



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116716242 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 08

(21) 申请号 202310304734.8

A61K 35/36 (2015.01)

(22) 申请日 2014.06.18

A61P 17/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 17/18 (2006.01)

61/836,634 2013.06.18 US

(62) 分案原申请数据

201480043963.8 2014.06.18

(71) 申请人 复制细胞生命科学公司

地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

(72) 发明人 罗尔夫·霍夫曼

凯文·约翰·麦克维

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

专利代理师 王达佐 洪欣

(51) Int. Cl.

C12N 5/0775 (2010.01)

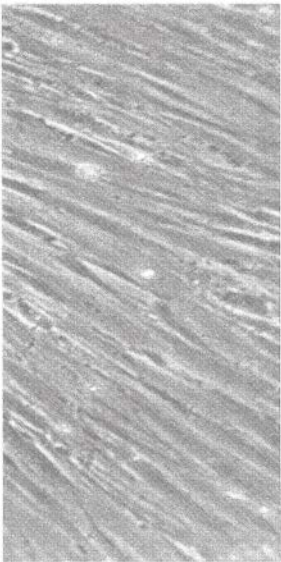
权利要求书2页 说明书12页 附图3页

(54) 发明名称

治疗皮肤的组合物和方法

(57) 摘要

本发明涉及利用源于毛囊的非球形真皮鞘
(NBDS) 细胞治疗皮肤的组合物和方法。



1. 分离非球形真皮鞘(NBDS)细胞的方法,其包括:
 - (a) 准备有活力的毛发;
 - (b) 切割步骤(a)中准备的毛发以移出毛囊球部;
 - (c) 分离非球形真皮鞘组织;以及
 - (d) 培养所分离的非球形真皮鞘组织以产生NBDS细胞。
2. 如权利要求1所述的方法,其中通过活体组织检查从对象头皮上的毛发获得所述有活力的毛发。
3. 如权利要求1所述的方法,其中所分离的NBDS细胞可自体或同种异体使用。
4. 如权利要求1所述的方法,其中使用显微操纵器和手术刀,或剪刀切割所述毛发。
5. 如权利要求1所述的方法,其还包括对所述分离的非球形真皮鞘组织进行酶促消化的步骤。
6. 如权利要求5所述的方法,其中用胶原酶、透明质酸酶、脱氧核糖核酸酶、弹性蛋白酶、木瓜蛋白酶、蛋白酶XIV型、胰蛋白酶和分散酶进行所述酶促消化。
7. 如权利要求1所述的方法,其中所述NBDS细胞被多次传代。
8. 组合物,其包含根据权利要求1至7中任一项所述的方法制备的分离的非球形真皮鞘细胞。
9. 组合物,其包含分离的非球形真皮鞘细胞。
10. 如权利要求8或9所述的组合物,其还包含血清血浆或富含血小板的血浆(PRP)。
11. 如权利要求8或9所述的组合物,其还包含纤维蛋白和/或透明质酸。
12. 如权利要求8或9所述的组合物,其还包含胞外基质组分、细胞因子、趋化因子和治疗剂。
13. 如权利要求12所述的组合物,其中所述胞外基质组分选自:葡糖氨基葡聚糖(GAGs)、硫酸肝素、硫酸软骨素、硫酸角质素、透明质酸、弹性蛋白、胶原、纤连蛋白和层粘连蛋白。
14. 如权利要求8或9所述的组合物,其还包含支架。
15. 如权利要求14所述的组合物,其中所述支架为生物可降解支架。
16. 如权利要求12所述的组合物,其中所述细胞因子选自:转化生长因子 β (TGF- β)及其同工型、胰岛素样生长因子(IGF)及其同工型、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、甲状旁腺激素相关蛋白、肝细胞生长因子/分散因子(HGF/SF)、巨噬细胞刺激蛋白(MSP)、表皮生长因子(EGF)、白细胞介素6(IL-6)、基质细胞源性因子1(SDF-1)、血小板源性生长因子(PDGF)和纤维母细胞生长因子(FGF)。
17. 如权利要求12所述的组合物,其中所述治疗剂选自:止痛剂、抗炎剂、抗生素、抗病毒剂、抗真菌剂和免疫调节剂。
18. 治疗皮肤的方法,其包括向对象的皮肤施用权利要求8至17中任一项所述的组合物的步骤。
19. 如权利要求18所述的方法,其中所述对象为选自人、马、狗和猫的哺乳动物。
20. 如权利要求18所述的方法,其中所述治疗是由于皮肤损伤。
21. 如权利要求20所述的方法,其中所述皮肤损伤为急性或慢性的伤口或者伤痕。
22. 如权利要求18所述的方法,其中所述皮肤损伤为由手术、烧伤、辐射或事故引起的

外伤性伤口。

23. 如权利要求18所述的方法,其中所述皮肤损伤为四肢上的自发或诱发挫伤的倾向。

24. 如权利要求18所述的方法,其中所述皮肤为老化的皮肤。

25. 如权利要求24所述的方法,其中所述老化的皮肤经受选自以下的状况:细小的或粗糙的皱纹、减少的皮肤厚度、减少的弹性和坚固性。

26. 如权利要求18所述的方法,其中所述皮肤为人类对象的皮肤的子部分,其选自:脸、颈和手。

27. 组合物,其包含NBDS细胞上清液。

28. 组合物,其包含从根据权利要求1至7中任一项所述方法培养的NBDS细胞制备的NBDS细胞上清液。

29. 如权利要求27或28所述的组合物,其中将所述组合物稀释或浓缩。

30. 如权利要求27至29中任一项所述的组合物,其还包含赋形剂。

31. 如权利要求30所述的组合物,其中所述赋形剂为聚合物。

32. 如权利要求30所述的组合物,其被加工为乳膏、乳霜或凝胶。

33. 权利要求27至32中任一项所述的组合物在治疗皮肤中的用途。

34. 用于治疗皮肤的方法,其包括向对象的皮肤施用权利要求27至32中任一项所述的组合物。

治疗皮肤的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请依据35U.S.C.§119(e) 要求于2013年6月18日提交的美国临时专利申请第61/836,634号的权益,将其通过引用整体并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及用于治疗皮肤以及用于不同美容和审美目的的组合物和方法,更具体地,涉及包含自体的或同种异体的非球形真皮鞘(NDBS)细胞的组合物,其用于治疗 and 修复皮肤(包括例如皮肤损伤)、用于皮肤老化的预防以及用于不同的美容和审美目的。

[0004] 发明背景

[0005] 相关领域的描述

[0006] 皮肤是复杂的器官,并且可被分为至少三个不同的层:表皮层、真皮层和皮下层。皮肤内大多数的纤维性结缔组织通过真皮纤维母细胞形成,其分泌不同的胶原类型(如I型、III型等等)以赋予皮肤的坚度、维持表皮,而且分泌多种自分泌和旁分泌因子。

[0007] 皮肤可以以多种方式变老或被损伤,其包括例如通过外部的创伤(包括外科手术),痤疮和导致伤痕的其他炎症性反应,导致具有慢性伤口的脆弱皮肤的遗传疾病(如营养不良性大疱型表皮松解症),慢性自身免疫性炎症疾病(如硬皮病及其变体、伯氏疏螺旋体(Borelliosis)感染、红斑狼疮及其变体、扁平苔藓),抽烟和紫外光的负面影响(外因性老化)和一般性老化(内因性老化)。

[0008] 皮肤的老化是多方面的,并且除内在/遗传的机制之外,抽烟和紫外光对皮肤具有有害的影响。多年之后,真皮的胶原降低并且从而使胶原与纤维母细胞的接触(例如整合素)减少。结果,老化的纤维母细胞显示相当圆的形状,不同于纺锤形、多连结的初期纤维母细胞。久而久之,这会导致皮肤的松弛,临床上可见为脸、手、小臂、露肩处以及其他处的细小的或有时更明显的皱纹。

[0009] 虽然存在许多可用来治疗皮肤的外科和非外科的方法,但是这些技术中没有一种能处理老化的皮肤中功能性纤维母细胞的细胞缺乏的问题。

[0010] 本发明公开了用于治疗皮肤老化和损伤的新型组合物和方法,并且还提供了其他相关优势。

[0011] 发明概述

[0012] 简而言之,本发明提供利用毛囊来源的非球形真皮鞘(“NDBS”)细胞治疗或预防皮肤老化或皮肤损伤的组合物和方法。在本发明的一方面,提供包括以下步骤的方法:(a) 准备有活力的(即,‘活的’)毛发;以及(b) 培养有活力的毛发以便获得NDBS细胞群。在优选的实施方案中,将NDBS细胞分离。

[0013] 在本发明的一个方面,提供用于分离NDBS细胞的方法,其包括以下步骤:(a) 准备有活力的毛发;(b) 将步骤(a)中准备的毛发切割(cleave)以移出毛囊的球部(其含有真皮鞘杯和真皮乳头);(c) 分离非球形真皮鞘组织;以及(d) 培养所述分离的非球形真皮鞘组织以产生NDBS细胞。在本发明的一个实施方案中,通过来自对象的枕部头皮的活体组织检查

获得有活力的毛发。在另一实施方案中,利用显微操纵器和手术刀将毛发切割。而在其他实施方案中,本文提供的方法还包括以下步骤:任选地,用例如胶原消化酶(如胶原酶、分散酶和亮抑酶肽)对分离的非球形真皮鞘组织进行酶促消化。在其他实施方案中,将细胞多次传代。

[0014] 在本发明的其他方面中,提供分离的NBDS细胞,任选地,根据上文所述的方法制备,其中将所述细胞分离以提供对于CD90、CD73和CD49b中的一种或多种主要为阳性的细胞群,和/或对于CD34、CD45和KRT14中的一种或多种主要为阴性的细胞群(任选地在培养前或培养后)。在优选的实施方案中,所述分离的NBDS细胞对上文所述的阳性标志物中的一种或多种至少70%、80%、90%、95%、98%或100%为阳性,和/或对上文所述的阴性标志物中的一种至少80%、90%、95%或98%为阴性。

[0015] 在本发明优选的实施方案中,分离的NBDS细胞的细胞群包含少于15%、10%、5%或1%的角质细胞,和/或包含少于15%、10%、5%或1%的黑色素细胞。然而,在其他实施方案中,分离的NBDS细胞群源自含有一些污染细胞类型的真皮细胞群(优选源自毛囊),分离的NBDS细胞群包含例如至少1、5、10、0.01%、0.1%或1%的角质细胞,和/或至少5、10、0.1%、0.01%的黑色素细胞。在本发明的其他实施方案中,分离的NBDS细胞纯度为至少95%,并且在细胞群中具有至少一种污染细胞类型(例如,至少一种角质细胞)。

[0016] 可将这些NBDS细胞(或者扩增的或分离的NBDS细胞)与其他组分(例如,血浆、纤维蛋白和/或透明质酸)一同包含在组合物中。在其他实施方案中,NBDS细胞(或者扩增的或分离的NBDS细胞)可能构成适合于注射的组合物,例如,乳酸林格式液或盐水缓冲液。可被用于形成本发明的组合物的其他成分包括:例如,胞外基质组分(例如,葡糖氨基葡聚糖(GAGs)、硫酸肝素、硫酸软骨素、硫酸角质素、透明质酸、白蛋白(例如,人白蛋白)、弹性蛋白、纤连蛋白和层粘连蛋白),细胞因子和趋化因子(例如,转化生长因子 β (TGF- β)及其同工型(isoform)、胰岛素样生长因子(IGF)及其同工型、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、甲状旁腺激素相关蛋白、肝细胞生长因子/分散因子(HGF/SF)、巨噬细胞刺激蛋白(MSP)、表皮生长因子(EGF)、白细胞介素6(IL-6)、基质细胞源性因子1(SDF-1)、血小板源性生长因子(PDGF)和纤维母细胞生长因子(FGF))和/或各种治疗剂(例如,止痛剂、抗炎剂和免疫调节剂)。然而在其他实施方案中,NBDS细胞(和分离的NBDS细胞)被提供至不含上文提及的任何成分(包括例如,血清或血浆)的组合物中。

[0017] 而在本发明的其他方面,提供用于治疗对象皮肤的方法,其包括以下步骤:向对象的皮肤施用包含本文所述的NBDS细胞的组合物。在一个实施方案中,所述对象为选自人、马、狗和猫的哺乳动物。在不同的实施方案中,所述治疗是由于皮肤损伤。在某些实施方案中,皮肤损伤可由外部创伤(例如,外科手术或伤口、烧伤、辐射或事故)或者急性或慢性的伤口或伤痕引起。在其他实施方案中,所述皮肤损伤是四肢上的自发或诱发挫伤的倾向。而在其他实施方案中,所述皮肤损伤的原因是痤疮和/或导致伤痕的其他炎症反应,具有脆弱肌肤的遗传性疾病(如营养不良性大疱型表皮松解症)或者其他遗传性或获得性发疱疾病(其具有由糖尿病、动脉硬化症或静脉曲张病、急性或慢性病毒性、霉菌或细菌性感染引起的慢性伤口),慢性自身免疫性炎症疾病(如硬皮病及其变体、伯氏疏螺旋体感染、红斑狼疮及其变体、扁平苔藓),抽烟和紫外光的负面影响(外因性老化)以及一般老化(内因性老化)。而在另一实施方案中,所述皮肤为整个人体的皮肤或身体的选定部分(如手、脸和颈)

的皮肤。在其他实施方案中,所述皮肤可因日光(紫外光)或抽烟而老化/损伤。在相关的实施方案中,老化的皮肤经受选自以下的状况:细小的或粗糙的皱纹、减少的皮肤厚度、减少的弹性和坚固性。在其他实施方案中,为了美容目的(例如,减少脂肪团的出现),对所述皮肤进行处理。而在其他实施方案中,皮肤当前无可见的损伤或创伤,然而可对皮肤进行处理以预防或延迟正常老化的发生,或者以改善正常皮肤的外观(和纹理)。

[0018] 在本发明的另一方面,提供包含NBDS细胞培养上清液的组合物。在一个实施方案中,从本文所述的培养的NBDS细胞制备NBDS细胞培养上清液。在其他实施方案中,可通过冷冻、冻干或其他合适的方法将NBDS细胞培养上清液储存。可以以多种方法使用NBDS细胞培养上清液,包括例如局部应用、注射(例如,对皮肤或其他身体部分进行微量注射)。

[0019] 在不同的实施方案中,可制备和使用NBDS细胞培养上清液,例如,过滤后,将其用合适的缓冲液或赋形剂稀释、浓缩或者与分离出的可被分别地使用不同组分(例如,干细胞因子、wnt-因子、其他生长因子、细胞因子或趋化因子)组合。在一个实施方案中,可按照以下方式使用NBDS细胞培养上清液:将其稀释或浓缩,并且使其与适合于施用的化合物或组合物(例如,凝胶、乳霜或基于聚合物的组合物)组合或混合。示例性实例包括:透明质酸、胶原、胞外基质、支架、基于聚合物(例如,聚乙二醇、聚乳酸和聚己内酯)的组合物。所述NBDS细胞培养上清液的其他合适的载体包括乳膏和美容行业中使用的其他液体(例如乳剂、假漆(laquer)、补养药、洗发水、喷雾剂)。在其他实施方案中,可将NBDS细胞培养上清液置于制造的或收集的胞外基质中(参见例如US 20100047305或US 20100124573)。在其他实施方案中,可在医疗装置上使用所述细胞,或者将其放在或放入非生物可降解的或生物可降解的支架或其他结构上。具体优选的支架或结构包括生物可降解的支架(例如,基于胶原的支架,如网格)。合适支架的示例性实例包括,例如美国专利第5,736,372号、第5,759,830号、第8,039,258号和第8,105,380号中的支架,将其全部通过引用整体并入。

[0020] 下文描述中阐述了一个或多个实施方案的细节。根据说明书、附图和权利要求书,其他特征、目标和优点将是显而易见的。此外,将本文提及的所有专利和专利申请的公开内容通过引用整体并入本文。

[0021] 附图简述

[0022] 图1显示人毛囊的解剖。图1A显示分离的人毛囊,可将其在毛根的球部以上(即,真皮乳头细胞和真皮鞘杯细胞以上,即,末端球以上),但在皮脂腺管基部以下切割,以便获得分离的真皮鞘(参见图1B)。可将图1B中描述的结构分为至少两个单独的部分,如图1C和1D所示。图1C描述了毛发纤维和相连的内根鞘,以及主要含有角质细胞的外根鞘,图1D为含有NBDS细胞的真皮鞘(偶尔也被称为结缔组织鞘、上部真皮鞘或不太精确地仅称为真皮鞘)。与真皮鞘杯细胞(DSC)和真皮乳头(DP)细胞相反,NBDS细胞对胶原-1标志物主要为阳性,对碱性磷酸酶和类固醇磷酸酯酶仅为弱阳性。此外,这些细胞表达诸如CD90的标志物和其他干细胞标志物。

[0023] 图2为毛囊的图解,描述了真皮乳头(“DP”)细胞、真皮鞘杯(“DSC”)细胞和非球形真皮鞘(“NBDS”)细胞的来源。

[0024] 图3为培养物中的NBDS细胞的显微照片。

[0025] 发明详述

[0026] 如上所述,本发明提供用于治疗或预防哺乳动物的皮肤老化和皮肤损伤的毛囊来

源的非球形真皮鞘(NBDS)细胞。然而,在阐明本发明之前,首先阐明下文中使用的某些术语的定义可有助于理解本发明。

[0027] 非球形真皮鞘细胞或“NBDS”细胞指真皮来源的细胞(或更具体地,源自毛囊)。在优选的实施方案中,从毛囊的外真皮鞘获得鞘细胞,在发根的球部以上(即,真皮乳头细胞和真皮鞘杯细胞以上)但在皮脂腺管基部以下。在本发明具体优选的实施方案中,NBDS细胞为没有经紫外线照射的细胞,即,它们还没有接触过大量紫外线的照射(例如,与鼻子或手的顶面相比)。可将NBDS细胞扩增和分离,这在下文会更详细地描述。

[0028] 可通过多种方法容易地鉴定NBDS细胞,包括例如,通过制备和培养的方法(如下文所述);形态学(参见,例如图3);以及细胞特异性标志物(例如,在培养之前或之后,对于CD90、CD73和CD49b,NBDS细胞主要为阳性,和/或对于CD34、CD45和KRT14,NBDS细胞主要为阴性)。然而在所有事件中,所述细胞必须为真皮来源,或者在更优选的实施方案中,来自毛囊。

[0029] 扩增的非球形真皮鞘细胞或“eNBDS细胞”指在培养物中经过多次传代扩增的NBDS细胞,但其仍保留产生胶原(例如,I型胶原)以及各种细胞因子、趋化因子和激素的能力。如上,意外地,所述eNBDS细胞也具有免疫调节能力。在优选的实施方案中,所述细胞可在培养物中传代1代、2代、3代、4代、5代、10代、20代或更多代。

[0030] “分离的”NBDS细胞指含有高于70%、80%、85%、90%、95%、98%或100%的NBDS细胞的细胞群。NBDS细胞具有产生胶原(例如,I型胶原)以及各种细胞因子和趋化因子的能力。意外地,NBDS细胞也具有免疫调节能力,使得它们特别适合用于治疗皮肤损伤(例如,通过帮助抑制任何炎症反应)。

[0031] 在本发明的某些实施方案中,可以使用能使细胞在微观范围可见的软件或其他可视技术来评估一个视野中大量细胞的尺寸、形状、生活力和粒度,并且确定NBDS细胞(其为如图3所示的纤维母细胞样,不同于角质细胞、黑色素细胞、DSCs和不同形态的其他细胞类型)的数量。因此,在本发明的一个实施方案中,提供用于分离NBDS细胞的方法,其包括以下步骤:将来自毛囊的细胞培养至少1代、2代、3代、4代、5代、6代、10代或20代,使得产生分离的NBDS细胞群。在优选的实施方案中,将所述细胞置于允许NBDS细胞贴壁的血或瓶,并且随着每次传代,将非贴壁细胞移出,并释放剩余的贴壁细胞(例如,通过胰蛋白酶消化),随后加入新鲜培养基。在这样的实施方案中,通过观察细胞培养基中的细胞可确定何时获得足够的分离的NBDS细胞群,以评估NBDS细胞相对于非NBDS细胞的数量。可视技术包括但不限于:直接的显微观察、将具有标志物(或缺乏标志物-例如,缺乏角蛋白)的细胞染色,和光/激光分析,以查看不同细胞类型的衍射图样(通常参见,“Laser Scanning Microscopy and Quantitative Image Analysis of Neuronal Tissue”Lidia Bakota and Roland Brandt,eds.,Humana Press,2014;也参见“Imaging and Spectroscopic Analysis of Living Cells:Optical and Spectroscopic Techniques”,Conn ed.,Academic Press,2012)。

[0032] 在其他实施方案中,可利用细胞特异性标志物(例如,对于CD 90、CD73和CD49b,NBDS细胞主要为阳性,和/或对于CD34、CD45和KRT14,NBDS细胞主要为阴性(任选地,在培养之前或培养之后)来评估与NBDS细胞相对于污染细胞类型的程度(Applications of Flow Cytometry in Stem Cell Research and Tissue Regeneration”,Krishan,

Krishnamurthy, and Totey eds., Wiley-Blackwell, 2010)。例如,可通过以下步骤制备分离的NBDS细胞:a)获得一个或多个有活力的毛囊;b)将细胞从毛囊释放(例如,通过使用酶,或通过在毛囊外培养来增殖细胞);以及c)将细胞进行分选(例如,通过流式细胞术或通过使用磁珠)以获得分离的NBDS细胞群。在本发明的某些实施方案中,任选地,可将处于所述过程中的任意阶段的细胞按如上所述进行培养(例如,可将细胞按如上所述培养至少1代、2代、3代、4代、5代、6代、10代或20代,并且通过例如流式细胞术或磁珠将得到的细胞进一步分离。

[0033] 在优选的实施方案中,对上述阳性标志物中的一种或多种,所述分离的NBDS细胞至少70%、80%、85%、90%、95%、98%或100%为阳性,和/或对上述阴性标志物中的一种,所述分离的NBDS细胞至少80%、90%、95%或98%为阴性。

[0034] 在本发明其他优选的实施方案中,从未经紫外线照射的组织,具体地从被毛发覆盖的毛囊中分离NBDS细胞,因此例如与手上或前臂的真皮细胞相比,所述NBDS细胞具有较少的紫外线照射和/或损伤。

[0035] 在本发明优选的实施方案中(并且利用本文所述技术中的任一种),在分离的NBDS细胞的细胞群中含有少于15%、10%、5%或1%的角质细胞和/或在所述细胞群含有少于15%、10%、5%或1%的黑色素细胞。然而,在其他实施方案中,所述分离的NBDS细胞群源自含有一些污染细胞类型的真皮细胞群(优选地,来自毛囊),所述细胞群含有例如至少1%、5%、10%、0.01%、0.1%或1%的角质细胞,和/或至少5%、10%、0.1%、0.01%的黑色素细胞。在本发明的其他实施方案中,所述分离的NBDS细胞的纯度至少为95%,以及在所述细胞群中含有至少一种污染细胞类型(例如,至少一种角质细胞)。

[0036] “皮肤损伤”指由于外部或内部创伤对皮肤的损害。例如,皮肤损伤可由以下原因引起:痤疮和/或导致伤痕或伤口的其他炎症反应,具有慢性伤口的脆弱肌肤的遗传疾病或发疱疾病(如营养不良性大疱型表皮松解症),慢性自身免疫性炎症疾病(如硬皮病及其变体、伯氏疏螺旋体感染和其它感染、红斑狼疮及其变体、扁平苔藓、牛皮癣、异位性皮炎、瘙痒)。皮肤损伤也可归因于外科手术或伤口以及事故。伤口可由多种因子引起,包括糖尿病和静脉或动脉供血不足。皮肤损伤也可由多种因子(包括烧伤、冻伤、辐射)引起或被不同的药物诱发。皮肤损伤也可归因于“皮肤老化”,其涉及多种因子的负面影响,包括例如,抽烟、紫外光(外因性老化)和一般老化(内因性老化)。

[0037] NBDS细胞的制备

[0038] 如上所述,本发明提供用于分离NBDS细胞的方法。在本发明的一个方面中,这样的方法包括以下步骤:(a)准备有活力的毛发;以及(b)培养所述有活力的毛发以获得NBDS细胞群。关于步骤(a),可利用多种方法来获得有活力的毛发,包括例如,外科方法以移除大量毛囊(与皮肤一起),或从直接从对象拔出一个或多个毛囊。

[0039] 一旦获得有活力的毛发,就将其在允许并且优选促进NBDS细胞生长的条件下培养。在优选的实施方案中,该培养在允许纤维母细胞样细胞增殖的条件下进行。在优选的实施方案中,所述培养步骤在无血清的培养基中进行。在多次传代之后(例如,至少2代、3代、4代、5代、10代或更多代),按如上所述分析培养的细胞,以确定是否存在足够量的NBDS细胞,以及所述细胞是否与污染细胞充分分离。

[0040] 在本发明的其他方面,提供包括以下步骤的方法:(a)准备有活力的毛发;(b)将步

骤(a)中准备的毛发切割以移出毛囊球部(该部位含有真皮鞘杯和真皮乳头);(c)分离非球形真皮鞘组织;以及(d)培养分离的非球形真皮鞘组织以产生NBDS细胞。

[0041] 为了准备有活力的(或“活的”)毛发,通常从指定对象(例如,哺乳动物如人、马、猪、猫、狗、兔子、豚鼠、大鼠或小鼠)获得样品。所述样品可从多个部位获得(例如,对人而言,从头皮枕部区域、胸部或大腿获得,对马而言,从鬃毛或尾部获得)。所述样品可通过活体组织或其他合适的手段获得(例如,通过‘拔除’或解剖)。优选地,选择处于发展中的毛发生长期的毛囊,尽管也可使用处于发展中的其他阶段(例如,退化期)的毛囊。

[0042] 一旦从对象获得样品,就将所述样品分开以分离毛囊,通常利用显微操纵器和手术刀,尽管也可利用其他器械,如针。在某些实施方案中,可将如图1A所示的分离的毛囊在毛根的球部之上(即,在真皮乳头细胞和真皮鞘杯细胞之上)但在皮脂腺管基部之下进一步切割,以获得分离的真皮鞘(参见图1B)。图1B中所述的结构可被分为至少两个单独的部分,如图1C和1D所示。图1C描述了毛发纤维以及相连的内毛根鞘和主要含有角质细胞的外毛根鞘,图1D为含有NBDS细胞的真皮鞘(偶尔也被称为结缔组织鞘)。

[0043] 在某些实施方案中,可将真皮鞘(图1D)进一步分离:例如,通过沿着一侧长度方向切割,或者使用诸如酶促消化(例如,用胶原消化酶如胶原酶、分散酶和亮抑酶肽)的技术。

[0044] 然后可将含有NBDS细胞的真皮鞘或分离的NBDS细胞在促进细胞扩增的培养基(含有或不含血清)中培养(参见例如图3)。合适的培养基包括例如,补充有纤维母细胞生长因子(FGF)、胎牛/牛血清和抗生素的DMEM/Hams F12。可选地,细胞可在无血清过程中复制,在此过程中可使用无血清培养基和补充物的不同组合。无血清培养基的实例包括含有血清补充物和/或人体来源的血小板提取物的X-Vivo™和TheraPEAK™ FGM-CD™。3至5天后,通常向培养基加入新鲜的增殖培养基。之后,可以每2至4天更换一次培养基。当培养物达到大约80%至90%的汇合度时,通过例如胰蛋白酶消化将细胞从培养瓶分离,并将其接种于更大的组织培养瓶。将该步骤重复若干代(例如,2代、4代或6代),直到获得大约5-100百万个细胞。

[0045] 在本发明的某些实施方案中,可在低氧张力的条件下培养所述细胞(例如,其描述于美国专利公开第2013/0177537号,将其通过引用整体并入本文)。

[0046] 一旦获得期望数量的细胞,就将细胞洗涤数次,胰蛋白酶消化,并将细胞在细胞运送培养基(CTM)中重悬,所述CTM由林格氏乳酸盐、10-20%人血清白蛋白(HAS)和2-5%二甲亚砜(DMSO)组成。将细胞计数并调节以提供最终浓度为20百万个细胞/ml,并且将其储存在液氮中。

[0047] 不将全部的细胞培养上清液丢弃,因为他们含有由患者细胞产生的各种生长因子、基质分子和干细胞因子。将细胞培养上清液冷冻、冻干或用适合于具体使用的任何其他储存方式。

[0048] 包含NBDS细胞的组合物的制备

[0049] 如上所述,NBDS细胞可与其他成分(如血清或血浆、富含血小板的血浆(PRP)、纤维蛋白和/或透明质酸)一同包含在组合物中。也可利用其他可商购的产品来制备合适的组合物,包括例如:TISSEEL和COSEAL(可购自Baxter)、TISSUCOL、BERIPLAST、QUIXIL、TACHOSIL和EVICEL。也可使用其他基于聚合物的组合物,包括例如聚乙二醇、聚乳酸和聚己内酯。在其他实施方案中,可将所述细胞置于制备的或收集的胞外基质中(参见例如US20100047305

或US20100124573)。在其他实施方案中,可将所述细胞置于非生物可降解的或生物可降解的支架或其他结构中。具体优选的支架或结构包括生物可降解支架(例如,基于胶原的支架,如,网眼)。合适的支架的示例性实例包括例如美国专利第5,736,372号、第5,759,830号、第8,039,258号和第8,105,380号中所述的支架,将其全部通过引用整体并入本文。

[0050] 在其他优选的实施方案中,可以以能够自由流动和可注射的一部分或两部分或更多部分(例如,在能使组分混合的双筒注射器中或在两室或多室的柱体中)的形式提供组合物。这样的注射器的示例性实例包括美国专利第5,750,657号和第8,039,021号中描述的注射器,将两者通过引用整体并入本文。

[0051] 其他成分也可被包含在这些组合物中,包括例如胞外基质组分(例如,葡糖氨基葡聚糖(GAGs)、硫酸肝素、硫酸软骨素、硫酸角质素、透明质酸、弹性蛋白、胶原、纤连蛋白和层粘连蛋白),细胞因子和趋化因子(例如,转化生长因子 β (TGF- β)及其同工型、胰岛素样生长因子(IGF)及其同工型、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、甲状旁腺激素相关蛋白、肝细胞生长因子/分散因子(HGF/SF)、巨噬细胞刺激蛋白(MSP)、表皮生长因子(EGF)、白细胞介素6(IL-6)、干细胞因子(SCF)、基质细胞源性因子1(SDF-1)、血小板源性生长因子(PDGF)和纤维母细胞生长因子(FGF))和/或多种治疗剂(例如,止痛剂、抗炎剂、抗生素、抗真菌剂、抗病毒剂和免疫调节剂)。

[0052] 使用NBDS细胞治疗皮肤的方法

[0053] 还提供用于治疗或预防皮肤老化或皮肤损伤的方法,其包括以下步骤:向对象施用包含如上所述的NBDS细胞的组合物。通常,通过注射施用细胞,尽管在不同的实施方案中,在一定程度上采用外科方法,可将细胞直接地提供于开放性的伤口处、旁边或下面。

[0054] 纤维母细胞为真皮中的主要细胞类型。它们有高的生物学活性,并与胶原混合且经表面受体(如整合素)连接用于多层的三维细胞网。胶原纤维通过酶如MMP(基质金属蛋白酶)进行不断的更新和分解,其调节皮肤的体积和紧度。随着变老、紫外线照射或抽烟,胶原降解并且其不能被成熟的纤维母细胞取代。纤维母细胞变得非常缺乏活性,外观越来越圆并且产生较少的胶原。这导致皮肤更薄,拉伸强度更差。最后,导致老化的皮肤具有细小的皱纹线,但在鼻唇沟、前额、脸颊以及别处可见到较大的皱纹。

[0055] 因此,如上所述,本公开提供用于治疗对象皮肤的组合物和方法,其包括以下步骤:向对象的皮肤施用包含本文所述的NBDS细胞的组合物。在一个实施方案中,对象为选自人、马、狗和猫的哺乳动物。在不同的实施方案中,所述治疗是由于皮肤损伤。在某些实施方案中,皮肤损伤可由外部创伤(例如,外科手术或创伤、烧伤、辐射或事故)或者急性或慢性的伤口或伤痕引起。在其他实施方案中,所述皮肤损伤为四肢上的自发或诱发挫伤的倾向。而在其他实施方案中,所述皮肤损伤是由于痤疮和/或导致伤痕的其他炎症反应,具有脆弱肌肤的遗传疾病(如营养不良性大疱型表皮松解症)或其他遗传性或获得性的发疱疾病(具有由糖尿病,动脉硬化症或静脉曲张病,急性或慢性病毒性、霉菌或细菌性感染引起的慢性伤口),慢性自身免疫性炎症疾病(如硬皮病及其变体、伯氏疏螺旋体感染、红斑狼疮及其变体、扁平苔藓),抽烟和紫外光的负面影响(外因性老化)以及一般老化(内因性老化)。而在另一实施方案中,所述皮肤为整个人体的皮肤或身体的选定部分(如手、脸和颈)的皮肤。在其他实施方案中,所述皮肤可因日光(紫外光)或抽烟老化/损害。在相关的实施方案中,所述老化的皮肤经受选自以下的状况:细小的或粗糙的皱纹、减少的皮肤厚度、减少的弹性和

坚固性。在其他实施方案中,为了美容目的(例如,减少脂肪团的出现),对皮肤进行处理。而在其他实施方案中,皮肤当前无可见的损伤或创伤,但是对皮肤进行处理以防止或延迟正常老化的发生,或者以改善正常皮肤的外观(和纹理)。

[0056] 在本发明不同的实施方案中,可通过装置的方式施用NBDS细胞,如PCT公开第WO 2013/113121号中公开的装置,将其通过引用整体并入本文。

[0057] 可用本文提供的NBDS细胞和组合物处理众多物种,包括例如哺乳动物,如人、马、狗和猫。

[0058] 使用NBDS细胞或其细胞培养上清液进行美容/美学过程

[0059] 如上所讨论的,通过皮内(i.c.)、真皮内或皮下(s.c.)注射NBDS细胞可很容易地处理和/或防止皮肤老化的各种迹象。在其他实施方案中,可用包含NBDS细胞培养上清液的组合物处理对象的皮肤。在本发明不同的实施方案中,虽然可以处理对象(例如,人类对象)的整个皮肤,但在更具体的方面,可以向对象提供美容性和美学性的处理。这种处理的示例性实例包括但不限于:位于脸颊、鼻子、耳朵、前额、鼻唇沟、眼睑、眼睛周围(眼角纹)、嘴唇周围、下巴、鬓角、颈、露肩处、胸部、躯干、手和臂、腿和脚上的细小和粗糙的皱纹。易受紫外线损害的基本上所有皮肤部分均能得益于这样的处理。此外,可通过注射NBDS细胞或通过使用包含NBDS细胞培养上清液的组合物处理经受体积损失的身体部分,因为这会通过加入细胞从而产生胶原来增加体积。因此,耳朵、耳垂、鼻子、嘴唇、面额、颈、露肩处、胸部、乳头、生殖器的组织扩张为另外的实施方案。

[0060] 在不同的实施方案中,所述NBDS细胞可通过注射递送,该过程可在有或没有局部或全身止痛或镇静的情况下进行。该过程可用单针头或多针头的装置进行。此外,该过程可通过以下方式进行:以单次快速静脉推注或不同技术如十字交叉法(criss-cross)、羽毛法(feathering)等的多次、多层式注射。递送的体积/细胞数主要取决于被治疗的病征和面积。通常的剂量可以从低到0.01ml至数个ml开始。在本发明的某些方面,所述注射的细胞数的范围可为10至数十亿细胞,更优选地,从100、1,000、10,000、100,000、1,000,000和/或10,000,000至高达十亿或更多个细胞。除其他以外,注射的细胞数将取决于以下因素:被处理面积的大小、可用细胞的总数和注射体积以及预期的疗效程度。

[0061] 此外,将NBDS细胞注射到急性或慢性伤口、其周围或下面将有益于伤口愈合。伤口可由本文所限定的疾病引起。

[0062] 而在本发明的其他方面,将NBDS细胞培养上清液提供在合适的美容制剂中。具体地,可将细胞培养上清液应用于皮肤本身,或者将其浓缩并与适合用作美容制剂的其他成分混合。合适的赋形剂在以下文献中有描述:例如,美国专利第8,343,466号、第8,343,520号和第8,349,338号,和Michael Ash 1977,“A Formulary of Cosmetic Preparations”,将其全部通过引用整体并入本文。

[0063] 可使用包含这种NBDS细胞培养上清液的组合物处理正常皮肤以及各种皮肤损伤。如上文的详细讨论,皮肤损伤可由外部创伤(例如,外科手术或创伤、烧伤、辐射或事故)或者急性或慢性的伤口或伤痕引起。在其他实施方案中,所述皮肤损伤为在四肢上的自发或诱发挫伤的倾向。而在其他实施方案中,所述皮肤损伤是由于痤疮和/或导致伤痕的其他炎症反应,具有脆弱肌肤的遗传疾病(如营养不良性大疱型表皮松解症)或者其他遗传性或获得性发疱疾病(其具有由糖尿病、动脉硬化症或静脉曲张病、急性或慢性病毒性、霉菌或或

细菌性感染引起的慢性伤口),慢性自身免疫性炎症疾病(如硬皮病及其变体、伯氏疏螺旋体感染、红斑狼疮及其变体、扁平苔藓),抽烟和紫外光的负面影响(外因性老化)和一般老化(内因性老化)。而在另一实施方案中,所述皮肤为整个人体的皮肤或身体的选定部分(如手、脸和颈)的皮肤。在其他实施方案中,所述皮肤可因日光(紫外光)或抽烟老化/损害。在相关的实施方案中,老化的皮肤经受选自以下的状况:细小的或粗糙的皱纹、减少的皮肤厚度、减少的弹性和坚固性。在其他实施方案中,为了美容目的(例如,减少脂肪团的出现)处理皮肤。而在其他实施方案中,皮肤当前无可见的损伤或创伤,但是对皮肤进行处理以预防或延迟正常老化的发生,或者以改善正常皮肤的外观(和纹理)。

[0064] 以下实施例示例了本发明,但不应当被理解为限制本发明的范围。

[0065] 实施例1

[0066] 组织样品

[0067] 按照以下步骤从对象获得来自头皮的枕部区域的皮肤活体组织。简言之,一旦选定了头皮上合适的区域,就用理发剪剃去毛发,确保留下一些发茬。然后将活体组织检查区域彻底地消毒并进行麻醉。一旦麻醉起作用,就将1-10mm深的穿孔或切除的活体组织从活体组织检查位置轻轻地移出,并且用手术缝合线缝合切口,所述缝合线可在8-16天后去除。然后在无菌条件下将皮肤活体组织放入预先标记的含有运输培养基的活体组织管。

[0068] 实施例2

[0069] NBDS细胞的分离和培养

[0070] 在转移有活体组织的培养基上进行无菌试验,以确保样品不被污染,或可选地,如果样品被污染,确保随后使用含有抗生素的培养基。然后将活体组织洗涤数次,以去除活体组织运送培养基和任何碎片,以制备用于后续处理的组织。通过以下步骤在Hams F10中处理毛囊:用无菌手术刀切除皮肤上皮以及使用无菌镊子从周围真皮组织“拔出”或解剖全部毛囊单元。用镊子离皮肤表面尽可能近地夹住毛囊,并且通过拉拽位于毛囊单元中的毛发将毛囊暴露。选择处于毛发生长期(毛发周期的生长阶段,以可见的外根鞘和毛球的DSC为指示)的毛囊进行进一步的处理。

[0071] 在Hams F10中,通过以下步骤进行NBDS分离:首先使用充分无菌的小型手术刀或针将毛囊的真皮鞘杯细胞和乳头与毛囊的其余部分分开,并且将其丢弃。移出含有NBDS细胞的真皮鞘,并且准备所述组织用于培养。

[0072] 将6-10个真皮鞘组织轻轻地放入3%透明质酸凝胶中,并且用促进细胞增殖的培养基(例如,补充有FGF、10% FCS和抗生素的DMEM/Hams F12)将其覆盖。3至5天后,将向培养物加入新鲜的增殖培养基。随后,每2至4天更换一次培养基。当培养物达到大约80%至90%的汇合度时,经胰蛋白酶消化将细胞从培养瓶分离,并且将其接种在更大的组织培养瓶中。重复该步骤四代至获得大约100百万个细胞。

[0073] 一旦获得大约100百万个细胞,将细胞用PBS洗涤、胰蛋白酶消化并且将其在细胞运送培养基(CTM:含有10%人血清白蛋白和5%二甲亚砜的林格氏乳酸盐)中重悬。通过离心使细胞沉积,并且将细胞合并在一起。吸走上清,并将细胞小球重悬在CTM中。从细胞-CTM混合物取两份细胞样品/等份用于质量控制和细胞计数。在对细胞计数之后,通过离心使其再次沉积,并且将得到的小球重悬在CTM中,得到最终浓度为20百万个细胞/ml。将最终的细胞样品在液氮中以低于-130℃储存直到装运。

[0074] 实施例3

[0075] 将NBDS细胞引入皮肤的准备和施用

[0076] 首先通过施用局部止痛剂(例如,EMLA霜)约1小时,准备脸上的皮肤用于注射。此后,将皮肤洗干净并消毒。然后以重复的方式将如上所述制备的NBDS细胞注射入皮肤,以覆盖预期治疗区域的整个表面。必要时,可以用冰冷却皮肤。

[0077] 实施例4

[0078] 细胞培养上清液在美容制剂中的用途

[0079] 作为附属的后续治疗或作为独立的治疗,可使用细胞培养上清液来对皮肤结构、纹理、外观、水分、厚度和坚度产生有益的效果。

[0080] 简言之,可单独地使用从实施例2所述的增殖NBDS细胞得到的细胞培养上清液,将其浓缩或溶解在通常的美容赋形剂中,并应用于老化或受损的皮肤。

[0081] 本公开提供以下具体的实施方案,其不限制本发明,但示例本文所公开的实施方案。

[0082] 1) 分离非球形真皮鞘(NBDS)细胞的方法,其包括:

[0083] (a) 准备有活力的毛发;

[0084] (b) 切割步骤(a)中准备的毛发以移出毛囊球部;

[0085] (c) 分离非球形真皮鞘组织;以及

[0086] (d) 培养所分离的非球形真皮鞘组织以产生NBDS细胞。

[0087] 2) 如实施方案1所述的方法,其中通过活体组织检查从对象头皮上的毛发获得所述有活力的毛发。

[0088] 3) 如实施方案1或2中任一项所述的方法,其中所分离的NBDS细胞可自体或同种异体使用。

[0089] 4) 如实施方案1至3中任一项所述的方法,其中利用显微操纵器和手术刀,或剪刀切割所述毛发。

[0090] 5) 如实施方案1至4中任一项所述的方法,其还包括对所述分离的非球形真皮鞘组织进行酶促消化的步骤。

[0091] 6) 如实施方案5所述的方法,其中用胶原酶、透明质酸酶、脱氧核糖核酸酶、弹性蛋白酶、木瓜蛋白酶、XIV型蛋白酶、胰蛋白酶和分散酶进行所述酶促消化。

[0092] 7) 如实施方案1至6中任一项所述的方法,其中所述NBDS细胞被多次传代。

[0093] 8) 包含根据实施方案1至7中任一项所述方法制备的分离的非球形真皮鞘细胞的组合物。

[0094] 9) 包含分离的非球形真皮鞘细胞的组合物。

[0095] 10) 如实施方案8或9所述的组合物,其还包含血清血浆或富含血小板的血浆(PRP)。

[0096] 11) 如实施方案8至10中任一项所述的组合物,其还包含纤维蛋白和/或透明质酸。

[0097] 12) 如实施方案8至11中任一项所述的组合物,其还包含胞外基质组分、细胞因子、趋化因子和治疗剂。

[0098] 13) 如实施方案12所述的组合物,其中所述胞外基质组分选自:葡糖氨基葡聚糖(GAGs)、硫酸肝素、硫酸软骨素、硫酸角质素、透明质酸、弹性蛋白、胶原、纤连蛋白和层粘连

蛋白。

[0099] 14) 如实施方案8至13中任一项所述的组合物,其还包含支架。

[0100] 15) 如实施方案14所述的组合物,其中所述支架为生物可降解支架。

[0101] 16) 如实施方案12所述的组合物,其中所述细胞因子选自:转化生长因子 β (TGF- β) 及其同工型、胰岛素样生长因子 (IGF) 及其同工型、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、甲状旁腺激素相关蛋白、肝细胞生长因子/分散因子 (HGF/SF)、巨噬细胞刺激蛋白 (MSP)、表皮生长因子 (EGF)、白细胞介素6 (IL-6)、基质细胞源性因子1 (SDF-1)、血小板源性生长因子 (PDGF) 和纤维母细胞生长因子 (FGF)。

[0102] 17) 如实施方案12所述的组合物,其中所述治疗剂选自:止痛剂、抗炎剂、抗生素、抗病毒剂、抗真菌剂和免疫调节剂。

[0103] 18) 治疗皮肤的方法,其包括向对象的皮肤施用实施方案8至17中任一项所述的组合物的步骤。

[0104] 19) 如实施方案18所述的方法,其中所述对象为选自人、马、狗和猫的哺乳动物。

[0105] 20) 如实施方案18或19所述的方法,其中所述治疗是由于皮肤损伤。

[0106] 21) 如实施方案20所述的方法,其中所述皮肤损伤是急性或慢性的伤口或伤痕。

[0107] 22) 如实施方案18所述的方法,其中所述皮肤损伤为由手术、烧伤、辐射或事故引起的外伤性伤口。

[0108] 23) 如实施方案18所述的方法,其中所述皮肤损伤为四肢上的自发或诱发挫伤的倾向。

[0109] 24) 如实施方案18所述的方法,其中所述皮肤为老化的皮肤。

[0110] 25) 如实施方案24所述的方法,其中所述老化的皮肤经受选自以下的状况:细小的或粗糙的皱纹、减少的皮肤厚度、减少的弹性和坚固性。

[0111] 26) 如实施方案18所述的方法,其中所述皮肤为人对象的皮肤的子部分,其选自:脸、颈和手。

[0112] 27) 包含NBDS细胞上清液的组合物。

[0113] 28) 包含从根据实施方案1至7中任一项所述方法培养的NBDS细胞制备的NBDS细胞上清液的组合物。

[0114] 29) 如实施方案27或28所述的组合物,其中将所述组合物稀释或浓缩。

[0115] 30) 如实施方案27至29中任一项所述的组合物,其还包含赋形剂。

[0116] 31) 如实施方案30所述的组合物,其中所述赋形剂为聚合物。

[0117] 32) 如实施方案30所述的组合物,所述组合物被加工为乳膏、乳霜或凝胶。

[0118] 33) 如实施方案27至32中任一项所述的组合物在治疗皮肤中的用途。

[0119] 34) 治疗皮肤的方法,其包括向对象的皮肤施用实施方案27至32中任一项所述的组合物。

[0120] 可将上文描述的各种实施方案组合,以提供进一步的实施方案。将本说明书涉及的和/或在申请数据表中列出的全部美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物通过引用的方式整体并入本文。如果需要应用不同专利、申请和出版物中的理念以提供进一步的实施方案,可将所述实施方案的方面进行修改。

[0121] 根据以上详细描述,可对所述实施方案作出这些或其它修改。通常,在所附权利要

求中,使用的术语不应被理解为将权利要求限于本说明书和权利要求中公开的具体实施方案,而应被理解为包括所有可能的实施方案以及所享有的权利要求等效物的全部范围。因此,所述权利要求并不局限于本公开的内容。

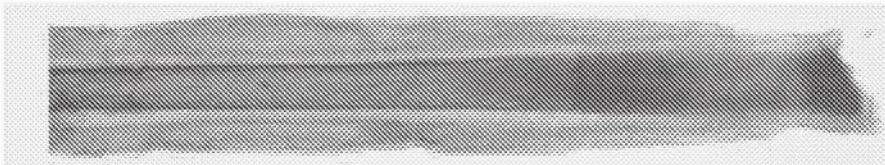


图 1C

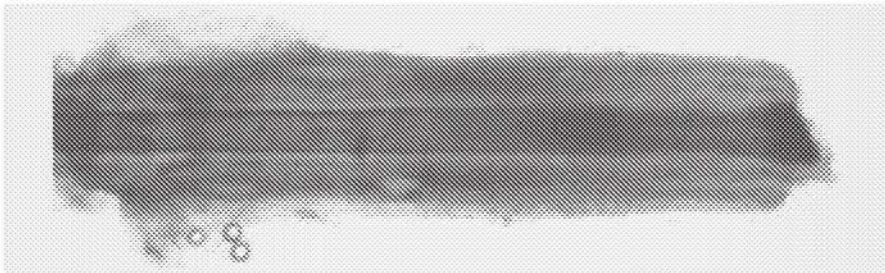
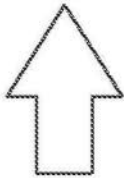


图 1B

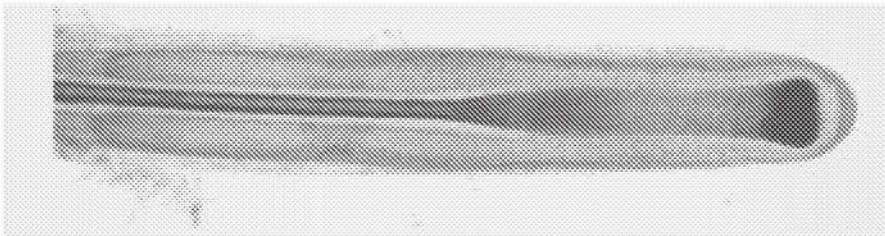


图 1A

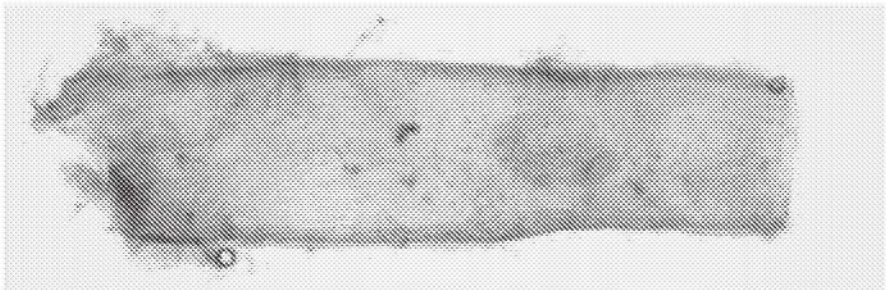


图1D

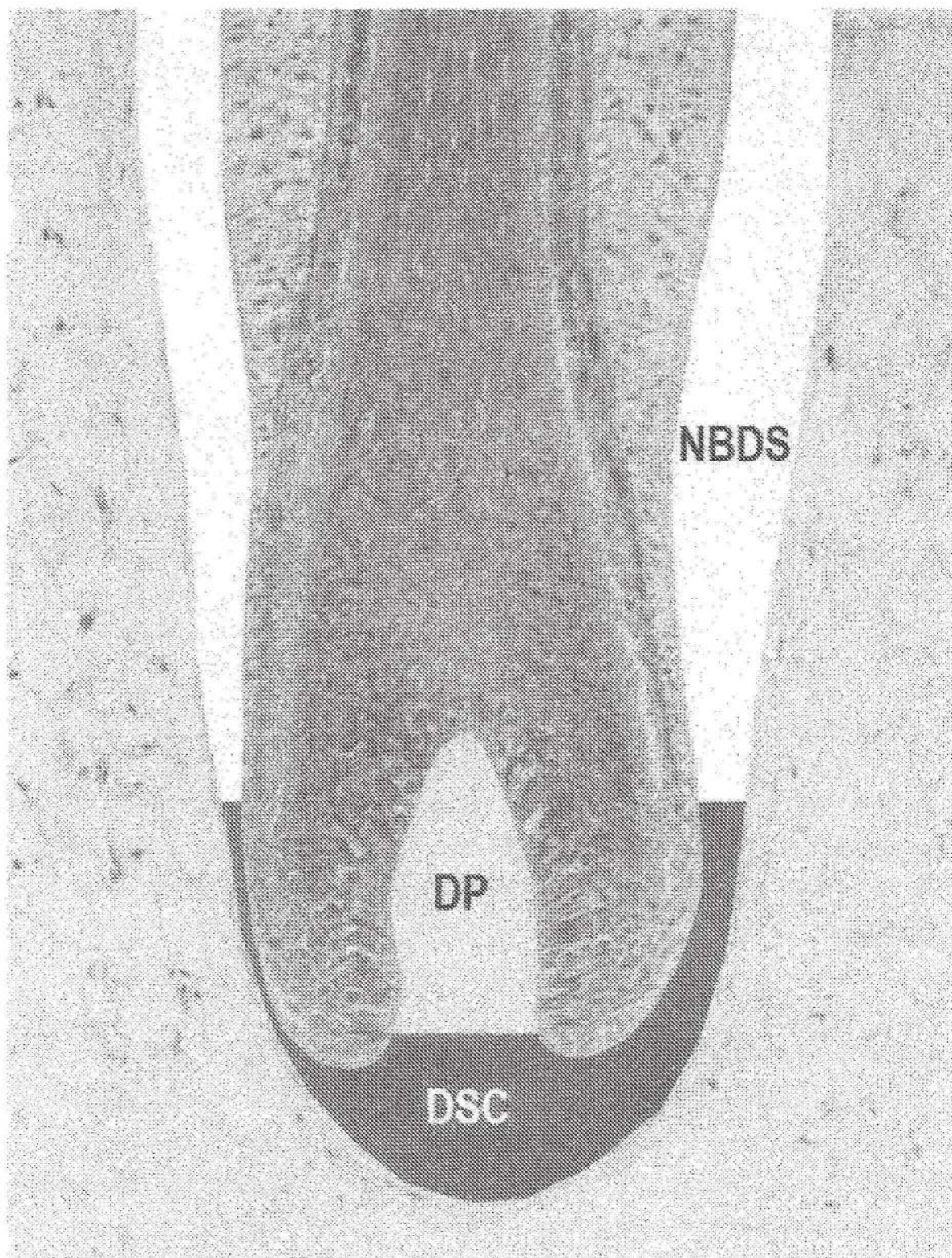


图2

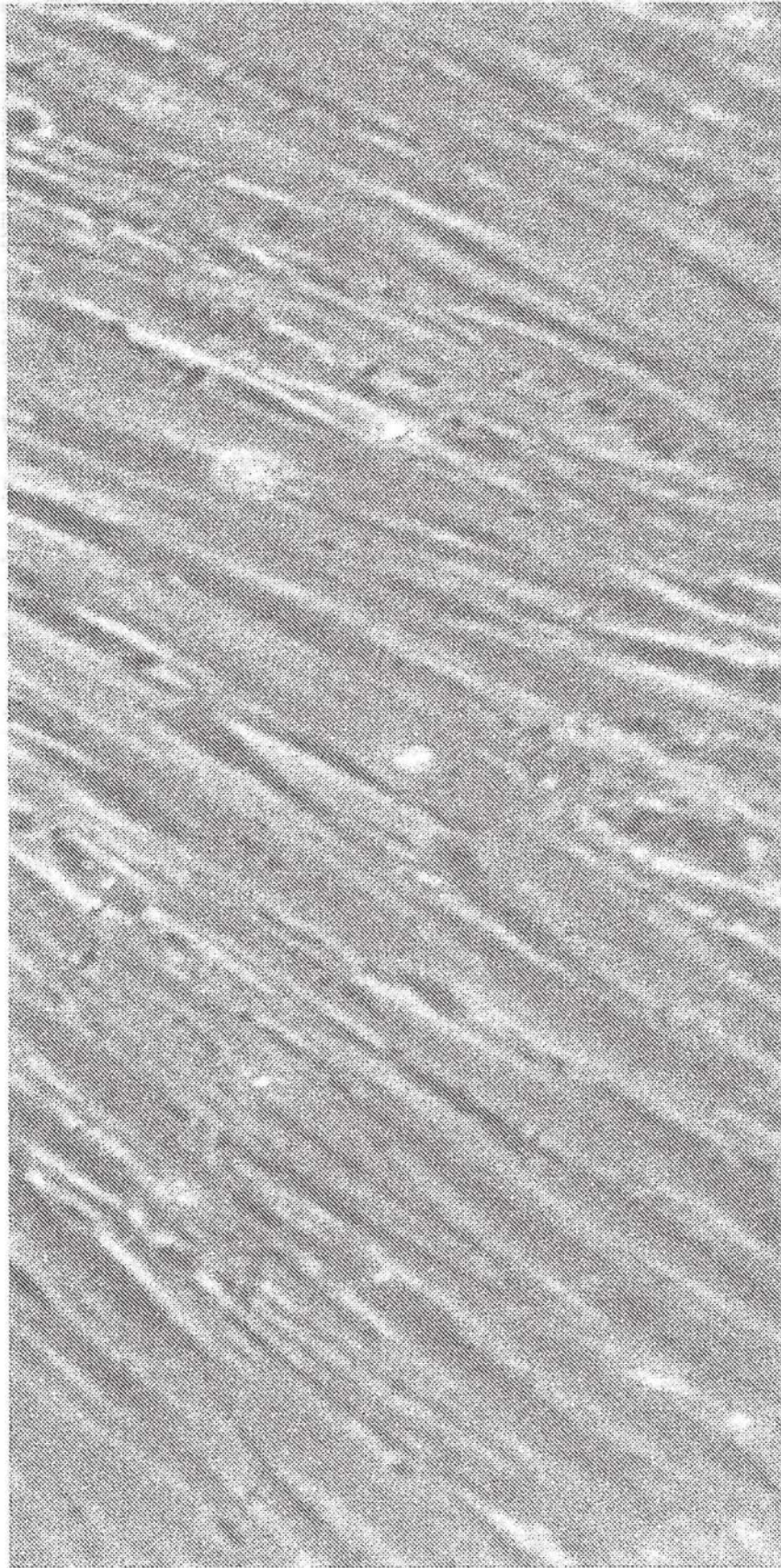


图3