



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111918662 B

(45) 授权公告日 2024. 03. 15

(21) 申请号 201980007312.6
(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 111918662 A
(43) 申请公布日 2020.11.10
(30) 优先权数据
10-2018-0001978 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/KR2019/000180 2019.01.07
(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/135644 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 吴然睦
(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 35/545 (2015.01)
A61K 9/127 (2006.01)

A61K 8/98 (2006.01)
A61K 8/14 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(56) 对比文件
W0 2012053976 A1,2012.04.26
W0 2011010966 A1,2011.01.27
W0 2017171491 A1,2017.10.05
Zhang J等.Exosomes released from
human induced pluripotent stem cells-
derived MSCs facilitate cutaneous wound
healing by promoting collagen synthesis
and angiogenesis.《J Transl Med》.2015,(第
undefined期),49.
Lee YS等.Human umbilical cord blood-
derived mesenchymal stem cells ameliorate
psoriasis-like skin inflammation in mice.
《Biochem Biophys Rep》.2016,(第undefined
期),281-288. (续)

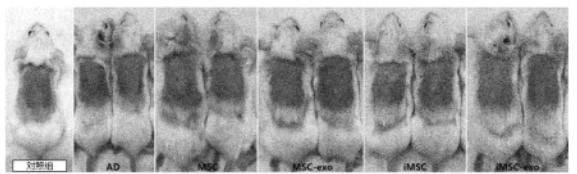
审查员 杜凌燕

权利要求书1页 说明书12页
序列表1页 附图8页

(54) 发明名称
包含来源于诱导性多能干细胞的间充质肝
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
本发明涉及包含来源于诱导性多能干细胞的
间充质细胞(iMSC)、其培养物或者从iMSC或
iMSC的培养物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或者用于
预防或改善皮肤疾病的化妆品组合物以及干
细胞治疗剂。在使用本发明的组合物的情况下,

可以提供具有比现有间充质干细胞更为改善的
免疫调节功效的用于改善、预防或治疗皮肤疾病
的组合物及干细胞治疗剂。



CN 111918662 B

[接上页]

(56) 对比文件

Zhang J等.Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-

derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis.《J Transl Med》.2015,(第 undefined期),49.

1. 从来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞或来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞的培养物分离的外泌体在制造用于预防或治疗过敏性皮炎或接触性皮炎的组合物中的用途。

包含来源于诱导性多能干细胞的间充质肝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] 本发明在韩国科学技术信息通信部的支持下完成,课题号为 NRF-2015K1A4A3046807,上述课题的研究管理机关为韩国研究财团,研究事业的名称为“海外优秀研究机关申办事”,研究课题名为“牙山-明尼苏达移植创新中心”,主管机关为“首尔牙山医院”,研究期间为2015年09月01日至2021年08月31日。

[0002] 本申请要求在2018年1月5日向韩国专利局提出的韩国专利申请第10-2018-0001978号的优先权,上述专利申请的公开内容在此引入本说明书中作为参考。

[0003] 本发明涉及一种包含来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞(iMSC)、其培养物、或者从iMSC或iMSC的培养物分离的外泌体(iMSC-exo)作为有效成分的用于改善、预防或治疗皮肤疾病的组合物。

背景技术

[0004] 过敏性皮炎(Atopic dermatitis,AD)也称作过敏性湿疹,为非常常见的炎症性皮肤病,已知在全世界的儿童中发病率为5~20%。据报告,急性过敏性皮炎的发病机制与以CD4⁺T细胞以及嗜酸性粒细胞的皮肤渗透、免疫球蛋白E(IgE)以及辅助性T细胞2(th2)细胞因子的分泌增加为媒介的辅助性T细胞2的炎症反应有关。然而,现在还没有已知的对于过敏性皮炎的直接具体治疗方法,因此急需开发新的用于治疗过敏性皮炎的治疗方法。

[0005] 间充质肝细胞(mesenchymal stem cells)为可分化为骨、软骨还有脂肪的具有多分化功能的高增生性粘附性细胞,已知具有抗炎性及免疫调节能力。间充质干细胞表现出抑制T细胞和B细胞的增生及分化,抑制树突细胞(dendritic cell)、自然杀伤(natural killer,NK)细胞以及巨噬细胞(macrophage)之类免疫细胞的功能等的免疫抑制效果。最近报告了将间充质干细胞与造血干细胞共同移植来增加造血干细胞的移植存活率的研究,据报告,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)、实验性自身免疫性脑脊髓炎(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)、结肠炎、多发性硬化(multiple sclerosis,MS)以及类风湿性关节炎等疾病中,间充质干细胞减少炎症且抑制自体免疫的过度反应。

[0006] 外泌体(Exosome)为脂质双分子层构成的囊泡(vesicle),为细胞向细胞外分泌的物质的构成体。已知为了实现细胞间的通讯以及调节细胞性免疫的功能性作用,外泌体扮演传递(运输)作为细胞内的生物分子的蛋白质、生物活性脂质以及RNA(miRNA)的角色。这样的外泌体还作为阿尔茨海默病等神经疾病的生物标志物来研究,其选择性透过性高以至于能够通过用来分离血液和脑脊液的血脑屏障(blood-brain barrier,BBB),因此也灵活运用在药物的纳米载体(nanocarrier)之类的药物传递系统的开发中。

[0007] 另外,已知分离自间充质干细胞的外泌体参与细胞间的通讯(cell-to-cell

communication),表现出干细胞具有的再生医学性治疗功效,因此,最近不直接使用间充质干细胞自身,而是使用间充质干细胞分泌的外泌体的对多种疾病的治疗效果的研究正如火如荼的进行着。

[0008] 本发明人致力于开发利用间充质干细胞及从其分离的外泌体的过敏性皮炎治疗剂。其结果,查明从诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cell,iPSC)分离的间充质干细胞(mesenchymal stem cell,MSC)[iMSC]具有比现有间充质干细胞更为改善的抗炎活性以及改善皮肤疾病的效果,来源于其的外泌体(iMSC-Exo)表现出改善过敏性皮炎之类的皮肤疾病的效果,从而完成本发明。

发明内容

[0009] 技术问题

[0010] 本发明的目的在于,提供一种包含从诱导性多能干细胞分化的间充质干细胞[iPSC-MSC,iMSC]、其培养物和/或来源于其的外泌体(iPSC-derived mesenchymal stem cell-derived exosome,iMSC-Exo)的用于预防或治疗皮肤疾病的药剂学组合物。

[0011] 本发明的再一目的在于,提供一种包含iMSC和/或iMSC-Exo的用于预防或改善皮肤疾病的化妆品组合物。

[0012] 本发明的另一目的在于,提供一种从来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞(iMSC)或其培养物分离的外泌体(iMSC-Exo)。

[0013] 本发明的又一目的在于,提供一种从来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞分离的外泌体的制备方法。

[0014] 本发明的还有一目的在于,提供一种包含iMSC和/或iMSC-Exo的干细胞治疗剂。

[0015] 技术方案

[0016] 根据本发明的一实施方式,本发明提供一种包含来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞、其培养物、或者从来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞或来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞的培养物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组合物。

[0017] 本发明人致力于开发强化抗炎活性的间充质干细胞的研究。其结果,确认从诱导性多能干细胞分化的间充质干细胞具有比现有间充质干细胞更为改善的抗炎活性以及改善皮肤疾病的效果,来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞及来源于其的外泌体(iMSC-Exo)表现出改善过敏性皮炎之类的皮肤疾病的效果。

[0018] 在本说明书中,术语“诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cell,iPSC)”是指诱导与体细胞一样已经分化的细胞的脱分化(dedifferentiation)使其回到未分化的初期状态而具有多能性(pluripotency)的细胞。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,或者注入在导入上述基因的细胞中产生的脱分化诱导蛋白质来诱导。上述多能性是指可以分化为起源于构成活体的三种胚层(germ layer),即内胚层(endoderm)、中胚层(mesoderm)以及外胚层(ectoderm)的组织或器官的能力。

[0019] 本发明的诱导性多能干细胞包括来源于人、猴、猪、马、牛、羊、狗、猫、老鼠、兔等哺乳动物的诱导性多能干细胞,优选地,为来源于人的诱导性多能干细胞。

[0020] 在本说明书中,术语“间充质干细胞”是指可以具有分化为脂肪、软骨、骨、肌肉、皮肤、神经等细胞的多能性(multipotent)的干细胞。上述间充质干细胞可以分化自诱导性多能干细胞,或者分离自骨髓、脂肪组织、脐带组织、脐带血、骨骼肌、外周血、滑膜、羊水等。

[0021] 在本说明书中,术语“来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞”是指从诱导性多能干细胞分化的间充质干细胞(iMSC)。

[0022] 在本发明的一实例中,上述来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞与从体内(例如,骨髓、脂肪组织、脐带组织、脐带血、骨骼肌、外周血、滑膜或羊水)分离的间充质干细胞相比,其特征在于,(i) 吲哚胺2,3-二氧化酶(indoleamine2,3-dioxygenase)的表达增加;(ii) 炎症性细胞因子的分泌减少。

[0023] 上述炎症性细胞因子为选自 γ 干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素1 β (IL-1 β)、白介素6(IL-6)以及白介素6R α (IL-6R α)组成的组中的至少一种炎症性细胞因子。

[0024] 在本说明书中,术语“培养物”是指在培养基中培养来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞而获得的培养液,或者上述培养液的干燥、过滤和/或浓缩物。上述培养物可以包含或不包含来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞。

[0025] 在本说明书中,术语“外泌体”是指细胞向细胞外分泌的或存在于细胞内的具有由脂质双分子层构成的膜结构的囊泡(membrane vesicle),存在于几乎所有真核生物的体液中。外泌体的直径为30~1000nm,可在多泡体(multivesicular bodies)与细胞膜融合时释放,或者直接从细胞膜释放。众所周知的,为了起到调节凝集、细胞间通讯以及细胞性免疫的功能性作用,外泌体扮演运输作为细胞内的生物分子的蛋白质、生物活性脂质以及RNA(miRNA)的角色。在本发明中,上述外泌体为包括微囊泡(microvesicle)的概念。外泌体的标记蛋白已知有CD63、CD81等,此外还有表皮生长因子(EGFR)之类的细胞表面受体、与信号传达相关的分子、与细胞粘附相关的蛋白质、间充质干细胞相关抗原、热激蛋白(heat shock protein)、与囊泡形状相关的Alix等的蛋白质。

[0026] 在本发明中,从上述来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞(iMSC)或其培养物分离的外泌体是指存在于上述来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞(iMSC)内的外泌体,或者从iMSC分泌到iMSC的培养物(或培养液)的外泌体。

[0027] 在本说明书中,术语“包含……作为有效成分”是指包含充分量的来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞、其培养物或从其分离的外泌体来达成改善、预防或治疗皮肤疾病的活性。

[0028] 在本说明书中,术语“皮肤疾病”是指发生于皮肤的非正常状态或症状。

[0029] 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是指为由以免疫细胞介导的炎症反应引起的,表现为瘙痒、红斑之类症状的皮肤疾病。

[0030] 在本发明的另一实例中,上述炎症性皮肤疾病为选自过敏性皮炎、接触性皮炎及寻常型银屑病组成的组中的皮肤疾病。

[0031] 在本说明书中,术语“过敏性皮炎”为由慢性再发的同时伴有严重瘙痒症的皮肤湿疹疾病,为皮肤炎症的一种。

[0032] 在本发明中所使用的术语“预防”是指通过给药本发明的组合物来抑制皮肤疾患或疾病,或者延迟病程的所有行为。

[0033] 在本说明书中所使用的术语“治疗”具有如下含义,即,(a) 皮肤疾患或疾病发展的抑制;(b) 皮肤疾患或疾病的减轻;(c) 皮肤疾病或疾病的消除。

[0034] 本发明的组合物可制备为药剂学组合物。

[0035] 根据本发明的优选实例,本发明的组合物为(a) 上述本发明的来源于诱导性多能干细胞的间充质细胞、其培养物或从其分离的外泌体的药剂学有效量;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”是指用来达成上述来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞(iMSC)、其培养物、或从iMSC或iMSC的培养物分离的外泌体的功效或活性的充分的量。

[0036] 在将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包含的药剂学上可接受的载体包括制剂时常用的乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、海藻酸、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、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石粉、硬脂酸镁以及矿物油等,但不限于此。本发明的药剂学组合物除上述成分外还可包含润滑剂、湿润剂、甜味剂、芳香剂、乳化剂、悬浮剂、保存剂等。适当的药剂学上可接受的载体及制剂详细记载于Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)。

[0037] 本发明的药剂学组合物可口服或非口服给药,可通过例如静脉内给药、皮下给药、肌肉内给药、腹腔内给药、局部给药、鼻腔内给药、肺内给药、直肠内给药、硬膜内给药、眼球给药、皮肤给药以及经皮给药等方法给药。

[0038] 本发明的药剂学组合物的适当给药量可根据制剂化方法、给药方式、患者的年龄、体重、性别、病症状态、饮食、给药时间、给药途径、排泄速度以及反应敏感性之类的因素来给出多种处方。以成人基准,本发明的药剂学组合物的一般给药量在0.0001~1000mg/kg的范围内,但不限于此。

[0039] 在本发明的一实例中,本发明的药剂学组合物的给药量可为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。

[0040] 本发明的药剂学组合物可以根据本发明所属领域的普通技术人员便于实施的方法,使用药剂学上可接受的载体和/或赋形剂来制剂化,可制备为单位容量的形态或装入大容量的容器内来制备。其中,剂型可包括油或水性介质中的溶液、悬浮液、糖浆剂或乳化液形态,或者提取剂、散剂、粉剂、颗粒剂、片剂或胶囊剂形态,还可以包括分散剂或稳定剂。

[0041] 根据本发明的其他实施方式,本发明提供一种包含来源于诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cell,iPSC)的间充质干细胞(mesenchymal stem cell,MSC)[iMSC]、其培养物、或者从iMSC或iMSC的培养物分离的外泌体(iMSC-derived exosome,

iMSC-Exo) 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。

[0042] 本发明的用于预防或改善皮肤疾病的化妆品组合物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对象疾病相同, 为避免本说明书的过度复杂, 将省略对两者间共同内容的记载。

[0043] 本说明书所使用的术语“改善”是指通过给药本发明的组合物来使皮肤疾患或疾病好转或痊愈的所有行为。

[0044] 本发明的组合物可制备为化妆品组合物。在将包含来源于诱导性多能干细胞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, 除作为有效成分的来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞或其培养物之外, 还包含通常用于化妆品组合物的成分, 例如, 稳定剂、溶解剂、维生素、颜料以及香料之类的普通辅助剂, 还包含载体。

[0045] 本发明的化妆品组合物可制备为相关领域通常制备的任意剂型, 可剂型化为例如溶液、悬浮液、乳浊液、糊剂、凝胶、霜剂、乳液、粉、皂、含表面活性剂的洁剂、油剂、粉状粉底霜、乳浊液粉底霜、蜡粉底霜及啫喱水等, 但不限于此。更详细地, 可制备为柔软化妆水、营养化妆水、营养霜、按摩霜、精油、眼霜、清洁霜、洗面奶、卸妆水、面膜、啫喱水或粉的剂型。

[0046] 本发明的剂型为糊剂、霜剂或凝胶时, 可使用动物油、植物油、蜡、石蜡、淀粉、西黄蓍胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅、膨润土、二氧化硅、滑石粉或氧化锌等作为载体成分。

[0047] 本发明的剂型为粉或啫喱水时, 可使用乳糖、滑石粉、二氧化硅、氢氧化铝、硅酸钙或聚酰胺粉作为载体成分, 尤其在啫喱水的情况下, 还可包含氯氟烃、丙烷/丁烷或二甲醚之类的推进剂。

[0048] 本发明的剂型为溶液或乳浊液时, 可使用溶剂、增溶剂或乳化剂作为载体成分, 有例如水、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-丁二醇油、脂肪族甘油酯、聚乙二醇或山梨聚糖的脂肪酸酯。

[0049] 本发明的剂型为悬浊液时, 可使用水、乙醇或丙二醇之类的液体稀释剂, 乙氧基异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇酯以及聚氧乙烯山梨糖醇酐酯之类的悬浊剂, 微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂或者lakanto等作为载体成分。

[0050] 本发明的剂型为含表面活性剂的洁剂时, 可使用脂肪醇硫酸盐、脂肪醇醚硫酸盐、磺基琥珀酸单酯、乙硫磷、咪唑啉鎓衍生物、牛磺酸甲酯、肌氨酸盐、脂肪酸酰胺醚硫酸盐、烷基甜菜碱、脂肪醇、脂肪酸甘油酯、脂肪酸二乙醇酰胺、植物油、羊毛脂衍生物或乙氧基化甘油脂肪酸酯等作为载体成分。

[0051] 根据本发明的一实施方式, 提供一种包括如下步骤的治疗皮肤疾病的方法, 即, 向需要治疗的对象给药包含来源于诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)的间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC) [iMSC]、其培养物或从iMSC或iMSC的培养物分离的外泌体(iMSC-derived exosome, iMSC-Exo)作为有效成分的组合物步骤。

[0052] 根据本发明的另一实施方式, 提供一种包括如下步骤的改善皮肤疾病的方法, 即, 向需要治疗的对象给药包含来源于诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)的间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC) [iMSC]、其培养物或从iMSC或iMSC的培养物分离的外泌体(iMSC-derived exosome, iMSC-Exo)作为有效成分的组合物步骤。

[0053] 作为本发明的治疗方法或改善方法的对象疾病的皮肤疾病与上述药剂学组合物

治疗对象疾病中的相关定义相同。

[0054] 在本发明的一实例中,上述对象为哺乳动物或人类。

[0055] 本发明的皮肤疾病治疗方法或改善方法为使用与上述的包含来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞(iMSC)、其培养物或从iMSC或iMSC的培养物分离的外泌体(iMSC-Exo)作为有效成分的组合物相同的有效成分,因此,为避免本说明书的过度复杂,将省略对其记载。

[0056] 根据本发明的又一实施方式,本发明提供一种从来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞或其培养物分离的外泌体。

[0057] 本发明的上述来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞为有别于现有的间充质干细胞的具有细胞学(免疫学)特征的间充质干细胞。正如在本发明的实施例中证明的,比较普通间充质干细胞和本发明的来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞(iMSC)的吲哚胺2,3-二加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase,IDO)的表达量的结果,确认iMSC的吲哚胺2,3-二加氧酶的表达量比MSC的高(图3)。并且,分别采集MSC和iMSC的培养液后比较炎症相关细胞因子蛋白质分泌量的结果,确认本发明的iMSC相比于MSC,表现出显著减少的IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6以及IL-6R α 的分泌(图4)。

[0058] 根据本发明的其他实施方式,本发明提供一种从来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞(iMSC)分离的外泌体(iMSC-Exo)的制备方法,包括如下步骤:

[0059] 步骤(a),从诱导性多能干细胞分化间充质干细胞;

[0060] 步骤(b),在细胞培养基中培养上述间充质干细胞;以及

[0061] 步骤(c),从上述间充质干细胞的培养液分离外泌体。

[0062] 分步骤说明上述从来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞分离的外泌体的制备方法。

[0063] 步骤(a):诱导分化为间充质干细胞

[0064] 首先,将诱导性多能干细胞分化为间充质干细胞。

[0065] 在本发明的一实例中,上述分化在涂有细胞外基质涂层的培养容器中培养诱导性多能干细胞来进行。

[0066] 在本说明书中,术语“细胞外基质(extracellular matrix)”是指存储有细胞生长分化所需的生化因子(biochemical factors),提供适当的供给且细胞能够识别的物理环境。

[0067] 在本发明的一实例中,上述细胞外基质为细胞外基质蛋白质。

[0068] 在本发明另一实例中,上述细胞外基质蛋白质包括玻连蛋白(vitronectin)、纤连蛋白(fibronectin)、层粘连蛋白(laminin)、弹性蛋白(elastin)、胶原蛋白(collagen)等,但不限于此。

[0069] 在本发明的特定实例中,上述细胞外基质蛋白质为玻连蛋白。

[0070] 上述分化的诱导通过对诱导性多能干细胞使用包含分化诱导因子(例如牛胎血清、碱性成纤维生长因子(bFGF)、 β -巯基乙醇)的细胞培养基来诱导分化为间充质干细胞。

[0071] 上述细胞培养基可以为通常用于培养动物细胞的任意培养基,例如,可以使用DMEM(Dulbecco's modification of Eagle's medium)、DMEM和F12的混合物、Eagles's MEM(Eagle's minimum essential medium)、 α -MEM、Iscove's MEM、199培养基、CMRL1066、

RPMI 1640、F12、F10、Way-mouth's MB752/1、McCoy's 5A以及MCDB系列等。

[0072] 步骤(b):间充质干细胞的培养

[0073] 接下来,在细胞培养基中培养上述间充质干细胞。

[0074] 用于上述细胞培养的培养基可以为通常用于培养动物细胞的任意培养基。

[0075] 在本发明的一实例中,上述细胞培养基为包含去除外泌体的牛胎血清的细胞培养基。上述细胞培养基之所以含有去除外泌体的牛胎血清,是因为通常用于细胞培养的牛胎血清中含有大量来源于牛胎血清的外泌体,是为了防止除本发明的间充质干细胞分泌的外泌体外混入来源于牛血清蛋白的外泌体。

[0076] 在本发明的一实例中,上述培养可进行12小时至120小时、24小时至96小时、48小时至96小时或者60小时至84小时,具体地可进行72小时的培养,但不限于此。

[0077] 步骤(c):外泌体的分离

[0078] 最后,从上述间充质干细胞的培养液分离外泌体。

[0079] 在本发明的一实例中,上述分离可以通过离心分离来从间充质干细胞的培养液分离外泌体。

[0080] 更具体地,将上述间充质干细胞的培养基在 $200 \sim 400 \times g$ 的条件下离心分离5分钟至20分钟,去除剩下的细胞和细胞残余物后,取上层液在 $9000 \sim 12000 \times g$ 的条件下高速离心分离60~80分钟后,再取上层液在 $90000 \sim 120000 \times g$ 的条件下离心分离80~100分钟,之后可以通过去除上层液得到留在下层的外泌体。根据本发明的特定实例,回收间充质干细胞培养基后,在 $300 \times g$ 的条件下离心分离10分钟,去除剩下的细胞和细胞残余物后,取上层液使用 $0.22\mu m$ 的过滤器进行过滤,之后使用高速离心机(high speed centrifuge)在 $10000 \times g$ 、 $4^\circ C$ 的条件下离心分离70分钟。再次取离心分离的上层液,使用超速离心机(ultracentrifuge)在 $100000 \times g$ 、 $4^\circ C$ 的条件下离心分离90分钟,之后通过去除上层液分离出留在下层的外泌体。

[0081] 根据本发明的再一实施方式,本发明提供一种包含来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞(iMSC)或从其分离的外泌体(iMSC-exo)作为有效成分的干细胞治疗剂。

[0082] 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,干细胞治疗剂以组织再生、脏器功能恢复或免疫细胞的功能调节为目的来使用。

[0083] 在本发明的一实例中,上述干细胞治疗剂为用于预防或治疗可通过干细胞的多能性得到恢复的疾病(例如心脏、肝、关节、神经系统或免疫相关疾病)的药剂学组合物。

[0084] 由于上述干细胞治疗剂与包含上述本发明的来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞、其培养物或从其分离的外泌体的药剂学组合物、化妆品组合物的结构成分相同,因此,为避免本说明书的过度复杂,将省略它们之间相同内容的记载。

[0085] 发明的效果

[0086] 本发明的特征及优点概括来说有如下几点:

[0087] (a) 本发明提供包含来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞、其培养物或从其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以及用于预防或改善皮肤疾病的化妆品组合物。

[0088] (b) 本发明提供包含来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞、其培养物或从其分离的外泌体作为有效成分的干细胞治疗剂。

[0089] (c) 在使用本发明的组合物的情况下,可以提供比现有间充质干细胞更为改善的具有免疫调节功效的用于皮肤疾病的组合物以及干细胞治疗剂。

附图说明

[0090] 图1为图形化示出的来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞(iMSC)以及来源于上述间充质干细胞的外泌体(iMSC-Exo)的制备。

[0091] 图2示出MSC、iPSC以及iMSC的表面抗原分析结果。

[0092] 图3示出对MSC以及iMSC的IDO表达程度进行确认的结果。

[0093] 图4示出对MSC以及iMSC的细胞因子分泌量进行确认的结果。

[0094] 图5示出对从间充质干细胞分离的外泌体(MSC-Exo)以及从来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞分离的外泌体(iMSC-Exo)的大小进行确认的结果。

[0095] 图6示出对MSC-Exo以及iMSC-Exo的CD63及CD9的表达进行确认的结果。

[0096] 图7示出MSC-Exo以及iMSC-Exo的电子显微镜图像。

[0097] 图8为图形化示出的过敏性皮炎动物模型的制备过程。

[0098] 图9示出对iMSC以及iMSC-Exo对过敏性皮炎动物模型的过敏病变的影响进行确认的结果。

[0099] 图10示出在过敏性皮炎动物模型中根据iMSC以及iMSC-Exo处理的皮肤临床分数的结果。

[0100] 图11示出在过敏性皮炎动物模型中根据iMSC以及iMSC-Exo处理的经皮水分丢失的程度。

[0101] 图12示出在过敏性皮炎动物模型中根据iMSC以及iMSC-Exo处理的皮肤组织的变化。比例尺为200 μ m。

[0102] 图13示出在过敏性皮炎动物模型中根据iMSC以及iMSC-Exo处理的血液免疫球蛋白E的浓度。

[0103] 图14示出在过敏性皮炎动物模型中根据iMSC以及iMSC-Exo处理的淋巴细胞的IL-17的分泌量。

具体实施方式

[0104] 以下,通过实施例详细说明本发明。这些实施例仅为更加具体地说明本发明,对于本发明相关领域的普通技术人员来说,根据本发明要旨的本发明的发明要求保护范围不以这些实施例为限制是显而易见的。

[0105] 在本说明书全文中,为表示特定物质的浓度而使用的“%”,若无其他说明,固体/固体指(重量/重量)%,固体/液体指(重量/体积)%,液体/液体指(体积/体积)%。

[0106] 实施例1:来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞的制备及分析

[0107] 将以不使用支持细胞(培养辅助细胞)的状态在包含knock-out无异源物种成分(Xeno-free)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DMEM/F-12培养基中培养诱导性多能干细胞(来源于首尔牙山医院干细胞中心培养的成纤维细胞(fibroblast)、外周血单核细胞(Peripheral Blood Mononuclear Cell,PBMC)、间充质干细胞的诱导性多能干细胞细

胞株)附着在预先使用玻连蛋白进行涂敷的培养皿(dish)后,使用添加有10%的牛胎血清(v/v)、5ng/ml的碱性成纤维细胞生长因子、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) (1 $\times$)、100unit/ml的青霉素以及100 μ g/ml的链霉素的DMEM培养液,在37 $^{\circ}$ C的温度下诱导分化为间充质干细胞。培养第七天,在使用稳定性胰蛋白酶替代酶(TrypLE express) (1 $\times$)进行处理来解体为单个细胞后,移到细胞培养板再进行7天的培养。每两天更换培养基,观察到分化为具有扁平且长的外形的间充质干细胞(iMSC) (图1)。

[0108] 14天的分化为间充质干细胞(iMSC)的诱导结束后,使用流式细胞分析法(Flow cytometry)分别对作为间充质干细胞的特异性表面抗原标记物的CD34(BD Biosciences, Catalog No.:348053)、SSEA4(BD Biosciences, Catalog No.:560128)的阴性表达和CD73(BD Biosciences, Catalog No.:550257)以及CD105(BD Biosciences, Catalog No.:560839)的阳性表达进行了确认。其结果,确认iMSC在CD34、SSEA4的阴性表达和CD73以及CD105的阳性表达上具有典型的间充质干细胞(MSC)的特征(图2)。作为对照组来使用的MSC为首尔牙山医院干细胞中心从胎儿的脐带组织分离并培养的来源于脐带组织的间充质干细胞。

[0109] 并且,在上述MSC以及iMSC中,利用实时(real-time)逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)来定量吲哚胺2,3-二加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)。其结果,确认相比于MSC, iMSC中吲哚胺2,3-二加氧酶的表达量高(图3)。

[0110] 表1

[0111] 用于检测吲哚胺2,3-二加氧酶的引物序列

[0112]	正向引物(Forward primer)(序列表中的序列1)	5'-GCCCTTCAAGTGTTCACCAA-3'
	反向引物(Rreverse primer)(序列表中的序列2)	5'-GCCTTTCCAGCCAGACAAATAT-3'

[0113] 上述吲哚胺2,3-二加氧酶作为将色氨酸转化为犬尿氨酸(kynurenine)的酶,已知其消耗细胞周边的色氨酸并通过抑制免疫细胞的增生来抑制炎症反应及免疫反应。由此可知,吲哚胺2,3-二加氧酶的表达高的本发明的iMSC的抑制免疫反应的活性高。

[0114] 并且,分别采集上述MSC以及iMSC的培养液来检测炎症相关细胞因子蛋白质的分泌量并进行比较。

[0115] 炎症相关细胞因子的检测根据MagneticLuminex[®] Screening Assay实验方法进行。首先,对MSC以及iMSC的培养液进行涡旋(vortexing)后,进行离心分离后使用稀释液(diluent)将上层液稀释为1/2来准备为各试样。将它们与磁珠偶联抗体混合物(bead-Ab Mixture)一起在常温下反应2小时,反应结束后,使用Luminex仪器(Luminex(路明克斯), 奥斯汀(Austin), 美国德克萨斯州(TX, USA))进行检测。试样内的各被分析物与贴附于特定编号的磁珠(bead)相应抗体各自独立地反应,使用检测抗体和2' (链霉亲和素-PE(streptavidin-PE))夹心式检测(sandwich assay)的结果来检测与各被分析物的量成比例的贴附于相应磁珠表面的藻红蛋白(Phycoerythrin, PE)的荧光量。Luminex仪器只允许磁珠一个个流过,通过检测第几个磁珠并检测该磁珠表面的藻红蛋白的荧光强度来获得各

被分析物的反应结果值 (MFI)。在计算软件“MasterPlex QT 2010 (MiraiBio, 日立 (Hitachi), 美国加利福尼亚州 (CA, USA))”中使用最佳适应 (best fit) 算法通过各标准 (standard) 浓度的反应检测值 (MFI) 求得标准曲线 (standard curve), 以标准曲线为基准通过反映稀释倍数来计算相关试样的结果浓度值。

[0116] 其结果通过比较 iMSC 和 MSC 来表示减少的 IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 以及 IL-6R α 的分泌 (图4)。

[0117] 从上述结果可知, 本发明的来源于诱导性多能干细胞的 iMSC 为具有区别于现有 MSC 的细胞学特征 (免疫学特征) 的新型间充质干细胞。

[0118] 实施例2: 来源于诱导性多能干细胞分化的间充质细胞的外泌体的分离及确认

[0119] 在添加有10%的去除了外泌体的牛胎血清 (Exosome-depleted FBS) 的培养基中追加培养已确认间充质干细胞特性的 iMSC。进行72小时的培养后, 回收 iMSC 的培养基在 $300 \times g$ 的条件下离心分离10分钟, 去除剩下的细胞和细胞残余物。使用 $0.22 \mu m$ 的过滤器过滤上层液, 之后使用高速离心机 (high speed centrifuge) 在 $10000 \times g$ 、 $4^{\circ}C$ 的条件下离心分离70分钟。使用超速离心机 (ultracentrifuge) 在 $100000 \times g$ 、 $4^{\circ}C$ 的条件下对离心分离的上层液实施90分钟的离心分离后去除上层液, 用磷酸缓冲盐溶液 (PBS, phosphate buffered saline) 稀释留在下层的外泌体来使用。

[0120] 通过纳米颗粒跟踪分析仪 (nanoparticle tracking assay) (NanoSight NS300, Malvern公司) 确认分别从 MSC 以及 iMSC 分离的外泌体的数量及大小分布 (图5)。使用免疫印迹法确认作为外泌体特异性表面抗原的 CD9 及 CD63 的表达 (图6), 使用电子显微镜来确认外泌体的形态 (图7)。

[0121] 由此可以确认来源于普通 MSC 和本发明的来源于 iMSC 的各外泌体作为外泌体具有相同的特性。

[0122] 实施例3: 诱发过敏性疾病的小鼠的制备及给药

[0123] 实验使用的动物为将购入的8周龄的雌性 BALB/c 小鼠 (orient 公司, 韩国), 进行一周的驯化后, 以9周龄用于实验。为了诱发过敏性皮炎, 用最大的脱毛器在 BALB/c 小鼠的背部进行脱毛直至背部上部。间隔24小时在脱毛的背部 $1 \times 1 cm^2$ 的面积内涂敷 $40 \mu g$ 的烟曲霉 (Af, *Aspergillus fumigatus*) 提取物共5天。经过2周的休止期后, 从第19天开始进行间隔24小时的反复5次涂敷, 从而完成过敏性皮炎动物模型的制备。

[0124] 过敏性皮炎动物模型制备结束后, 皮下 (subcutaneous) 注射 MSC、iMSC、MSC-Exo (来源于间充质干细胞的外泌体) 或者 iMSC-Exo (源自来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞的外泌体)。MSC 或 iMSC 的注射量为每只 2×10^6 个, MSC-Exo 或 iMSC-Exo 的注射量为每只 $12 \mu g$ 。注入后第5日对小鼠施行安乐死后进行分析 (图8)。

[0125] 实施例4: 来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞 (iMSC) 和来源于诱导性多能干细胞的间充质干细胞的外泌体 (iMSC-Exo) 的过敏性皮炎治疗活性的评价

[0126] ①过敏症状的改善

[0127] 为了确认 iMSC 及 iMSC-Exo 的过敏改善水平, 对没有诱发过敏性皮炎的阴性对照组 (CONTROL, 生理盐水处理)、诱发过敏性皮炎的阳性对照组 (AD, 烟曲霉处理)、MSC 处理组、MSC-Exo 处理组、iMSC 处理组及 iMSC-Exo 处理组进行观察比较。其结果, iMSC 处理组及 iMSC-Exo 处理组表现出与阴性对照组相似水平的改善效果 (图9)。

[0128] 由此可知,本发明的iMSC以及iMSC-Exo对过敏性皮炎之类皮肤疾病的改善或治疗功效卓越。

[0129] ②皮肤临床分数及经皮水分丢失的评价

[0130] 皮肤临床分数分为干燥(dryness)、鳞屑(scaling)、糜烂(erosion)、擦伤(excoriation)以及出血的5个项目来策定。以各项目病变均无的为0分,轻症为1分,中度为2分,重症为3分来策定,将它们合计来计算皮肤临床分数。其结果,iMSC处理组及iMSC-Exo处理与阳性对照组(AD)或MSC处理组、MSC-exo处理组相比表现出改善的皮肤临床分数(表2及图10)。

[0131] 表2

[0132] 皮肤临床分数

[0133]	CONTROL	AD	MSC	MSC-exo	iMSC	iMSC-exo
	0.1	4.1	1.6	2.1	1.6	1.8

[0134] 并且,为了评价同一给药组中皮肤屏障的损伤,使用 VapometerSWL-3® (Delfin technologies公司)检测经皮水分丢失(transepidermal water loss,TEWL)。其结果,确认iMSC处理组及iMSC-Exo处理与阳性对照组(AD)、阴性对照组(CONTROL)、MSC处理组、MSC-exo处理组相比,经皮水分丢失显著减少,过敏症状好转(表3及图11)。

[0135] 表3

[0136] 经皮水分丢失(TEWL)程度

[0137]	CONTROL	AD	MSC	MSC-exo	iMSC	iMSC-exo
	3.4	13.3	4.2	4.4	3.6	3.5

[0138] 由此可知,本发明的iMSC以及iMSC-Exo改善皮肤临床症状,显著减少经皮水分丢失,对过敏性皮炎之类皮肤疾病的改善或治疗功效卓越。

[0139] ③皮肤组织观察

[0140] 分离阴性对照组、阳性对照组、MSC处理组、MSC-Exo处理组、iMSC处理组及iMSC-Exo处理组的皮肤组织。使用10%的福尔马林溶液固定分离的皮肤组织后制备成石蜡块,之后以5 μ m的间隔将皮肤组织切片为纵断面。为了观察皮肤组织的变化和炎症细胞的浸润,使用苏木精(hematoxylin)和伊红(eosin)染色皮肤切片,在显微镜下以400倍比例进行观察。其结果,相比于阳性对照组,在iMSC处理组以及iMSC-Exo处理组中,角质层的损伤得到改善,表皮层及真皮层的厚度减小(图12)。

[0141] 由此可知,由此可知,本发明的iMSC以及iMSC-Exo改善皮肤角质层的损伤,减小表皮层及真皮层的厚度,对过敏性皮炎之类皮肤疾病的改善或治疗功效卓越。

[0142] ④血清免疫球蛋白E(IgE)的检测

[0143] 将阴性对照组、阳性对照组、MSC处理组、MSC-Exo处理组、iMSC处理组以及iMSC-Exo处理组的小鼠剖腹后,插入针头从后腔静脉抽取大约0.5~0.7ml的血液。通过离心分离从血液分离出血清。使用酶联免疫吸附检测(ELISA)实验试剂盒(eBioscience公司)检测分离的血清的总免疫球蛋白E。确认相比于阳性对照组,虽然iMSC处理组血清免疫球蛋白E的水平减小了,但iMSC-Exo处理组的血清免疫球蛋白E的水平变化不大(图13)。

[0144] 以上述结果以及上述实施例的临床症状改善效果为基础进行判断,可知本发明的

iMSC、iMSC-Exo的皮肤疾病改善功效主要不由免疫球蛋白E介导。

[0145] ⑤T细胞免疫反应的确认

[0146] 为了确认通过iMSC以及iMSC-Exo的T细胞免疫反应,从阴性对照组、阳性对照组、iMSC处理组以及iMSC-Exo处理组小鼠的淋巴结分离淋巴细胞。对分离的淋巴细胞进行CD3/CD28刺激后采取培养液通过酶联免疫吸附检测试剂盒(eBioscience公司)检测细胞因子的分泌。在IL-17A作为Th17细胞生成的主要细胞因子的情况下,在iMSC处理组以及iMSC-Exo处理组中显著减少至与阴性对照组相似的水平(图14)。

[0147] 以上述结果以及上述实施例的临床症状改善效果,还有血清免疫球蛋白E水平的变化为基础进行判断,可以推断本发明的iMSC、iMSC-Exo的皮肤疾病改善功效主要不由免疫球蛋白E介导,而是通过抑制IL-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> 包含来源于诱导性多能干细胞的间充质肝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> PP180063
- [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

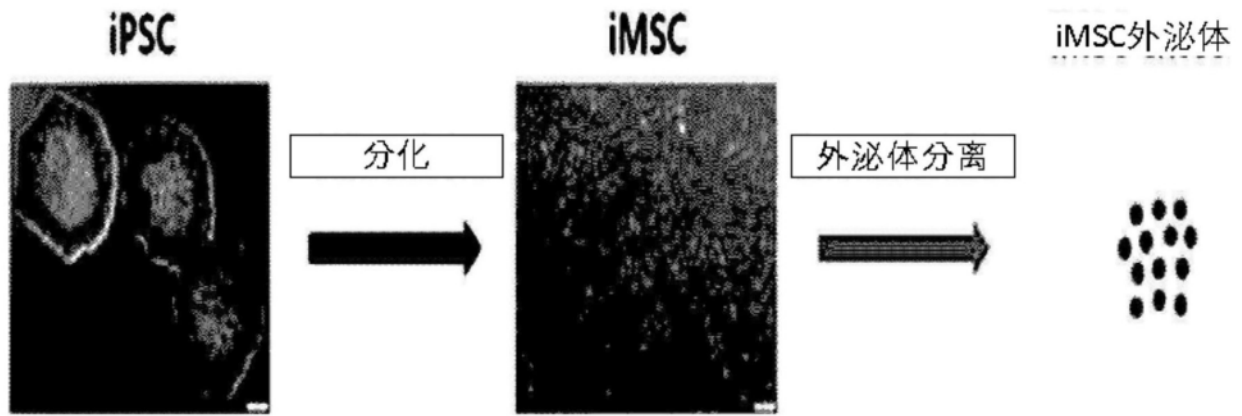


图1

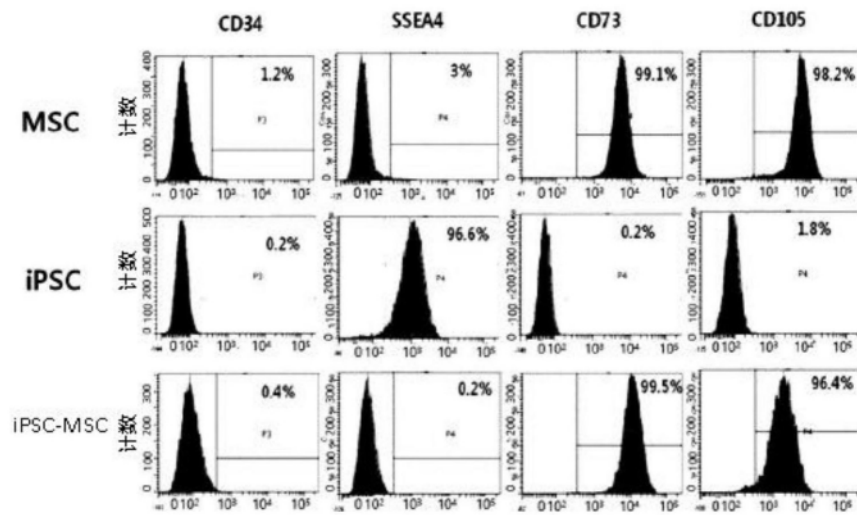


图2

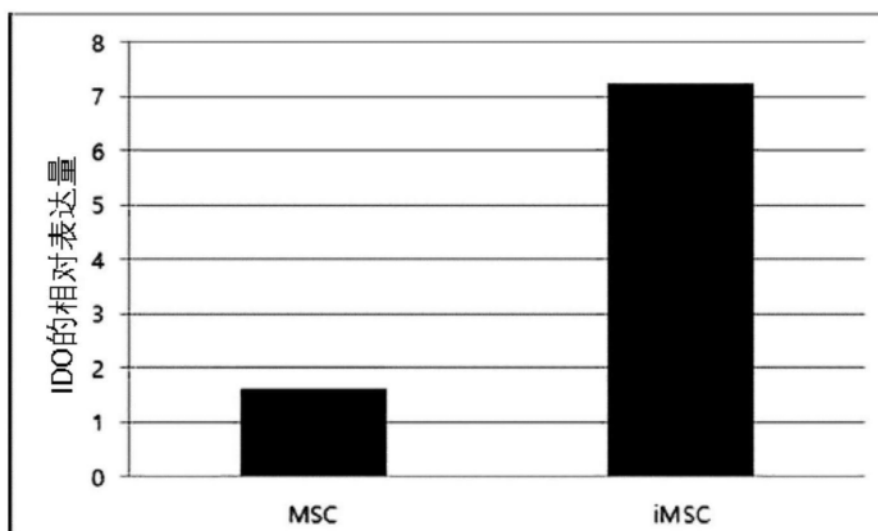


图3

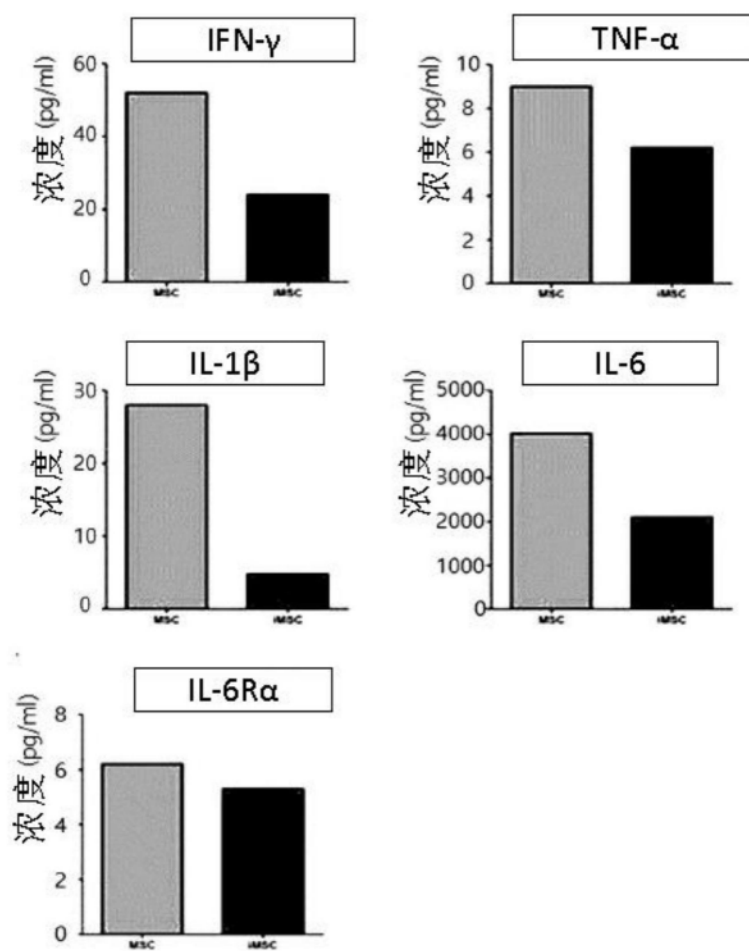


图4

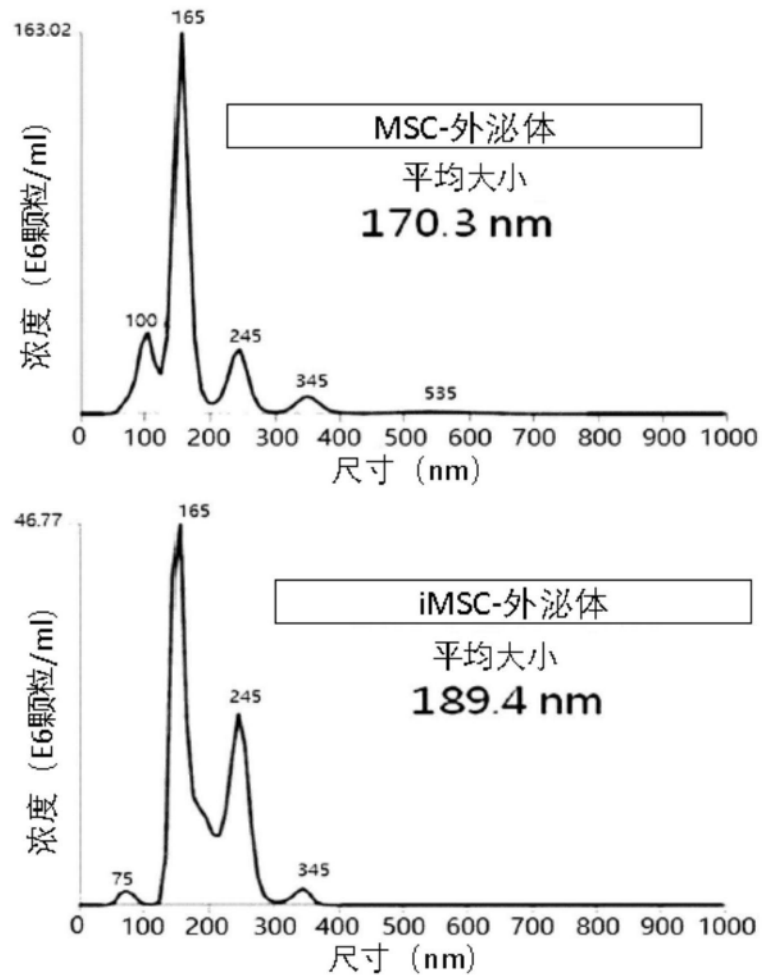


图5

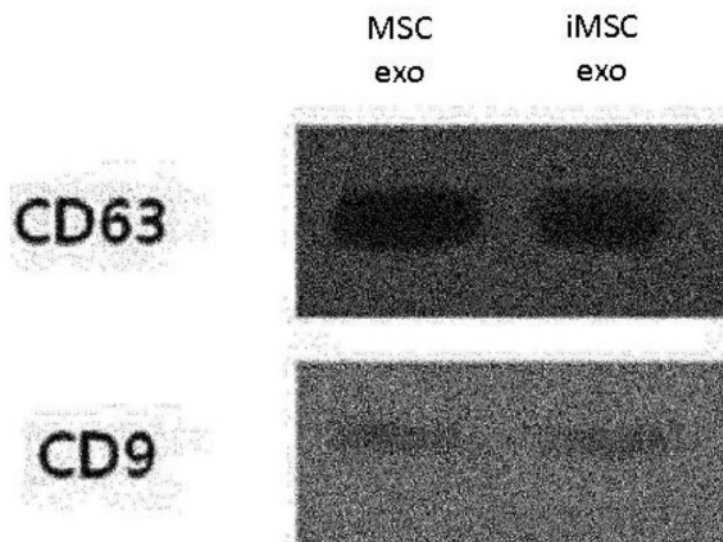


图6

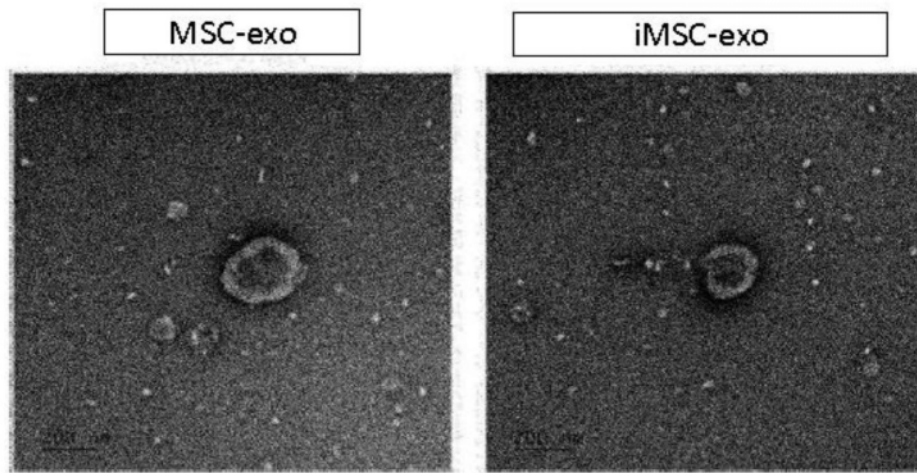


图7

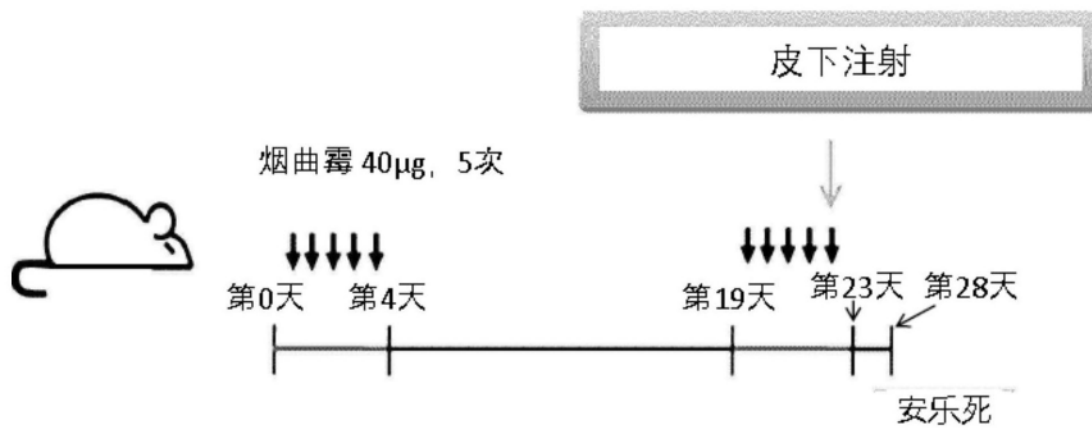


图8

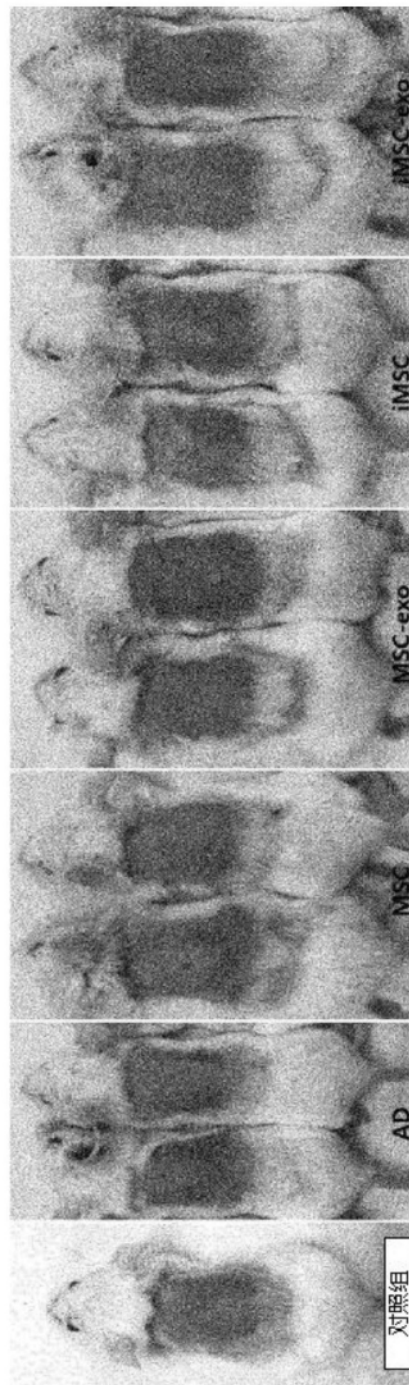


图9

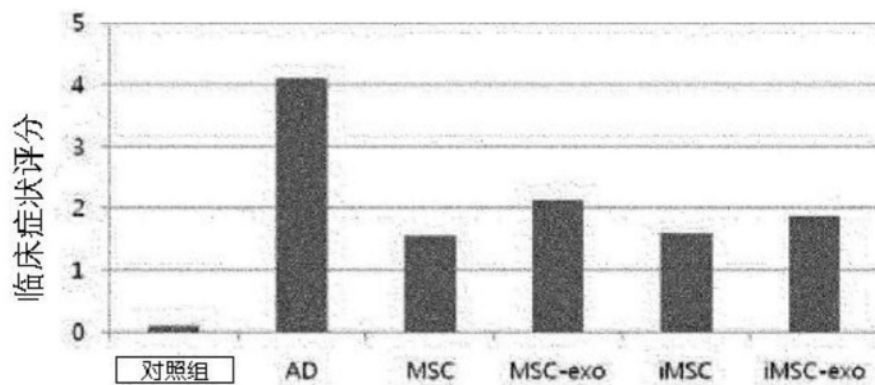


图10

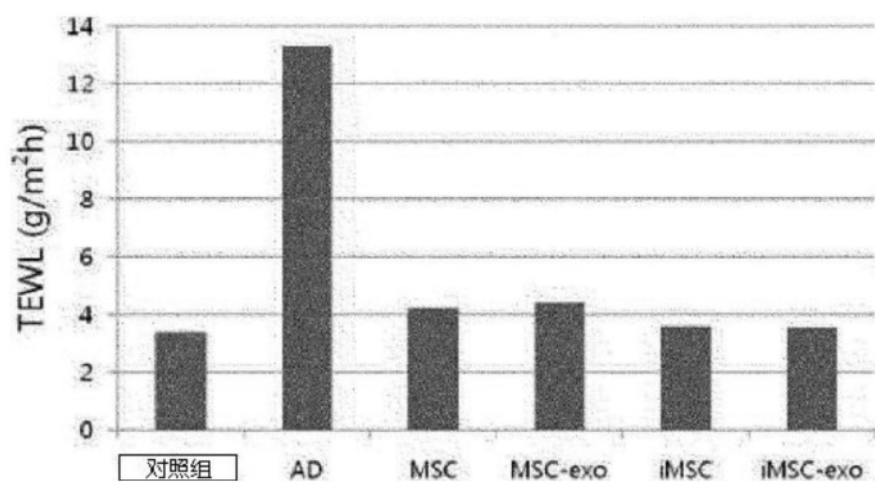


图11

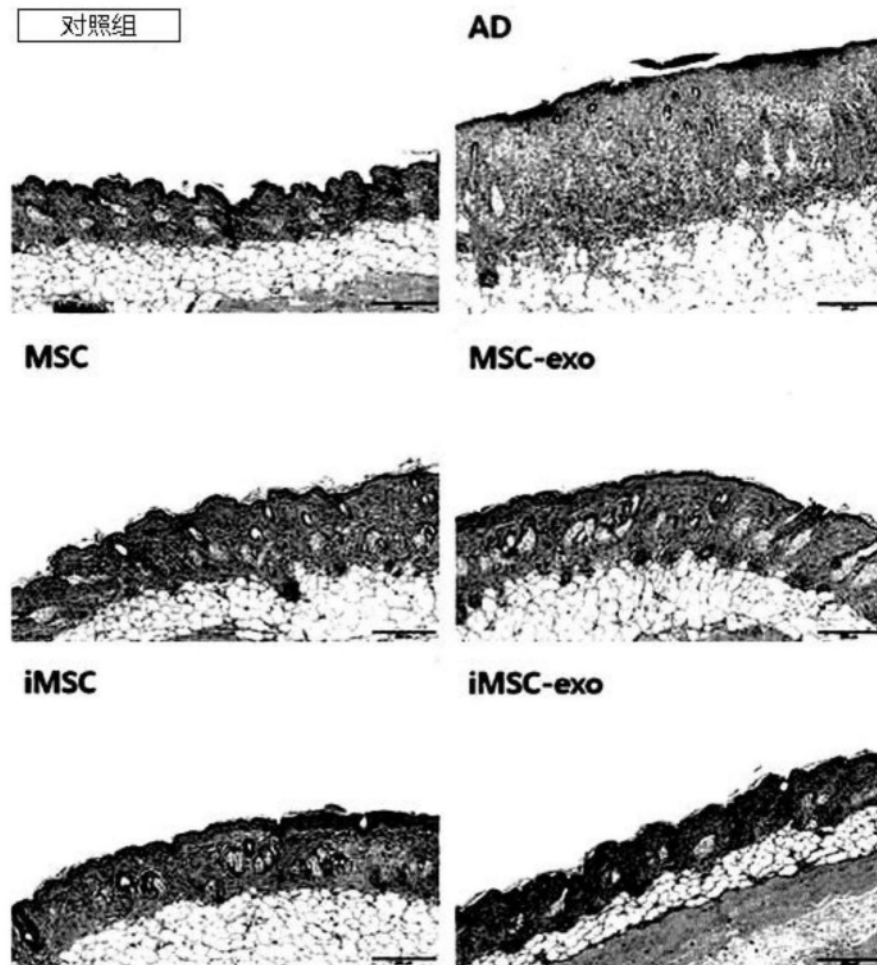


图12

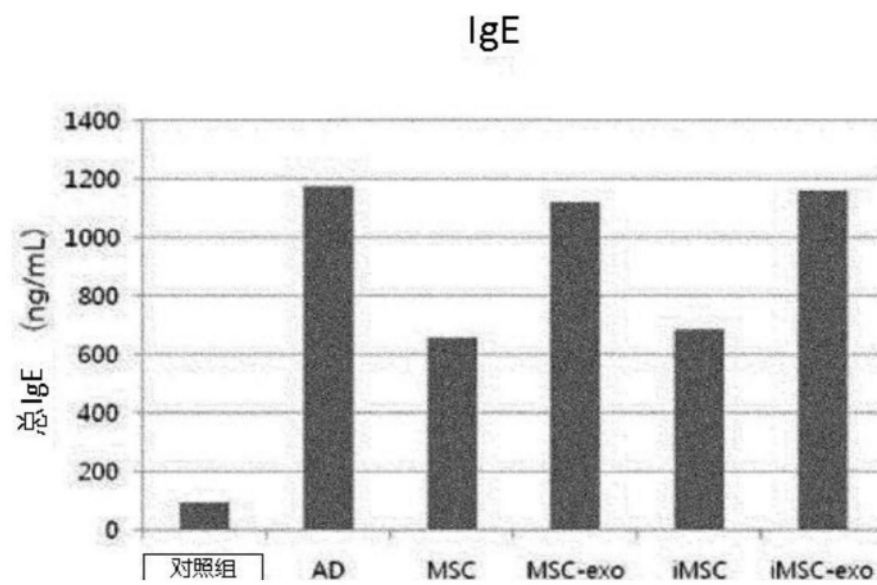


图13

IL-17A

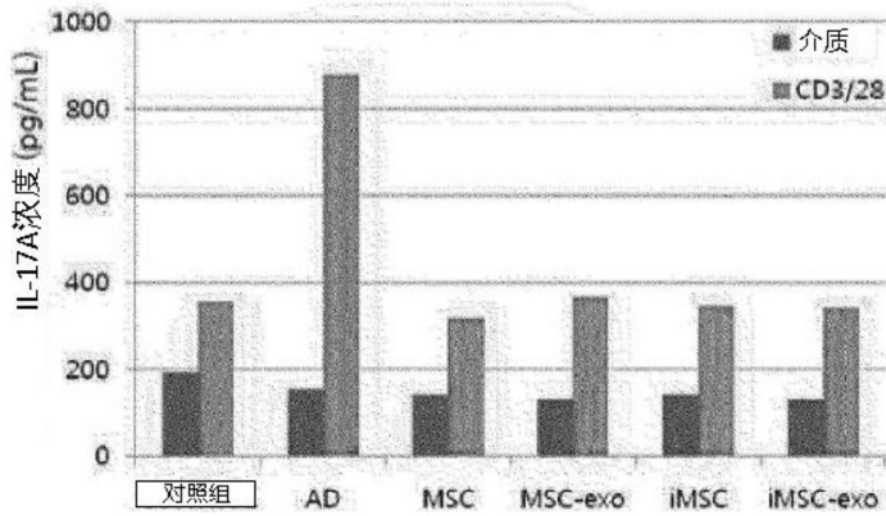


图14