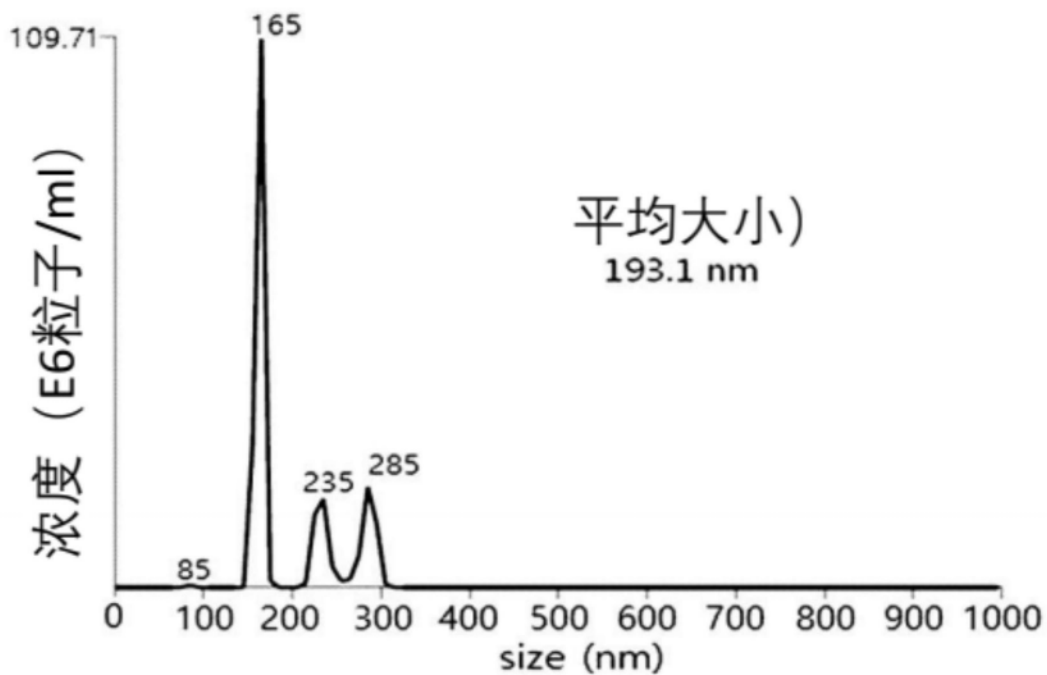


图4



利用干扰素 γ 预处理的间充质干细胞分离外泌体



利用干扰素 γ 预处理的诱导多能干细胞来源的间充质干细胞外泌体

图5

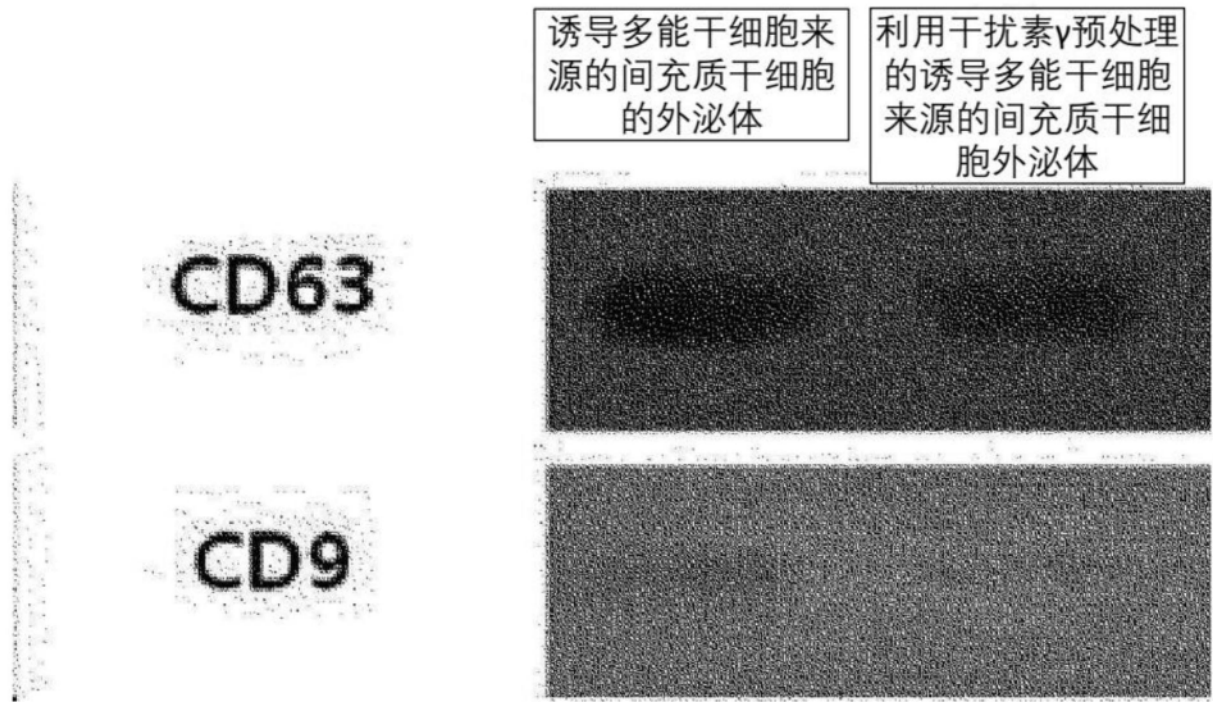


图6

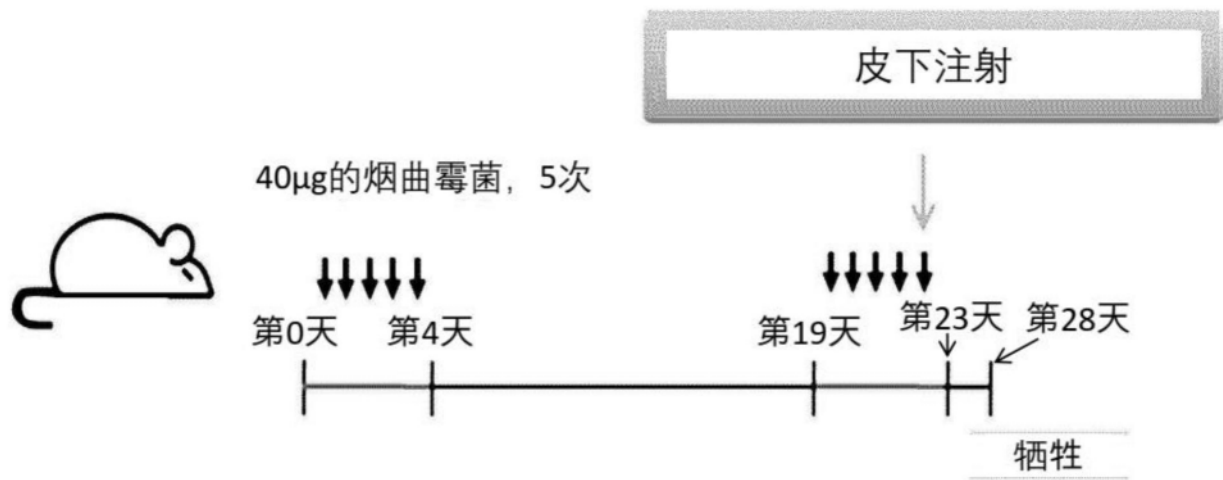


图7

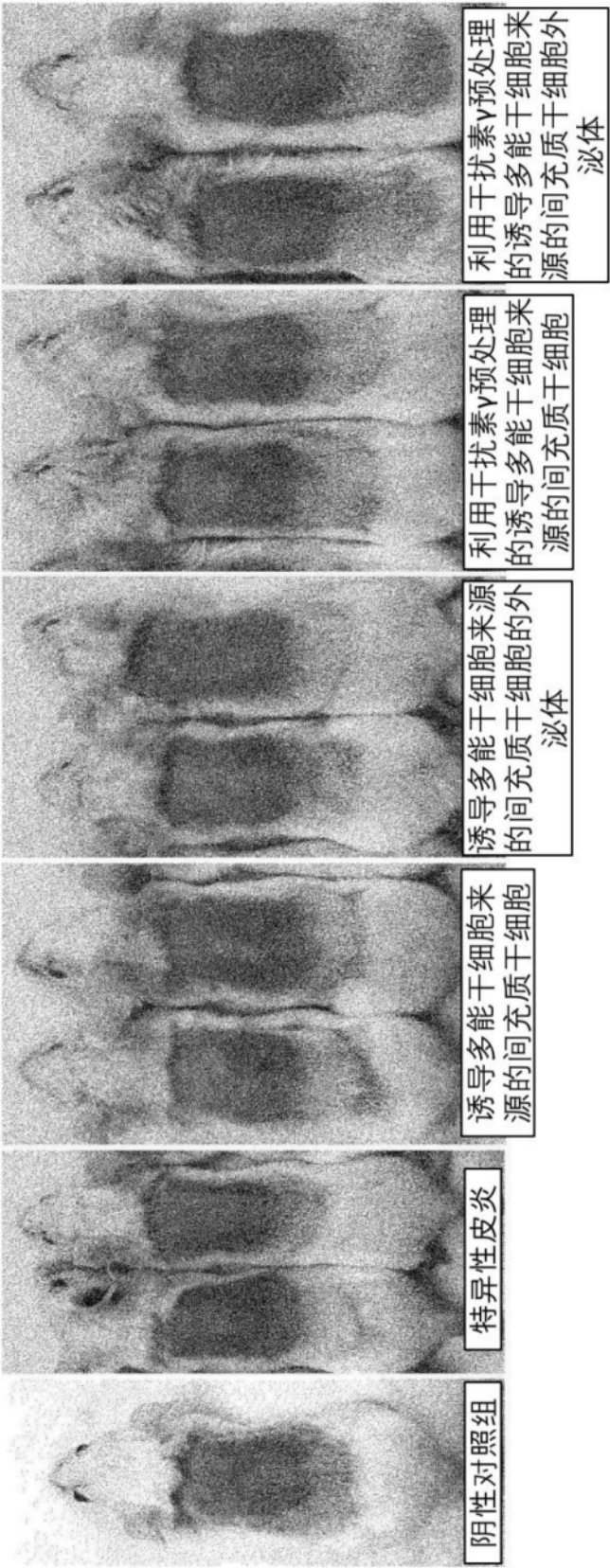


图8

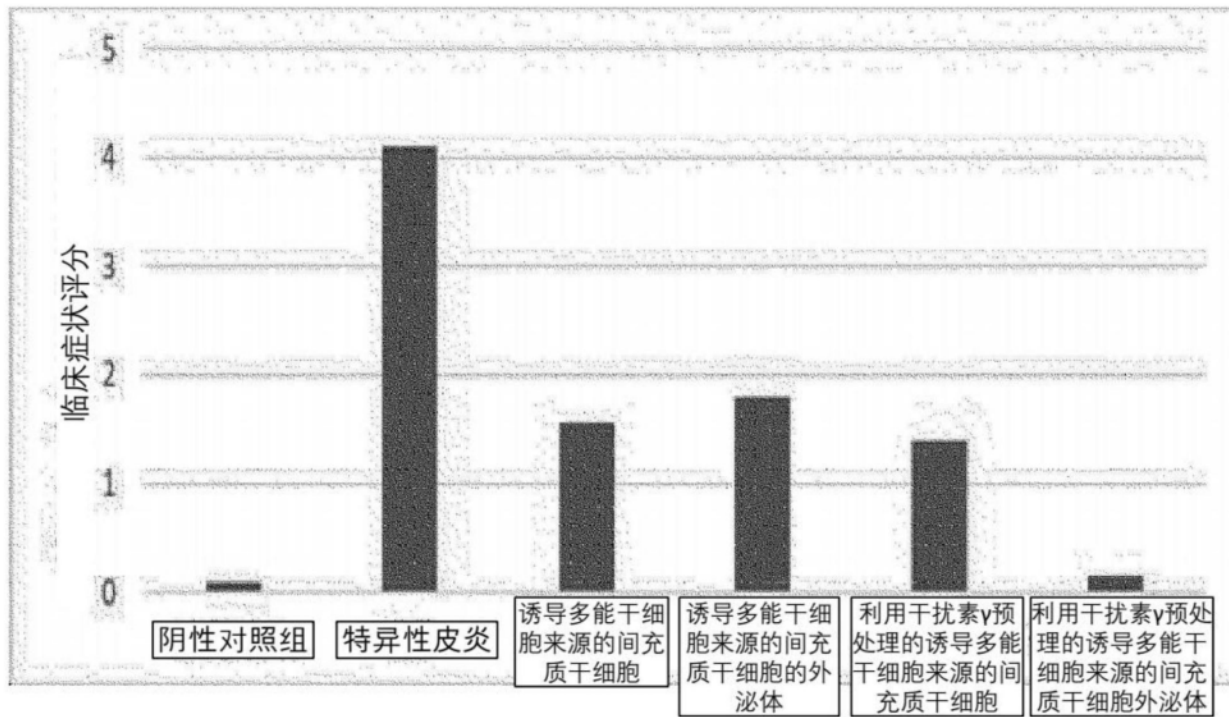


图9

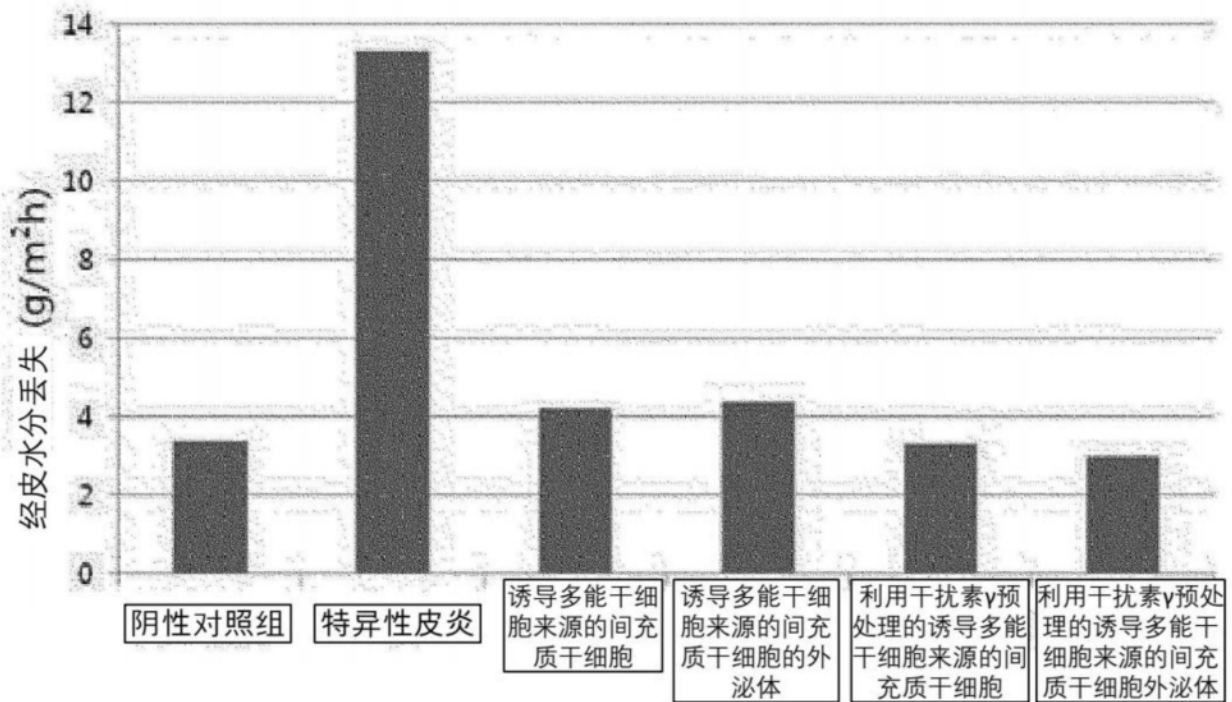


图10

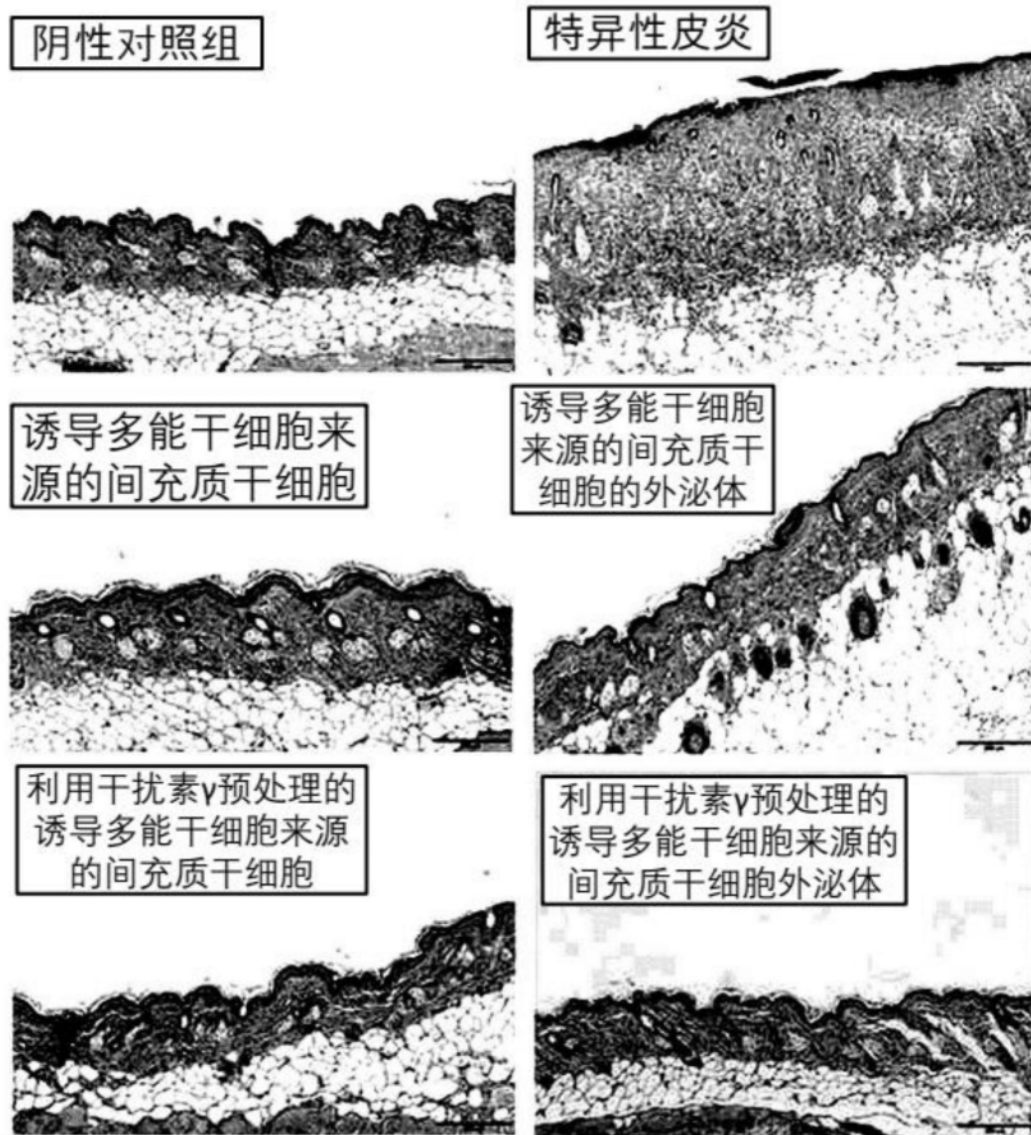


图11

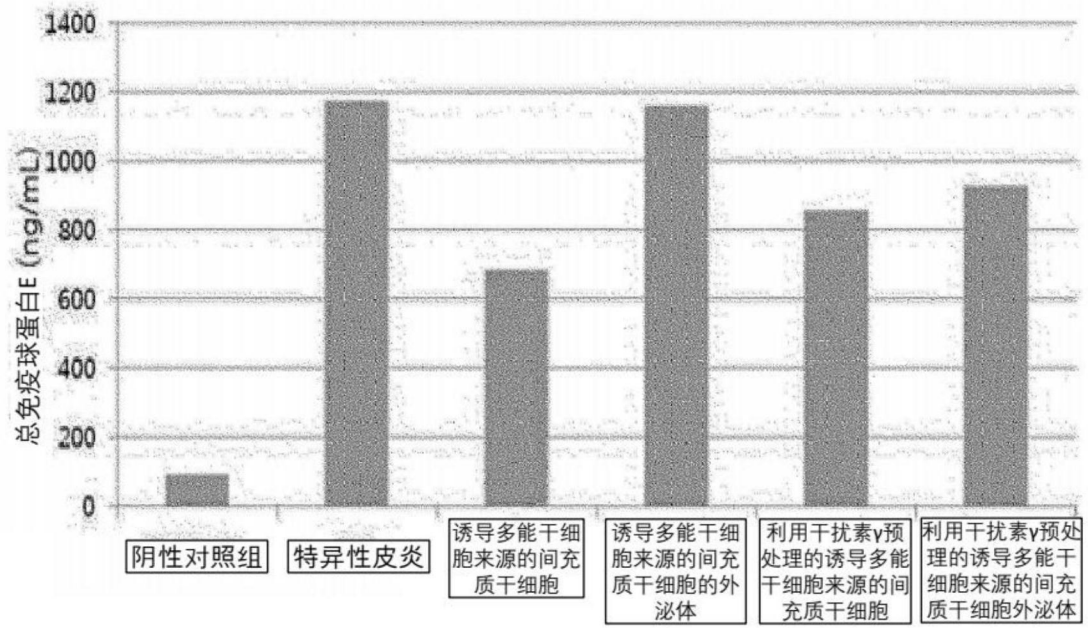


图12

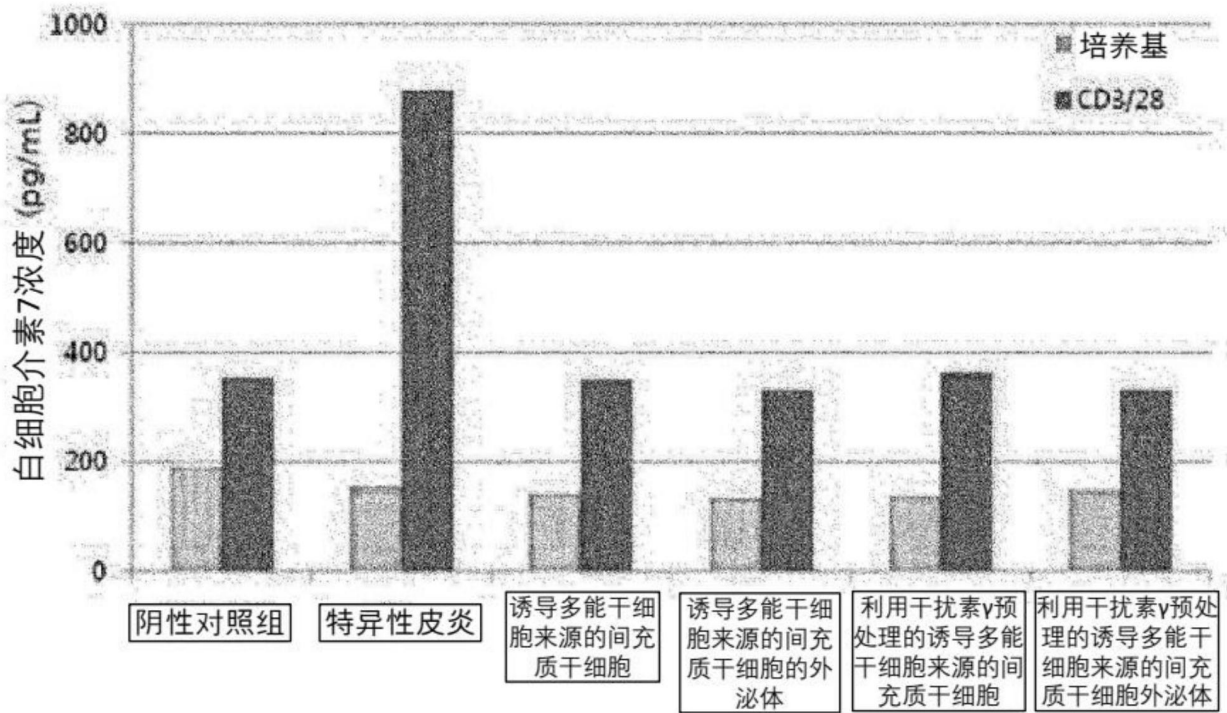


图13