



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113583946 B

(45) 授权公告日 2024. 11. 08

(21) 申请号 202110909867.9  
 (22) 申请日 2016.04.19  
 (65) 同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 113583946 A  
 (43) 申请公布日 2021.11.02  
 (30) 优先权数据  
 10-2015-0159011 2015.11.12 KR  
 (62) 分案原申请数据  
 201680003627.X 2016.04.19  
 (73) 专利权人 S生物医药公司  
 地址 韩国首尔市  
 (72) 发明人 金相宪 崔淙勋 朴贵德  
 (74) 专利代理机构 北京铭硕知识产权代理有限公司 11286  
 专利代理师 陈宇 韩芳

(51) Int.Cl.  
 C12N 5/077 (2010.01)  
 C12N 5/071 (2010.01)  
 (56) 对比文件  
 Sangmyung Rhee等.Promigratory and Procontractile Growth Factor Environments Differentially Regulate Cell Morphogenesis.Exp Cell Res.2010,第316卷(第2期),摘要,第233页左栏第1段,右栏第2段,第234页左栏第1段,第239页左栏第2段.  
 Park IS等.A novel three-dimensional adipose-derived stem cell cluster for vascular regeneration in ischemic tissue.CYTOTHERAPY.2014,第16卷(第4期),第509页左栏最后1段、第510页右栏最后1段,第514页左栏第1段第1-3行,右栏最后1段-第515页左栏第1段,第519页左栏最后1段.

审查员 修旺珊

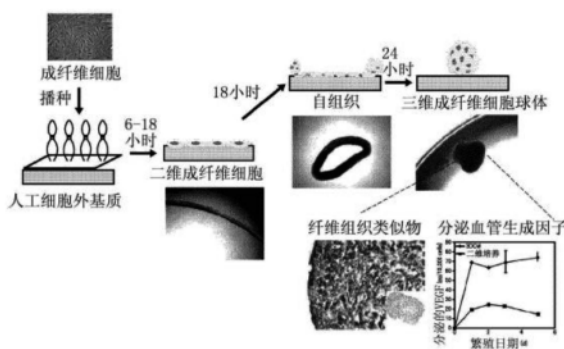
权利要求书1页 说明书19页 附图11页

## (54) 发明名称

三维成纤维细胞集合体及包含此的体外三维皮肤真皮模型

## (57) 摘要

本发明提供一种三维成纤维细胞集合体、该细胞集合体的制造方法以及包含由成纤维细胞培养的成纤维细胞集合体的体外(In vitro)三维皮肤真皮模型及使用该模型而筛选药物的方法。



1. 一种用于生产成纤维细胞集合体的方法,包括如下的步骤:

在具备涂覆有蛋白质的表面的培养容器中的液体培养基中培养成纤维细胞,从而获得包含有因成纤维细胞从所述表面脱离而形成的成纤维细胞集合体的培养物,其中,所述蛋白质具有与成纤维细胞结合的活性;以及

从所述培养物中分离成纤维细胞集合体,

其中,具有与所述成纤维细胞结合的活性的蛋白质是成纤维细胞生长因子,

其中,成纤维细胞生长因子以比结合到整合素的蛋白质与成纤维细胞之间的结合更弱的方式结合于成纤维细胞,

其中,在培养所述成纤维细胞时,以 $1.25 \times 10^5$ 细胞/cm<sup>2</sup>以上的细胞浓度播种成纤维细胞。

2. 如权利要求1所述的方法,其中,所述蛋白质借助于从由如下的物质组成的群中选择的任意一种或者其组合而被固定于培养容器表面:

麦芽糖结合蛋白质、疏水蛋白及疏水性细胞穿透肽。

## 三维成纤维细胞集合体及包含此的体外三维皮肤真皮模型

[0001] 本申请是申请日为2016年4月19日、申请号为201680003627.X、发明名称为“三维成纤维细胞集合体及包含此的体外三维皮肤真皮模型”的发明专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及一种三维成纤维细胞集合体、该细胞集合体的生产方法、包含该细胞集合体的体外三维皮肤真皮模型以及使用该细胞集合体而筛选药物的方法。

### 背景技术

[0003] 近来,细胞治疗技术作为难治疾病等的治疗的新领域而受到瞩目。目前为止,为了治疗人类的难治疾病,提出了脏器移植或基因治疗等,但由于免疫排斥、供应脏器不足、载体开发或疾病基因相关知识的不足,未能完成有效的实用化。

[0004] 于是,对于细胞治疗技术的关心高涨,且将从生物体内分离的细胞在生物体外进行增殖并移植的技术正在商用化,人工皮肤、软骨或纤维组织的重建等的实用化在持续进行。成纤维细胞为用于生产并维持间质性细胞外基质(ECM)的细胞,成纤维细胞通过细胞外基质而有机地连接。并且,成纤维细胞作为生产免疫防御用的多样的细胞因子及生理活性因子的细胞而广为人知。

[0005] 为了将这样的成纤维细胞作为细胞治疗剂或组织工程学素材而灵活利用,以二维方式培养成纤维细胞而大量增殖之后利用胰蛋白酶之类的酶进行了处理,然而在这样的成纤维细胞中,在将生成的细胞外基质分解而移植的步骤中无法期待细胞外基质的作用。作为组织工程技术,利用可生物分解的合成高分子或天然高分子,并利用被称为支架的人工三维多孔性细胞外基质,而用于将包含成纤维细胞在内的多样的细胞培养成三维细胞集合体的研究曾展开。然而,其中却存在着生物分解速度或炎症反应等素材的限制,因此难以实现商用化,于是需要一种诱导形成三维细胞集合体的技术。

[0006] 另一方面,人体的皮肤组织大体分为三个部分,即由形成皮肤的最外侧的表皮层、其下层的真皮层、以及皮下组织所构成。其中,表皮层由从用于使表皮层与真皮层得以牢固结合的基底膜(basement membrane)分化为多层的上皮细胞以及所述上皮细胞外的黑色素细胞、免疫细胞构成。表皮层下方的真皮层主要由成纤维细胞及该细胞所分泌的多种细胞外基质(extracellular matrix)构成。真皮层与皮肤健康及老化密切相关,这一点已周知。

[0007] 胶原作为占据真皮层的90%的主要蛋白质,用于维持皮肤结合组织,并提供皮肤弹力。通常,随着外界因素及年龄的增加,成纤维细胞的数量和功能减少,这被周知为是老化的主要原因。细胞的减少引发皮肤组织中的纤维质成分合成及水分的损失、以及角质层的变化。而且,胶原酶的增加使交联形态的胶原减少,这使皮肤的光滑、水分及弹力减小。胶原含量及合成增加意味着皮肤的水分及弹力的增加。

[0008] 皮肤基质内的胶原的分解和合成借助于作为蛋白酶的基质金属蛋白酶(MMP; matrix metalloproteinase)而得到调节。根据结构和功能性特性,MMP分为多个种类。I型胶原作为皮肤的典型胶原,由于MMP-1的作用而分解。MMP-1活性借助于为了维持皮肤的稳

态而分泌的TIMP-1之类的抑制剂而得到调节。MMPs和TIMPs之类的生物分子由包含成纤维细胞在内的细胞而分泌。而且,MMP-1分解细胞外基质,并据此促进肿瘤转移及进展。基于MMP-1的胶原合成及分解在癌的转移中起到重要作用。因此,将MMP-1/胶原作为靶的药物和物质作为癌治疗剂或化妆品组合物的目的得到开发。

[0009] 并且,已经周知MMP在例如关节炎之类的炎症性疾病或者例如癌转移之类的癌症等病理学条件下过表达,将MMP作为靶的MMP抑制剂被作为如上所述的疾病的治疗剂得到开发。

[0010] 如上所述的用于筛选将MMP或胶原作为靶的药物的基于2D细胞的试验,然而基于2D细胞的试验因药物的敏感度、对细胞及组织的药物渗透问题而存在局限性,且不宜用于准确预测存活生命体的反应。而且,由于上述皮肤的结构、功能方面的复杂性,利用一个种类的皮肤细胞的皮肤研究具有限度,为了克服此而开发的三维结构的皮肤模型即为人工皮肤,然而现有的人工皮肤却存在着难以高速筛选药物的局限性。因此,如果想要快速筛选(high-throughput)药物,则需要开发一种可用于皮肤环境仿真的新型皮肤模型系统。

## 发明内容

[0011] 技术问题

[0012] 本发明之一形态旨在提供一种用于生产成纤维细胞集合体的方法,包括如下的步骤:将成纤维细胞在培养容器中的液体培养基中培养,从而获得包含有因成纤维细胞从表面脱离而形成的成纤维细胞集合体(fibroblast cluster)的培养物,所述培养容器具备涂覆有蛋白质的所述表面,所述蛋白质具有结合于成纤维细胞的活性;以及从所述培养物中分离成纤维细胞集合体,其中,具有结合于所述成纤维细胞的活性的蛋白质以比成纤维细胞与成纤维细胞之间的结合更弱的方式结合于成纤维细胞。

[0013] 本发明的另一形态旨在提供一种通过上述方法制造的成纤维细胞集合体。

[0014] 本发明的又一形态旨在提供一种包括由成纤维细胞培养成的成纤维细胞集合体的体外(In vitro)三维皮肤真皮模型,。

[0015] 本发明的其他形态旨在提供一种用于制造体外三维人工皮肤模型的方法,包括如下步骤:将成纤维细胞在培养容器中的液体培养基中培养,从而获得包含有因成纤维细胞从表面脱离而形成的成纤维细胞集合体(fibroblast cluster)的培养物,其中,所述培养容器具备涂覆有蛋白质的所述表面,所述蛋白质具有与成纤维细胞结合的活性,具有所述成纤维细胞结合的活性的蛋白质以比成纤维细胞与成纤维细胞之间的结合更弱的方式结合于成纤维细胞;以及将源自所述培养物的成纤维细胞集合体额外培养至少12个小时。

[0016] 本发明的其他形态旨在提供一种用于筛选使MMP的表达或活性减少的物质的方法,包括如下步骤:对所述成纤维细胞集合体或体外三维皮肤真皮模型处理被检测物质;将处理所述被检测物质的成纤维细胞集合体或皮肤真皮模型的MMP的表达或活性的水平进行测量;将测量的MMP的表达或活性的水平与无处理对照组的水平进行比较;以及将使MMP的表达或活性相对于对照组而言降低的物质进行筛选。

[0017] 本发明的又一不同的形态旨在提供一种用于筛选使胶原的表达或活性增加的物质的方法,包括如下步骤:对所述成纤维细胞集合体或体外三维皮肤真皮模型处理被检测物质;将处理所述被检测物质的成纤维细胞集合体或皮肤真皮模型的胶原的表达或活性的

水平进行测量;将测量的胶原的表达或活性的水平与无处理对照组的水平进行比较;以及将使胶原的表达或活性相对于对照组而言增加的物质进行筛选。

[0018] 技术方案

[0019] 根据本发明之一形态,提供一种用于生产成纤维细胞集合体的方法,包括如下的步骤:将成纤维细胞在培养容器中的液体培养基中培养,从而获得包含有因成纤维细胞从表面脱离而形成的成纤维细胞集合体(fibroblast cluster)的培养物,其中,所述培养容器具备涂覆有蛋白质的所述表面,所述蛋白质具有与成纤维细胞结合的活性;以及从所述培养物分离成纤维细胞集合体,其中,具有与所述成纤维细胞结合的活性的蛋白质以比成纤维细胞与成纤维细胞之间的结合更弱的方式结合于成纤维细胞。

[0020] 根据本发明的另一形态,提供一种用于形成成纤维细胞集合体的培养容器,其以如下方式构成:成纤维细胞在培养基中黏着于培养容器的表面,所述表面涂覆有蛋白质,所述蛋白质具有与成纤维细胞结合的活性,其中,具有与所述成纤维细胞结合的活性的蛋白质以比成纤维细胞与成纤维细胞之间的结合更弱的方式结合于成纤维细胞。

[0021] 在本发明中,术语“成纤维细胞(fibroblast)”(与“纤维细胞”互换使用)为用于构成纤维性结合组织的成分的细胞,可表示哺乳动物的结合组织的细胞。成纤维细胞可用于生产细胞外基质和胶原,且可以起到治愈伤口的作用,例如用于治疗皮肤的伤疤、烧伤、褥疮或创伤。

[0022] 术语“成纤维细胞集合体(fibroblast cluster)”或“三维成纤维细胞集合体”(与“成纤维细胞组织体”互换使用)表示2个以上的细胞密集的状态,且既可以是组织状态,也可以是单个细胞状态。各个细胞集合体可作为组织本身或局部,或单一细胞的集合体而存在,且可以包括成纤维细胞类似-组织体。而且,术语“三维(three-dimension)”可表示非二次元的、具有几何学3个参数(例如深度、宽度、高度或X、Y、Z轴)模型的立体,因此根据一个具体例的成纤维细胞集合体可表示如下的成纤维细胞集合体:得到三维培养,即在培养容器中脱附而以浮游状态培养,从而随着细胞增殖而具有立体的球形、片(sheet)状或者与之类似的三维形态(例如,类似组织体)。并且,对于根据一个具体例的成纤维细胞集合体而言,无需通过组织工程学技术而使用人工的三维多孔性细胞外基质,例如无需使用片材、水凝胶、膜、支架之类的生物分解性合成高分子或天然高分子支撑体,其意味着可以凭借自身而形成三维成纤维细胞集合体,所述组织工程学技术并非细胞,而是三维基质,其与根据一具体例的三维成纤维细胞集合体存在区别。

[0023] 所述成纤维细胞的向培养容器中的播种可包括为了在培养容器中培养成纤维细胞而执行的所有行为,其中包括:将成纤维细胞添加到培养容器;或者将成纤维细胞黏着于培养容器。

[0024] 术语“细胞黏着或细胞结合”的含义可包括:细胞与细胞之间的黏着或结合;以及细胞与培养容器或生物材料的表面之间的黏着或者结合。在培养容器或生物体材料的表面发生的细胞的黏着或结合可具有多样的机制。例如包括:将生物学识别作为媒介的特异性细胞黏着;以及由静电或表面能量支配的非特异性细胞黏着。特异性细胞黏着可表示如下的黏着:将作为细胞外基质(extracellular matrix;ECM)蛋白质的胶原、纤连蛋白(fibronectin)、层粘连蛋白等中存在的特定的肽(例如:arginine-glycine-aspartic acid;RGD)借助于存在于细胞膜的水溶体而予以结合,从而引发的黏着。非特异性细胞黏着

可表示如下的黏着：使具有携带电阴性的磷脂的细胞膜所黏着的表面携带电阳性，从而诱导细胞的黏着。

[0025] 培养容器可包括具有疏水性的表面，例如可包括水接触角为90至150°的表面，且可以是具有与成纤维细胞黏着或结合的活性的蛋白质涂覆于表面的表面。上述具有改性的表面的培养容器可包括以如下方式诱导的表面：比起细胞-细胞之间的结合而言，细胞-黏着基质（例如，具有与涂覆于培养容器的表面的细胞结合的活性的蛋白质或生长因子）之间的结合更弱。所述成纤维细胞不同于血液细胞，作为黏着于细胞外基质而生育的上皮细胞或间充质细胞之类的黏着依赖性细胞，如果细胞不黏着于黏着基质则诱发细胞死亡，将这种细胞死亡称为ANOKIS。对于根据一个具体例的培养方法而言，在细胞-黏着基质之间的黏着或结合之中，并不诱发细胞死亡，且将细胞-黏着基质之间的黏着或结合以比细胞-细胞之间的黏着或结合更弱的方式诱导，因此不会培养成二维单层。即，所述成纤维细胞在培养初期被诱导较弱的细胞-黏着基质之间的黏着或结合，并因细胞-细胞之间的黏着或结合被诱导而借助于这样的细胞之间的结合而形成二维成纤维细胞集合体，且随着培养时间变长，二维成纤维细胞集合体从培养容器表面脱附或脱离，且脱附或脱离的二维成纤维细胞集合体在培养容器中以浮游状态继续得到培养，从而可以形成三维成纤维细胞集合体。

[0026] 为了能够使细胞-黏着基质（例如，具有与涂覆于培养容器的表面的细胞结合的活性的蛋白质或生长因子）之间的黏着或结合得以比所述细胞-细胞之间的黏着或结合更弱地诱导，将培养容器的表面进行改性的方法可通过使用具有与成纤维细胞结合的活性的蛋白质而进行诱导。

[0027] 当使用与存在于成纤维细胞的细胞膜的整合素（integrin）结合的蛋白质（例如，胶原、纤连蛋白、层粘连蛋白等）的情况下，所述细胞-黏着基质之间的黏着或结合被较强地诱导。术语“整合素（integrin）”可表示存在于细胞膜而在细胞黏着于纤连蛋白、胶原等细胞外基质时作用的水溶体分子，且作为由 $\alpha$ 或 $\beta$ 两个小单元杂2合体构成的膜贯通型糖蛋白质，可包括所有类型的整合素。因此，具有结合于所述成纤维细胞的活性的蛋白质可以在培养基中以比成纤维细胞与纤连蛋白相结合的力度而言更弱地结合于所述成纤维细胞。并且，具有结合于所述成纤维细胞的活性的蛋白质在培养基中以比成纤维细胞与纤连蛋白相结合的力度而言以60至95%的活性结合于所述成纤维细胞，例如，可以是60、70、80、90或95%。因此，具有结合于所述成纤维细胞的活性的蛋白质可包括不与整合素结合的蛋白质。而且，在一个具体例中，所述不与整合素结合的蛋白质可包括与存在于成纤维细胞的细胞膜的硫酸类肝素蛋白多糖（heparan sulfate proteoglycan）相结合的蛋白质。在一个具体例中，与所述硫酸类肝素蛋白多糖结合的蛋白质可以是成纤维细胞生长因子（FGF）。并且，所述蛋白质可以是以5至100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度固定于培养容器表面的蛋白质。

[0028] 所述术语“成纤维细胞生长因子（Fibroblast growth factor; FGF）”作为生长因子的一个种类，可表示通过刺激成纤维细胞而诱导增殖性的生长因子。成纤维细胞生长因子作为肝素结合（heparin-binding）蛋白质，如上所述，可以与成纤维细胞的硫酸类肝素蛋白多糖相互作用。FGF可包括22个种类，例如可包括：FGF 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22。即使种类的名称不同，只要本领域技术人员可认识到意味着相同蛋白质，则全都可以包含于所述FGF的种类中。例如，FGF 11、12、13及14也被周知为“iFGF”，FGF 15也被周知为“FGF 15/19”。而且，例如FGF 1或FGF 2可包括“肝素结合生

长因子1(heparin-binding growth factor 1;HBGF-1)”或“肝素结合生长因子2(heparin-binding growth factor 2,HBGF-2)”。

[0029] 针对培养容器表面的具有结合于所述成纤维细胞的活性的蛋白质的固定化用于将多肽固定于固体基质表面,其可以通过相关技术领域中公知的所有方法实现,例如可利用物理性吸附、基于非选择性化学反应的共价键等。作为这种固定化方法的例,可包括如下方法:在将蛋白质结合于生物素(biotin)之后,将该蛋白质应用于用链霉亲和素(streptavidin)或抗生物素蛋白(avidin)处理的固体表面,从而利用生物素-链霉亲和素/抗生物素蛋白结合而将蛋白质固定;利用等离子体而在基板上集聚活性基团(用于基于化学键而固定蛋白质的化学作用基团),从而将蛋白质固定;利用溶胶-凝胶(sol-gel)法而在固体基板表面形成比表面积充分增加的多孔性溶胶-凝胶薄膜,然后借助于物理性吸附而将蛋白质固定于所述多孔性薄膜;通过等离子体反应而将抗血栓性蛋白质固定于聚四氟乙烯(PTFE)表面;将阳离子性氨基酸残基在2个酶中连续融合2个以上的酶予以结合,从而将蛋白质进行固定;利用基质而将蛋白质固定于与固体状支撑台相结合的疏水性高分子层;在塑料表面利用缓冲成分而固定蛋白质;在酒精溶液中将蛋白质接触于具有疏水性表面的固体表面,从而将蛋白质进行固定。

[0030] 并且,可使用在重组方面可实现大量表达及容易精制的多肽链(link),以如下的形态执行固定化:在所述多肽链的羧基末端融合有生长因子(例如FGF)的氨基酸末端的多肽链-生长因子(例如FGF)重组蛋白质形态。针对所述生长因子,利用多肽链而在维持生长因子本来的生物学活性的情况下以重组蛋白质的形态固定于疏水性表面,然后利用针对固定的生长因子的成纤维细胞的黏着活性而将成纤维细胞黏着于所述表面,从而可以实现成纤维细胞的高效培养。

[0031] 适于本发明的多肽链通过其羧基末端而与生长因子的氨基末端结合,并可通过存在于该氨基末端的疏水性区域而被吸附于具有疏水性表面的培养容器,只要在重组方面可实现大量表达和容易的精制,且不对成纤维细胞的培养产生影响,则可以使用任何多肽链。作为多肽链例如可包括:麦芽糖结合蛋白质(maltose-binding protein;MBP)、疏水蛋白(hydrophobin)、疏水性细胞穿透肽(hydrophobic cell penetrating peptides;CPPs)等。

[0032] MBP(NCBI GenBank Accession No.AAB59056)可表示如下的膜周边(periplasm)蛋白质:横穿大肠杆菌(*Escherichia coli*)的细胞膜而位于原生质膜空间,并参与到麦芽糖或麦芽糖糊精(maltodextrin)等糖类的向细胞内的移动。MBP主要用于将有用的外来蛋白质以重组蛋白质形态生产,其从细胞内的基因malE解码而得到制造,且当在克隆的malE基因的下部(downstream)插入外来蛋白质的基因而在细胞内表达时,可容易地大量生产2个蛋白质所结合的重组蛋白质。尤其,当旨在表达的蛋白质的大小较小或者其为在其他宿主细胞内稳定性降低的外来蛋白质时,如上所述地利用MBP而以重组蛋白质形态在细胞内予以表达可能有利。如此,由结合有malE基因的基因表达的外来蛋白质可利用MBP具有与麦芽糖的结合亲和力这一特性而进行分离。例如,使麦芽糖多重化的形态即涂覆有直链淀粉(amylose)的树脂与细胞破碎液进行反应,并将反应的树脂数次洗涤而将污染的其他蛋白质去除,然后添加高浓度的麦芽糖而予以竞争,从而可以简单地使所期望的蛋白质单独溶出。

[0033] 所述MBP-细胞黏着基质(例如生长因子)重组蛋白质可利用业界通常采用的化学

合成或基因重组技术等而制造,并将用于将其表达的性状转化细菌在适当的条件下培养,然后由培养液回收重组蛋白质以获取。将如此获取的MBP-细胞黏着基质重组蛋白质固定于具有疏水性表面的培养容器的过程不需要特别的处理,而是可以利用位于重组蛋白质多肽链的氨基末端的疏水性区域而借助于与疏水性表面之间的物理性吸附而自发实现。

[0034] 而且,可用于使细胞-黏着基质(例如,具有结合于成纤维细胞的活性的蛋白质)之间的黏着或结合比所述细胞-细胞之间的黏着或结合更弱地诱导的方法可以是,利用使成纤维细胞与基质(例如,培养容器的表面)之间的黏着或结合弱化的物质进行处理,从而可以诱导。

[0035] 所述表面具有疏水性的培养容器,例如具有水接触角为90至150°的表面的培养容器可以是由对通常的细胞培养容器赋予疏水性的高分子进行表面处理,或者可以是由那样的高分子制造的细胞培养容器。作为这样的疏水性高分子,例如可包括但不限于:聚苯乙烯(polystyrene)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)、聚氯乙烯(PVC)、聚乙烯(PE)、聚丙烯(PP)、聚四氟乙烯(PTFE)、作为脂肪族聚酯高分子的聚(L-乳酸)(PLLA)、聚(D,L-乳酸)(PDLA)、聚(乙醇酸)(PGA)、聚(己内酯)(PCL)、聚(羟基烷酸酯)、聚二恶烷酮(PDS)、聚三亚甲基碳酸酯中选择的一种、或者作为以其为单位的共聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)、聚(L-丙交酯-co-己内酯)(PLCL)、聚(羟基乙酸-co-己内酯)(PGCL)、其衍生物等。并且,根据一具体例的适当的培养容器可具有如下的表面:由疏水性表面硅烷化的表面(silanized surface)、碳纳米管(CNT)表面、涂覆有烃的表面(hydrocarbon coated surface)、或者金属(例如,不锈钢、钛、金、铂等)表面。

[0036] 在将所述成纤维细胞播种到培养容器之前,所述成纤维细胞可使用传代增殖的培养细胞。所述传代增殖的方法可以是利用公知的方法分离的成纤维细胞以公知的方法传代增殖的方法。例如,对于所述分离的成纤维细胞而言,可在随后的三维成纤维细胞集合体的形成中直接使用1传代培养的细胞,或者使用培养10传代以上的细胞。

[0037] 将所述成纤维细胞播种的浓度可以是以 $1.0 \times 10^4$ 至 $2.0 \times 10^5$ 细胞/cm<sup>2</sup>的细胞浓度进行的播种。而且,例如,所述细胞浓度可以是 $7.5 \times 10^4$ 至 $1.5 \times 10^5$ 细胞/cm<sup>2</sup>或 $1.25 \times 10^5$ 细胞/cm<sup>2</sup>。如果所述细胞的浓度为 $1.0 \times 10^4$ 以上,则可以形成三维的细胞集合体,如果其为 $1.25 \times 10^5$ 细胞/cm<sup>2</sup>以上,则可以形成可用肉眼识别的大小的三维细胞集合体。

[0038] 并且,所述培养期间可以是1日至1星期。适于所述培养的培养基为通常使用于成纤维细胞的培养和/或分化的培养基,只要是含有血清或无血清的培养基,就可以不加限制地使用,例如可以使用DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)、Ham's F12、在它们的混合物等中添加血清的培养基。

[0039] 如上所述,成纤维细胞形成三维成纤维细胞集合体的步骤中,借助于细胞-黏着基质之间的结合而在初期形成的二维成纤维细胞集合体从培养容器表面脱附,且脱附的二维成纤维细胞集合体在培养容器中以浮游的状态继续得到培养,从而可以形成三维细胞集合体。

[0040] 在培养容器表面通过使成纤维细胞黏着而培养形成的成纤维细胞集合体具有可用肉眼检测的程度的大小的直径,因此可以使用移液器而分离,或者可借助于过滤或离心分离等方法而容易地获取。即,用于由所述培养容器获取形成的成纤维细胞集合体的步骤可以通过无酶处理方式实现。如此获取的三维细胞集合体可按如下方式使用:利用胶原酶、

胰蛋白酶或中性蛋白酶 (dispase) 的酶学处理、利用压力的机械处理或者借助于其并用处理而将集合体形态瓦解而以单一细胞形态使用,或者以三维细胞集合体形态直接使用。

[0041] 作为其他形态,提供一种由上述方法制造的成纤维细胞集合体。

[0042] 关于成纤维细胞集合体的制造方法,如同以上记载。

[0043] 所述成纤维细胞集合体可以是能够用肉眼识别的大小的球形或片材,例如可以是直径为300至2000 $\mu\text{m}$ 的球形的成纤维细胞集合体,在一个具体例中,可以是300至1000 $\mu\text{m}$ 。对于所述球形的成纤维细胞集合体的直径而言,本领域技术人员可借助于根据一个具体例的培养方法而调节为肉眼可识别的大小。而且,根据一个具体例的球形的成纤维细胞集合体可在直径为400 $\mu\text{m}$ 以内的范围内包括 $3.0 \times 10^5$ 至 $1.0 \times 10^6$ 个纤维细胞。在又一具体例中,所述成纤维细胞集合体可分泌上皮细胞生长因子 (EGF)、细胞外基质 (ECM) 或血管内皮生长因子 (VEGF)。

[0044] 因此,根据一个具体例的成纤维细胞集合体可作为供应细胞治疗剂或者生理活性物质时的细胞源 (source) 而有效地使用。以下,对所述成纤维细胞集合体的用途进行说明。

[0045] 根据另一形态,提供一种包括根据一个具体例的成纤维细胞集合体的用于皮肤再生或血管新生的细胞治疗剂。

[0046] 而且,提供一种将根据一个具体例的成纤维细胞集合体或者其培养液作为有效成分而包含的皮肤伤疤、烧伤、褥疮或者缺血性疾病的预防及治疗用药学组合物。

[0047] 如上所述,成纤维细胞集合体可分泌上皮细胞生长因子、细胞外基质或血管内皮生长因子,因此可以移植到需要它的个体而执行作为细胞源的作用,从而可以促进皮肤再生或血管新生。并且,通过促进皮肤再生或血管新生,可在皮肤伤疤、烧伤、褥疮或缺血性疾病的预防及治疗用药学组合物中也可有效地利用。所述缺血性疾病例如可以是缺血性心脏疾病、缺血性心肌梗塞、缺血性心脏衰竭、缺血性肠炎、缺血性血管疾病、缺血性眼疾病、缺血性网膜症、缺血性绿内障、缺血性肾衰竭、缺血性秃头、缺血性中风及缺血性下肢疾病。

[0048] 根据一个具体例的细胞治疗剂或药学组合物的给药量以构成作为有效成分的细胞集合体的成纤维细胞集合体为基准,而可以是 $1.0 \times 10^5$ 至 $1.0 \times 10^8$ 细胞/kg (体重) 或 $1.0 \times 10^7$ 至 $1.0 \times 10^8$ 细胞/kg (体重)。然而,给药量因制剂化方法、给药方式、患者的年龄、体重、性别、病理状态、饮食、给药时间、给药途径、排泄速度及反应感应性之类的要素而多样的调节,只要是本领域技术人员则可通过考虑这样的因素而适当地调节给药量。给药次数可以是1次或者是临床可允许的副作用范围内的2次以上,关于给药部位,可以对1处或2处以上给药。针对人类以外的动物,每kg以相同于人类的量给药,或者例如以目的动物与人类之间的器官 (心脏等) 的容积比 (例如平均值) 等将所述给药量换算而以换算量给药。作为根据一个具体例的治疗的对象动物,可将人类及其以外的作为目的的哺乳动物包含,例如包括人类、猿猴、小鼠、大鼠、兔子、羊、牛、狗、马、猪等。

[0049] 根据一个具体例的细胞治疗剂或药学组合物中,作为有效成分,可包含细胞集合体以及药学可允许的载体和/或添加物。例如,可包括杀菌水、生理盐水、惯用的缓冲剂 (磷酸、柠檬酸、其他的有机酸等)、稳定剂、盐、抗氧化剂 (抗坏血酸等)、界面活性剂、悬浊剂、等渗剂或保存剂等。为了局域给药,优选与生物体高分子 (biopolymer) 等有机物、羟基磷灰石等无机物、具体而言与胶原基质、聚乳酸聚合物或共聚物、聚二醇聚合物或共聚物及其化学衍生物等进行组合。当根据一个具体例的细胞治疗剂或药学组合物被制造成适于注射的剂

型时,细胞集合体可溶解于药学可允许的载体中,或者以溶解的溶液状态冻结。

[0050] 根据一个具体例的细胞治疗剂或药学组合物可根据其给药方法或剂型而适当地包括悬浊剂、溶解辅助剂、稳定化剂、等渗剂、保存剂、吸附防止剂、界面活性化剂、稀释剂、赋形剂、pH调整剂、无痛化剂、缓冲剂、还原剂、抗氧化剂等。包括以上举例的试剂在内,适于本发明的药学可允许的载体及制剂详细记载于文献[Remington's Pharmaceutical Sciences,19th ed.,1995]中。

[0051] 对于根据一个具体例的细胞治疗剂或药学组合物而言,在根据本发明所属的技术领域中具备基本知识的人员所能够容易实施的方法,可利用药学可允许的载体和/或赋形剂予以制剂化,从而以单位容量形态制造或者内置于多容量容器内而制造。此时,剂型可以是油或水性介质中的溶液、悬浊液或乳化液形态或者粉末、颗粒、片剂或胶囊形态。

[0052] 并且,另一形态提供一种根据一个具体例的成纤维细胞集合体装载(loading)于生物分解性高分子支架的组织工程学用支撑体。

[0053] 如上所述,根据一个具体例的成纤维细胞可分泌上皮细胞生长因子、细胞外基质或血管内皮生长因子,因此能够以装载于支架的状态移植到需要它的个体而促进皮肤再生或血管新生。所述组织工程学用支撑体可以通过成型出生物分解性高分子而制造的支撑体中装载有成纤维细胞集合体的支撑体。

[0054] 所述生物分解性高分子在生物体内经过预定期间后自发徐缓分解,其可以包括具备有生物体适合性、血液亲和性、防钙化特性、细胞的营养成分及形成细胞间基质的功能中的一种以上的特性的高分子。这样的生物分解性高分子的种类在本发明中并不特别受限定,然而代表性地可以使用纤维蛋白、胶原、明胶、壳聚糖、藻酸盐(alginate)、透明质酸、葡聚糖、聚乳酸、聚羟基乙酸(poly(glycolic acid),PGA)、聚(乳酸-co-羟基乙酸)(poly(lactic-co-glycolic acid),PLGA)、聚- $\epsilon$ - (己内酯)、聚酞、聚原酸酯、聚乙烯醇、聚乙二醇、聚氨酯、聚丙烯酸、聚-N-异丙基丙烯酰胺、聚(环氧乙烷)-聚(环氧丙烷)-聚(环氧乙烷)共聚物、它们的共聚物、它们的混合物等。此时,复合支撑体中的生物分解性高分子的含量可根据支撑体的成型观点或者细胞集合体的装载观点而为5至99重量%含量。所述复合支撑体可根据现有的公知方法成型出生物分解性高分子而制造,所述公知方法例如包括:盐浸出法(solvent-casting and particle-leaching technique)、气体发泡法(gas forming technique)、将高分子纤维制造成无纺布而制造成高分子网孔(mesh)的方法(fiber extrusion and fabric forming process)、相分离法(thermally induced phase separation technique)、乳化冻结干燥法(emulsion freeze drying method)、高压气体膨胀法(high pressure gas expansion)等。

[0055] 如上所述地成型制造的支撑体将装载的细胞集合体传递到移植的组织内,并可起到使细胞三维地贴附生长而形成新组织的作用。此时,在细胞贴附生长于复合支撑体的方面,支撑体的孔隙大小和结构可能产生影响,为了使营养液可均匀渗透至支撑体内部而使细胞良好地生长,可具有孔隙相互连接(inter-connecting)的结构。而且,在所述支撑体中,孔隙可具有50至600 $\mu\text{m}$ 的平均直径。

[0056] 作为又一形态,提供一种包括根据一个具体例的成纤维细胞集合体的药物筛选用三维培养系统。

[0057] 所述三维成纤维细胞集合体具有仿真生物体内环境的人为细胞形态,其可在实际

的细胞形态及功能研究或治疗剂(例如,所述皮肤疾病或血管疾病)等中有效地使用。因此,对于包括所述三维成纤维细胞集合体的药物筛选用三维培养系统而言,在用于医药品或化妆品等的疾病治疗剂功效测试或者炎症及过敏测试等的实验中,可取代动物实验。

[0058] 作为又一形态,提供一种包括由成纤维细胞培养成的成纤维细胞集合体的体外(In vitro)三维皮肤真皮模型。

[0059] 作为另一形态,提供一种包括由成纤维细胞培养成的成纤维细胞集合体的药物(例如,MMP抑制剂或细胞内胶原的表达或活性增加剂)筛选用体外(In vitro)模型。

[0060] 作为另一形态,提供一种用于筛选体外三维皮肤真皮模型或者MMP抑制剂或细胞内胶原的表达或活性增加剂的体外模型制造方法,其包括如下的步骤:将成纤维细胞在培养容器中的液体培养基中培养,从而获得包含有因成纤维细胞从表面脱离而形成的成纤维细胞集合体(fibroblast cluster)的培养物,其中,所述培养容器具备涂覆有蛋白质的所述表面,所述蛋白质具有结合于成纤维细胞的活性,具有结合于所述成纤维细胞的活性的蛋白质以比成纤维细胞与成纤维细胞之间的结合更弱的方式结合于成纤维细胞;以及将源自所述培养物中的成纤维细胞集合体额外培养至少12个小时的。

[0061] 关于所述成纤维细胞集合体及其制造方法的内容,如同上面的记载。

[0062] 在一个具体例中,本说明书可提供包括由成纤维细胞培养成的成纤维细胞集合体的药物筛选用组合物或模型。所述药物可以是皮肤老化改善剂;炎症性疾病、关节炎或癌的治疗剂。因此,例如,包括由成纤维细胞培养成的成纤维细胞集合体的体外三维皮肤真皮模型可用于筛选皮肤老化改善剂;炎症性疾病、关节炎或癌的治疗剂。

[0063] 在一个具体例中,所述成纤维细胞集合体可表现出基于皮肤老化的病理学特性。例如,对于所述成纤维细胞集合体而言,胶原的表达或活性可处于减少的状态,或者基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase:MMP)的表达或活性可处于增加的状态。所述成纤维细胞集合体可额外地处于纤连蛋白的表达或活性减少的状态,或者处于弹性蛋白的表达或活性增加的状态。在本说明书中,所述表达或活性的减少或增加可表示如下的含义:比起正常细胞而言,或者比起以二维方式培养的成纤维细胞而言,所述提及的蛋白质或基因的表达或活性处于减少或增加的状态。所述胶原可包括胶原类型I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII或XIV。而且,所述MMP可包括MMP 1至28中的任意一种以上。

[0064] 如同在上文的背景技术中提到的那样,所述胶原的减少可引起皮肤组织中的纤维质成分合成及水分的损失、以及角质层的变化。而且,所述胶原可被MMP分解。因此,胶原的表达或活性减少的、或者MMP的表达或活性增加的根据一具体例的成纤维细胞集合体可在筛选用于改善皮肤老化的药物的方面有效地使用。例如,用于改善所述皮肤老化的药物可包括具有皮肤的保湿效果、弹力的增加、皱纹的减少及抗氧化活性的药物。并且,所述MMP可分解细胞外基质,并据此促进肿瘤转移及进展,基于此的胶原合成及分解可在癌转移中起到作用。而且,MMP在例如关节炎等炎症性疾病或者例如癌症转移等癌之类的病理学条件下过表达,这已被周知,将MMP作为靶的MMP抑制剂作为上述疾病的治疗剂而得到开发。因此,胶原的表达或活性减小的、或者MMP的表达或活性增加的根据一个具体例的成纤维细胞集合体可在筛选炎症性疾病、关节炎或者癌的治疗剂时效地使用。所述炎症性疾病可从如下的疾病构成的群中选择:皮肤炎、结膜炎、腹膜炎、牙周炎、鼻炎、中耳炎、咽喉炎、扁桃体炎、肺炎、胃溃疡、胃炎、克罗恩病、大肠炎、痔疮、痛风、强直性脊柱炎、风湿热、狼疮、纤维肌痛

(fibromyalgia)、银屑病关节炎、骨关节炎、风湿性关节炎、肩关节周围炎、肌腱炎、腱鞘炎、肌腱周炎、肌肉炎、肝炎、膀胱炎、肾炎、干燥综合征(sjogren's syndrome)、多发性硬化症、急性及慢性炎症疾病。而且,所述关节炎可以是骨关节炎或风湿性关节炎。所述癌治疗剂不仅包括抑制癌症本身的细胞增殖的物质,而且还可以包括用于抑制癌的转移的物质。

[0065] 由所述成纤维细胞到成纤维细胞集合体的培养可通过将所述成纤维细胞黏着于表面具有疏水性的培养容器而予培养并分化。具体而言,如果将所述成纤维细胞在表面具有疏水性的培养容器中黏着培养,则随着所述黏着的成纤维细胞的密度增加,成纤维细胞从培养容器中脱附,从而形成成纤维细胞集合体。并且,对于所述培养而言,在培养成成纤维细胞集合体之后,或者在形成成纤维细胞集合体之后,可额外地培养至少12个小时,或者至少1日以上,例如可以额外培养12小时至15日、1日至15日、3日至10日、3日至7日、或者5日至7日。适于所述培养的培养基作为成纤维细胞的培养和/或分化中通常使用的培养基,只要是含有血清或者无血清的就都可用,其不受限制。例如,可以使用DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)、Ham's F12、以及其混合物等中添加了血清的培养基。上述通过培养而形成细胞集合体的方法的详细内容将在后面说明。

[0066] 由根据一个具体例的成纤维细胞培养成的成纤维细胞集合体由于是三维地培养而成的,因此可以良好地仿真生物体内的环境,且由于包含细胞外基质,因此可作为体外皮肤真皮模型而有效地使用。在本说明书中,术语“皮肤真皮模型(skin dermis model)”(可以与人工真皮(dermal equivalent)互换使用)可表示将真皮组织或真皮的结构或形状模式化的模型,且可以表示为了阐明真皮内细胞之间的相互作用、与结构或形态关联性而考虑到的模型。

[0067] 作为另一形态,提供一种用于筛选使MMP的表达或活性降低的物质的方法,包括如下的步骤:对所述成纤维细胞集合体或体外三维皮肤真皮模型处理被检测物质;将所述被检测物质得到处理的成纤维细胞集合体或皮肤真皮模型的MMP的表达或活性的水平进行测量;将测量的MMP的表达或活性的水平与无处理对照组的水平进行比较;以及将使MMP的表达或活性相对于对照组而言减少的物质进行挑选。

[0068] 作为又一形态,提供一种用于筛选使胶原的表达或活性增加的物质的方法,包括如下的步骤:对所述成纤维细胞集合体或体外三维皮肤真皮模型处理被检测物质;将处理所述被检测物质的成纤维细胞集合体或皮肤真皮模型的胶原的表达或活性的水平进行测量;将测量的胶原的表达或活性的水平与无处理对照组的水平进行比较;以及将使胶原的表达或活性相对于对照组而言增加的物质进行筛选。

[0069] 在上述筛选方法中,被检测物质可以是如下的物质构成的组中选择的任意一种:低分子化合物、抗体、反义核苷酸、短干扰RNA(short interfering RNA)、短发夹RNA(short hairpin RNA)、核酸、蛋白质、肽、其他提取物及天然物。

[0070] 上述处理被检测物质的步骤可包括如下的步骤:使所述成纤维细胞集合体或体外三维皮肤真皮模型与被检测物质接触。所述接触例如可包括如下的步骤:在包含有一个以上的成纤维细胞集合体或体外三维皮肤真皮模型的各个孔中,注入包含有预定浓度的被检测物质的溶液。

[0071] 所述MMP或胶原的表达或活性水平测量可通过从由如下的方法组成的群中选择的任意一种方法测量:逆转录聚合酶连锁反应(Reverse Transcription-Polymerase Chain

Reaction, RT-PCR)、酶免疫分析法 (ELISA)、免疫组织化学、免疫印迹 (Western Blotting)、免疫沉降 (immunoprecipitation)、免疫荧光法 (immunofluorescence) 及流细胞分析法 (FACS)。并且,所述MMP或胶原的表达或活性水平的测量可包括对培养液中的分泌的MMP或胶原的含量的测量。所述培养液中胶原的含量测量可通过羟脯氨酸检测进行测量。

[0072] 将上述测量的MMP的表达或活性的水平与无处理对照组的水平进行比较,从而可以将促使MMP的表达或活性相对于对照组降低的物质作为MMP的表达或活性抑制剂物质或候选物质而进行挑选。所述促使MMP的表达或活性减少的物质或候选物质可以是皮肤老化改善剂或癌治疗剂。并且,可将所述测量的胶原的表达或活性的水平与无处理对照组的水平进行比较,从而将使胶原的表达或活性比对照组增加的物质作为胶原的表达或活性抑制剂物质或候选物质而进行挑选。所述促使胶原的表达或活性减少的物质或者候选物质可以是皮肤老化改善剂或癌治疗剂。

[0073] 在一个具体例中,对于由成纤维细胞培养成的成纤维细胞集合体而言,胶原的表达或活性处于减少的状态,或者MMP的表达或活性处于增加的状态,因此根据一个具体例的成纤维细胞集合体可有效地使用于筛选与胶原或MMP的表达或活性相关的物质。

[0074] 在另一具体例中,本说明书包括具有一个以上的孔的孔板,在所述孔中提供一个以上的播种所述成纤维细胞集合体的药物筛选装置。关于所述成纤维细胞集合体的内容,如同上面的记载。

[0075] 并且,提供一种药物筛选方法,包括如下的步骤:在所述药物筛选装置的各个孔中注入包含有候选物质的溶液;将包含有注入了所述候选物质的孔的孔板进行培养;从所述孔板收集所述成纤维细胞集合体,或者从所述孔板回收培养液;由所述收集到的成纤维细胞执行试验,或者由所述培养液执行试验。所述候选物质可以是相同或不同的候选物质。对于所述培养而言,本领域技术人员可确定任意的培养时间和温度。所述试验例如可包括:由所述培养液使用ELISA的MMP分泌试验;或者由所述成纤维细胞集合体进行的免疫印迹方法;或者使用到免疫组织化学染色的ECM分泌试验。

[0076] 有益效果

[0077] 根据基于一个形态的成纤维细胞集合体或者其制造方法,具有如下的技术效果:可在培养容器中短时间内容易地获取大量的三维成纤维细胞集合体,并可围绕于细胞外基质的三维成纤维细胞集合体作为细胞源而以无纤维细胞损伤的方式利用注射制剂移植到生物体内。

[0078] 根据另一形态的体外三维皮肤真皮模型及利用其筛选药物的方法则具有如下的技术效果:由于由三维细胞集合体构成,因此能够理想地模仿具有结构性、功能性方面的复杂性的皮肤的生物体内环境,不仅如此,可将包括MMP或胶原的与细胞外基质相关的物质高速 (high-throughput) 筛选。

## 附图说明

[0079] 图1为示意性图示根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体的制作过程的图。

[0080] 图2是将根据一个具体例的成纤维细胞的细胞黏着率根据蛋白质量而予以定量化的图表。

[0081] 图3为表示根据一个具体例的成纤维细胞的细胞形态荧光染色照片的图。

- [0082] 图4为表示根据一个具体例的成纤维细胞的FAK的磷酸化活性的图。
- [0083] 图5为表示根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体的形成照片的图。
- [0084] 图6为表示根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体的形成照片的图。
- [0085] 图7为表示根据一个具体例的三维成纤维细胞集合的H&E染色结果的图。
- [0086] 图8为表示根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体的第一型胶原免疫荧光学染色结果的图。
- [0087] 图9为表示根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体的VEGF分泌量的图。
- [0088] 图10是用显微镜观察根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体的形成过程的照片。
- [0089] 图11为表示根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体的细胞外基质相关基因的相对表达量的图表。
- [0090] 图12为表示将根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体的胶原含量用羟脯氨酸试验进行测量的结果的图表。
- [0091] 图13为表示将根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体的胶原I型表达量用免疫染色进行测量的结果的图。
- [0092] 图14为表示将根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体的胶原I型表达量用免疫印迹试验进行测量的结果的图。
- [0093] 图15为表示根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体的MMP 1表达量及分泌量的图表。
- [0094] 图16为表示对根据一个具体例的对三维成纤维细胞集合体处理MMP1抑制剂之后的细胞的MMP1分泌量的图。
- [0095] 图17为表示为了诱导MMP1过表达而照射了紫外线的、在二维培养的成纤维细胞中处理MMP1抑制剂之后的细胞的MMP1分泌量的图。
- [0096] 图18为示意性图示根据一个具体例的包含三维成纤维细胞集合体的药物筛选装置及使用该装置筛选药物的方法的图。

### 具体实施方式

- [0097] 以下,对本发明的实施例进行更加详细的说明。然而,这些实施例仅用于示例性地说明本发明,本发明的范围并不局限于这些实施例。
- [0098] 实施例1:三维成纤维细胞集合体的形成及其特性分析
- [0099] 在本实施例中,将成纤维细胞在培养容器中培养,从而形成了三维成纤维细胞集合体,所述培养容器具备涂覆有蛋白质的表面,所述蛋白质具有与成纤维细胞结合的活性。
- [0100] 图1为示意性地表示根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体的制作过程的图。
- [0101] 参考图1进行说明。将成纤维细胞播种到涂覆有MBP-FGF2的培养容器。然后,成纤维细胞在培养容器表面以二维方式被培养并脱附,且脱附或脱离的二维成纤维细胞集合体在培养容器中以浮游的状态被继续培养,从而在1日后开始形成三维成纤维细胞集合体。确认了如下的事实:根据一个具体例而形成的三维成纤维细胞集合体具有细胞外基质和血管内皮生长因子(VEGF)分泌功能。以下,对图1所示三维成纤维细胞集合体的形成过程及特性分析方法以及结果进行说明。

[0102] (1) 成纤维细胞的细胞黏着特性及黏着后形态变化分析

[0103] 为了构建诱导形成三维成纤维细胞集合体的培养方法,对成纤维细胞的细胞黏着特性、基于黏着基质的细胞黏着信号及细胞形态进行了分析。

[0104] (1.1) 成纤维细胞的细胞黏着分析

[0105] 在非-组织细胞培养用96-孔板(Non-Tissue Culture Treated 96-well Plate;"NTCP";表面因聚苯乙烯材质而呈现疏水性;Falcon公司)分别将ECM纤连蛋白(fibronectin) (20 $\mu$ g/ml)、MBP(10 $\mu$ g/ml)、MBP-VEGF(10 $\mu$ g/ml)、MBP-HBD(100 $\mu$ g/ml)以及MBP-FGF2(10 $\mu$ g/ml)涂覆4小时,然后用PBS洗涤了3次。然后,利用100 $\mu$ g/ml BSA而密闭1小时,并用PBS洗涤了3次。针对每1孔 $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>的成纤维细胞而在无血清DMEM培养基中悬浮,然后分别播种到涂覆有蛋白质的96孔板,从而在37 $^{\circ}$ C培养基中溶解给定的1小时,然后观察了细胞的形态。利用细胞溶解缓冲物将黏着的细胞溶解,然后借助于BCA(bicinchoninic acid)试验而测量蛋白质,从而将黏着的细胞定量。

[0106] 图2为将根据一个具体例的将成纤维细胞的细胞黏着率基于蛋白质的量而定量化的图表。

[0107] 如图2所示,在利用BSA、MBP及MBP-VEGF涂覆的NTCP中没有出现细胞黏着。另外,在利用MBP-FGF2进行涂覆的NTCP中,在细胞播种之后过了一个小时后,表现出比与细胞膜的整合素结合的ECM-纤连蛋白而言更低的黏着率。

[0108] (1.2) 基于成纤维细胞的黏着基质的细胞形态分析

[0109] 在上述实施例1的(1.1)中,为了比较分别用纤连蛋白和MBP-FGF2涂覆的NTCP中培养的成纤维细胞的细胞形态,而将黏着之后经过30分钟、1小时、4小时的成纤维细胞利用鬼笔环肽(palloidin)进行了染色。

[0110] 图3为表示根据一个具体例的成纤维细胞的细胞形态荧光染色照片的图。

[0111] 如图3所示,可以确认黏着于MBP-FGF2的成纤维细胞比起黏着于纤连蛋白的成纤维细胞而言,细胞骨架并未激活。这意味着黏着于MBP-FGF的成纤维细胞的黏着比黏着于纤连蛋白的成纤维细胞而言,将作为存在于细胞膜的细胞黏着分子的整合素(integrin)作为媒介的细胞黏着活性受限。

[0112] (1.3) 基于成纤维细胞的黏着基质的细胞黏着信号分析

[0113] 在所述实施例1的(1.1)中,为了比较分别用纤连蛋白和MBP-FGF2涂覆的NTCP中培养的成纤维细胞的细胞黏着信号,测量了黏着斑激酶(focal adhesion kinase;FAK)的磷酸化。为了测量FAK的磷酸化,针对黏着后经过30分钟、1小时、4小时的成纤维细胞而利用抗磷酸化-FAK-抗体(Cell signalling公司)而执行了免疫印迹分析。

[0114] 图4为表示根据一个具体例的成纤维细胞的FAK的磷酸化活性的图。

[0115] 如图4所示,可以确认,黏着于MBP-FGF2的成纤维细胞比起黏着于纤连蛋白的成纤维细胞而言,FAK的磷酸化未得到激活。这意味着在黏着于MBP-FGF2的成纤维细胞中将整合素作为媒介的细胞黏着活性较低。

[0116] (2) 三维成纤维细胞集合体的形成

[0117] 基于实施例1的(1.1)至(1.3)的结果,构建了用于形成三维成纤维细胞集合体的培养方法。

[0118] 针对成纤维细胞,将用含有高浓度葡萄糖DMEM培养基(FGM培养基)的MBP-FGF2涂

覆的聚苯乙烯表面可移动的12、24、48及96-孔NTCP的各个孔中以 $0.5 \times 10^4$ 细胞/cm<sup>2</sup>至 $1.5 \times 10^5$ 细胞/cm<sup>2</sup>的细胞浓度进行播种,然后在37°C的静置培养基中分别培养了1、2、3日。在培养初期,以片形态存在的成纤维细胞随着时间的经过而从培养表面脱附,从而在1日之后开始以细胞体形式存在,于是可以在没有胰蛋白酶之类的酶处理的情况下借助于移液器而容易回收。

[0119] 图5为表示根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体的形成照片的图。

[0120] 如图5所示,可确认在利用FGM进行培养时,在 $1.25 \times 10^5$ 细胞/cm<sup>2</sup>以上的细胞浓度下诱导高效的三维成纤维细胞集合体的形成。在更低的细胞浓度下,为了细胞-细胞间相互作用而所需的细胞间的距离没有充分靠近,因此细胞集合体可能无法良好地形成。在并非FGM的培养基中,细胞集合体虽然形成,然而可能需要比在FGM的细胞集合体形成浓度更高的条件。

[0121] 图6为表示根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体形成照片的图。

[0122] 如图6所示,可确认,根据孔大小,在用MBP-FGF2涂覆的表面中形成可通过肉眼检测的400至1000 $\mu$ m以上大小的三维球形细胞集合体。

[0123] (3) 三维成纤维细胞集合体的分泌功能分析

[0124] (3.1) 细胞外基质 (ECM) 分泌功能分析

[0125] 在实施例1的(2)中,在用多样的种类的MBP-FGF2涂覆的孔--NTCP(12、24、48、96-孔)中以 $1.25 \times 10^5$ cells/cm<sup>2</sup>的细胞浓度播种而形成三维细胞集合体,并利用PBS洗涤数次,且将4%多聚甲醛在室温下处理30分钟而予以固定化。然后,利用多样的浓度的乙醇(50~100%)而脱水,然后利用石蜡进行了包埋。针对制造的石蜡块,利用超薄切片机而以4 $\mu$ m厚度切割,并固定于载玻片,然后执行了H&E染色及针对纤连蛋白和胶原1型的免疫学染色。胶原1型的染色执行了荧光免疫染色。在上述处理中,首先将制备的载玻片在BSA(4%)中处理了1小时,然后浸泡在包含有一次抗体的PBS中而彻夜反应,然后用PBS洗涤了3次,再将其在暗室中与二次抗体反应1小时。在利用DAPI而额外执行核染色之后,利用共聚焦显微镜进行了分析。对照组并未使用一次抗体而执行了相同的处理,并进行分析。

[0126] 图7为表示对根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体进行H&E染色的结果的图。

[0127] 如图7所示,可确认,在培养1日后在所有孔中以相同的浓度处理的成纤维细胞形成了细胞集合体。

[0128] 图8为表示根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体的第一型胶原免疫荧光学染色结果的图。

[0129] 如图8所示,可确认胶原在三维成纤维细胞集合体内得到全面染色,据此可知形成细胞集合体时大量分泌胶原。

[0130] (3.2) 血管内皮生长因子 (VEGF) 分泌量分析

[0131] 在实施例1的(2)中,将以 $1.25 \times 10^5$ cells/cm<sup>2</sup>细胞浓度用MBP-FGF2涂覆的96-孔NTCP进行播种而形成三维细胞集合体回收,从而测量了血管内皮细胞生长因子(VEGF)分泌量。

[0132] 具体而言,将形成的三维细胞集合体以10个为单位聚集而转移到6-孔NTCP,然后用PBS洗涤了1次。额外地,利用不含有FBS的alpha MEM(Lonza公司)洗涤了1次,然后投入alpha MEM(1.5mL),并在静置培养基中培养了1日。然后,每当到了预先设定的日期则收取

培养液,并投入了新的培养液。利用ELISA套件(R&D公司)对收取的培养液内存在的VEGF进行了定量。套件使用方法则根据供应公司的方案进行。图9为表示根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体的VEGF分泌量的图。

[0133] 图9为表示根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体的VEGF分泌量的图。

[0134] 如图9所述,可知三维成纤维细胞集合体比起以二维方式培养的细胞而言,VEGF量增加了两倍以上。

[0135] 实施例2:体外(In vitro)三维人工真皮模型的制造及其特性分析

[0136] (1) 体外三维人工真皮模型的制造

[0137] 为了制造体外三维人工真皮模型,首先培养了成纤维细胞。具体而言,针对人类真皮成纤维细胞,利用组织培养圆底烧瓶而在37°C、5%CO<sub>2</sub>及95%O<sub>2</sub>的大气条件下用高葡萄糖达尔伯克改良伊格尔培养基(high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium)(DMEM;Weljen;韩国大邱)进行了培养。将传代数5的人类真皮成纤维细胞应用于所有实验。

[0138] 然后,用于成纤维细胞的三维培养的培养容器以如下方式制作。在非-组织细胞培养用96-孔板(Non-Tissue Culture Treated 96-wellPlate,"NTCP";由聚苯乙烯材料形成且表面呈现疏水性;Falcon公司)中将MBP(麦芽糖结合蛋白质)-FGF(成纤维细胞生长因子)(20μg/ml)在常温下涂覆了4小时。然后,用PBS洗涤了3遍,从而去除了没有结合的MBP-FGF。关于所述培养容器的详细的制造方法记载于韩国公开专利第10-2010-0122778号,所述文献的全部作为参考而包含于本说明书。

[0139] 在所述培养容器播种所述成纤维细胞而制造了三维成纤维细胞集合体。具体而言,以每1孔 $1.25 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>的浓度将成纤维细胞播种到成纤维细胞生长培养基(FGM,Lonza)中的所述96孔板,并在37°C下培养。成纤维细胞在培养容器表面以二维方式得到培养并脱附,且脱附或脱离的二维成纤维细胞集合体在培养容器中以浮游状态继续得到培养,从而在24小时以内自发形成三维成纤维细胞集合体。将形成的三维成纤维细胞集合体在培养第一日(1day)、第三日(3day)及第五日(5day)分别收集,并将黏着性成纤维细胞的三维成纤维细胞集合体的形成过程用相位差显微镜(Carl Zeiss;德国)进行了观察,其结果示于图10。以下,将所述三维成纤维细胞集合体表示为“3DCM”。

[0140] 并且,作为比较例,以二维方式培养了所述成纤维细胞。具体而言,在组织细胞培养用96-孔板(TCP)中接种每孔对应 $1.25 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>的脂肪干细胞,然后在成纤维细胞生长培养基(FGM,Lonza)中进行了培养,为了与所述三维细胞集合体相同地进行人工真皮模型特性分析,在培养第一天(1day)、第三天(3day)及第五天(5day)收集了细胞。以下,将所述以二维方式培养的细胞表示为“2D”。

[0141] 图10是用显微镜观察根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体的形成过程的照片。

[0142] 如图10所示,可确认,形成了肉眼可检测的400至1000μm以上大小的三维球形细胞集合体。

[0143] (2) 体外三维人工真皮模型的特性分析

[0144] 为了对如上所述地制作的三维成纤维细胞集合体的作为人工真皮模型的特性进行分析,执行了如下的实验。

[0145] (2.1) 三维成纤维细胞集合体的细胞外基质 (ECM) 基因表达分析

[0146] 为了对作为细胞外基质相关基因的胶原、纤连蛋白及弹性蛋白的基因表达量进行分析,使用了qRT-PCR(Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction)。

[0147] 具体而言,在不同的时间(第一天、第三天及第五天)使用Qiagen miniprep套件(Qiagen Inc;美国)而根据制造公司的指示从3DCM和2D提取了总RNA。将提取的RNA溶解于核酸酶-无添加水中,并使用NanoDrop ND1000分光光度计(Thermo Fisher Scientific)而将RNA浓度进行了定量化。使用Maxime RT PreMix (iNtRon;韩国)而根据制造公司的指示执行互补DNA合成。所有靶引物序列均从Bioneer(韩国)购入。使用ABI Prism 7500(Applied Biosystems)而执行了所有聚合连锁反应,使用SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa;日本)而定量化了基因表达水平。使用相对Ct方法(comparative Ct method)而计算了相对基因表达水平,其结果示于图11。

[0148] 图11为表示根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体的细胞外基质相关基因的相对表达量的图表。

[0149] 如图11所示,可确认胶原1型和纤连蛋白的表达量比2D而言在3DCM中几乎低了3倍左右,对于弹性蛋白而言,表达量比起2D而言在3DCM中有所增加。尤其,对于弹性蛋白而言,培养第一日的2D与3DCM的表达量类似,然而从培养第三日开始有显著增加。由于上述结果,根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体模拟了胶原和纤连蛋白的表达减少,且弹性蛋白的表达增加的皮肤真皮的环境而可知能够将其有效地使用于将其作为靶的物质的开发中。

[0150] (2.2) 三维成纤维细胞集合体的胶原表达量分析

[0151] 为了分析三维成纤维细胞集合体的胶原,执行了羟脯氨酸试验(hydroxyproline assay)、免疫染色及免疫印迹。

[0152] 具体而言,为了羟脯氨酸试验,使用RIPA缓冲器(Sigma-Aldrich)而在不同的时间(第一日、第三日及第五日)收集了2D、3DCM( $3 \times 10^6$ 细胞),并在120°C下历时3小时执行了借助12N HCl溶液的水解。试验通过使用羟脯氨酸试剂套件(Sigma-Aldrich)而根据制造商的指示进行。吸光度则使用Multiskan(Thermo)而在560nm下测量,其结果示于图12。

[0153] 为了免疫染色而将在不同的时间收集的所述3DCM和2D用PBS洗涤了三遍,并用4% PFA固定化30分钟。然后,包埋于OCT化合物(optimal cutting temperature compound)(TISSUE-TEK<sup>®</sup> 4583;Sakura Finetek USA, Inc.),并在-28°C下冻结,且以6 $\mu$ m厚度切割。为了避免非特异性结合,将切片在常温下在BSA(4%)中培养1小时。然后,在4°C下利用针对胶原I的一次抗体(Rabbit, Abcam)而培养一夜。然后,利用PBS洗涤了试料,并用1%BSA内的相应的荧光共轭二次抗体(Donkey anti-rabbit)(Life Technologies)历时1小时而在常温下进行了培养。并且,将DAPI(4,5-二氨基-2-苯基吡啶)(Vector Laboratories)使用于核染色。对照组则在相同的条件下以无一次抗体的方式执行,并利用共聚焦显微镜(CarlZeiss)观察,其结果示于图13。

[0154] 为了进行免疫印迹,将通过与如上所述的方法相同的方法培养的细胞与蛋白酶抑制剂混合物(protease inhibitor cocktail)一起以RIPA缓冲物(Sigma-Aldrich)进行了可溶化。然后,将所述溶解物在4°C温度下历时30分钟而以15,000g离心分离,并稀释到包含有2%SDS和5%(v/v)2-巯基乙醇的Laemmli试料,且在90°C下历时5分钟进行了加热。针对蛋白质,与10%分离胶(resolving gel)的使用一起用SCD-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-

PAGE)进行了分离,并移置于硝化纤维膜(Bio-Rad;美国)。针对所述膜,与胶原I型(Coll1a1, Boster Bio CO.Ltd)和 $\beta$ -肌动蛋白(Santan Cruz Biotechnology)相关一次抗体一起在4 $^{\circ}$ C下培养了一夜。为了检测,将所述膜在常温下历时1小时而与过氧化物酶-共轭抗体(Santa Cruz Biotechnology)一起进行了培养。利用图像分析器(LSA3000,Fujifilm)形成化学发光图像而执行了扫描,其结果示于图14。

[0155] 图12为表示通过羟脯氨酸试验测量出根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体的胶原含量的结果的图表。

[0156] 图13为表示通过免疫染色测量出根据一个具体例的成纤维细胞集合体的胶原表达量的结果的图。

[0157] 图14为表示通过免疫印迹法测量出根据一个具体例的成纤维细胞集合体的胶原表达量的结果的图。

[0158] 如图12所示,可确认由3DCM分泌的总胶原量随着培养时间的变长而增加,且可以确认比起2D而言有所减少。可知上述结果与所述实施例2的(2.1)的结果一致。

[0159] 而且,如图13所示,在3DCM中培养的期间内胶原I型染色减少,相反地在2D中却并不减少。上述结果表示胶原I型在三维培养系统内在培养的期间内分解。

[0160] 并且,如图14所示,可确认,与图12的结果一致地,在3DCM中培养的期间内胶原I型片段化,相反在2D却并不是那样。

[0161] 基于上述结果,可知,根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体中胶原的表达减少,从而能够在促使胶原的含量增加的候选物质的筛选中有效地使用。

[0162] (2.3) 三维成纤维细胞集合体的MMP表达分析

[0163] 为了三维成纤维细胞集合体的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase: MMP)1的表达分析,执行了RT-PCR。RT-PCR以与所述实施例2的(2.1)相同的方法得到执行,其结果示于图15a。

[0164] 而且,为了分析总MMP-1的分泌量,执行了ELISA。具体而言,将培养基从2D、3DCM中分别在不同的时间(第一天、第三天及第五天)制造。试验则使用Quantikine ELISA人类总MMP 1套件(R&D System)而根据制造商的指示执行。吸光度则使用Multiskan(Thermo)而在560nm下测量,其结果示于图15b。

[0165] 图15为表示根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体的MMP1表达量及分泌量的图表。

[0166] 如图15所示,可以确认在3DCM中MMP1基因的表达量比2D而言显著增加。并且,如同ELISA分析那样,MMP1的分泌量也在3DCM中比起2D而言显著增加。基于上述结果,可知根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体处于MMP的表达显著增加的状态,因此可将其有效地用于将其作为靶的物质的开发中。

[0167] (3) 利用三维成纤维细胞集合体的MMP抑制剂的抑制功能评估

[0168] 在本实施例中,为了额外地确认所述三维成纤维细胞集合体是否可使用于MMP抑制剂的筛选,对目前已知的MMP抑制剂进行了处理,从而确认了MMP的分泌量。

[0169] 具体而言,在所述实施例2的(1)中制作的培养第一日的三维成纤维细胞集合体中接种了稀释到成纤维细胞生长培养基(Fibroblast Growth Media,FGM,Lonza公司)的维甲酸(retinoic acid)(10mM)、松香酸(Abietic acid)(100mM)、变形生长因子- $\beta$ 1

(Transforming Growth Factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) (5ng/ml)。然后,额外地,在37°C下置放2日、4日之后,在静置培养基中培养,然后将培养液回收,从而测量了基质金属蛋白分解酶-1 (matrix metalloproteinase-1, MMP1) 的分泌量。测量则利用了ELISA套件 (R&D公司) 进行定量,使用方法则根据供应商的方案进行,其结果示于图16。

[0170] 作为三维成纤维细胞集合体的对照组,为了利用以二维方式培养的成纤维细胞的MMP抑制剂的抑制功能进行比较,使用了照射紫外线B的成纤维细胞。具体而言,在组织细胞培养用6-孔板 (Tissue culture treated 6-well plate) 中以 $2.5 \times 10^5$  细胞/cm<sup>2</sup> 细胞浓度将悬浮的成纤维细胞播种到高浓度葡萄糖DMEM培养基,然后在37°C静置培养基中培养了1日。然后,用PBS反复洗涤了3次,并投入无血清MEM培养基,且在37°C静置培养基中历时1小时培养。另外,利用PBS反复洗涤了3次,然后为了诱导MMP1的过表达而照射了紫外线B (20mJ/cm<sup>2</sup>)。在照射紫外线之后,接种了稀释到成纤维细胞生长培养基 (Fibroblast Growth Media, FGM, Lonza公司) 的多种浓度的维甲酸 (2, 10, 40mM)、松香酸 (20, 100, 400mM)、TGF- $\beta$ 1 (1, 5, 20, ng/ml), 然后额外地在37°C下在静置培养基中培养了2日,然后将培养液回收,从而测量出MMP1分泌量。测量则利用ELISA套件 (R&D公司) 而定量化,使用方法则按照供应商的方案而进行,其结果示于图17。

[0171] 图16为表示对根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体处理了MMP1抑制剂之后的细胞的MMP1分泌量的图。

[0172] 图17为表示对为了诱导MMP1过表达而照射了紫外线的、以二维方式培养的成纤维细胞处理了MMP1抑制剂之后的细胞的MMP1分泌量的图。

[0173] 如图16所示,对于没有处理MMP1抑制剂的成纤维细胞集合体而言,随着培养时间经过2、4日,MMP1的分泌量分别增加了2.1倍、2.4倍。相反地,对于处理了维甲酸和松香酸的成纤维细胞而言,相对于对照组而言分别表现出约为80%、81%的分泌量,处理了TGF- $\beta$ 1的组的分泌量则表现为60%左右。

[0174] 如图17所示,以二维方式培养的照射了紫外线B的成纤维细胞比起未照射的成纤维细胞而言大致表现出高出1.3倍左右的MMP1分泌量。然而,处理了维甲酸的成纤维细胞则比对照组而言MMP1分泌量约减少为30%,且与TGF- $\beta$ 1处理组比较时,根据处理量而减少为25~35%。尤其,对于处理了松香酸的成纤维细胞而言,在20mM处理时减少了约一半的分泌量,然而对于处理了100mM以上的情形而言,却比起对照组而言表现出约为2%的分泌量。与利用3DCM评估的结果相比,抑制剂处理时分泌量减少的倾向相同。然而,相比2D的MMP抑制剂的对照组而言减少的幅度与3DCM相比而言,维甲酸处理组表现为高出2.7倍,TGF- $\beta$ 1表现为高出1.7至2.4倍,松香酸表现为高出1.7至40倍。

[0175] 基于上述结果,对于2D而言,对于药物的细胞的灵敏度显著高,因此不适合于药物筛选,并可知3DCM能够在包含MMP抑制剂的药物的筛选中有效地使用。

[0176] 图18是将包含根据一个具体例的三维成纤维细胞集合体的药物筛选装置及利用该装置而筛选药物的方法示意性地表示的图。参考图18而进行说明。提供一种如下的药物筛选装置,包括具有一个以上的孔的孔板,所述孔中播种有根据一个以上的具体例的三维成纤维细胞集合体。所述三维成纤维细胞集合体中,各个细胞集合体可分别包括 $3.0 \times 10^5$  至 $1.0 \times 10^6$  个的细胞。并且,细胞集合体的直径可以是300至2000 $\mu$ m,形状则可以是球形 (包括球体) 或片状。所述药物即候选物质相关内容如上文所述。并提供一种如下的药物筛选方

法,包括如下的步骤:将包含候选物质的溶液注入到所述药物筛选装置的各个孔;将包含有上述注入了候选物质的孔的孔板进行培养;从所述孔板收集所述三维成纤维细胞集合体,或者从所述孔板中回收培养液;由所述收集的成纤维细胞执行试验,或者由所述培养液执行试验。所述候选物质可以是相同或不同的候选物质。关于所述培养,本领域技术人员可任意地确定培养时间和温度。所述试验例如可包括由所述培养液使用ELISA的MMP分泌试验、或者由所述三维成纤维细胞集合体使用免疫印迹方法或免疫组织化学染色的ECM分泌试验。

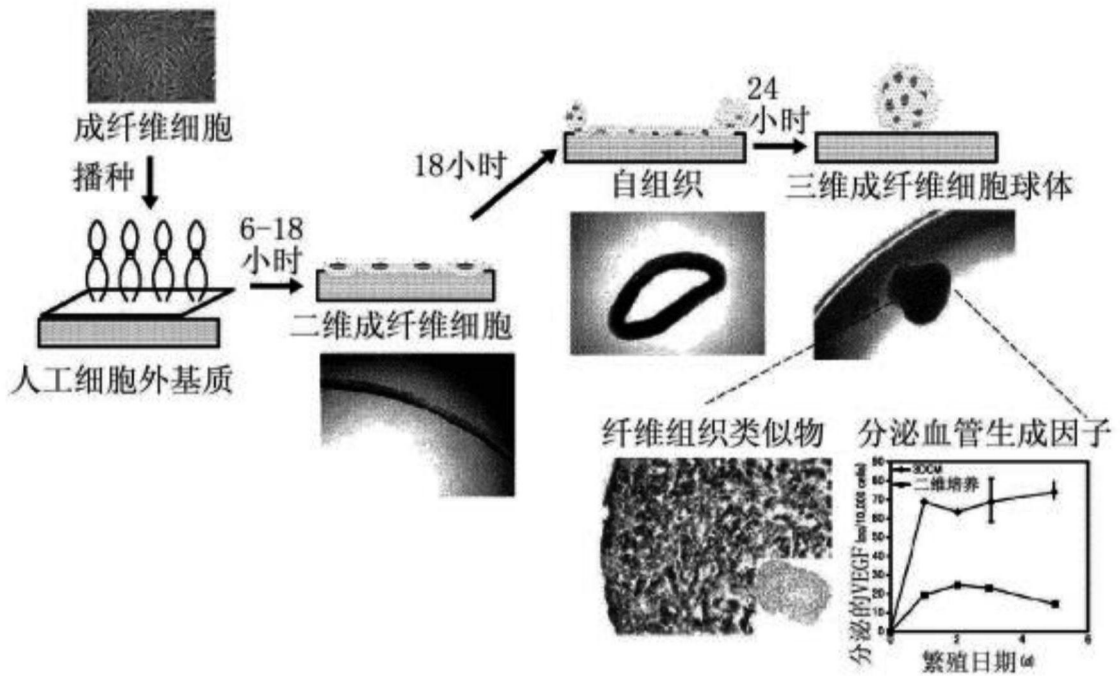


图1

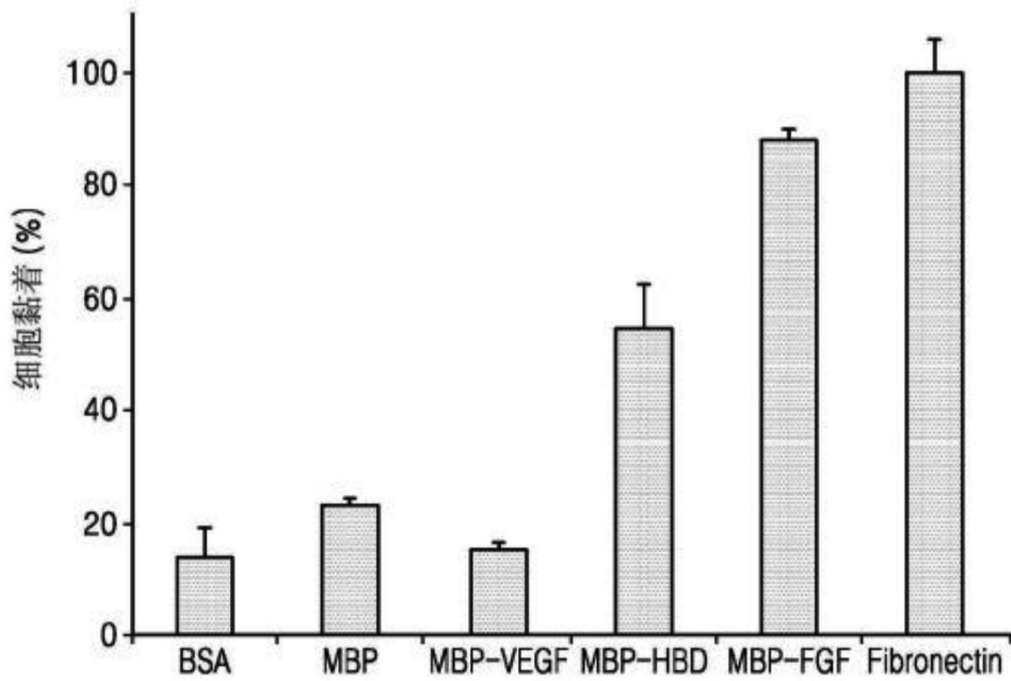


图2

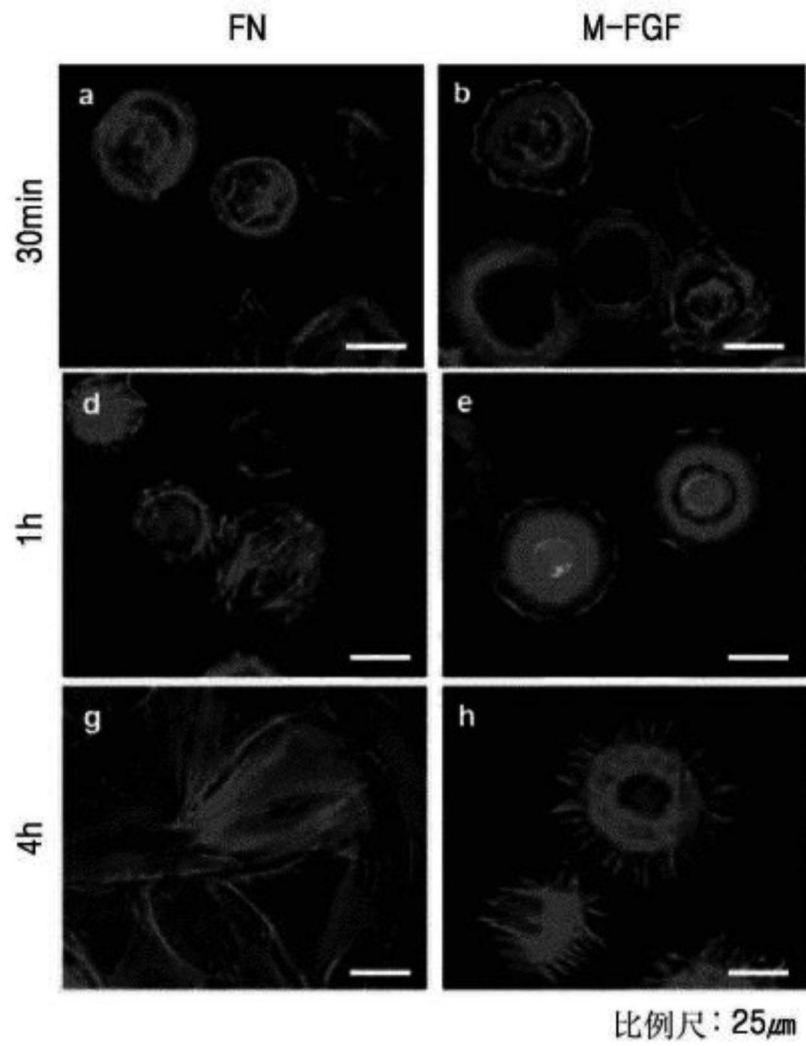


图3

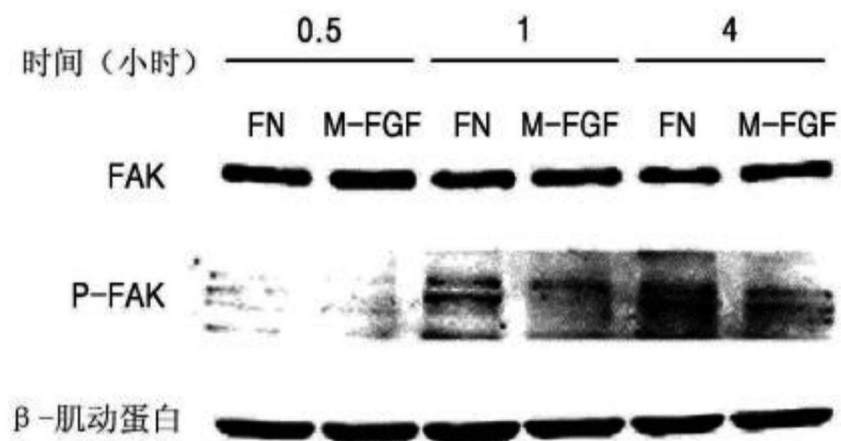


图4

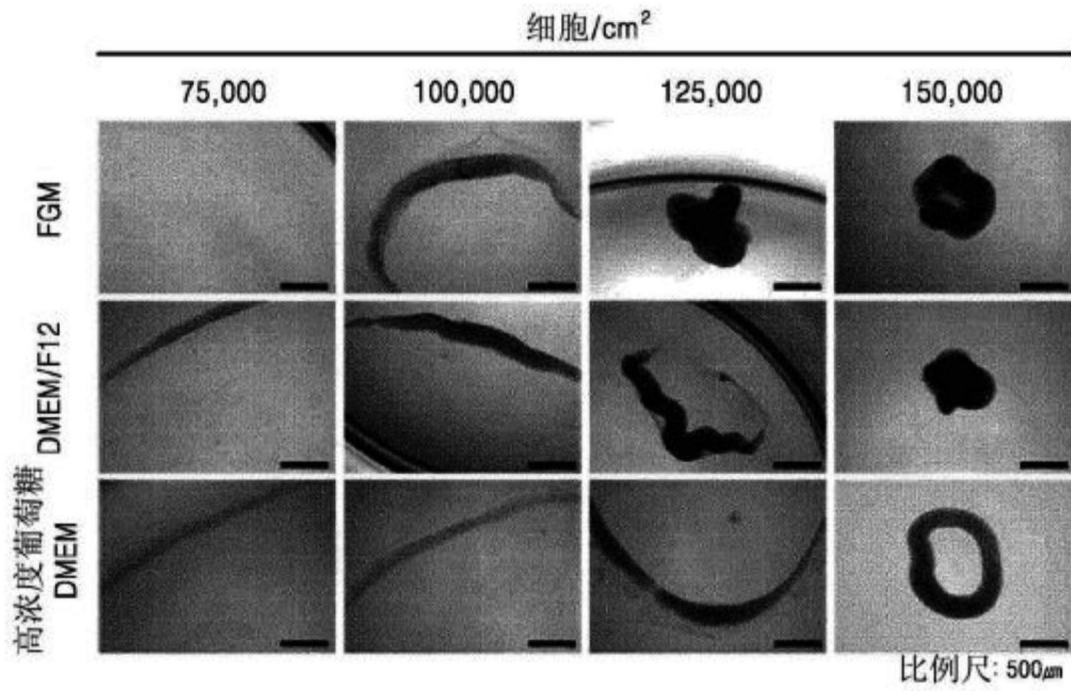


图5

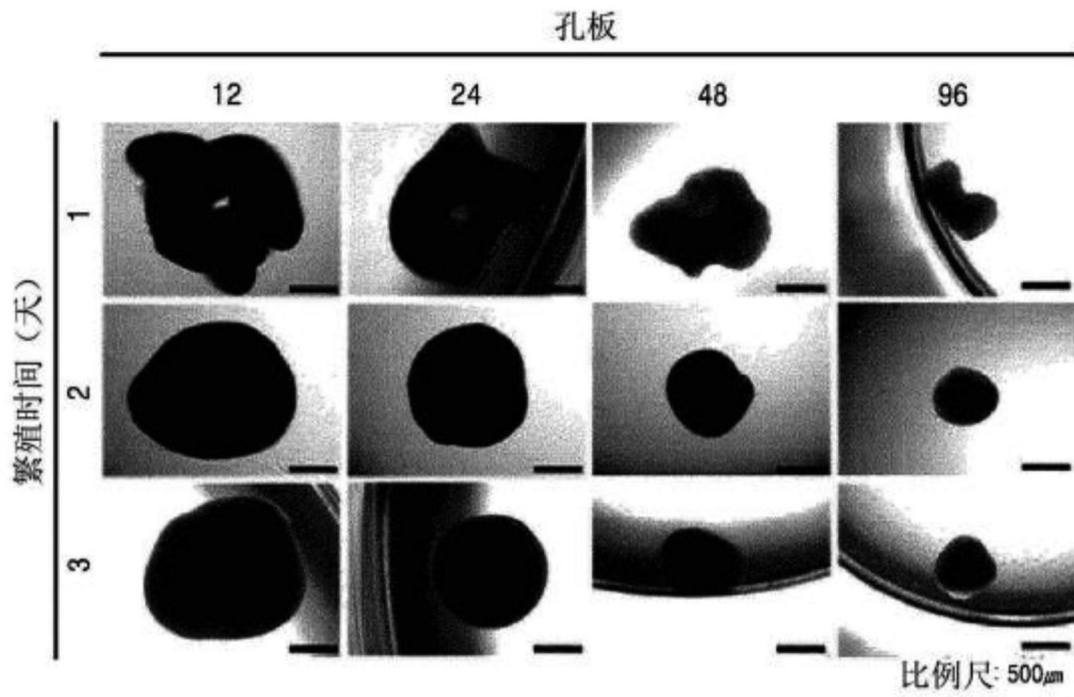


图6

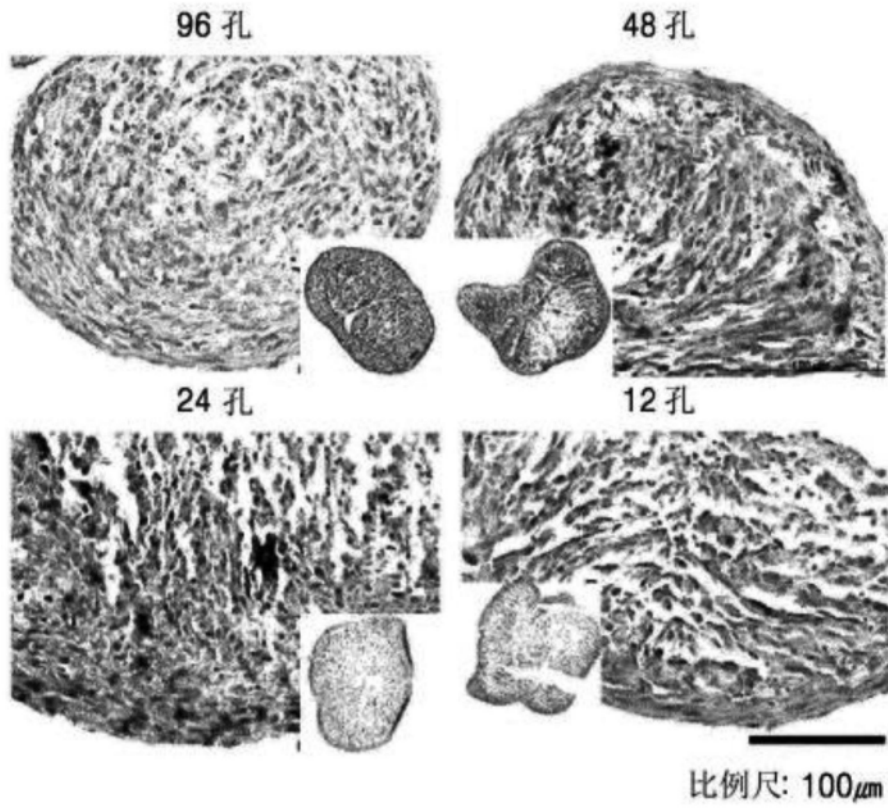


图7

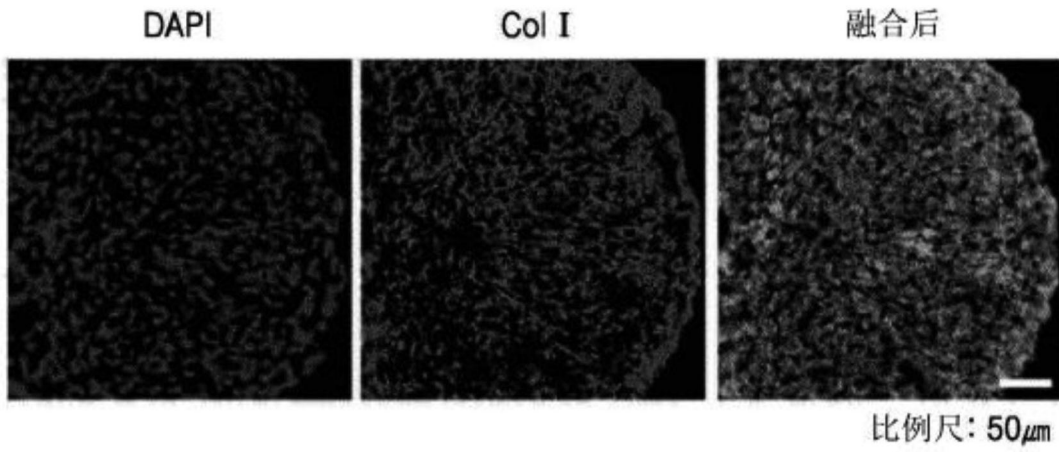


图8

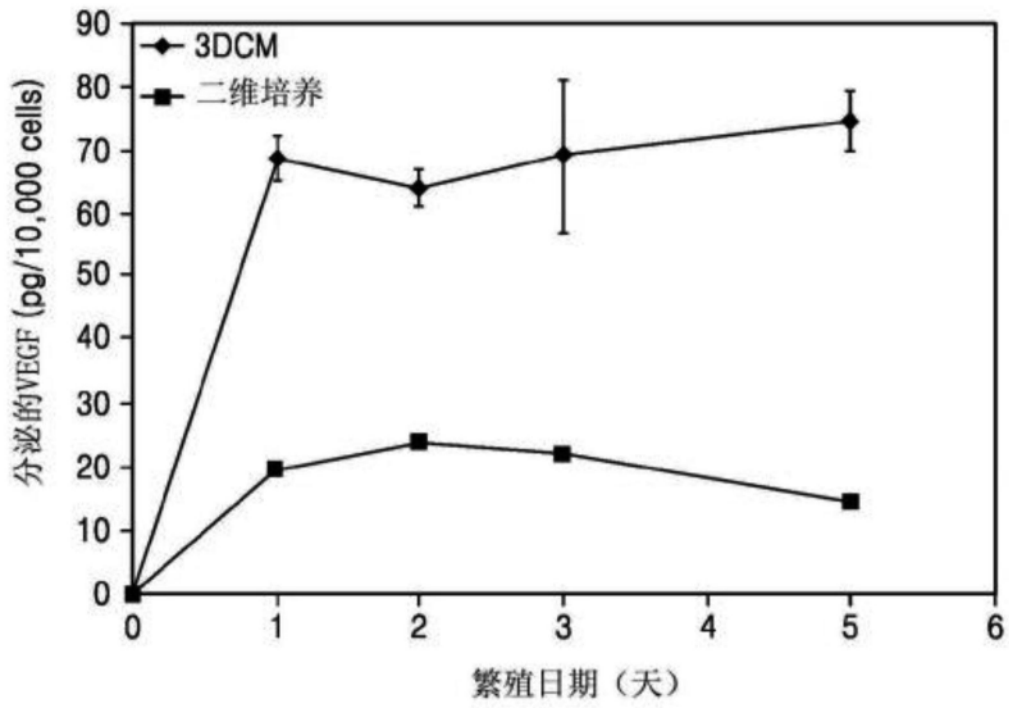


图9

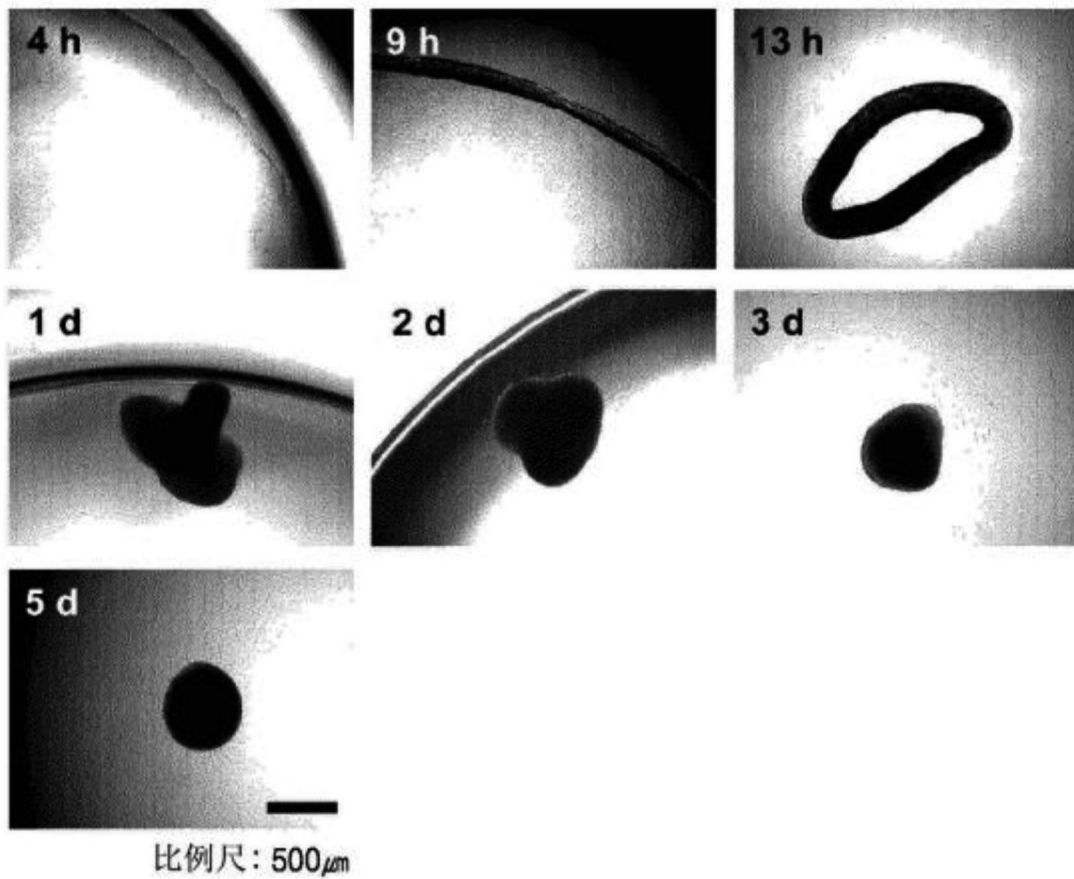


图10

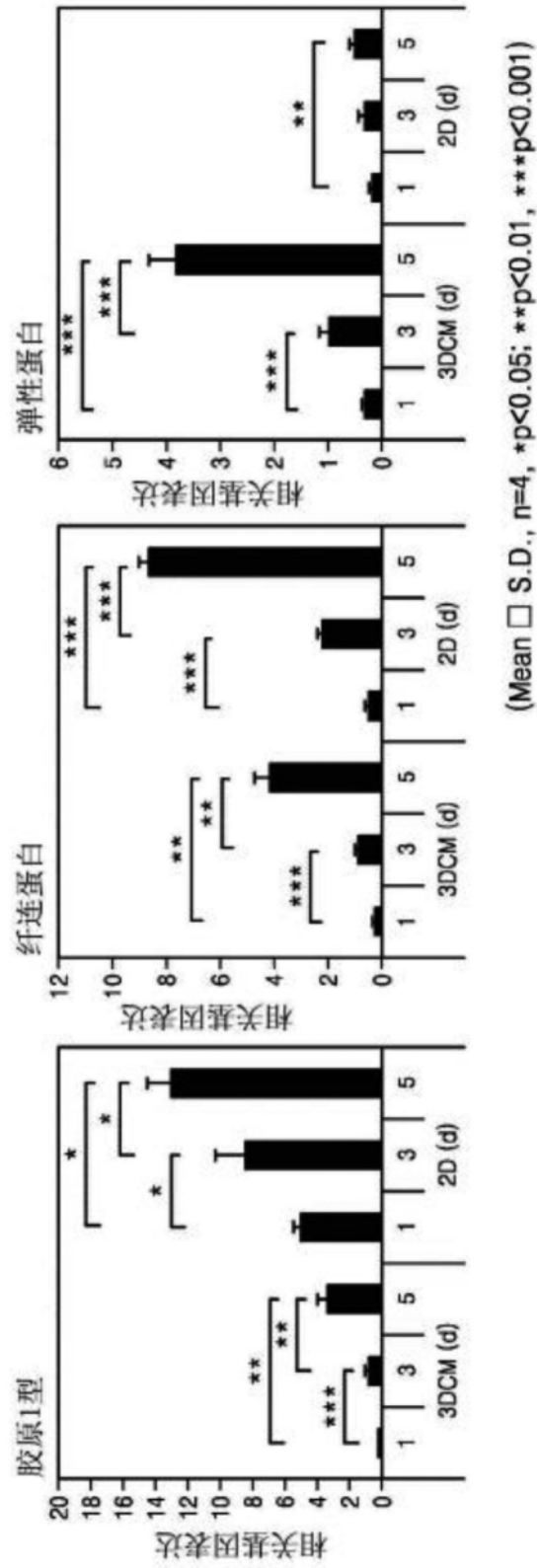


图11

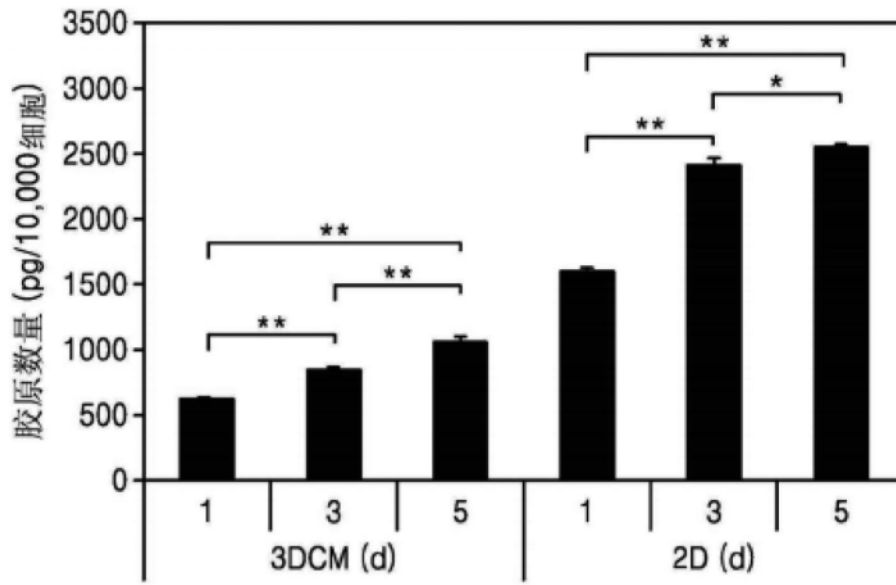


图12

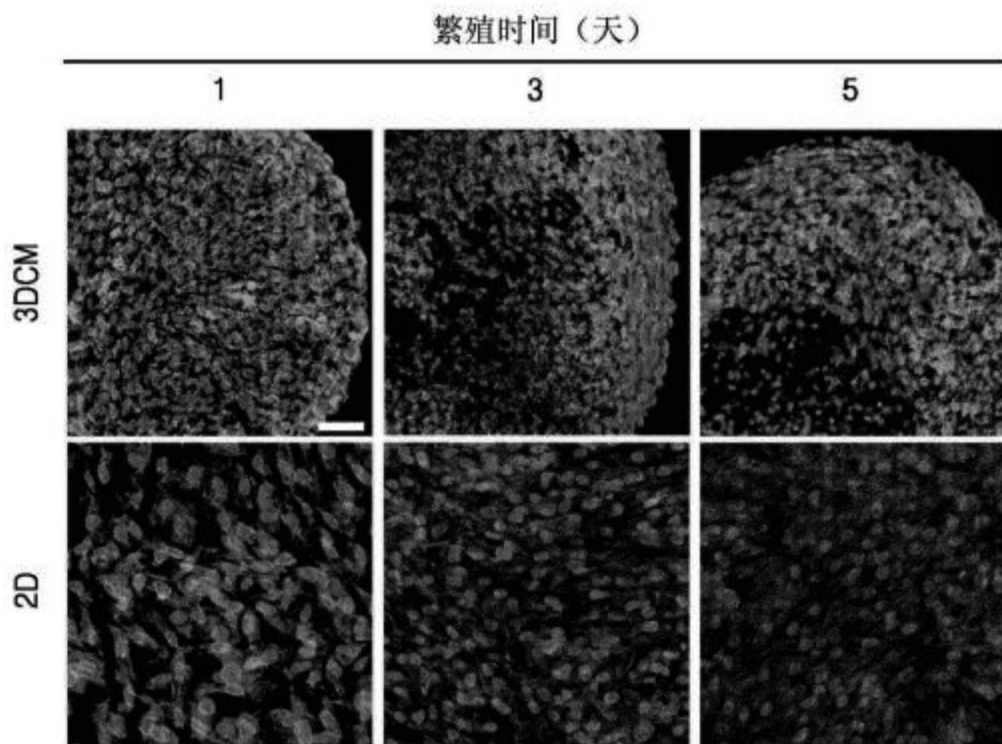


图13

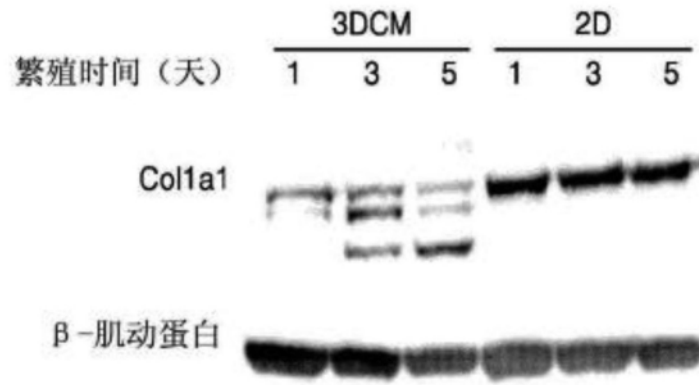


图14

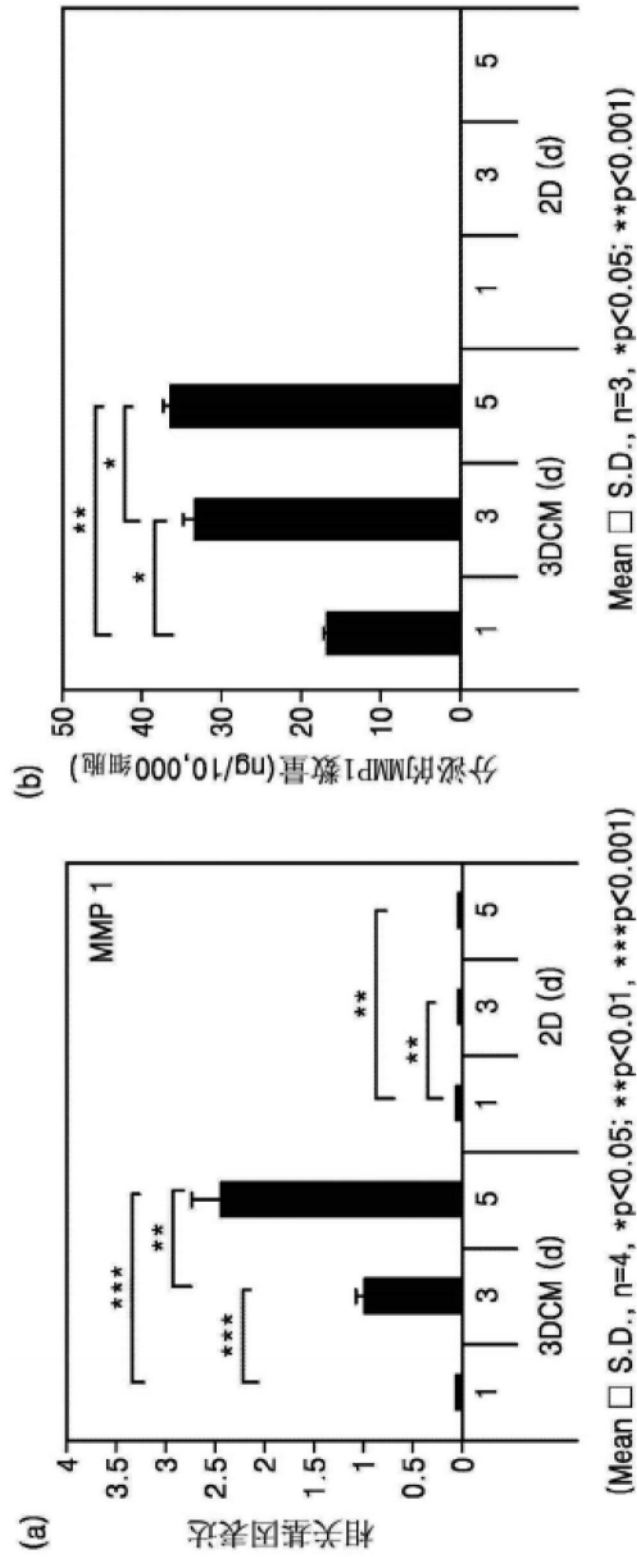


图15

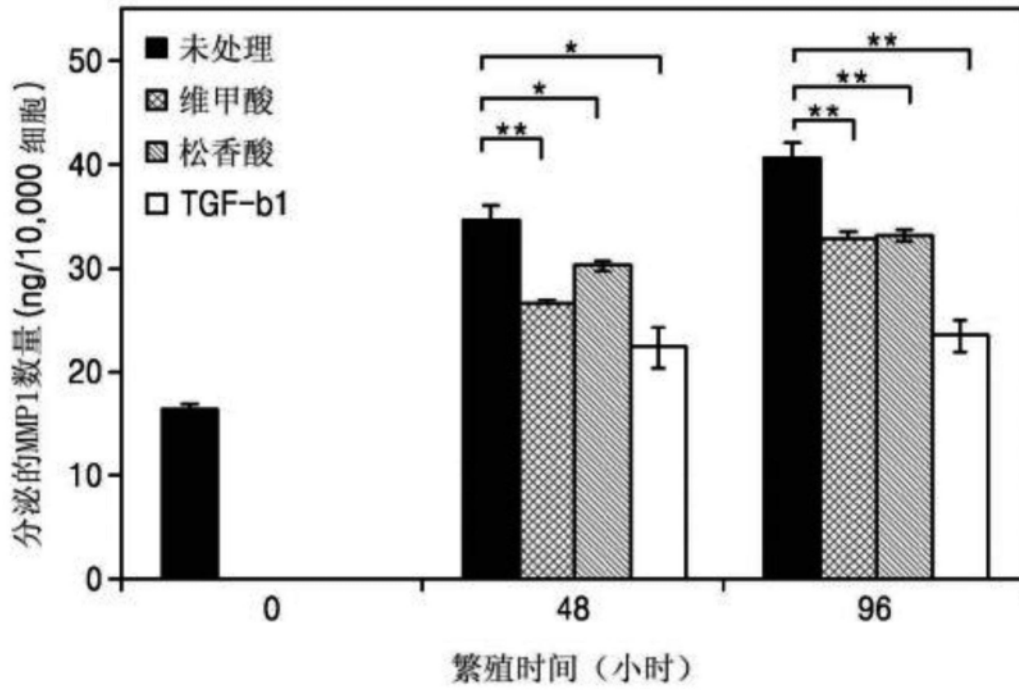


图16

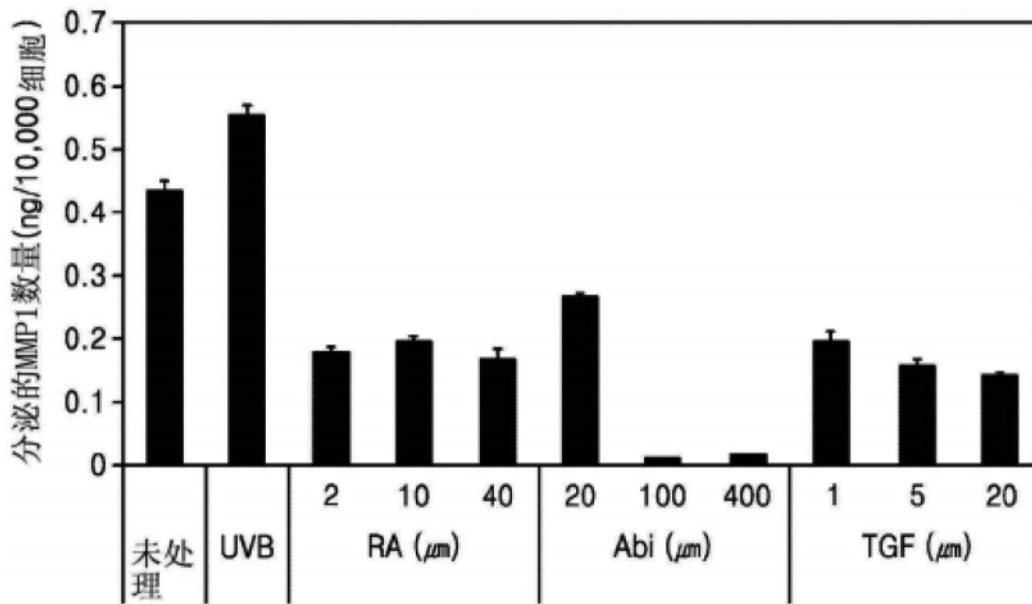


图17

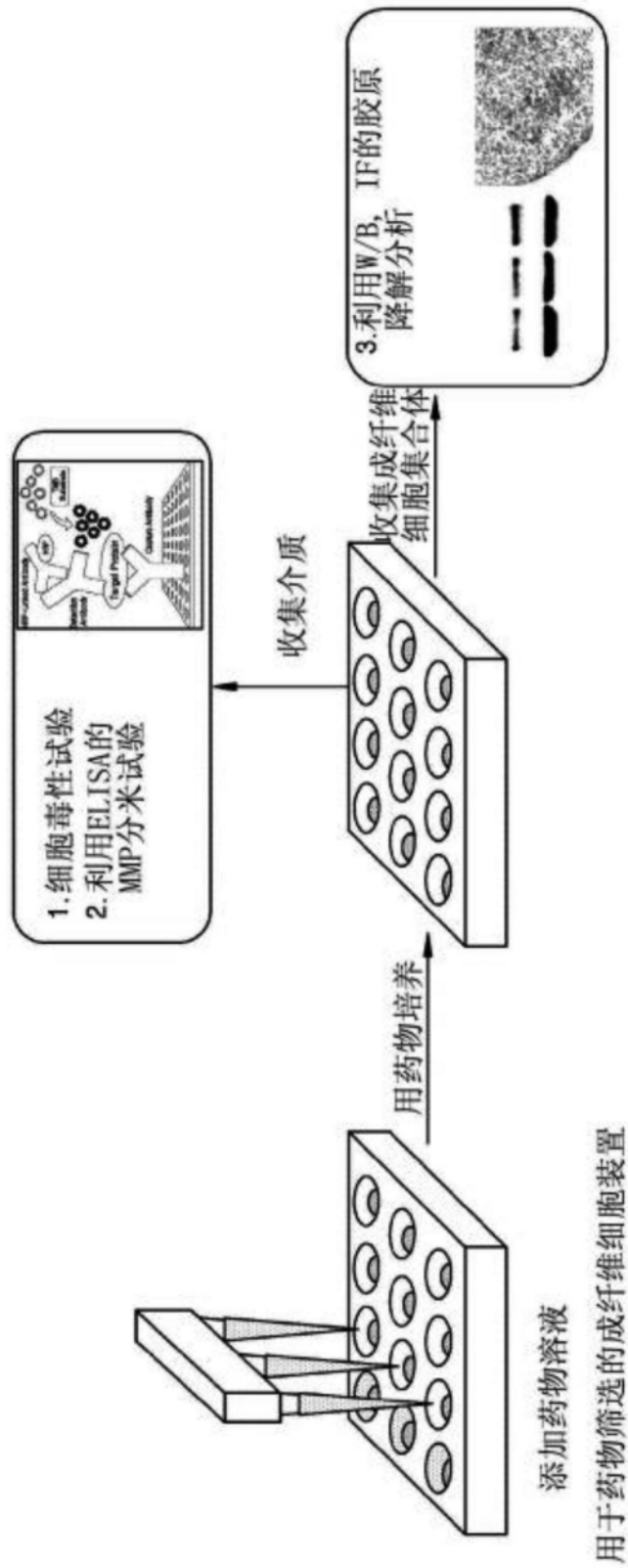


图18