



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113018316 A

(43) 申请公布日 2021.06.25

(21) 申请号 201911346272.6

(22) 申请日 2019.12.24

(71) 申请人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明区思明南路422号

(72) 发明人 徐秀琴 刘靖

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038

代理人 李程达

(51) Int. Cl.

A61K 35/28 (2015.01)

A61K 9/06 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61K 8/99 (2017.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

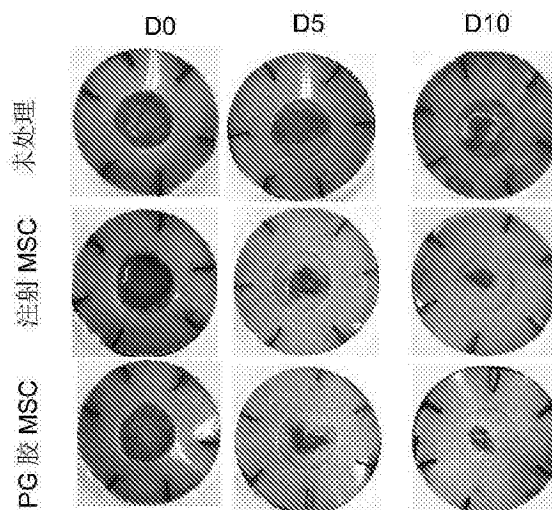
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

多能干细胞来源的间充质干细胞在修复皮肤损伤中的应用

(57) 摘要

本发明涉及人多能干细胞来源的间充质干细胞 (MSCs) 在加快皮肤伤口愈合或修复皮肤损伤方面的应用。



1. 组合物,其包含间充质干细胞(MSCs)和水凝胶,所述MSCs来源于多能干细胞,所述组合物用于加快皮肤伤口愈合或修复皮肤损伤。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中MSCs与水凝胶的比例为1:5-5:1),任选地,所述组合物还包括帮助修复皮肤损伤的细胞因子或其他物质。

3. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述MSCs来源于人胚胎干细胞(hESC)或人诱导多能干细胞(iPSC)。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的组合物在制备用于加快皮肤伤口愈合或治疗皮肤损伤的药物中的用途。

5. 根据权利要求4所述的用途,其中所述药物通过外涂施用。

6. 一种用于加快皮肤伤口愈合或治疗皮肤损伤的试剂盒,其包含权利要求1-3任一项所述的组合物和使用说明书。

## 多能干细胞来源的间充质干细胞在修复皮肤损伤中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及多能干细胞来源的间充质干细胞(MSC)在修复皮肤损伤中的应用。

### 背景技术

[0002] 皮肤是最大的人体器官,对于保护机体至关重要,各种因素造成的皮肤屏障损伤难以愈合、愈合速度慢或创伤后发生瘢痕,给患者带来极大痛苦。目前治疗手段主要是自体皮肤移植。自体皮肤移植治疗最难逾越的核心问题就是可供移植的自体皮肤来源较少,并增加了患者休克的可能性,不仅给病人增添了新的痛苦,而且这种移植与缺损区原有正常组织在形态和功能上都难以一致。目前尚缺乏有效的治疗手段。许多新技术(包括生长因子和皮肤替代物)被报道可用于促进皮肤修复,但在大多数情况下,现有治疗方法能实现伤口愈合的百分比仅为50-60%。故开发新的皮肤修复手段,渐成人们追逐的热点。

[0003] 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)属于成体干细胞的一种,其具有免疫原性低以及旁分泌功能强等特点,在干细胞应用治疗中被广泛使用。由于间充质干细胞具有抗炎、组织再生和免疫调节的作用,所以在皮肤损伤修复中具有巨大潜能。本发明人发现, MSCs可以加速皮肤伤口愈合,可成为临床治疗皮肤损伤的新手段。

[0004] 目前, MSCs可来源于包括骨髓、脐带、胎盘和脂肪等多种组织,然而用于临床试验和治疗的MSCs存在几大问题:1,细胞需求量巨大;2,需要合适的供体并可能会对供体带来损伤;3,不同来源的MSCs可能存在异质性;4,不同来源的MSCs难以统一标准,这些问题都严重阻碍了MSCs的临床治疗。而多能干细胞来源的MSCs可以很好的解决以上问题,是临床治疗领域的新型MSCs来源。

### 发明内容

[0005] 本发明的发明人出人意料地发现,多能干细胞来源的MSCs能够促进皮肤损伤修复,适合用于制备化妆品,由此完成了本发明。

[0006] 本发明第一方面提供了一种组合物,其包含MSCs和水凝胶,所述MSCs来源于多能干细胞,所述组合物用于加快皮肤伤口愈合或修复皮肤损伤。优选地,在本发明所述的组合物中MSCs与水凝胶的比例为5:1-5:1。优选地,在本发明所述的组合物中MSCs来源于人胚胎干细胞(hESC)或人诱导多能干细胞(hiPSC)。

[0007] 本发明第二方面提供了本发明所述的组合物,在制备用于加快皮肤伤口愈合或治疗皮肤损伤药物中的用途。优选地,其中所述药物通过外涂施用。

[0008] 本发明第三方面提供了一种用于加快皮肤伤口愈合或治疗皮肤损伤的试剂盒,其包含本发明所述的组合物和使用说明书。

[0009] 以下对上述方面做进一步描述。

[0010] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的MSCs是多能干细胞来源的MSCs。现阶段MSCs疗法的细胞来源主要是骨髓、脂肪组织、脐带和胎盘等,这些成体来源的MSCs,普遍存

在着一些问题,如:取材困难(特别是骨髓);随着年龄的增大MSCs的数量和扩增潜能显著降低;不同个体和同一个体不同组织来源的MSCs差异大,这导致了成体来源MSCs疗效的不稳定性。而多能干细胞来源的MSCs,可实现MSC制备的标准化和可控性,实现GMP级工业化的大规模生产,可以制备一系列高度均一、特性稳定和质量可控的MSCs。

[0011] 在本发明中所述的多能干细胞来源的MSCs可以是,使用任何适当的方法从未经过体内发育的受精14天以内的人胚胎分离或者获取的干细胞培养得到的MSCs。在一个具体实施方案中,本发明使用商业上可获得的hESC系培养得到的MSCs。培养、分化和分离方法是本领域技术人员已知的。

[0012] 在本发明中所述的多能干细胞来源的MSCs也可以是使用任何适当的方法从人诱导多能干细胞(hiPSC)培养得到的MSCs。培养、分化和分离方法是本领域技术人员已知的。

[0013] 在本发明中,所述的MSCs来源于商业上可获得的hESC细胞系,例如可来源于H9(ATCC公司,商品号是ATCC HTB-176TM)。

[0014] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的MSCs培养物为由适合培养MSCs的培养基培养所得的培养物。在本发明中,适合培养间MSCs的培养基为本领域所公知的,例如选自MEM培养基、DMEM培养基和DMEM:F12培养基。在本发明的一个具体实施方案中,所述适合培养MSCs的培养基为DMEM培养基。本领域公知,DMEM培养基的配方并不是固定不变的,根据不同的培养需求可能有不同的加减变化,例如可参考<http://www.thermofisher.com/cn/zh/home.html>中对相关产品的描述。

[0015] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的适合培养间MSCs的培养基还含有谷氨酰胺,其浓度例如为1-3mM。

[0016] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的适合培养MSCs的培养基还含有血清(例如胎牛血清),其浓度例如为5%-20%。

[0017] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的MSCs为冻干后制得的冻干粉。

[0018] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的MSCs为溶液,所述溶液通过以下方法制备得到:将所述MSCs制得的冻干粉溶解在溶剂中。

[0019] 在本发明的一个实施方案中,其中所述溶剂可以为任何可以溶解上述冻干粉并且适合药用或化妆品用的溶剂,例如选自血清、生理盐水、葡萄糖溶液(例如等渗葡萄糖溶液)和甘油。

[0020] 本发明还涉及药物组合物,其包含多能干细胞例如hESC或hiPSC来源的MSCs和药学上可接受的载体。

[0021] 在本发明的一个实施方案中,其中所述药物组合物用于修复皮肤损伤。

[0022] 在本发明中,可以将MSCs涂抹于皮肤,或者可以将MSCs冻干后再用适当的溶剂溶解,然后再涂抹于皮肤。

[0023] 在本发明的优选实施方案中,可以将MSCs与水凝胶成分混合,然后在受损部位涂抹混合水凝胶和来源于多能干细胞的MSCs,从而修复皮肤损伤。

[0024] 本发明所述的水凝胶,是以水为分散介质的凝胶,可以形成稳定的壳,以保护包裹的细胞、蛋白、药物或其他分子。水凝胶是商业上可获得的,例如sigma公司的产品G0421。

[0025] 本发明的创新点至少在于:1)多能干细胞-MSCs是临床治疗领域的新型MSCs来源;2)水凝胶混合MSCs治疗皮肤损伤;以及3)外涂施用。

## 附图说明

- [0026] 图1显示了H9细胞系的形态学。
- [0027] 图2显示了hESC来源MSCs的形态学。
- [0028] 图3显示了hiPSC来源MSCs的形态学。
- [0029] 图4显示了hESC来源MSCs的表面marker鉴定。
- [0030] 图5显示了hESC来源MSCs的生物学特征鉴定。
- [0031] 图6显示了hESC来源MSCs用于治疗皮肤损伤的效果。
- [0032] 图7hESC来源MSCs治疗皮肤损伤统计分析图。
- [0033] 图8hiPSC来源MSCs治疗皮肤损伤统计分析图。

## 具体实施方式

[0034] 为了促进对本发明的理解,以下将参考某些实施方式,并且将使用特定语言来描述本发明。然而,应当理解的是,这些具体实施方式并不意图限制本发明的范围。本说明书中所描述的实施方式中的任何改变和进一步的修改,以及本发明的任何进一步应用,均为本领域技术人员通常会想到的。

[0035] 下述实施例中所述试验方法,如无特别说明,均为常规方法;所述试剂和生物材料,如无特别说明,均可从商业途径获得。

[0036] 下述实施例中,所述百分含量如无特别说明,均为质量百分含量。

[0037] 下述实施例对本发明的具体实施做进一步说明,但本发明并不仅限于这些实施例。

[0038] 实施例1

[0039] 用来源于hESC的MSCs进行皮肤损伤修复。

[0040] 1、获得hESC来源的MSCs:

[0041] 将hESC细胞系H9分化为MSCs(分化培养基:K-DMEM+10%KSR+0.5%PSG+0.5%NAA+8ng/ml bFGF+4ng/ml PDGF+1%ITS),通过流式细胞仪对MSCs特异性表达的表面标志物CD105、CD90和CD44等进行鉴定,确定hESC向MSCs的分化效率,并进行通过成脂和成骨分化对其进行生物学特征鉴定。

[0042] H9胚胎干细胞的形态学观察见图1,无饲养层体系中培养的hESC呈克隆样生长,透光性好,克隆内细胞排列紧密,核质比高。诱导分化为MSCs后,细胞形态如图2所示,变为长梭形。通过流式分析,发现hESC-MSCs高表达间质细胞标志CD44,CD90和CD105(图4),不表达造血和内皮细胞标志CD45,说明本实验获得的hESC-MSCs具有MSCs的表型特征。

[0043] hESC-MSCs在成骨诱导分化后,细胞呈扁平状,碱性磷酸酶染色呈蓝色(图5A)。成脂诱导分化后,胞体饱满,胞质中开始出现脂滴,油红O染色呈红色(图5B)。说明hESC-MSCs具有成脂、成骨分化的能力,具有MSCs的生物学特征。

[0044] 2、建立小鼠皮肤损伤模型:

[0045] 建立小鼠皮肤损伤模型所使用的小鼠购自厦门大学实验动物中心。脱去小鼠背部毛,用打孔活检工具制作一个圆形全层皮肤机械损伤创面。小鼠均饲养在IVC独立鼠笼中,正常饮食给水。

[0046] 如图6所示,D0对照组,肉眼可见皮肤打孔器在小鼠背部造成约6mm的损伤创面。

[0047] 3、采用hESC来源的MSCs进行治疗：

[0048] 造模当天开始治疗，每天在受损皮肤上涂抹水凝胶（购自sigma公司，G0421）混合hESC-MSCs（采用三种比例：hESC-MSCs：水凝胶=1:5；hESC-MSCs：水凝胶=1:1；hESC-MSCs：水凝胶=5:1。三种比例均为50 $\mu$ l体系含 $2 \times 10^5$ 个的MSCs），分别于治疗后第5和10天观察伤口愈合情况，计算创面愈合率=（原始创面面积-未愈合创面面积）/原始创面面积 $\times 100\%$ 。对照组是涂抹不含MSCs的水凝胶和培养基。

[0049] 4、观察皮肤修复情况：

[0050] 如图6和7所示：hESC来源MSCs混合水凝胶治疗组小鼠，涂抹5天后，小鼠背部创面愈合率显著高于对照组，不同混合比例的治疗组在实验中的愈合率分别为 $60.83 \pm 4.69\%$ 、 $55.38 \pm 1.25\%$ 和 $57.79 \pm 2.35\%$ ，对照组仅为 $18.67 \pm 2.5\%$ 。并且，hESC-MSCs混合水凝胶治疗后，小鼠创面修复时间明显快于对照组。如图7所示，不同混合比例的治疗组在10天时，创面愈合率分别为 $76.67 \pm 2.74\%$ 、 $70.23 \pm 1.36\%$ 和 $73.45 \pm 3.58\%$ ，而对照组愈合率是： $45 \pm 4.47\%$ 。提示hESC-MSCs联合水凝胶具有促进皮肤损伤修复的作用。

[0051] 实施例2

[0052] 注射hESC来源的MSCs

[0053] 注射hESC来源的MSCs也可能有类似的效果，但是治疗的途径有变化，有伤害性，并且效果低于MSC混合水凝胶组。

[0054] 建立小鼠皮肤损伤模型所使用的小鼠购自（厦门大学实验动物中心）。脱去小鼠背部毛，用打孔活检工具制作一个圆形全层皮肤机械损伤创面。造模当天开始治疗，每天在受损皮下注射hESC来源的MSCs，分别于治疗后第5和10天观察伤口愈合情况。

[0055] 如图6和7所示，注射MSC的治疗组，在治疗后5天和10天的创面愈合率分别为 $48.33 \pm 4.08\%$ 和 $68.33 \pm 6.06\%$ ，高于对照组，但略低于MSC混合水凝胶组。

[0056] 实施例3

[0057] 用来源于hiPSC的MSCs进行皮肤损伤修复。

[0058] 1、获得hiPSC来源的MSCs：

[0059] hiPSC是取自健康人的细胞，按照Shinya Yamanaka等人文章（Cell, 2007, 131, 861-872）报道的方法进行制备。

[0060] 将hiPSC细胞分化为MSCs（分化培养基：K-DMEM+10%KSR+0.5%PSG+0.5%NAA+8ng/ml bFGF+4ng/ml PDGF+1%ITS）。

[0061] 结果如图3所示，分化后的MSCs具有典型的MSCs的形态特点，呈长梭形，细胞排列紧密。

[0062] 2、建立小鼠皮肤损伤模型：

[0063] 建立小鼠皮肤损伤模型所使用的小鼠购自（厦门大学实验动物中心）。脱去小鼠背部毛，用6mm的皮肤打孔器在小鼠背部制作一个圆形全层皮肤机械损伤创面。（小鼠均饲养在IVC独立鼠笼中，正常饮食给水）

[0064] 3、采用hiPSC来源的MSCs进行治疗：

[0065] 造模当天开始治疗，每天在受损皮肤上涂抹水凝胶（购自sigma公司，G0421）混合多能干细胞来源的MSCs（采用三种比例：hESC-MSCs：水凝胶=1:5；hESC-MSCs：水凝胶=1:1；hESC-MSCs：水凝胶=5:1。三种比例均为50 $\mu$ l体系含 $2 \times 10^5$ 个的MSCs），分别于治疗后第5

和10天观察伤口愈合情况,计算创面愈合率=(原始创面面积-未愈合创面面积)/原始创面面积 $\times 100\%$ 。对照组是涂抹不含MSCs的水凝胶和培养基。

[0066] 4、观察皮肤修复情况:

[0067] hiPSC来源MSCs治疗组小鼠,涂抹5天后,治疗组明显比其它小鼠创面面积小,修复时间明显快于对照组。

[0068] 如图8所示:hiPSC来源MSCs混合水凝胶治疗组小鼠,涂抹5天后,小鼠背部创面愈合率显著高于对照组,不同混合比例的治疗组在实验中的愈合率分别为 $58.91 \pm 4.26\%$ 、 $56.28 \pm 3.25\%$ 和 $55.79 \pm 4.35\%$ ,对照组仅为 $18.25 \pm 2.31\%$ 。并且,hiPSC-MSCs混合水凝胶治疗后,小鼠创面修复时间明显快于对照组。如图8所示,不同混合比例的治疗组在10天时,创面愈合率分别为 $72.46 \pm 3.37\%$ 、 $71.23 \pm 2.34\%$ 和 $70.45 \pm 4.32\%$ ,而对照组愈合率是: $44.99 \pm 3.25\%$ 。提示hiPSC-MSCs联合水凝胶具有促进皮肤损伤修复的作用。

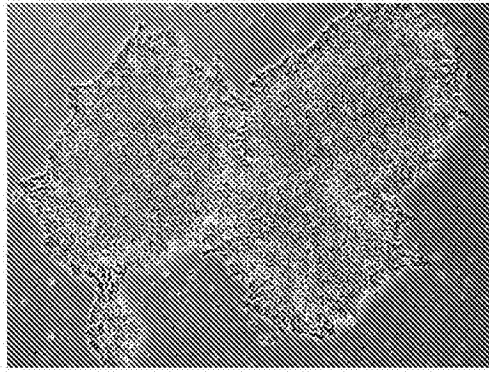


图1

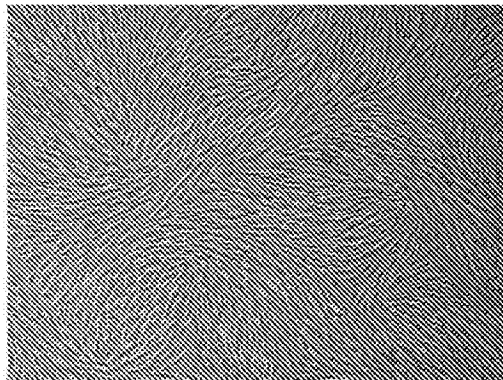


图2

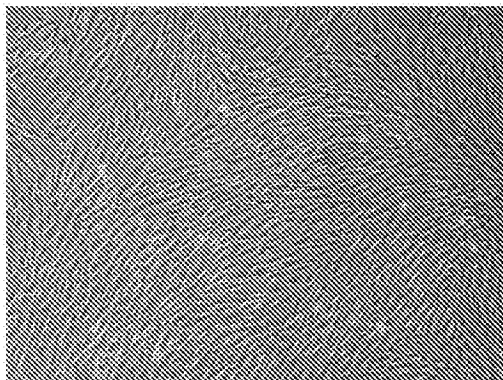


图3



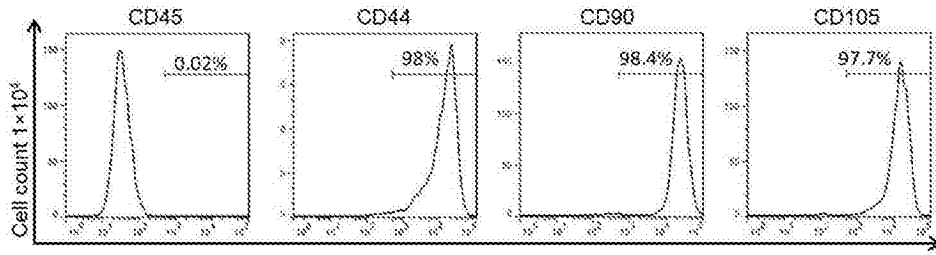


图4

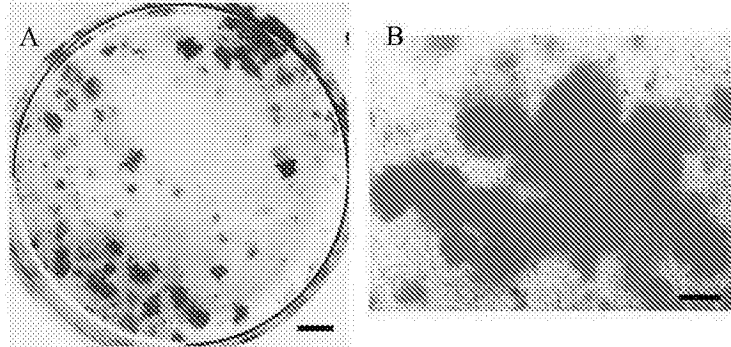


图5

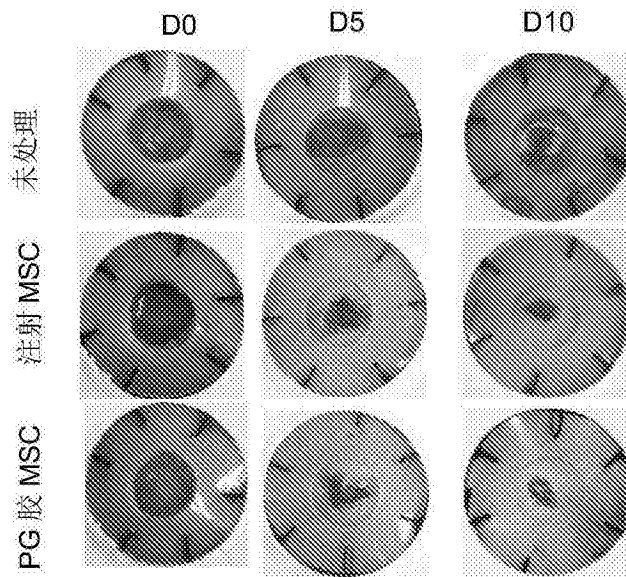


图6

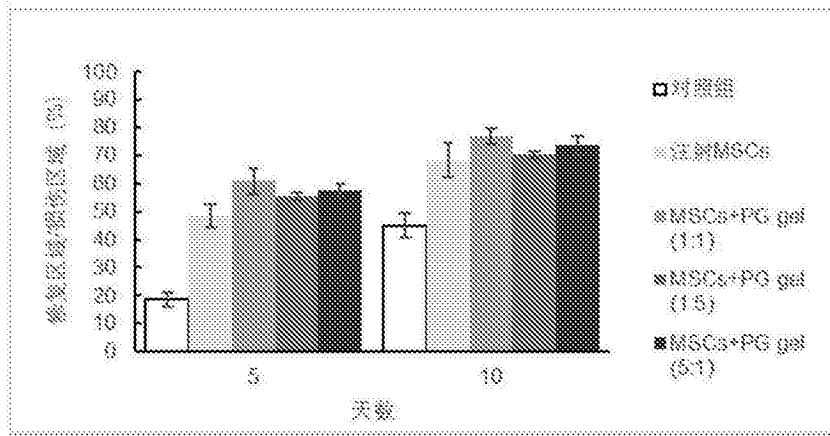


图7

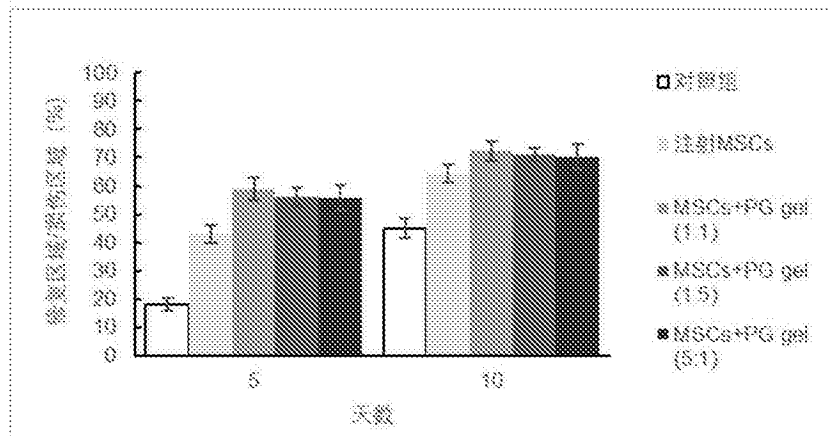


图8