



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109893542 A

(43)申请公布日 2019.06.18

(21)申请号 201810304220.1

C12N 5/0775(2010.01)

(22)申请日 2018.04.04

(71)申请人 天津欣普赛尔生物医药科技有限公司

地址 300400 天津市北辰区中关村(天津)  
可信产业园A11

(72)发明人 张冰晶 韩洪起 鲁振宇 牟鑫煜  
徐悦

(74)专利代理机构 天津才智专利商标代理有限公司 12108

代理人 王晓红

(51)Int.Cl.

A61K 35/28(2015.01)

A61K 9/06(2006.01)

A61P 15/10(2006.01)

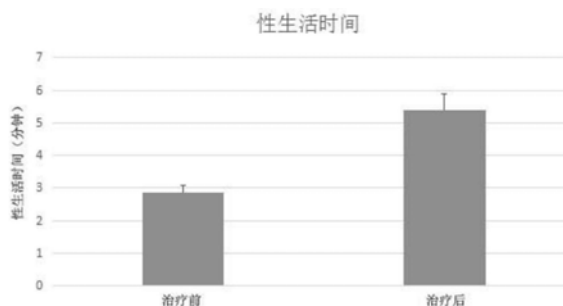
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

### (54)发明名称

用于治疗勃起功能障碍的干细胞外泌体浓缩液凝胶制剂及其制备方法与给药方法

### (57)摘要

本发明公开了一种用于治疗勃起功能障碍的干细胞外泌体浓缩液凝胶制剂及其制备方法与给药方法,采用饥饿脐带间充质干细胞的方法,在较短时间内就能得到人脐带间充质外泌体提取物,通过超速离心的方法浓缩以获得高浓度的人脐带间充质干细胞外泌体,其中人脐带间充质干细胞外泌体外用凝胶中含有海藻酸钠和复方电解质注射液作为稳定剂,并含有保湿剂、透皮吸收促进剂,使其形成稳定均一,利于吸收的凝胶状物质。用于男性ED的治疗。



1. 一种用于治疗勃起功能障碍的干细胞外泌体浓缩液凝胶制剂的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 人脐带间充质干细胞的培养:选取生长状态良好的,微生物检测均为阴性的,P2-P8的人源脐带间充质干细胞,按照 $3-5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的初始密度接种于细胞培养瓶或细胞培养皿中,培养基为基础培养基中含有体积比浓度5-15%的胎牛血清的培养体系;

(2) 接种培养2-4天后,细胞融合率达到80-95%,细胞生长状态良好,吸弃全部培养上清,并以医用复方电解质注射液清洗细胞2-4次,然后加入复方电解质溶液,使溶液高度达到2-3mm,放入二氧化碳培养箱中饥饿培养;

(3) 饥饿培养18-30h后,回收全部培养上清,以0.22 $\mu\text{m}$ 孔径滤膜过滤,过滤后的培养上清在3000-5000g的离心力条件下离心10-20min,再次回收离心上清;

(4) 在200000-500000g的离心力条件下对回收的上清离心30-60min,离心后轻轻取出离心管,以移液管吸弃上部70%-90%体积的液体,将下部10%-30%体积的液体及沉淀混合均匀后作为制备ED治疗制剂的原料—脐带间充质干细胞外泌体浓缩液;

(5) ED治疗凝胶制剂的配制:每100ml制剂中含有药用高分子稳定剂2-10g、保湿剂5-10ml、透皮吸收促进剂5-10ml、步骤(4)得到的脐带间充质干细胞外泌体浓缩液10-50ml,复方电解质注射液余量。

2. 如权利要求1所述的制备方法制得的用于治疗勃起功能障碍的干细胞外泌体浓缩液凝胶制剂。

3. 如权利要求2所述用于治疗勃起功能障碍的干细胞外泌体浓缩液凝胶制剂,通过直接涂抹于阴茎龟头处,通过皮肤直接吸收的给药方法。

## 用于治疗勃起功能障碍的干细胞外泌体浓缩液凝胶制剂及其制备方法

### 与给药方法

#### 技术领域

[0001] 本发明涉及干细胞外泌体浓缩液凝胶制剂,尤其是一种用于治疗勃起功能障碍的干细胞外泌体浓缩液凝胶制剂及其制备方法与给药方法。

#### 背景技术

[0002] 勃起功能障碍(erectile dysfunction,ED)是最常见的一种男性性功能障碍,指阴茎持续不能达到或维持足够的勃起以完成满意性生活,病程3个月以上。ED一般可分为器质性ED、手术或外伤性ED、精神性ED、阴茎自身病变等,常规的治疗方法可通过口服药物治疗,但药物治疗依赖性强,不能达到根治的目的。

[0003] 脐带间充质干细胞属于成体干细胞,具有多向分化、组织修复、免疫调节等多种功能,因其免疫原性极低,异体使用不会引起免疫排斥,故在临床应用中具有极大的优势。研究显示,脐带间充质干细胞能够一定程度上治疗和缓解ED症状。但是,直接静脉回输脐带间充质干细胞由于细胞难于到达阴茎部位,所以治疗效果有限,而将脐带间充质干细胞直接注射于阴茎中的方法相对复杂,且风险较高。

[0004] 研究发现,脐带间充质干细胞行使生物学功能的一个最重要途径是通过分泌大量生物活性因子,进而调节病变组织的机能、促进血管再生、加速组织再生修复。而大量的生物活性因子的分泌途径主要是通过外泌体,一种生物膜包裹的、直径在40-200nm不等的分泌小泡。

#### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是,提供一种用于治疗勃起功能障碍的干细胞外泌体浓缩液凝胶制剂及其制备方法与给药方法,通过饥饿培养脐带间充质干细胞并进行富集浓缩的方法,获得高浓度的具有生物活性的脐带间充质干细胞外泌体,制备通过外部涂抹用于治疗ED的外用脐带间充质干细胞外泌体浓缩液凝胶制剂。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:一种用于治疗勃起功能障碍的干细胞外泌体浓缩液凝胶制剂的制备方法,包括以下步骤:

[0007] (1) 人脐带间充质干细胞的培养:选取生长状态良好的,微生物检测均为阴性的,P2-P8的人源脐带间充质干细胞,按照 $3-5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的初始密度接种于细胞培养瓶或细胞培养皿中,培养基为基础培养基中含有体积比浓度5-15%的胎牛血清的培养体系;

[0008] (2) 接种培养2-4天后,细胞融合率达到80-95%,细胞生长状态良好,吸弃全部培养上清,并以医用复方电解质注射液清洗细胞2-4次,然后加入复方电解质溶液,使溶液高度达到2-3mm,放入二氧化碳培养箱中饥饿培养;

[0009] (3) 饥饿培养18-30h后,回收全部培养上清,以0.22 $\mu\text{m}$ 孔径滤膜过滤,过滤后的培养上清在3000-5000g的离心力条件下离心10-20min,再次回收离心上清;

[0010] (4) 在200000-500000g的离心力条件下对回收的上清离心30-60min,离心后轻轻

取出离心管,以移液管吸弃上部70%-90%体积的液体,将下部10%-30%体积的液体及沉淀混合均匀后作为制备ED治疗制剂的原料—脐带间充质干细胞外泌体浓缩液;

[0011] (5) ED治疗凝胶制剂的配制:每100ml制剂中含有药用高分子稳定剂2-10g、保湿剂5-10ml、透皮吸收促进剂5-10ml、步骤(4)得到的脐带间充质干细胞外泌体浓缩液10-50ml,复方电解质注射液余量。

[0012] 上述的制备方法制得的用于治疗勃起功能障碍的干细胞外泌体浓缩液凝胶制剂。

[0013] 上述用于治疗勃起功能障碍的干细胞外泌体浓缩液凝胶制剂,通过直接涂抹于阴茎龟头处,通过皮肤直接吸收的给药方法。

[0014] 本发明的有益效果是:间充质干细胞在培养过程中会分泌多种大量的外泌体,外泌体能够促进皮肤组织分化、血管新生以及肉芽组织的生长,可调节局部组织微环境,促进血管新生,改善局部供血,从而达到改善阴茎供血、治疗ED的效果。本发明采用饥饿脐带间充质干细胞的方法,在较短时间内就能得到人脐带间充质外泌体提取物,通过超速离心的方法浓缩以获得高浓度的人脐带间充质干细胞外泌体。制剂中加入了保湿剂和吸收促进剂,最大限度增加外泌体的稳定性和活性,并提高其透皮吸收能力,治疗效果大大提高。

## 附图说明

[0015] 图1实施例1治疗前后性生活时间对比图。

[0016] 图2实施例2治疗前后性生活时间对比图。

[0017] 图3实施例3治疗前后性生活时间对比图。

## 具体实施方式

[0018] 下面结合具体实施方式对本发明作进一步详细说明:

[0019] 本发明的用于治疗勃起功能障碍的干细胞外泌体浓缩液凝胶制剂的制备方法,包括以下步骤:

[0020] (1) 人脐带间充质干细胞的培养:选取生长状态良好的,微生物检测均为阴性的,P2-P8的人源脐带间充质干细胞,按照 $3-5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的初始密度接种于细胞培养瓶或细胞培养皿中,培养基为基础培养基中含有体积比浓度5-15%的胎牛血清的培养体系;

[0021] (2) 接种培养2-4天后,细胞融合率达到80-95%,细胞生长状态良好,吸弃全部培养上清,并以医用复方电解质注射液清洗细胞2-4次,然后加入复方电解质溶液,使溶液高度达到2-3mm,放入二氧化碳培养箱中饥饿培养;

[0022] (3) 饥饿培养18-30h后,回收全部培养上清,以0.22 $\mu\text{m}$ 孔径滤膜过滤,过滤后的培养上清在3000-5000g的离心力条件下离心10-20min,再次回收离心上清;

[0023] (4) 在200000-500000g的离心力条件下对回收的上清离心30-60min,离心后轻轻取出离心管,以移液管吸弃上部70%-90%体积的液体,将下部10%-30%体积的液体及沉淀混合均匀后作为制备ED治疗制剂的原料—脐带间充质干细胞外泌体浓缩液;

[0024] (5) ED治疗凝胶制剂的配制:每100ml制剂中含有药用高分子稳定剂2-10g、保湿剂5-10ml、透皮吸收促进剂5-10ml、步骤(4)得到的脐带间充质干细胞外泌体浓缩液10-50ml,复方电解质注射液余量。

[0025] 上述的制备方法制得的用于治疗勃起功能障碍的干细胞外泌体浓缩液凝胶制剂。

[0026] 上述用于治疗勃起功能障碍的干细胞外泌体浓缩液凝胶制剂,通过直接涂抹于阴茎龟头处,通过皮肤直接吸收的给药方法。

[0027] 所述药用高分子稳定剂为海藻酸钠、透明质酸钠、壳聚糖和羟乙基淀粉中的一种。

[0028] 所述保湿剂为丙二醇和甘油。

[0029] 所述头皮吸收促进剂为二甲基亚砷。

[0030] 所述复方电解质溶液为四川科伦药业股份有限公司生产,成分为每1000ml含氯化钠5.26g、葡萄糖酸钠5.02g、醋酸钠3.68g、氯化钾0.37g、氯化镁0.30g

[0031] 本发明含有浓缩3.3-9倍的脐带间充质干细胞饥饿培养获得外泌体成分。通过对脐带间充质干细胞饥饿培养的方法,促进其生物活性物质的分泌。以外泌体的形式回收脐带间充质干细胞分泌的生物活性物质,大大提高了回收效率、回收方式更为简便通过超速离心的方法浓缩外泌体,提高了外泌体的浓度。

[0032] 本发明间充质干细胞在培养过程中会分泌多种大量的外泌体,人脐带间充质干细胞分泌的外泌体能够促进皮肤组织分化、血管新生以及肉芽组织的生长,可调节局部组织微环境,促进血管新生,改善局部供血,从而达到改善阴茎供血、治疗ED的效果。本发明采用饥饿脐带间充质干细胞的方法,在较短时间内就能得到人脐带间充质外泌体提取物,通过超速离心的方法浓缩以获得高浓度的人脐带间充质干细胞外泌体,其中人间充质干细胞外泌体外用凝胶中含有海藻酸钠和复方电解质注射液作为稳定剂,并含有保湿剂、透皮吸收促进剂,使其形成稳定均一,利于吸收的凝胶状物质。用于男性ED的治疗。

[0033] 实施案例1:

[0034] 患者李某,39岁,因工作繁忙、压力大,在一年前出现性欲减退、性生活频率降低,并出现早期的勃起功能障碍症状,治疗前3个月内性生活频率平均为1次/周,其中2次因阴茎无法正常勃起未完成性生活;5次在性交过程中阴茎在射精前未能保持勃起状态,射精失败;另外7次完成了性交过程,平均时间不足3分钟。按照《国际勃起功能指数》自测评分为12分,属于轻度勃起功能障碍。

[0035] 患者使用外泌体凝胶治疗四周,每天在早晨、中午及晚上入睡前清洗阴茎后取凝胶涂抹阴茎整个龟头,每次涂抹1-2ml,保证凝胶全部被吸收。治疗周期中,患者保持1次/周的性生活频率,期间勃起情况不做统计。

[0036] 治疗四周后停用凝胶,一个月内患者共进行5次性生活,全部成功完成射精,平均性交时间达到5.4分钟,治疗效果明显(图1),差异显著( $p < 0.01$ )。按照《国际勃起功能指数》自测评分为16分,属于轻度勃起功能障碍。

[0037] 实施案例2:

[0038] 患者李某,45岁,糖尿病患病5年以上,性生活频率降低,治疗前6个月内性生活频率平均为1次/两周,出现明显勃起功能障碍症状。统计6个月的性生活质量,其中3次因阴茎无法正常勃起未完成性生活;5次在性交过程中阴茎在射精前未能保持勃起状态,射精失败;另外6次完成了性交过程,平均时间不足3min。按照《国际勃起功能指数》自测评分为9分,属于中度勃起功能障碍。

[0039] 患者使用外泌体凝胶治疗四周,每天在早晨、中午及晚上入睡前清洗阴茎后取凝胶涂抹阴茎整个龟头,每次涂抹1-2ml,保证凝胶全部被吸收。治疗周期中,患者发生过两次性生活,期间勃起情况不做统计。

[0040] 治疗四周后停用凝胶,3个月内患者共进行8次性生活,全部成功完成射精,平均性交时间达到5分钟,治疗效果明显(图2),差异显著( $p<0.01$ )。按照《国际勃起功能指数》自测评分为14分,属于轻度勃起功能障碍。

[0041] 实施案例3:

[0042] 患者赵某,42岁,糖尿病患病1年以上,性生活频率降低,治疗前3个月内性生活频率平均为1次/周,出现明显勃起功能障碍症状。统计3个月的性生活质量,其中1次因阴茎无法正常勃起未完成性生活;2次在性交过程中阴茎在射精前未能保持勃起状态,射精失败;另外11次完成了性交过程,平均时间不足4min。按照《国际勃起功能指数》自测评分为14分,属于轻度勃起功能障碍。

[0043] 患者使用外泌体凝胶治疗四周,每天在早晨、中午及晚上入睡前清洗阴茎后取凝胶涂抹阴茎整个龟头,每次涂抹1-2ml,保证凝胶全部被吸收。治疗周期中,患者发生过4次性生活,期间勃起情况不做统计。

[0044] 治疗四周后停用凝胶,2个月内患者共进行10次性生活,全部成功完成射精,平均性交时间达到8分钟,治疗效果明显(图3),差异显著( $p<0.01$ )。按照《国际勃起功能指数》自测评分为20分,属于轻度勃起功能障碍。

[0045] 综上所述,本发明的内容并不局限在上述的实施例中,相同领域内的有识之士可以在本发明的技术指导思想之内可以轻易提出其他的实施例,但这种实施例都包括在本发明的范围之内。

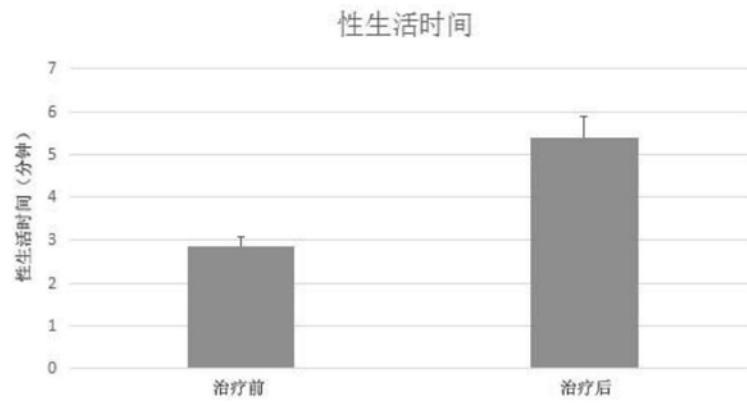


图1

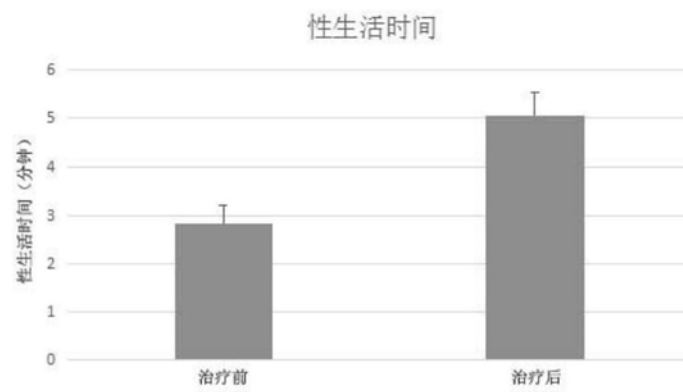


图2

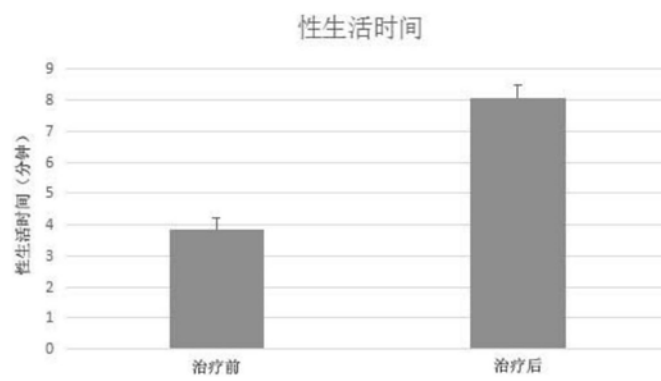


图3