



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118679243 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 20

(21) 申请号 202280091254.1

(22) 申请日 2022.12.23

(30) 优先权数据

10-2021-0187682 2021.12.24 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.08.08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2022/021214 2022.12.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/121400 KO 2023.06.29

(71) 申请人 梨花女子大学校产学协力团

地址 韩国

申请人 荷拉生物制药有限公司

(72) 发明人 李承晋 申智英 全庭和 金希定

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

专利代理师 郑天松

(51) Int.Cl.

C12N 5/074 (2010.01)

A61K 35/36 (2015.01)

A61P 17/14 (2006.01)

A61K 8/98 (2006.01)

A61Q 7/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书10页 附图16页

(54) 发明名称

毛囊来源干细胞的培养方法及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种毛囊来源干细胞的培养方法及其用途,特别涉及一种毛囊来源干细胞的培养方法;所述方法制备的毛囊来源干细胞;以及用于治疗脱发或促进毛发生长的药物组合物;一种准药品组合物;以及化妆品组合物,其含有制备的毛囊来源干细胞、所述毛囊来源干细胞的培养物或从所述毛囊来源干细胞分化的细胞作为活性成分。根据本发明的培养方法,可从毛囊组织中有效地分离和获得干细胞,并且得到的毛囊来源干细胞具有优异的多能性和自我复制能力以及优异的治疗脱发和促进毛发生长效果,可有效地用于改善、预防或治疗脱发。

	HB-HFSC vs. CD200+ CD49+ HFSC	HB-HFSC vs. 健康 HF 组织	HB-HFSC vs. 健康 HF 组织
LRRRC15		3.21	1.49
TMEM119	HB-HFSC 特异性	1.48	2.26
SNAP25	2.26		
CAMK2N1	1.11	2.04	
GPNNB	HB-HFSC 特异性	1.22	
KRTAP1-5		31.92	
PLCB4	2.46		
ITGA8	HB-HFSC 特异性		1.61
SLC7A8		2.49	3.86
AGAP2-AS1		1.12	
CRNDE			
GALNT6		1.86	1.93
IL17RE		1.33	
DCHS1	2.34		
COL10A1	HB-HFSC 特异性	1.83	3.24
VAT1L	4.61		
AQP1	1.46		

1. 毛囊来源干细胞的培养方法,所述方法包括:
 - (a) 将毛囊组织包埋到水凝胶中,并培养所述毛囊组织以获得培养物;和
 - (b) 在获得的培养物中分解水凝胶,以回收已从毛囊组织迁移到水凝胶中并在水凝胶中增殖的干细胞。
2. 根据权利要求1所述的毛囊来源干细胞的培养方法,其中步骤(a)包括将毛囊组织包埋到双层水凝胶中,并培养所述毛囊组织。
3. 根据权利要求1所述的毛囊来源干细胞的培养方法,其中通过从表皮去除与毛囊漏斗相对应的部位而得到的片段被用作毛囊组织。
4. 根据权利要求1所述的毛囊来源干细胞的培养方法,其中在步骤(a)中,将毛囊组织培养3~20天。
5. 根据权利要求1所述的毛囊来源干细胞的培养方法,其中在步骤(a)中,毛囊组织培养是将毛囊组织以1mm以上且50mm以下的组织间距接种。
6. 根据权利要求1所述的毛囊来源干细胞的培养方法,其中所述毛囊来源干细胞具有选自下列中的一个以上基因增加的表达:SANP25、COL10A1、TMEM119、AQP1、PLCB4或ITGA8。
7. 根据权利要求1所述的毛囊来源干细胞的培养方法,其中所述毛囊来源干细胞具有如下免疫学特性:

CD73、CD90、CD105、巢蛋白和Lgr5表达,
但CD34、CD45和HLA-DR不表达。
8. 毛囊来源干细胞,其根据权利要求1所述的方法制备。
9. 根据权利要求8所述的毛囊来源干细胞,其具有选自下列中的一个以上基因表达增加:SANP25、COL10A1、TMEM119、AQP1、PLCB4或ITGA8。
10. 根据权利要求8所述的毛囊来源干细胞,其具有如下免疫学特性:

CD73、CD90、CD105、巢蛋白和Lgr5表达,
但CD34、CD45和HLA-DR不表达。
11. 用于治疗脱发或促进毛发生长的药物组合物,其包含通过根据权利要求1所述的方法制备的毛囊来源干细胞、所述毛囊来源干细胞的培养物或从所述毛囊来源干细胞分化的细胞作为活性成分。
12. 用于改善脱发或促进毛发生长的准药品组合物,其包含通过根据权利要求1所述的方法制备的毛囊来源干细胞、所述毛囊来源干细胞的培养物或从所述毛囊来源干细胞分化的细胞作为活性成分。
13. 用于改善脱发或促进毛发生长的化妆品组合物,其包含通过根据权利要求1所述的方法制备的毛囊来源干细胞、所述毛囊来源干细胞的培养物或从所述毛囊来源干细胞分化的细胞作为活性成分。

毛囊来源干细胞的培养方法及其用途

【技术领域】

[0001] 本发明涉及一种毛囊来源干细胞的培养方法及其用途,具体涉及一种毛囊来源干细胞的培养方法;所述方法制备的毛囊来源干细胞;以及用于治疗脱发或促进毛发生长的药物组合物;一种准药品组合物;以及化妆品组合物,其含有制备的毛囊来源干细胞、所述毛囊来源干细胞的培养物或从所述毛囊来源干细胞分化的细胞作为活性成分。

【背景技术】

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

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

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

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

【发明概述】

【技术问题】

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

[0009] 在此背景下,本发明人进行了各种研究来开发新的干细胞,结果发现,通过本发明的培养方法制备的毛囊来源干细胞具有优异的体外增殖能力、细胞性能和分化能力,并可用于治疗脱发和促进毛发生长,并由此完成了本发明。

【技术方案】

[0011] 本发明的目的在于提供一种利用毛囊组织和水凝胶进行的毛囊来源干细胞的培养方法。

[0012] 本发明的另一目的是提供通过所述方法制备的毛囊来源干细胞。

[0013] 本发明的又一目的在于提供一种用于治疗脱发或促进毛发生长的药物组合物,其含有毛囊来源干细胞、所述毛囊来源干细胞的培养物或从所述毛囊来源干细胞分化的细胞作为活性成分。

[0014] 本发明的又一目的在于提供一种用于改善脱发或促进毛发生长的准药品组合物,其含有毛囊来源干细胞、所述毛囊来源干细胞的培养物或从所述毛囊来源干细胞分化的细

胞作为活性成分。

[0015] 本发明的又一目的在于提供一种用于改善脱发或促进毛发生长的化妆品组合物,其含有毛囊来源干细胞、所述毛囊来源干细胞的培养物或从所述毛囊来源干细胞分化的细胞作为活性成分。

[0016] 本发明的又一目的在于提供一种用于毛囊来源干细胞培养的组合物,其含有毛囊组织和水凝胶。

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

[0018] 【有利效果】

[0019] 根据本发明的培养方法,可有效地从毛囊组织中分离和获得干细胞,并且得到的毛囊来源干细胞具有优异的多能性和自我复制能力以及优异的治疗脱发和促进毛发生长的效果,可有效地用于改善、预防或治疗脱发。

【附图说明】

[0020] 图1示出了毛囊组织片段形成的结果(图1A)、毛囊组织包埋在水凝胶中和培养的示意图(图1B),以及按培养期划分的水凝胶中细胞迁移和增殖的结果(图1C);

[0021] 图2示出了HB-毛囊来源干细胞的免疫表型检查结果;

[0022] 图3示出了在进行传代培养时检测HB-毛囊来源干细胞增殖能力的结果;

[0023] 图4示出了HB-毛囊来源干细胞的集落形成能力的检查结果;

[0024] 图5A示出了检测HB-毛囊来源干细胞向脂肪细胞的分化能力的结果;

[0025] 图5B示出了检测HB-毛囊来源干细胞向骨细胞的分化能力的结果;

[0026] 图6A示出了基于DB的生发功能相关基因String网络分析结果以及鉴定HB-毛囊来源干细胞的特异性毛发生长促进功能基因的结果;

[0027] 图6B示出了HB-毛囊来源干细胞中主要生发功能相关基因表达水平的比较分析结果;

[0028] 图6C示出了在HB-毛囊来源干细胞中特异性表达的毛发生长促进功能基因与在脂肪来源干细胞中特异性表达的毛发生长促进功能基因表达水平的比较分析结果;

[0029] 图6D示出了在HB-毛囊来源干细胞中特异性表达的毛发生长促进功能基因与在脂肪来源干细胞中特异性表达的毛发生长促进功能基因表达水平的比较分析结果;

[0030] 图6E示出了在HB-毛囊来源干细胞中特异性表达的毛发生长促进功能基因的表达水平与现有毛囊来源干细胞中表达水平的比较分析结果;

[0031] 图7A示出了在小鼠模型中检测HB-毛囊来源干细胞的毛发生长促进效果的结果;

[0032] 图7B示出了在小鼠模型中检测HB-毛囊来源干细胞的毛发生长促进效果的结果;

[0033] 图8A示出了在小鼠模型中检测HB-毛囊来源干细胞的毛囊形成能力的结果;

[0034] 图8B示出了在小鼠模型中检测HB-毛囊来源干细胞的毛囊形成能力的结果;

[0035] 图8C示出了在小鼠模型中检测HB-毛囊来源干细胞的毛囊形成能力的结果;

[0036] 图8D说明了在小鼠模型中检测HB-毛囊来源干细胞的毛囊形成能力的结果;

[0037] 图9A示出了在小鼠模型中检测HB-毛囊来源干细胞的Wnt信号传导机制的结果;和

[0038] 图9B示出了在小鼠模型中检测HB-毛囊来源干细胞的Wnt信号传导机制的结果。

[0039] 【发明详述】

[0040] 以下,将对本发明进行详细说明。同时,本发明所公开的各描述和各实施方式也可分别应用于其他描述和其它实施方式。也就是说,本发明中公开的各种元素的所有组合都落入本发明的保护范围。此外,本发明的保护范围不受以下具体描述的限制。

[0041] 本发明的一个方面旨在实现上述目的,提供一种利用毛囊组织和水凝胶进行的毛囊来源干细胞的培养方法,以及通过所述方法培养的毛囊来源干细胞。

[0042] 具体地,用于培养毛囊组织来源干细胞的方法包括:(a) 将毛囊组织包埋到水凝胶中,并培养所述毛囊组织以获得培养物;(b) 在获得的培养物中分解水凝胶,以回收从毛囊组织迁移到水凝胶中并在水凝胶中增殖的干细胞。

[0043] 在本发明中,所述水凝胶是指通过共价键或非共价键交联亲水性聚合物而形成的三维网络结构。由于毛囊组织被三维包埋到水凝胶中,因此水凝胶可为毛囊组织提供物理支持,同时提供使存在于毛囊组织中的毛囊来源干细胞迁移到水凝胶中并在水凝胶中增殖的细胞外基质功能。

[0044] 为了水凝胶支持的三维培养,本发明的水凝胶优选为以溶液状态存在并能转化为溶胶和凝胶的相变水凝胶,并且可具体地选自下列中的一种以上:胶原蛋白、明胶、软骨素、透明质酸、海藻酸、基质胶TM、壳聚糖、肽、纤维蛋白、PGA(聚乙醇酸)、PLA(聚乳酸)、PEG(聚乙二醇)和聚丙烯酰胺,但不限于此。

[0045] 在步骤(a)中,包埋了毛囊组织的水凝胶的培养可在将包埋了毛囊组织的水凝胶浸入本领域已知适合于干细胞培养的常规培养基中后进行。

[0046] 步骤(a)可包括将毛囊组织包埋到多层水凝胶中进行培养。具体而言,步骤(a)可包括将毛囊组织包埋到双层水凝胶中进行培养,但不限于此。

[0047] 在本发明的实施方式中,当毛囊组织被包埋在水凝胶中时,分两个阶段加入水凝胶,使得毛囊组织被包埋在夹心型双层水凝胶中,并进行培养。

[0048] 在如上所述将毛囊组织包埋到多层水凝胶中的情况下,其优点是可防止由于残留在毛囊组织片段的毛质层外层的疏水性而使组织片段未被水合而是漂浮,并且通过两阶段水凝胶处理将毛囊组织充分包埋到双层水凝胶中。

[0049] 在步骤(a)中,通过从表皮去除对应于毛囊漏斗的部位得到的片段可用作毛囊组织。片段可为0.01至10mm、0.05至5mm或0.1至3mm,但片段的大小不受限制。

[0050] 在本发明的实施方式中,当毛囊组织片段形成时,通过去除对应于表皮漏斗区域的部位得到的1-3mm毛囊组织片段用于培养。

[0051] 在步骤(a)中,毛囊组织的培养期可为3~20天、3~18天、3~16天、3~14天、或4~12天,但不限于此。

[0052] 随着培养期的增加,每组织重量的分离细胞数增加,这在细胞分离效率方面是有利的。然而,随着培养的继续,组织周围的水凝胶中的细胞汇合度增加,这导致通过接触抑制抑制细胞增殖和诱导干细胞分化的可能性,以及细胞/水凝胶比率增加,发生细胞聚集,并且在细胞分离过程中通过水凝胶的选择性分解抑制细胞释放。

[0053] 因此,由于观察到由于组织周围的细胞过度拥挤而导致的聚集和组织周围的浑浊,因此在培养组织时,将培养期适当调整为观察到细胞向外生长的时期是很重要的。

[0054] 在本发明的实施方式中,将毛囊组织培养4~12天并使用。

[0055] 对于步骤(a)中的毛囊组织培养,毛囊组织接种的组织间间距可为1mm以上、2mm以上、3mm以上、4mm以上、5mm以上、50mm以下、40mm以下、30mm以下、20mm以下,或10mm以下,但不限于此。

[0056] 当进行培养时,在组织接种中需要考虑到长过距离和从一个组织迁移/增殖的细胞的距离来调整组织间距。

[0057] 在本发明的实施方式中,将组织片段以组织间间距为5mm以上的间隔接种并进行培养。

[0058] 在步骤(b)中,仅水凝胶可被选择性分解,以便回收在步骤(a)的水凝胶支持的三维培养后在水凝胶中迁移/增殖的毛囊来源干细胞。

[0059] 水凝胶可通过选自下列中的一种以上酶进行分解:胶原酶、明胶酶、尿激酶、链激酶、TPA(组织纤溶酶原激活剂)、纤溶酶和透明质酸酶。

[0060] 本发明的毛囊干细胞分离/培养技术是一种基于水凝胶的生态位保存自复制诱导分离技术,其为分离干细胞的技术,对应于允许毛囊组织在体外存活/培养,并无需酶处理而直接从组织中分离高纯度细胞的新技术。

[0061] 与现有方法不同,该分离方法具有以不同于现有的方式在体外增殖能力和细胞性能方面具有优越性的优点。

[0062] 通过现有方法分离的细胞在体外只能扩增多达2-3次传代(最多5次传代),但是通过本发明方法分离的细胞具有即使细胞传代培养8次以上也不会发生细胞衰老的优异的性能,并且可长时间传代培养,从而可用于细胞的大规模生产。

[0063] 同时,通过本发明提供的毛囊来源干细胞的制备方法制备的毛囊来源干细胞表现出免疫学特性,其中CD73、CD90、CD105、巢蛋白和Lgr5表达,但CD34、CD45和HLA-DR不表达,并表现出可分化成脂肪细胞、骨细胞等的多能性特性,但不限于此。

[0064] 毛囊来源干细胞可与本发明提供的毛囊来源干细胞制备方法制备的毛囊来源干细胞、本发明的毛囊来源干细胞、毛囊来源干细胞、HB-毛囊来源干细胞、本发明的HB-毛囊来源干细胞和HB-HFSC互换使用。

[0065] 在本发明的实施方式中,可验证通过本发明的毛囊来源干细胞的制备方法制备的毛囊来源干细胞的增殖能力、分化能力和集落形成能力。

[0066] 在本发明的实施方式中,可验证通过本发明的毛囊来源干细胞的制备方法制备的毛囊来源干细胞的毛发生长促进效果。

[0067] 在本发明的实施方式中,通过评估传代培养时细胞生长能力/细胞衰老(体外增殖能力)和原代细胞的纯度,可进一步验证通过本发明的毛囊来源干细胞的制备方法制备的毛囊来源干细胞在体外具有较长的存活期和优异的活力。

[0068] 通过本发明提供的毛囊来源干细胞的制备方法制备毛囊来源干细胞,可表达特定的毛发生长促进功能基因。

[0069] 此时,促进毛发生长的功能基因可具体为选自下列中的一个以上基因:SANP25(突触体相关蛋白25)、COL10A1(X型胶原 α 1链)、TMEM119(跨膜蛋白119)、AQP1(水通道蛋白1)、PLCB4(1-磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸磷酸二酯酶 β -4)或ITGA8(整合素亚基 α 8),但不限于此,并且可能包括任何已知为促进毛发生长功能基因的基因。

[0070] 在本发明的实施方式中,发现通过毛囊来源干细胞的制备方法制备的毛囊来源干

细胞中所述7个促进毛发生长功能基因的表达水平是脂肪来源干细胞中的表达水平的10倍以上的显著的表达水平,可验证通过本公开的方法制备的毛囊来源干细胞表现出特定的毛发生长促进功能基因。

[0071] 本发明的另一方面提供一种用于治疗脱发或促进毛发生长的药物组合物,其含有毛囊来源干细胞、所述毛囊来源干细胞的培养物或从所述毛囊来源干细胞分化的细胞作为活性成分。

[0072] 在本发明中,术语“培养物”或“培养液”可为在将毛囊来源干细胞在培养基中培养的过程中或培养后获得的培养物,或其上清液、其浓缩物或其冻干产品。

[0073] 在本发明中,术语“毛发生长”或“促进毛发生长”是不仅可包括促进毛发生长、增加毛发生数量和使毛发增厚的作用,而且还可包括毛囊再生或毛囊细胞增殖的作用的概念,以及所述毛囊细胞的增殖可包括促进毛囊细胞从休止期向生长期的转化,但毛发生长或促进毛发生长并不局限于此。

[0074] 在本发明中,术语“药物组合物”是指为预防或治疗疾病而制备的产品,并且可在实际临床给药中以各种口服和肠胃外剂型给药,并且可使用常用的稀释剂或赋形剂(如填充剂、填充剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂和表面活性剂)配制。

[0075] 根据制剂的不同,可进一步包含药学上可接受的添加剂,并且此时,作为药学上可接受的添加剂,可使用:淀粉、糊化淀粉、微晶纤维素、乳糖、聚维酮、胶体二氧化硅、磷酸氢钙、乳糖、甘露糖醇、麦芽糖、阿拉伯树胶、预胶化淀粉、玉米淀粉、粉状纤维素、羟丙基纤维素、欧巴代、乙醇酸淀粉钠、巴西棕榈酸铅、合成硅酸铝、硬脂酸、硬脂酸镁、硬脂酸铝、硬脂酸钙、白糖、葡萄糖、山梨糖醇和滑石粉。根据本发明的药学上可接受的添加剂可含有0.1~90重量份的组合物。

[0076] 除了毛囊来源的间充质干细胞外,药物组合物还可含有一种以上常规的药学上可接受的惰性载体,例如,防腐剂、镇痛药、增溶剂、稳定剂等,在局部给药用制剂的情况下,还可含基剂、赋形剂、润滑剂、防腐剂等。

[0077] 本发明的药物组合物可作为单独的治疗剂给药或与其他治疗剂组合给药,并且可与常规治疗剂顺序或同时给药。本发明的药物组合物可单次给药或多次给药。重要的是,在考虑到所有因素的情况下,以能够承受最大效果并且不引起副作用的最小量施用本发明的药物组合物,可由本领域技术人员轻松确定。

[0078] 此外,本发明提供的药物组合物除了毛囊来源干细胞以外,还可含有有助于治疗脱发或促进毛发生长,维持毛囊来源干细胞的活性,或促进毛囊来源干细胞的分化的各种成分,例如,还可含有抗炎剂,干细胞动员因子、生长诱导因子等。

[0079] 本发明的药物组合物可用于改善、预防或治疗脱发的目的。

[0080] 本申请中所说的脱发既包括非瘢痕性脱发(即暂时性脱发)和瘢痕性脱发(当毛囊或发根被永久性破坏时发生),其中非瘢痕性脱发包括感染性脱发、创伤性脱发、炎症性脱发、先天性脱发、内分泌性脱发、肿瘤性脱发、营养缺乏性脱发、药物引起的脱发以及由毛发结构异常引起的脱发,还包括男性型秃发、女性型秃发和斑秃。

[0081] 在本发明中,术语“改善”可指通过向个体施用本发明的组合物来延缓脱发进展或缓解脱发症状的任何动作。

[0082] 在本发明中,术语“预防”可指通过向个体施用本发明的组合物来抑制或延缓脱发

发生的任何作用。

[0083] 在本发明中,术语“治疗”可指通过将本发明的组合物给予怀疑患有脱发的个体来使脱发症状好转或变得有利的任何行动。

[0084] 本发明的又一目的在于提供一种促进毛发生长或预防或治疗脱发的方法,其包括向个体施用含有毛囊来源干细胞、所述毛囊来源干细胞的培养物或从所述毛囊来源干细胞分化的细胞作为活性成分的组合物。

[0085] 所述毛囊来源干细胞、所述毛囊来源干细胞的培养物或从所述毛囊来源干细胞分化的细胞,促进毛发生长、预防和/或治疗脱发均如上所述。

[0086] 在本发明中,术语“给药”是指以适当的方式将组合物导入个体。具体地,含有本发明的毛囊来源干细胞、所述毛囊来源干细胞的培养物或从所述毛囊来源干细胞分化的细胞作为活性成分的组合物,或含有所述组合物的药物组合物可施用于局部部位,例如,施用于脱发部位或作为注射剂给药,但并不局限于此。

[0087] 所述组合物可与可用于促进毛发生长或预防或治疗毛发脱落的其它药物组合物组合使用。

[0088] 在本发明中,术语“个体”是指已经或可能发生脱发的任何动物,例如大鼠、小鼠和牲畜,包括人类。该动物可为人类,也可需要预防或治疗与其类似的症状的哺乳动物,例如牛、马、绵羊、猪、山羊、骆驼、羚羊、狗或猫,但不限于此。

[0089] 本发明的组合物可以药学上有效的量给药。

[0090] 术语“药剂量”是指足以治疗疾病的量,具有适用于医学治疗的合理收益/风险比,有效剂量水平可根据包括个体的类型和严重程度、年龄、性别、药物活性、对药物的敏感性、给药时间、给药通路和排泄率,治疗时间,以及同时使用的药物,以及医学领域中众所周知的其他因素确定。

[0091] 所述组合物可作为单独的治疗剂给药或与其他治疗剂组合给药,并且可与常规治疗剂顺序或同时给药。所述组合物可单次给药或多次给药。考虑到所有因素,以能够承受最大效果并且不引起副作用的最小量施用组合物是很重要的,其可由本领域技术人员轻松确定。

[0092] 所述组合物可口服或肠胃外给药(例如,静脉内、皮下、腹膜内或局部给药),具体取决于所需的方法,并且剂量根据患者的状况和体重、疾病程度、药物形式以及给药的途径和时间而变化,但可由本领域的技术人员适当选择。作为具体示例,所述组合物通常可每天给药一次或数次,但是优选的剂量可由本领域技术人员根据个体的状况和体重、疾病程度、药物形式以及给药的途径和期间适当地选择。

[0093] 本发明的又一目的在于提供一种用于改善脱发或促进毛发生长的准药品组合物,其含有毛囊来源干细胞、所述毛囊来源干细胞的培养物或从所述毛囊来源干细胞分化的细胞作为活性成分。

[0094] 在本发明中,术语“准药品组合物”是用于治疗、缓解、治愈或预防人类或动物疾病的物品,其对应于纺织品、橡胶制品或类似物品中的一种;对人体作用较弱或不直接作用于人体且不是仪器、机器的物品及类似物品;以及用于灭菌、杀虫和类似目的预防感染的制剂,是指用于诊断、治疗、缓解、治愈或预防人类或动物疾病的物品,不包括非器械、机器或装置的物品和用于对人类或动物的结构和功能产生药理作用的物品,不包括非器械的物

品,机器或设备,并且可为专门用于外用的皮肤制剂或个人护理产品。

[0095] 本发明的又一目的在于提供一种用于改善脱发或促进毛发生长的化妆品组合物,其含有毛囊来源干细胞、所述毛囊来源干细胞的培养物或从所述毛囊来源干细胞分化的细胞作为活性成分。

[0096] 在本发明中,术语“化妆品组合物”可制备在任何常用的制剂中,例如,可配制成溶液、乳液、混悬浮液、糊剂、乳膏、化妆水、凝胶、粉末、喷雾剂、含表面活性剂的清洁产品、油、肥皂、液体洗涤剂、浴盐、粉底、化妆底、精华液、爽肤水、泡沫、包装、软化水、防晒霜或防晒油。

[0097] 本发明的又一目的在于提供一种用于毛囊来源干细胞培养的组合物,其含有毛囊组织和水凝胶,以及一种用于毛囊来源干细胞培养的试剂盒,含有所述组合物。

[0098] 此外,用于毛囊来源干细胞培养的试剂盒可包括用于干细胞培养的组合物和各种组分,例如用于培养干细胞所需的溶液和装置。

[0099] 本发明的又一目的在于提供含有毛囊来源干细胞、所述毛囊来源干细胞的培养物或从所述毛囊来源干细胞分化的细胞作为活性成分的组合物用于促进毛发生长或预防或治疗脱发的用途。

[0100] **【本发明的实施方式】**

[0101] 以下,将结合实施例对本发明进行更详细的描述。但是,这些实施例仅用于说明目的,本发明的保护范围并不局限于这些实施例。

[0102] **【实施例1.多层水凝胶支持的毛囊组织的三维培养】**

[0103] 将获赠的毛囊组织浸泡在生理盐水溶液中并在冷藏下储存,用作样品并用PBS (Gibco) 洗涤三次。在切割洗过的毛囊组织的毛干部分后,从切割侧去除0.5mm至1mm的漏斗部分,形成毛囊组织片段。用DMEM(低葡萄糖,Gibco) 洗涤一次后,除去上清液,加入5mL纤维蛋白原溶液(0.25% w/v纤维蛋白原(GC Biopharma) 和200 μ g/mL氨甲环酸(Shin Poong Pharmaceutical) 在DMEM中)。加入等量凝血酶溶液(0.5IU/mL凝血酶(GC Biopharma) 在DMEM中) 后,立即将混合物转移到100mm培养容器中,使毛囊片段和水凝胶均匀分布,然后在室温下静置10分钟或更短时间,使毛囊组织固定在水凝胶上。此外,加入5mL纤维蛋白原溶液(在DMEM中0.25% w/v纤维蛋白原和200 μ g/mL氨甲环酸) 和5mL凝血酶溶液(在DMEM中0.5IU/mL凝血酶)。将混合物静置10分钟或更短时间以形成二级水凝胶,然后在37 $^{\circ}$ C下进行培养2小时以获得充分的凝胶化(图1B)。加入含有100 μ g/mL氨甲环酸的生长培养基(90%低DMEM:F12=1:1,10%胎牛血清,20ng/mL表皮生长因子,5ng/mL碱性成纤维细胞生长因子,10ng/mL胰岛素样生长因子和10mg/mL庆大霉素) 10mL,并在以10至30rpm的速度进行搅拌的同时培养1小时。之后,每2至3天更换一次生长培养基。

[0104] **【实施例2.迁移到多层水凝胶中并在多层水凝胶中生长的HB-毛囊来源干细胞的回收和扩增培养】**

[0105] 通过实施例1中描述的方法将毛囊组织培养10天或14天。将水凝胶用温热的PBS洗涤3次3分钟后,加入30% FBS/DMEM,并在轨道振荡器上以10至30rpm的速度进行搅拌。1小时后除去上清液后,加入10mL含1 μ g/mL阿替普酶的30%FBS/DMEM,使凝胶分解。当凝胶充分分解时,在静态条件下进行过夜培养,然后除去上清液,加入生长培养基,并以常规方式进行培养。生长培养基每2至3天更换一次,每4至6天进行一次传代培养。

[0106] 通过上述方法进行组织培养和细胞分离及培养的结果如图1所示。

[0107] **【实施例3.分离和培养的HB-毛囊来源干细胞的免疫表型检查】**

[0108] 为了检查通过实施例2的方法分离和培养的HB-毛囊来源干细胞的免疫表型,获得在T75烧瓶中培养的细胞,并将其悬浮在3%牛血清白蛋白(Sigma)/PBS中。将细胞悬浮液分成9等份,并在4℃下与以下抗体反应1小时:FITC偶联的CD73(Abcam,1:25)抗体、APC偶联的CD90(Invitrogen,1:40)、FITC偶联的CD105(Abcam,1:50)、FITC偶联的CD34(Abcam,1:10)抗体、FITC偶联的HLA-DR(Novusbiologicals,1:20)抗体、巢蛋白(Novusbiologicals,1:100)抗体、FITC偶联的Lgr5(Origene,1:100)抗体、FITC偶联的小鼠IgG同型对照(Novusbiologicals,1:5)抗体,或AlexaFluor594偶联的CD45(Novus,1:20)抗体。反应后,将反应混合物以300g离心5分钟,洗涤,悬浮于3% BSA/PBS中,并使用流式细胞仪(BD)进行测量(图2)。

[0109] 结果,从图2可看出,发现分离和培养的HB-毛囊来源干细胞表达CD73、CD90、CD105、巢蛋白和Lgr5,但不表达CD34、CD45和HLA-DR。

[0110] **【实施例4.分离和培养的HB-毛囊来源干细胞的增殖能力和集落形成能力的检查】**

[0111] 为了检查实施例2中获得的分离和培养的HB-毛囊来源干细胞的增殖能力,通过在初始培养时以4000个细胞/cm²的密度接种细胞并每4天传代培养一次获得的细胞数量来测量根据传代次数的群倍增时间。

[0112] 通过台盼蓝染色计算未染色细胞的数量来测量细胞数,并且根据以下公式计算群倍增时间(PDTs),如图3所示: $PDT = [\text{天}/(\log N_2 - \log N_1)] / \log 2$, ($N_1 = 4,000$ 个细胞, $N_2 = 4$ 天后的细胞数)。

[0113] 为了检查实施例2中获得的分离和培养的HB-毛囊来源干细胞的集落形成能力,将人毛囊来源干细胞(4次传代)以20个细胞/孔接种在6孔板中。将细胞以每3天更换一次生长培养基而培养14天。用PBS洗涤细胞,并用4%多聚甲醛(4% PFA,Sigma)在室温下固定15分钟。固定细胞用PBS洗涤3次,然后在室温下用0.5%结晶紫/甲醇染色15分钟。在将剩余的溶液全部除去后,用蒸馏水洗涤三次,观察染色的菌落,结果如图4所示。

[0114] 如图3和图4所示,发现通过实施例2的方法获得的HB-毛囊来源干细胞在进行传代培养时保持增殖能力,并且还具有一定水平以上的集落形成能力。

[0115] 换言之,当将HB-毛囊来源干细胞传代培养至第六代并确定群倍增时间(PDT)时,发现观察到PDT平均为32小时±7小时,并且在传代培养时保持增殖能力。

[0116] **【实施例5.HB-毛囊来源干细胞的分化能力的检验】**

[0117] 为了评估获得的HB-毛囊来源干细胞向脂肪细胞的分化能力,将细胞以 1×10^4 个细胞/cm²的浓度接种并在生长培养基中培养至达到80%汇合度,然后将培养基更改为StemPro™脂肪生成分化试剂盒(Gibco,cat.A1007001),每3天更换一次培养基而培养14天。将细胞用4% PFA固定15分钟,用60%异丙醇反应15分钟,然后除去所有溶液,将细胞彻底干燥。将细胞在室温下用60%油红O(SIGMA)/乙醇染色15分钟,以检查细胞质中是否存在脂肪蓄积(图5A)。

[0118] 为了评估HB-毛囊来源干细胞向骨细胞的分化能力,将细胞以 1×10^4 个细胞/cm²的浓度接种并在生长培养基中培养至达到80%汇合度,然后将培养基更改为StemPro™成骨分化试剂盒(Gibco,cat.A1007201),每3天更换一次培养基而培养14天。将细胞用4% PFA固

定60秒,用BCIP/NBT底物溶液(Sigma)处理,并在光阻断条件下染色10分钟,以检查碱性磷酸酶(ALP)的活性(图5B)。

[0119] 换言之,从结果来看,验证了通过本公开的培养方法获得的HB-毛囊来源干细胞具有多能性。

[0120] 【实施例6.HB-毛囊来源干细胞与脂肪来源干细胞中差别表达基因的检查】

[0121] 对于3批脂肪来源干细胞样品(ASC-1、ASC-2型、ASC-3)和3批HB-毛囊来源干细胞样本(HB-HFSC-1、HB-HFSC-2、HB-HFSC-3),使用TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit根据制造商的方案构建双端RNA文库,并在Macrogen(韩国首尔)进行测序。预处理过程后,使用HISAT2程序(版本2.1.0,<https://ccb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml>)将基因定位到参考基因组(版本GRCh38),并使用StringTie程序(版本2.1.3b,<https://ccb.jhu.edu/software/stringtie/>)获取每个转录组的表达谱(图6A)。基因表达水平通过取TPM(每千碱基百万转录本)值的对数来处理(图6A)。使用R程序(版本4.0)的edgeR包[1]获取对照组和比较组之间的差别表达基因(1.SZKLARCZYK,Damian,et al.STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage,supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets.Nucleic acids research,2019,47.D1:D607-D613)。为了将干细胞中差别表达的基因的表达谱与相关疾病转录组数据进行比较,从GEO(Gene Expression Omnibus)数据库中收集了公开可用的转录组数据。使用R程序(版本4.0)的limma包[2]对每个公开可用的数据进行差异基因表达水平分析(2.ROBINSON,Mark D.;MCCARTHY,Davis J.;SMYTH,Gordon K.edgeR:a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data.bioinformatics,2010,26.1:139-140)。分析程序本身提供的统计检验结果按原样使用,小于0.05的显著性水平被认为是显著的。在表示P值超过0.05的结果的情况下,P值单独表示。

[0122] 为了构建标记基因参与的生物网络,使用String数据库(11.5版本)[3]构建了蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络(3.SMYTH,Gordon K.,et al.LIMMA:linear models for microarray data.In Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor.Statistics for Biology and Health.2005)(图7A和7B)。用于构建PPI网络的生物参考是智人(Homo sapiens)。作为构建网络的设置,根据实验结果、生物数据库和文献以及基因融合等证据将代表蛋白质的节点之间的连接边缘连接起来,并且将边缘得分为0.4以上的认为是显著的。网络构建后,将删除其他节点之间没有连接的孤立节点。根据KEGG数据库[4],仅提取了具有统计学意义的节点组所属的生物学功能(误发现率<0.05)(4.KANEHISA,Minoru;GOTO,Susumu.KEGG:kyoto encyclopedia of genes and genomes.Nucleic acids research,2000,28.1:27-30)。两组间显著性差异检验采用T检验法,P值<0.05时看作具有显著性。分析程序提供的统计检验结果按原样使用,小于0.05的显著性水平被认为是显著的。在表示P值超过0.05的结果的情况下,P值单独表示。

[0123] 利用String DB,利用毛发生长促进相关基因网络分析HB-毛囊来源干细胞表达的基因,以检查与已知毛发生长促进通路的相关性,并得出7个毛发生长促进功能基因(SNAP25、ITGA8、PLCB4、COL10A1、GPNMB、TMEM119和AQP1)(图6A)。研究发现,与脂肪来源干细胞相比,HB-毛囊来源干细胞以更高水平表达主要的毛发生长功能相关基因(TCF3、

PRDM1、WNT5A、WNT5B、WNT9A、FGFR2等) (图6B)。在HB-毛囊来源干细胞中,鉴定出80个与脂肪来源干细胞相比倍数变化 >10 的基因,其中,图6A中导出的7个促进毛发生长功能基因(SNAP25、ITGA8、PLCB4、COL10A1、GPNMB、TMEM119和AQP1)与脂肪来源干细胞中的基因相比存在差别表达(图6C和6D)。当将现有毛囊或毛囊来源干细胞的基因表达水平与HB-毛囊来源干细胞进行比较时,发现7个促进毛发生长功能基因(SNAP25、ITGA8、PLCB4、COL10A1、GPNMB、TMEM119和AQP1)的表达增加了10倍以上,确认存在显著差异(图6E)。

[0124] 已知的7个毛发生长促进功能基因是与Wnt信号传导和PI3K信号传导(已知的与毛囊形成和生长相关的信号传导)相关的基因,基于此,可推断出本发明的毛囊来源干细胞制备方法制备的毛囊来源干细胞的毛发生长促进作用。

[0125] 此外,还发现CCN2和TGFB1基因(诱导毛囊退行期的基因)的表达降低(图6B)。

[0126] **【实施例7.裸鼠毛发生长促进效果的检验】**

[0127] 使作为实验动物的7至12周龄的BALB/c裸鼠(中央实验动物)通过吸入3%异氟烷(Hana Pharmaceuticals)麻醉。确认麻醉完成后,将 1×10^6 HB-毛囊来源干细胞悬浮于100 μ L生理盐水(NS)中,使用胰岛素注射器(30号)在背部四个角(2×2 cm)进行皮内注射。HB-毛囊来源干细胞给药后,进行14天和31天的随访观察,给药后立即(第0天)和给药后第3、7、14、28、31天用数码相机拍摄给药部位。使用Image J(NIH)根据给药部位的百分比(2×2 cm、 4cm^2)测量毛发生长部分的面积(图7A和7B)。从结果中,验证了HB-毛囊来源干细胞对毛发生长的促进作用。

[0128] **【实施例8.检查裸鼠毛囊形成能力和皮肤厚度增加】**

[0129] 为了组织学分析,将皮肤组织固定在固定剂(4%甲醛,Sigma,USA)中24小时,然后将组织石蜡包埋并切片,并进行H&E(苏木精和伊红)染色。在光学显微镜下检查毛囊和皮肤层厚度的形态变化。使用Image J(图8)测量形成的毛囊数以及表皮、真皮和皮下组织的厚度。在给予HB-毛囊来源干细胞14天和31天后,验证了毛囊的形成和皮肤厚度的增加。

[0130] **【实施例9.裸鼠Wnt信号机制的检查】**

[0131] 以与H&E染色相同的方式,将每组的组织固定,石蜡包埋并切片以制备组织载玻片。通过将二抗连接到 β -连环蛋白抗体(Invitrogen,MA1-2001)(图9A)进行免疫荧光(IF)染色,在预杂交溶液(50%甲酰胺, $4 \times$ SSC,50mM DDT, $4 \times$ Denhart溶液,'X TED,100 μ g/ml变性鲑鱼精子DNA,250 μ g/ml酵母RNA)中在42度下结合1小时,以将组织与CD34 mRNA结合(图9B)。研究发现,HB-毛囊来源干细胞给药31d后, β -连环蛋白表达增加,CD34基因表达增加。

[0132] 基于上述描述,本发明所涉及的本领域技术人员可理解,本发明可以其他特定形式实施,而不改变其技术精神或本质特征。因此,应该理解,上述实施例不是限制性的,而是在所有方面都具有说明性的。本发明的范围由所附权利要求定义,而不是由它们前面的描述定义,因此,属于权利要求范围和界限或此类范围和界限的等同物的所有更改和修改都旨在包含在本发明的权利要求中。

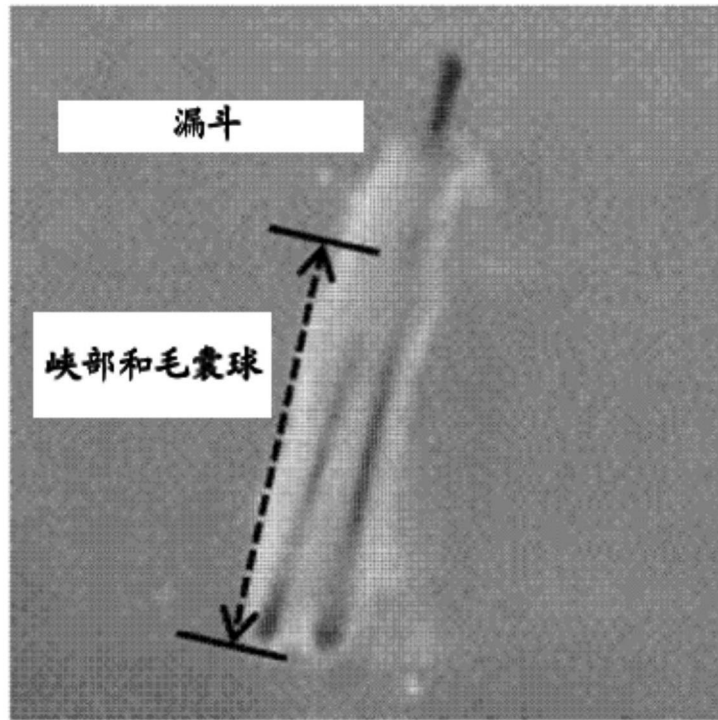
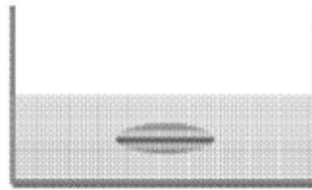


图1A



包埋到双层水凝胶中的组织片段

图1B

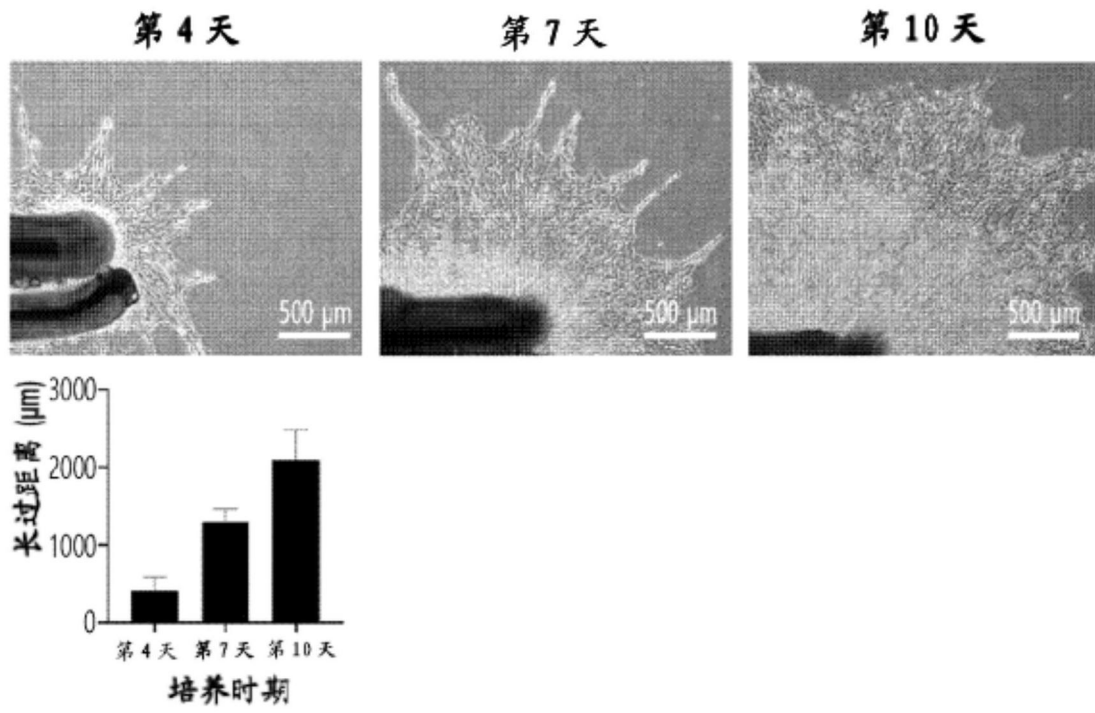


图1C

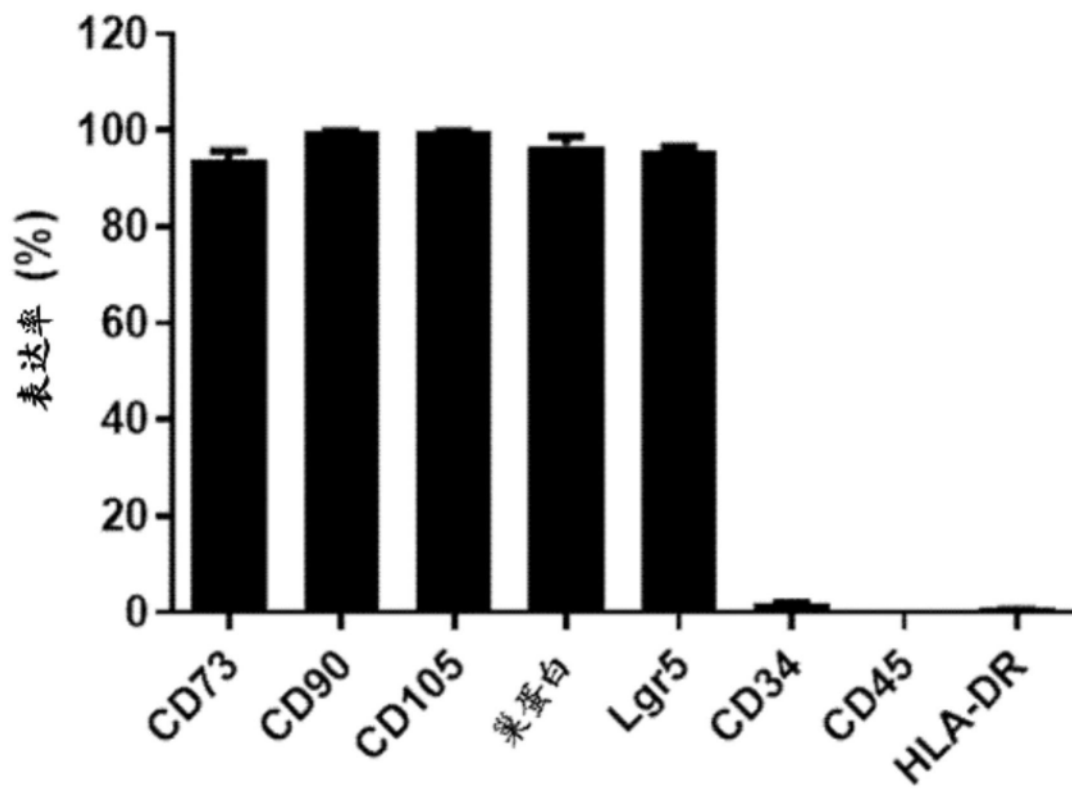


图2

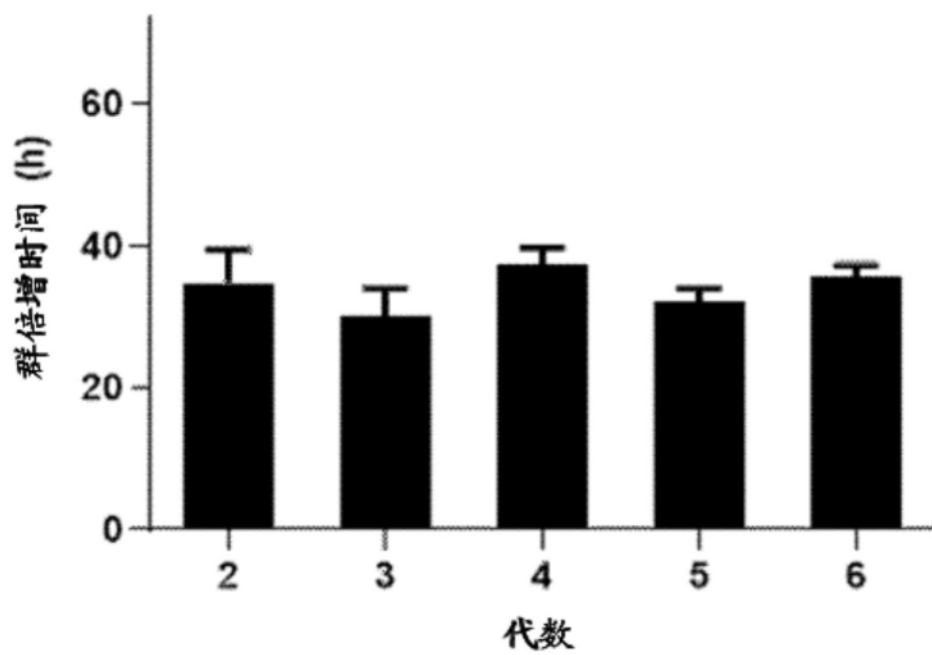


图3

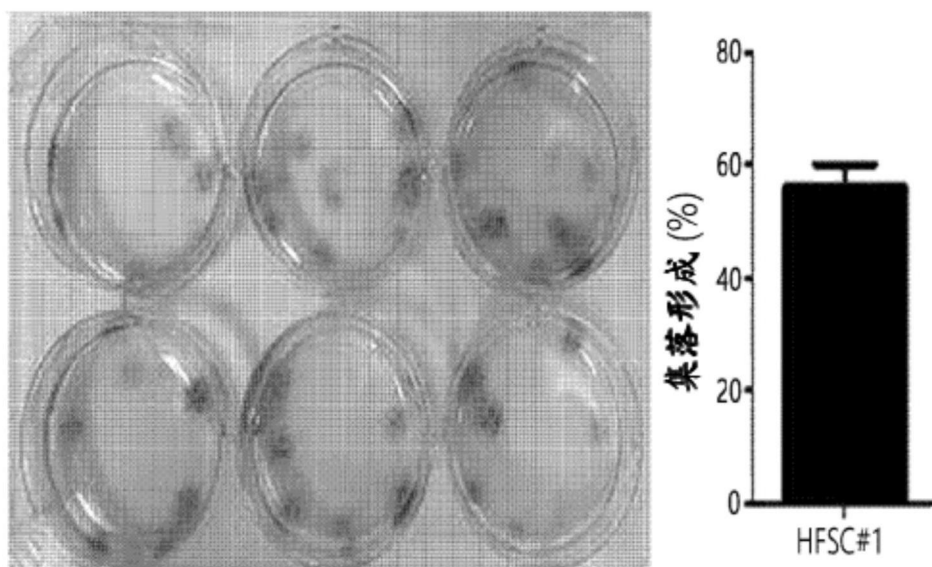


图4

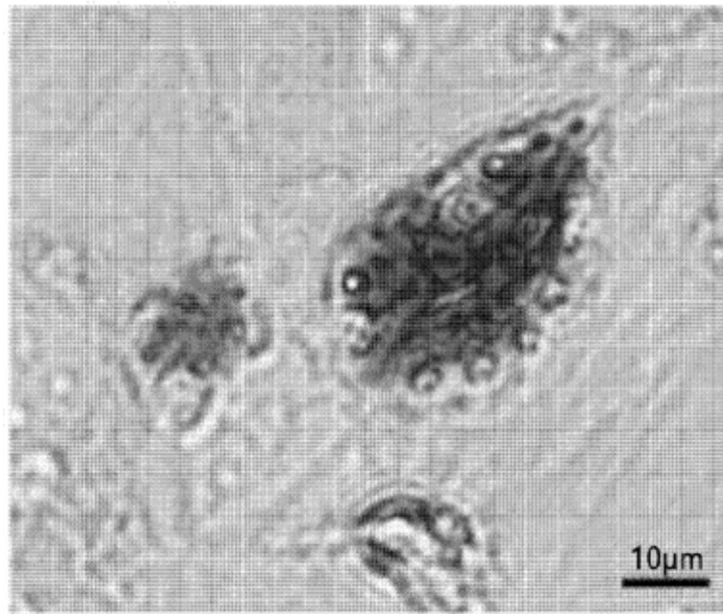


图5A

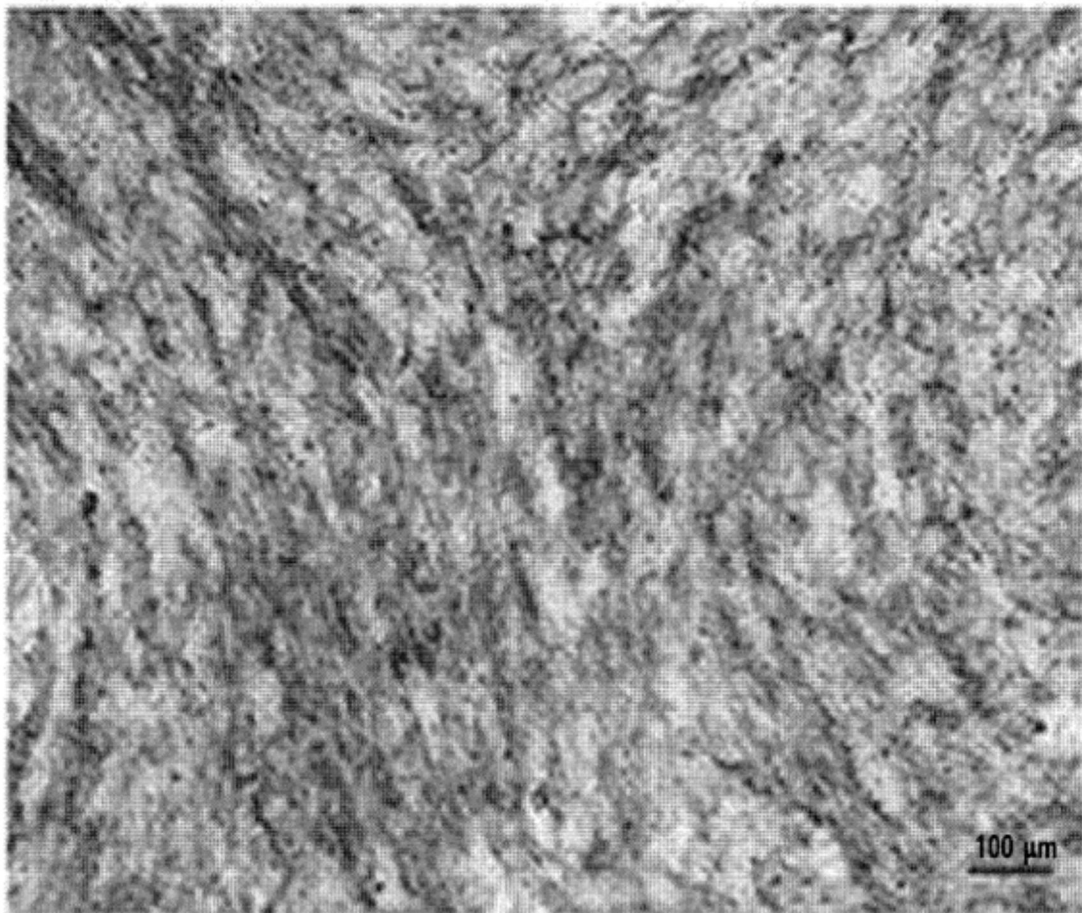


图5B

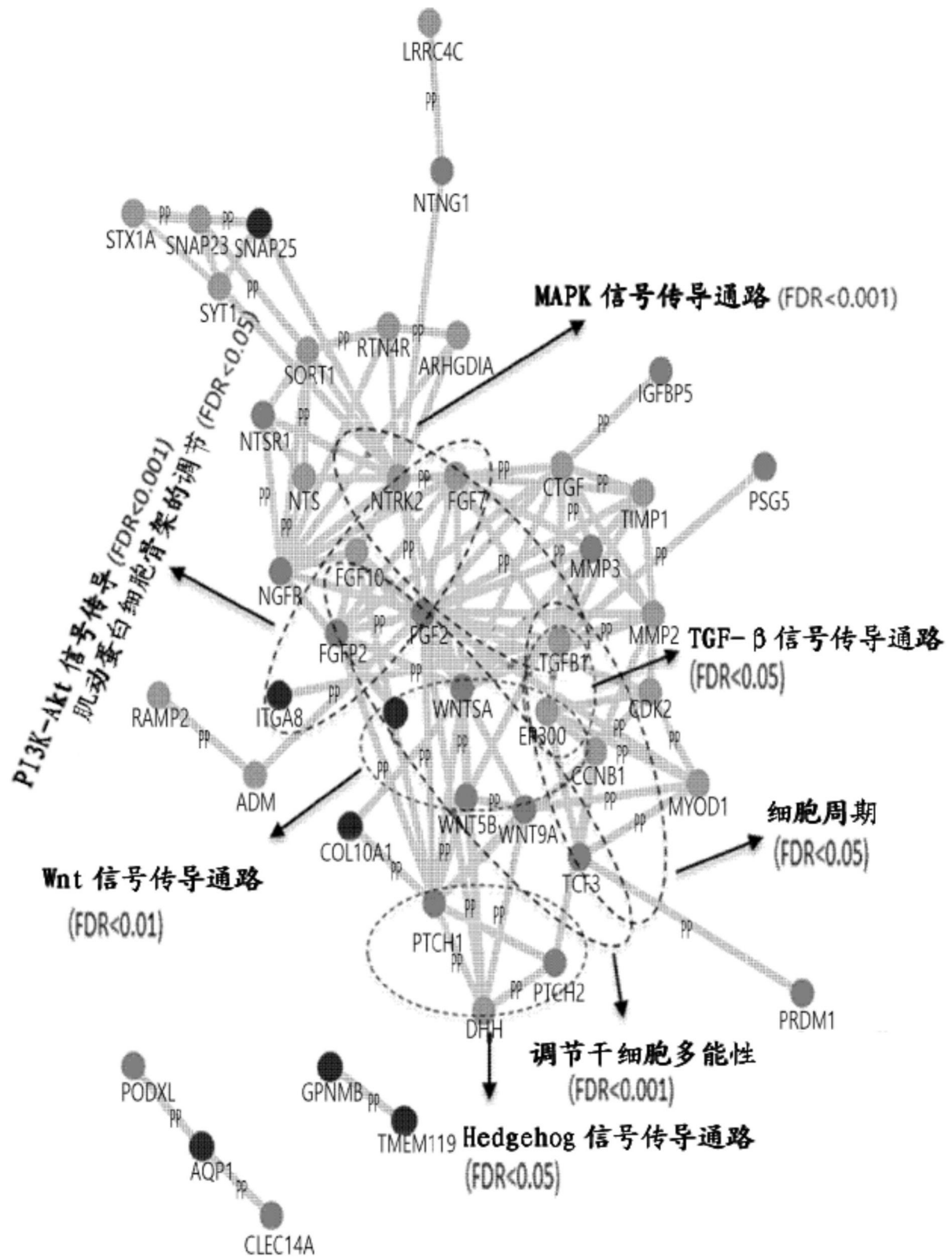


图6A

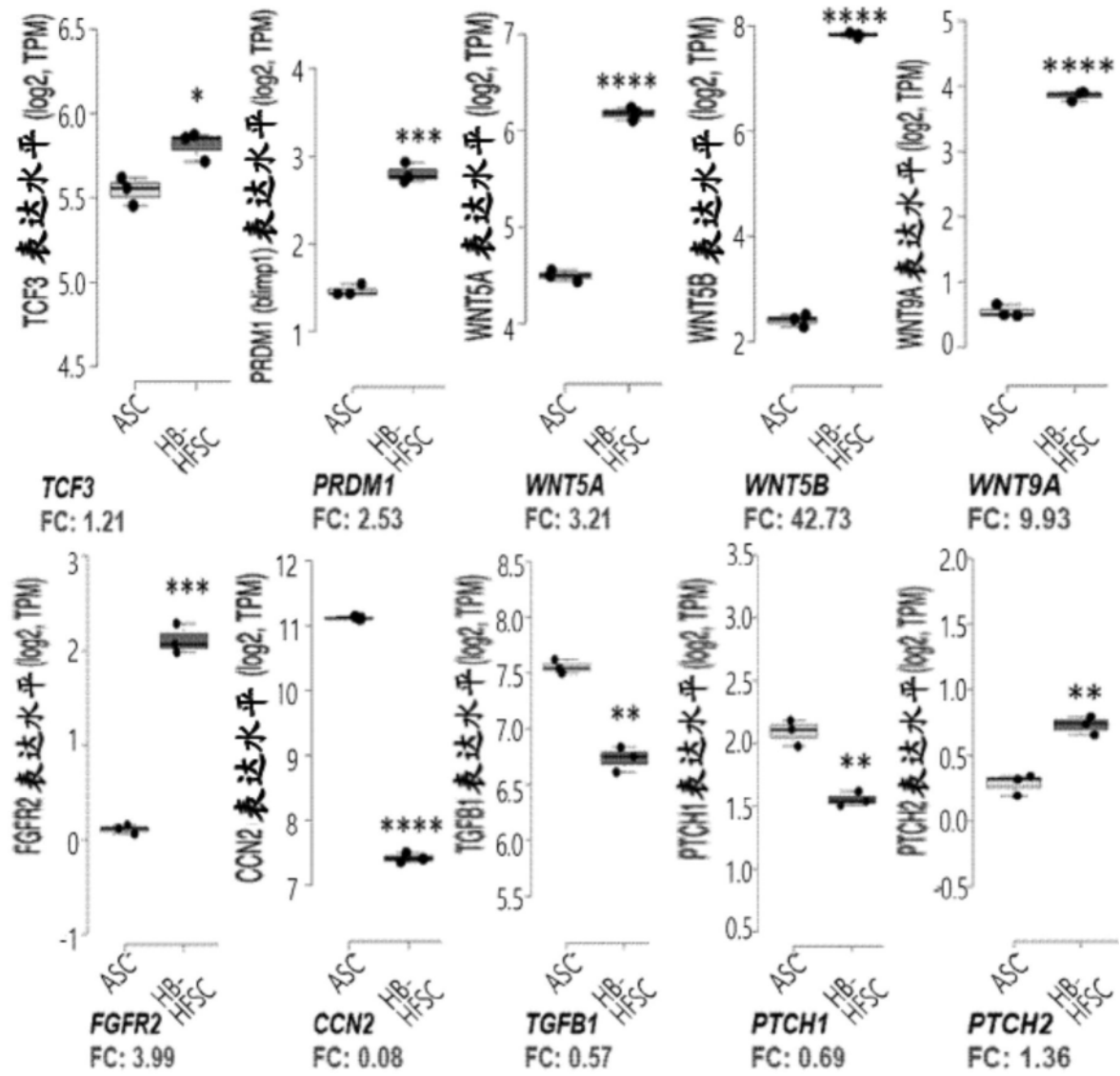


图6B

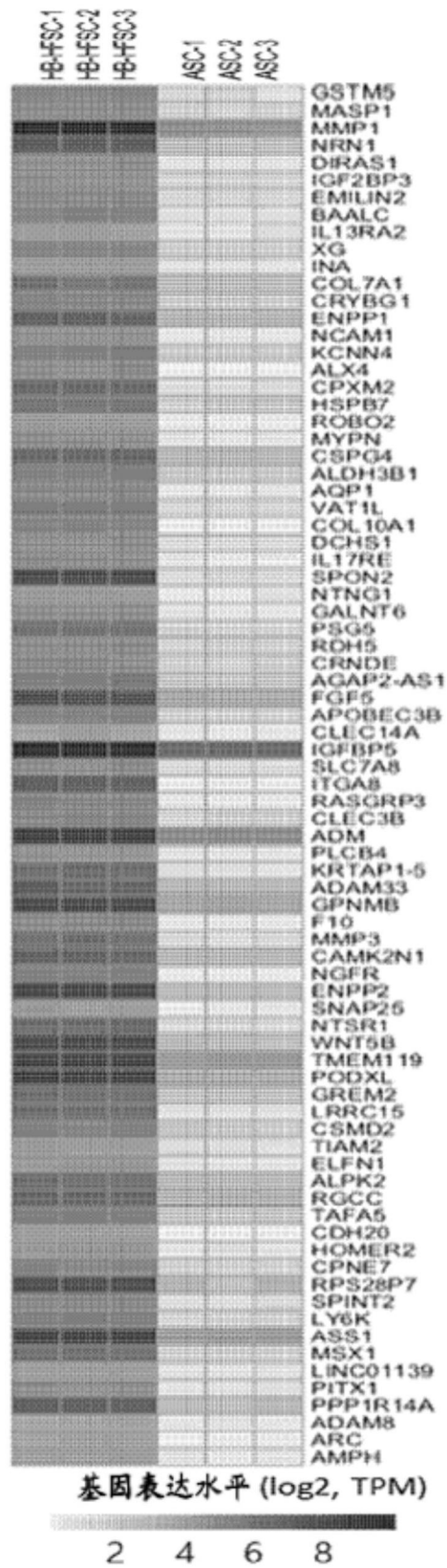


图6C

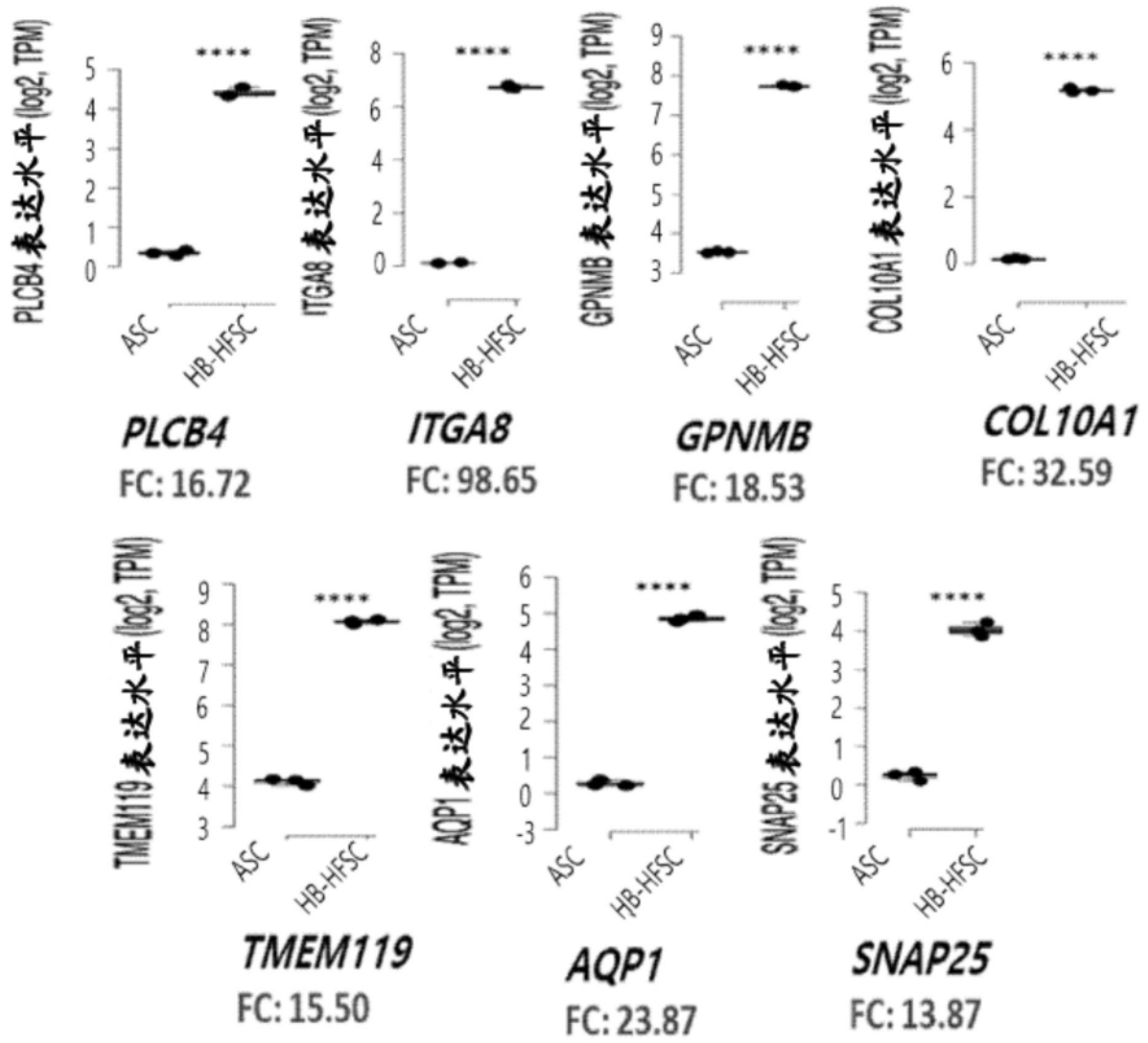


图6D

	HB-HFSC vs. CD200+ CD49+ HFSC	HB-HFSC vs. 健康 HF 组织	HB-HFSC vs. 健康 HF 组织
LRRC15		3.21	1.49
TMEM119	HB-HFSC 特异性	1.48	2.26
SNAP25	2.26		
CAMK2N1	1.11	2.04	
GPNMB	HB-HFSC 特异性	1.22	
KRTAP1-5		31.92	
PLCB4	2.46		
ITGA8	HB-HFSC 特异性		1.61
SLC7A8		2.49	3.86
AGAP2-AS1		1.12	
CRNDE			
GALNT6		1.86	1.93
IL17RE		1.33	
DCHS1	2.34		
COL10A1	HB-HFSC 特异性	1.83	3.24
VAT1L	4.61		
AQP1	1.46		

图6E

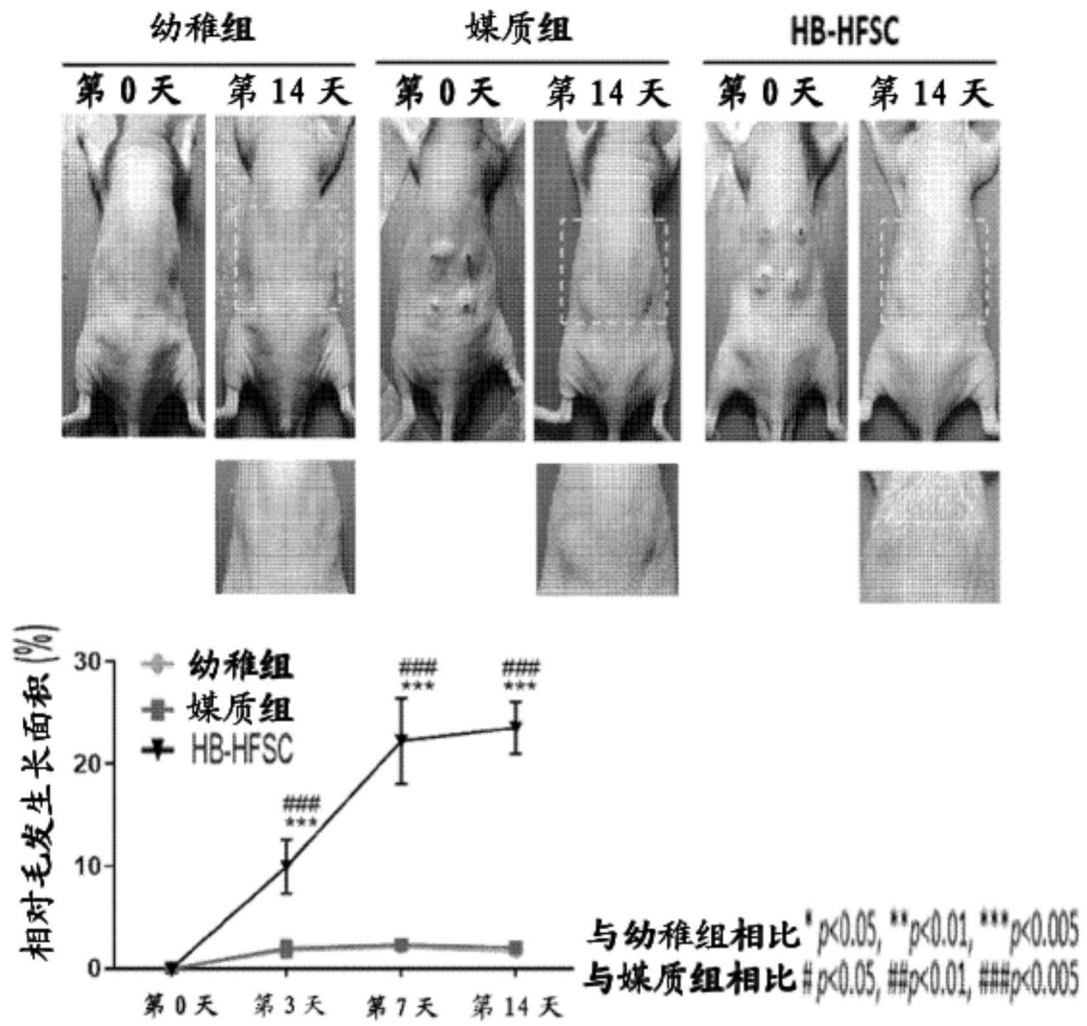


图7A

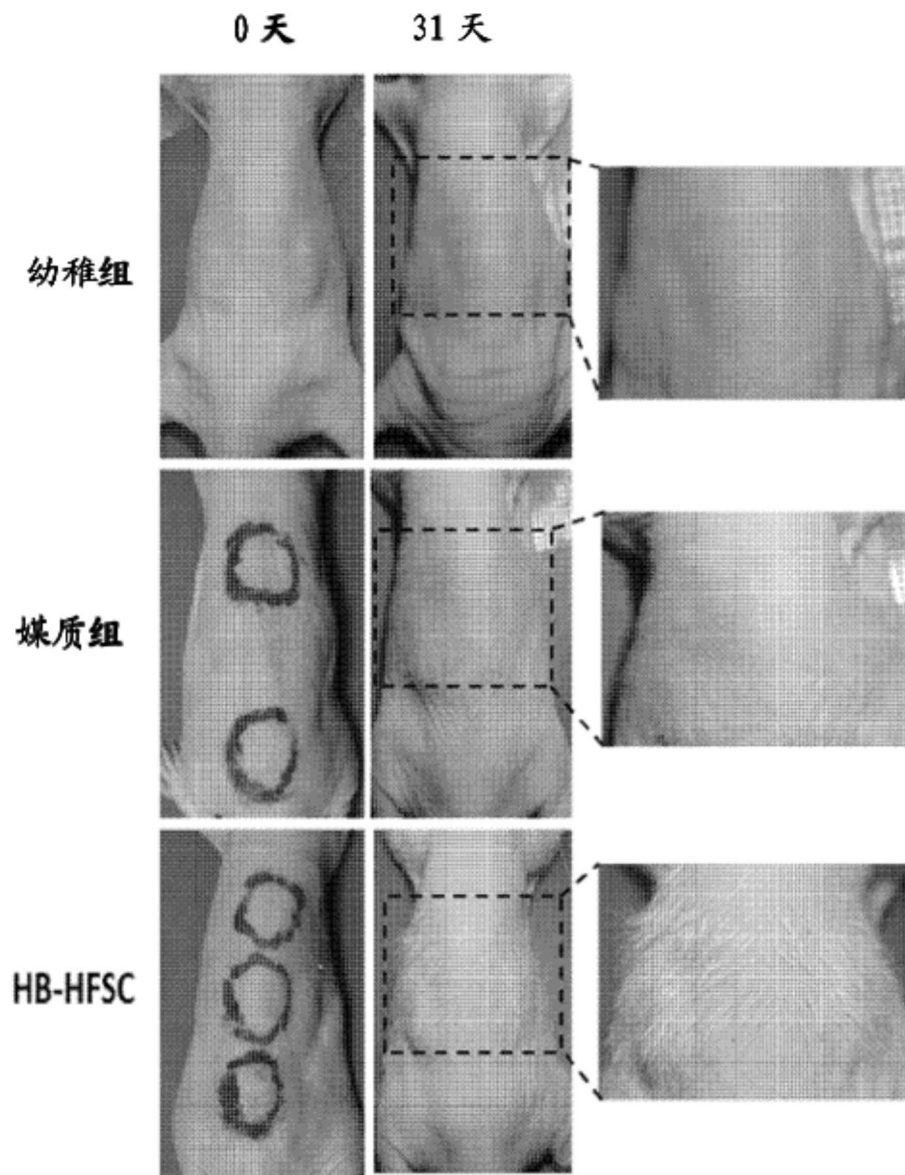


图7B

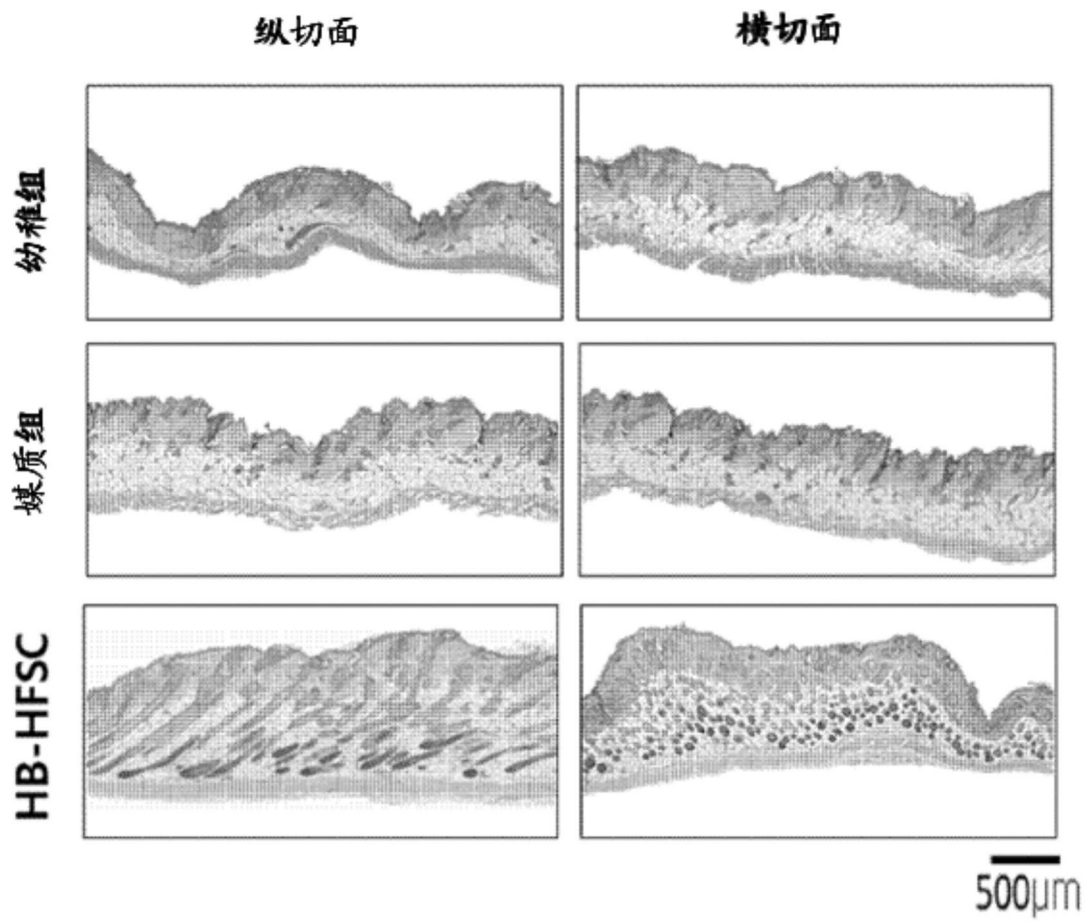


图8A

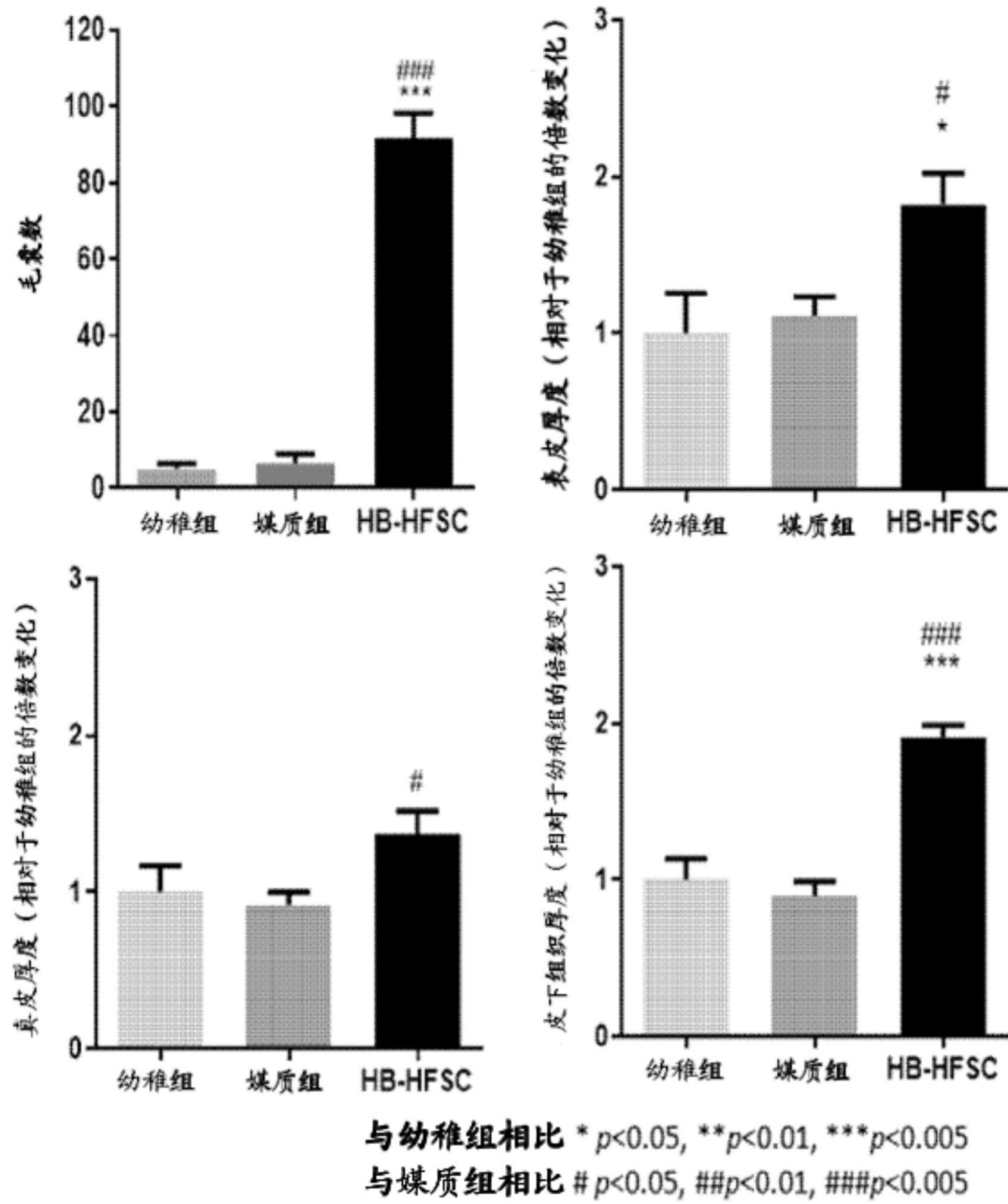


图8B

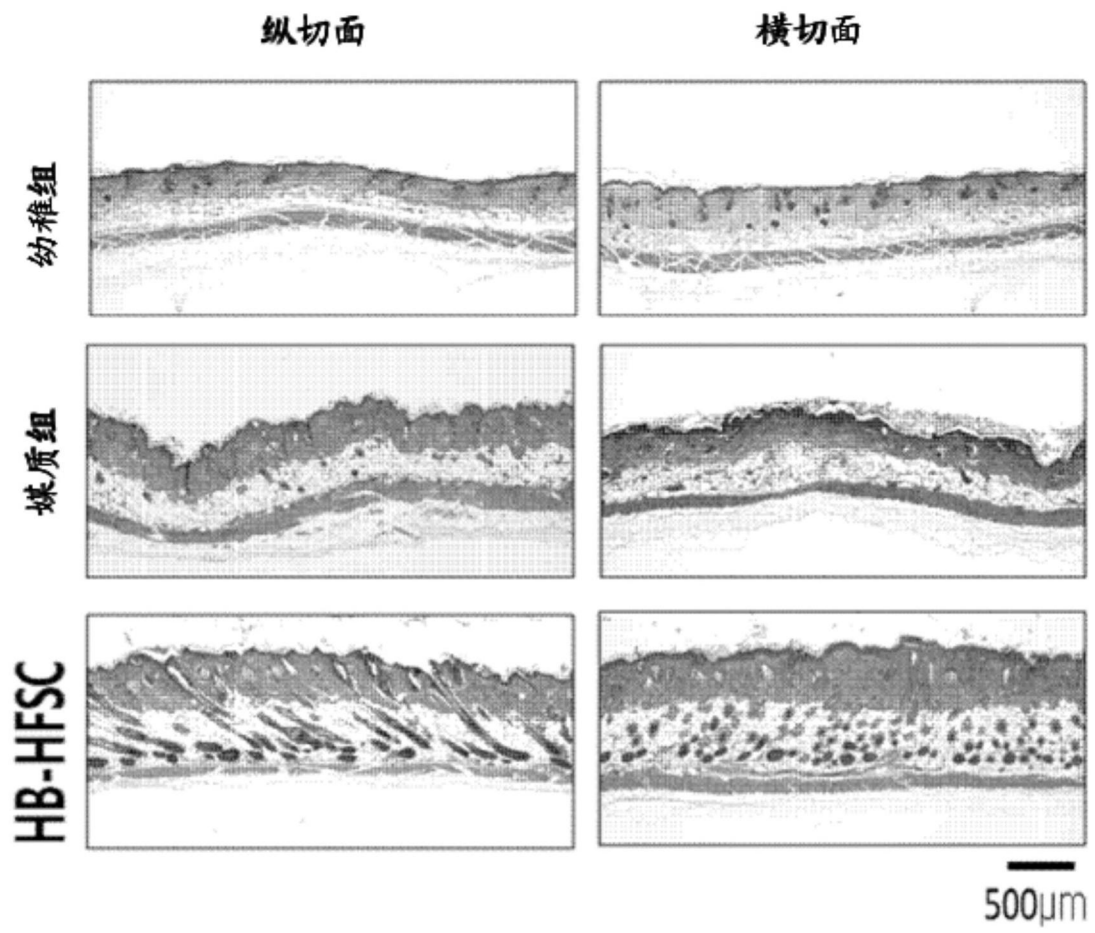


图8C

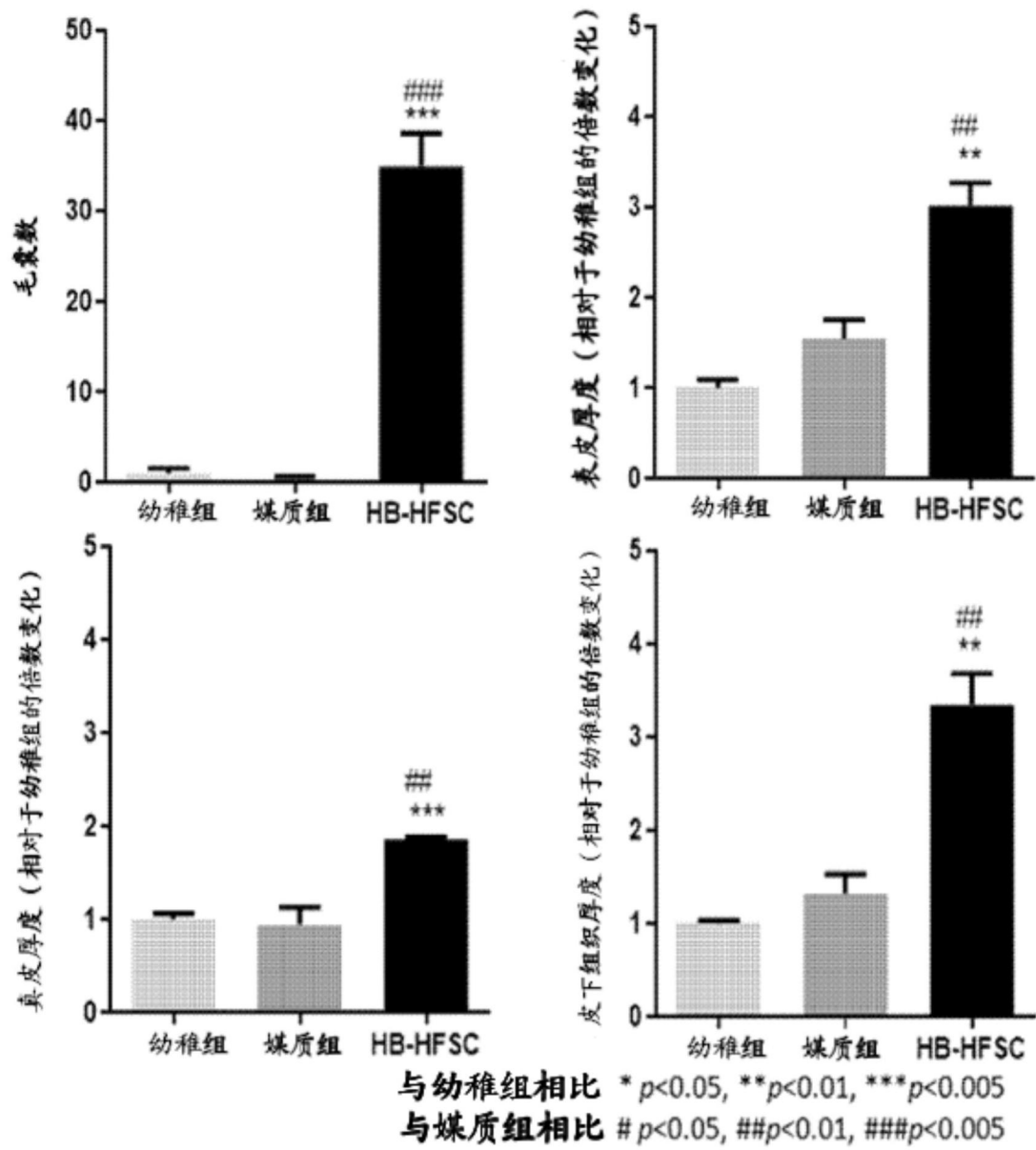


图8D

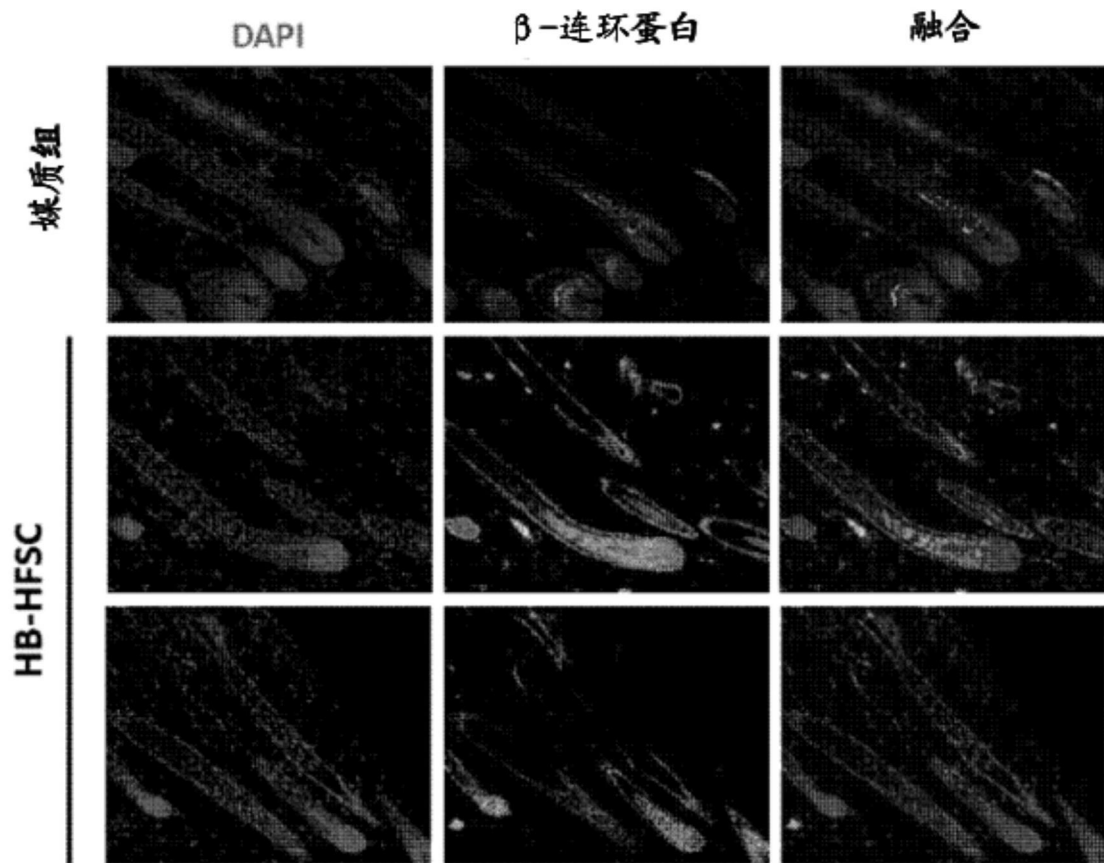


图9A



图9B