

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61L 27/24 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580027334.7

[43] 公开日 2007 年 7 月 18 日

[11] 公开号 CN 101001652A

[22] 申请日 2005.8.5

[21] 申请号 200580027334.7

[30] 优先权

[32] 2004.8.13 [33] DE [31] 102004039537.3

[86] 国际申请 PCT/EP2005/008478 2005.8.5

[87] 国际公布 WO2006/018147 德 2006.2.23

[85] 进入国家阶段日期 2007.2.12

[71] 申请人 彭尼恩两合公司

地址 德国法兰克福

[72] 发明人 奥古斯特·贝恩德

沃尔夫冈·弗里斯

卡斯滕·鲁迪格·梅韦斯

马丁纳·劳斯 亨利埃特·本茨

斯特凡·基彭伯格

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任
公司

代理人 杨 青 樊卫民

权利要求书 3 页 说明书 20 页

[54] 发明名称

生产皮肤替代物的交联胶原基质

[57] 摘要

本发明涉及制备皮肤替代物、真皮替代物、表皮替代物的交联胶原基质，和基于所述胶原基质的皮肤替代物，并涉及制备所述胶原基质和真皮、表皮或皮肤替代物的方法。

1. 一种制备全皮模型的方法，其特征在于
 - a. 从含胶原的组织得到难溶的胶原，
 - b. 将所述难溶胶原依靠混合装置转化成均匀的胶原悬液，
 - c. 冻干所述胶原悬液，进而产生第一基质 A，
 - d. 第一基质 A 经过交联，进而产生机械稳定的第二基质 B，
 - e. 将成纤维细胞播散到第二基质 B 上，并使之生长，
 - f. 角化细胞在第二基质 B 上种植，并使之生长，以及最后，
 - g. 将在基质 B 内外生长的成纤维细胞和角化细胞进一步培养，直至完全形成全皮模型的真皮和表皮部分。
2. 一种制备胶原基质的方法，其特征在于
 - a. 从含胶原的组织得到难溶的胶原，
 - b. 将所述难溶胶原依靠混合装置转化成均匀的胶原悬液，
 - c. 冻干所述胶原悬液，进而产生第一基质 A，
 - d. 第一基质 A 经过交联，进而产生机械稳定的第二基质 B。
3. 一种制备真皮替代物的方法，其特征在于
 - a. 从含胶原的组织得到难溶的胶原，
 - b. 将所述难溶胶原依靠混合装置转化成均匀的胶原悬液，
 - c. 冻干胶原悬液，进而产生第一基质 A，
 - d. 第一基质 A 经过交联，进而产生机械稳定的第二基质 B，
 - e. 将成纤维细胞播散到第二基质 B 上，并使之生长，以及最后，
 - f. 将在基质 B 内外生长的成纤维细胞进一步培养，直至完全形成真皮替代物。
4. 一种制备表皮替代物的方法，其特征在于
 - a. 从含胶原的组织得到难溶的胶原，
 - b. 将所述难溶胶原依靠混合装置转化成均匀的胶原悬液，

c. 冻干所述胶原悬液，进而产生第一基质 A，
d. 第一基质 A 经过交联，进而产生机械稳定的第二基质 B，
e. 将角化细胞播散到第二基质 B 上，并使之生长，以及最后，
f. 将在基质 B 内外生长的角化细胞进一步培养，直至完全形成表皮替代物。

5. 权利要求 1 至 4 中任一项所述的方法，其特征在于所述难溶胶原是粗纤维胶原，所述粗纤维胶原在水性培养基中放置数小时后，不显示可见的溶胀或凝胶化或只有轻微的溶胀或凝胶化，并且优选是来自动物，尤其是哺乳动物，优选马、猪或牛的腱，以及最特别的是来自牛的跟腱的难溶胶原。

6. 前述权利要求中任一项所述的方法，其特征在于冻干步骤 c) 在冷却速度高达每小时 50°C，优选每小时 5°C 至 40°C，优选每小时 10°C 至 30°C，更优选每小时 15°C 至 25°C，最优选每小时 18-23°C，并且甚至更优选每小时 20°C 至 22°C 下进行。

7. 通过权利要求 1 所述的方法得到的全皮模型。

8. 权利要求 7 所述的全皮模型，其特征在于表达了皮肤特有的蛋白，尤其是弹性蛋白。

9. 权利要求 7 或 8 所述的全皮模型，其特征在于所述全皮模型集居有微生物，尤其是致病微生物。

10. 权利要求 9 所述的全皮模型，其特征在于所述微生物选自金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）和假丝酵母（*Candida*）、马拉色菌（*Malassezia*）和毛癣菌（*Trichophyton*）属的种。

11. 通过权利要求 2 所述的方法得到的胶原基质。

12. 通过权利要求 3 所述的方法得到的真皮替代物。

13. 通过权利要求 4 所述的方法得到的表皮替代物。

14. 权利要求 11 所述的胶原基质在制备真皮替代物、表皮替代物或全皮模型中的应用。

15. 权利要求 7 至 10 所述的全皮模型、权利要求 12 所述的真皮替代物或权利要求 13 所述的表皮替代物，在检测产物，尤其是有效性、不需要的副作用、刺激、毒性和发炎或过敏作用或物质相容性中的应用。

生产皮肤替代物的交联胶原基质

本发明涉及制备皮肤替代物、真皮替代物、表皮替代物的交联胶原基质，和基于所述胶原基质的皮肤替代物，并涉及制备所述胶原基质和真皮、表皮或皮肤替代物的方法。

皮肤典型的全皮模型(whole skin model)，也可以称为体外皮肤替代物，可在皮肤病学和变态反应学中作为试验皮肤用于检验物质，例如潜在的药物或化妆品，或动因(agent)，如光和热，检验其药理或美容作用，更具体的是刺激性、毒性和发炎作用，并检验其相容性。另外，所述系统可以用于各种免疫学、组织学和分子生物工作。这些包括，例如，对伤口愈合的研究和对物质渗透和吸收的研究。较之动物试验和人类志愿者试验，用所述全皮模型检验物质能提供显著的优势，因为以全皮模型得到的结果更易再现，并且检验可以更快进行，还较廉价。

近年来，人类细胞培养已逐渐用作检验原材料和产品的体外系统。器官样人类组织或生物人工结构物和共培养系统代表了细胞培养技术的进一步发展。所得的结果可以用于人类，甚至比单细胞培养得到的结果更好。

EP 0 197 090 B1 公开了用于形成皮肤替代物的方法，其中通过将酸性胶原溶液和收缩细胞，例如成纤维细胞混合，产生水合胶原网架。中和 pH 后，将胶原原纤维在胶原网架中沉淀。收缩细胞将其自身贴附到胶原网架上，并导致其收缩，致使真皮替代物的形成。将钻孔皮肤活检(punch skin biopsy)引入胶原网架中，钻孔活检中的角化细胞能在真皮替代物表面生长，导致皮肤替代物的形成。

EP 0 285 474 B1 公开了一种含有得自胶原和成纤维细胞的真皮替代物，以及多层表皮替代物的皮肤替代物。所述真皮替代物用人类或动物的外植体（*explantate*），例如毛囊接种，以得到真皮替代物。

EP 0 020 753 B1 记述了用于形成组织的，更具体是皮肤组织的方法，其中成纤维细胞再次被引入水合胶原网架中，并且组织在胶原网架收缩后形成。角化细胞预先体外培养，或者可以将从包皮分离的角化细胞用于所述组织，导致皮肤代用品的形成。

EP 0 418 035 B1 记述了一种含有水合胶原网架的组织替代物，其通过收缩剂，如成纤维细胞，和胶原凝胶进行收缩，其与可渗透成分接触。将胶原和收缩剂的混合物应用于胶原凝胶，胶原网架的径向和横向收缩可被胶原凝胶和可渗透成分，如聚碳酸酯膜之间的接触所抑制，因此网架只能在其厚度方向收缩。真皮替代物形成后，然后可以播散角化细胞，导致皮肤替代物的形成。

另外，美国专利 US 5,861,153 公开了一种由载体上的表皮替代物组成的皮肤替代物，该表皮替代物含有角化细胞和 Langerhans 细胞的诱导或非诱导的前体。所述载体可以是含有成纤维细胞的胶原网架或没有表皮的真皮部分，人工膜，基于胶原的皮下替代物或合成材料。

美国专利 US 4,963,489 记述了一种原位产生的基质组织，基质细胞如成纤维细胞，其包绕住由生物兼容材料，如纤维素组成的基础骨架。所描述的系统可以特别用于产生三维皮肤培养系统，其中角化细胞和黑素细胞可以应用于真皮替代物，即三维载体基质。

美国专利 US 5,755,814 记述了一种皮肤模型系统，其既可以用作体外检验系统，也可以用于治疗目的。所述系统包括具有包含于其中的成纤维细胞的不可溶胶原的三维交联基质，和层状的分化表皮细胞层，其中表皮细胞层与所述胶原基质表面直接接触。所述基质既可以

通过热处理和除水，也可以通过化学试剂例如碳二亚胺来交联。

美国专利 US 5,882,248 记述了，测定化学物质或化学剂对根据美国专利 US 5,755,814 的人类皮肤模型系统的作用的方法。通过皮肤模型系统的细胞和这些细胞对代谢、增殖、分化和识别的作用，从物质的释放可以测定皮肤模型系统和待检物质之间的相互作用。

另外，WO 95/10600 记述了一种用其可以得到表皮替代物的方法。该表皮替代物可以用于药品和/或化妆品的晒黑检验。

国际专利申请 WO 01/092477 公开了一种分化和/或增殖分离的皮肤成纤维细胞的方法，其中所述成纤维细胞培育在其可以在其中增殖的三维凝胶样基质中。除了要培育的成纤维细胞，该基质还含有胶原溶液，即组织典型的基质蛋白形成的人类或动物胶原的骨架。该方法据说能提供由两个组织典型层，即真皮替代物和表皮替代物制成的类器官的体外皮肤模型。器官典型皮肤模型据说在组织和功能上与天然皮肤基本相当。

已知的皮肤模型的不足在于，它们通常只由一个或多个角化细胞的表皮层组成。在得到分层表皮的情况下，组织移植体（explantate）被经常使用，从而涉及被病原体污染的风险，在随后皮肤替代物用做试验皮肤的情况下，导致错误的结果。如果所述皮肤模型有真皮部分，其通常由海绵、状交联物质组成，所述物质除了胶原之外，还能含有其他非皮肤典型的材料。如果现有技术所述皮肤替代物的真皮部分仅由胶原和成纤维细胞组成，其将经受不确定的收缩过程，所述过程可归因于胶原凝胶的重度收缩和液体从其中流出。其影响在于，现有技术描述的皮肤替代物只有限度地适用于特定大小的试验皮肤，并且从其所得的结果也只能以有限的程度应用于天然人类皮肤。另外，具有胶原和成纤维细胞的真皮部分的常规皮肤替代物制作复杂，因为所用的胶原凝胶难以加工。凝胶溶液必须在低温下搅拌，即最好在冰上，

并且还必须冷移取，因为只有这样才能保持液态。然后凝胶溶液在培育器中加热，例如至 37°C。只有在这些条件下和在正确的 pH 下，才能发生凝胶化。该凝胶溶液越温暖，对其的加工越困难。另外，如果该凝胶被加热得太厉害，则胶原有变性的危险，致使凝胶变得不可用。

最后，还需要指出的是，现有技术已知的皮肤模型在其与皮肤的相似度上未达最佳标准。特别是，与天然真皮形成对比，重要的真皮分化标记的表达，弹性蛋白，在已知皮肤模型中无处可见。

因此，本发明所定位的技术难题是为了提供基本相应于天然人类皮肤的人类体外全皮模型，其将具有表皮层和真皮层，其将避免上述现有技术的不足，并能用作试验皮肤，例如用于研究药理和美容作用，以及用于检验皮肤病学的相容性，还提供了生产体外全皮模型的方法和手段。

根据本发明，所述难题通过全皮模型的生产方法得到解决，所述方法的特征在于

- a) 从含胶原的组织得到难溶的胶原，
- b) 将该难溶胶原依靠混合装置转化成均匀的胶原悬液，
- c) 将该胶原悬液冻干，进而产生第一基质 A，
- d) 将第一基质 A 经过交联，进而产生机械稳定的第二基质 B，
- e) 将成纤维细胞播散到第二基质 B 上，并使之生长，
- f) 角化细胞在第二基质 B 上种植，并使之生长，以及最后，
- g) 将在基质 B 内外生长的成纤维细胞和角化细胞进一步培养，直至完全形成全皮模型的真皮和表皮部分。

与现有技术所用的胶原凝胶完全相反，b)步骤得到的胶原悬液能方便地在室温下保存并且不难移取。

依照本发明得到的全皮模型与已知模型相比，易于操作，因为其特别耐用。另外，依照本发明得到的全皮模型良好地粘附于培养容器底部，从而尚未完全形成的皮肤模型不会过早脱开，和因此不能用。

在本发明的范围中，术语“培养”意味着在适当环境下，细胞，例如成纤维细胞或角化细胞的生命功能在体外优选保持，例如，通过引入和清除代谢离析物和产物，尤其是细胞的增殖。

在本发明的范围中，成纤维细胞应理解为天然存在的成纤维细胞，尤其是真皮中存在的成纤维细胞、遗传修饰的成纤维细胞、或者源自自发性突变或其前体的成纤维细胞。所述成纤维细胞可以是动物或人源的。

“难溶的胶原”在本发明范围内应理解为粗纤维胶原，其在水性介质中数小时后，表现出没有可见的溶胀或只有轻度溶胀，并且很少或没有胶凝作用，完全没有胶凝作用。难溶胶原优选得自动物，尤其是哺乳动物，优选马、猪或牛的腱，并更优选得自牛的跟腱或皮肤，更特别来自牛的跟腱。

转变为均匀胶原悬液可以用专家认为合适的任何混合装置，或在其内，进行，优选在静态混合器中或用 Ultra Turrax。

将胶原悬液放入容器中，其中容器的尺寸与所需基质的尺寸相应，例如放入微孔板的孔中。

在容器，例如微孔板的孔，被充入胶原悬液之前，它们可以用各种试剂涂层，以便随后改善冻干的胶原基质对容器壁的粘附。适用的涂层剂是，例如，胶原，胶质，聚赖氨酸，纤维蛋白或纤维蛋白原/凝血酶或纤连蛋白。为了涂层，容器内壁首先用所述试剂的溶液或悬液润湿，干燥容器，使容器内表面形成所述试剂的层，最后，容器充入

胶原悬液。

冻干（冷冻干燥）步骤 c)在这些容器中发生。如果以低冷却速度进行冷冻，将得到大冰晶，并导致浓度不同和产物分离。缓慢、显著的冰晶生长导致特大冰晶的形成，其在冷冻期间存在温度梯度时，将在梯度的方向排列。在此情况下，所得产物充满了大内腔的柱型或烟囱型结构。但是，所述粗生长结构的特定表面的大小降低了，使重构性质能被反向作用。

为此，冷却通常在生物材料的冻干中迅速进行。

但是，申请人惊异地发现，冻干步骤期间，胶原悬液的缓慢冷却对基质 A 和 B 的质量有有利的影响。根据本发明，冷却速率可达每小时 50°C，尤其是每小时 5°C-40°C，有利的是每小时 10°C-30°C，优选每小时 15°C-25°C，更优选每小时 18°C-23°C，更甚优选每小时 20°C-22°C。

这样优选得到的冻干产物在产物表面上有小的表层。

所述小的表层在冻干基质表面中有利地形成小孔，对于随后的采用成纤维细胞的集居提供特别好的条件，因为其能促进成纤维细胞缓慢迁移进入基质中。通过比较，冻干步骤期间较快的冷却速度经常导致开孔基质（open-pored matrix），其表面带有“坑凹”，成纤维细胞不能在给定的培养时间内完全使新合成的细胞外基质填满。散播的胶质细胞能落入这些坑凹，并能在其中聚集和从那里传播，从而可显著影响皮肤模型的涂层和因此的分化。

交联步骤 d)能通过专家看来适合的物理或化学交联方法进行。申请人惊奇地发现，不管其细胞毒性和凋亡特性，戊二醛对于依照本发明的方法而言，是特别适用的交联剂。但是，交联还能通过物理方法

进行，如紫外辐射和脱水加热交联（DHT）。

根据本发明，适用的化学交联剂是双功能物质，其基团与胶原纤维各种多肽链上的赖氨酸和羟赖氨酸残基的氨基反应。另外，在与另一个多肽链的氨基反应之前，游离谷氨酸和天冬氨酸残基的羧基的活化，能导致胶原纤维依照本发明交联。根据本发明，两个胶原纤维之间的交联也能通过氨基与二异氰酸酯的反应或通过酰基叠氮化物的形成来实现。另一个可以用于本发明目的的标准的交联方法是用碳化二亚胺，如 EDC（1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺交联，举例，与 N-琥珀酰亚胺结合。根据本发明，用同/双官能交联剂与氨基反应的交联反应，例如用对-苯醌、乙二亚氨酸二甲酯(dimethyl adipimidate)、二甲基 pimelinidate、辛二亚氨酸二甲酯(dimethyl suberimidate)、1,4-亚苯基二异硫代氰酸酯、聚氧乙烯-双-(咪唑基羰基)、双-[聚氧乙烯-双-(咪唑基羰基)]和辛二酸-双-(N-羟基琥珀酰亚胺酯)，也是可能的，如生物交联剂应用的那样，更特别的是用酶，优选转谷氨酰胺酶，其能把肽链彼此联接，或赖氨酰氧化酶(EC 1.4.3.13)。其它交联选择在 EP-A2-0898973 谈到，在此将其作为参考。

通过专业人员已知的方法得到和培养的成纤维细胞和角化细胞，可以修改为要生产的皮肤模型所需的性质。

另外，在本发明的优选实施方案中，人类和动物源，例如哺乳动物的其它细胞类型和/或其他组织类型的其它细胞，和/或其前体细胞，例如黑素细胞、巨噬细胞、单核细胞、白细胞、浆细胞、中性细胞、脂肪细胞、Langerhans 细胞的诱导和非诱导前体、Langerhans 细胞和其它免疫细胞、内皮细胞、皮肤肿瘤细胞或皮肤相关的细胞，尤其是皮脂腺细胞或脂肪腺组织或脂肪腺外植体、汗腺细胞或汗腺组织或汗腺外植体、毛囊细胞或毛囊外植体、和来自其它器官的肿瘤的细胞或来自转移的细胞，可以在步骤 f) 中播散角化细胞之前、期间或之后，播散在基质上。各种来源的干细胞、组织特异性干细胞、胚胎和/或成人干

细胞也可以结合在皮肤模型中。因此，依照本发明的方法提供了类器官的体外皮肤模型，其由两个组织特异性层，即真皮替代物和表皮替代物组成。器官型皮肤模型在组织和功能上与天然皮肤基本符合。

基质 A 交联的作用在于，在基质 B 内外生长的真皮替代物在培养期间，极少或没有经受收缩。从而得到有直径确定、表面均匀、和与培养器皿边缘一致的边界确定的皮肤替代物。根据用作试验表面的全皮模型的大小一致和质量一致的优点，在检验物质药理和/或美容作用中所产生的结果的质量被提高，并且检测结果变得更可重复。

因此，用于成纤维细胞培养的基质 B 含有要培养的成纤维细胞和新构建于如下物质的胶原骨架，所述物质为人或动物来源的优选新鲜的胶原悬液，浓度大约为每毫升基质 5-50 mg 胶原，相应于 0.5%-5% 胶原。优选范围为每毫升基质 8-25，相应于 0.8%-2.5% 胶原，并且特别优选范围为每毫升基质 8-12 mg 胶原，相应于 0.8%-1.2% 胶原。

胶原骨架从难溶胶原的优选无细胞的酸性悬液中得到，所述悬液的蛋白浓度优选为 5-15 mg/ml，相应于 0.5-1.5 重量%。所述胶原溶液的 pH 值范围为 0.1-6.9，优选范围为 2.0-5.0，更优选在 3.0-4.5 的范围内，最优选范围是 3.5-4.0。

为了培养含成纤维细胞的基质，向基质 B 中加入含有细胞培养基（优选 DMEM 细胞培养基）、缓冲液（例如 Hepes 缓冲液）、血清（优选胎牛血清（FCS），标准小牛血清（NCS），标准小羊血清（NLS），定义的血清或血清代用品）和优选 $1-6 \times 10^5$ 基质成纤维细胞，更特别的是预培养的成纤维细胞的溶液。

为了进一步稳定基质 B，可以在向培养基上或内加入纤连蛋白和/或层粘连蛋白，优选人纤连蛋白和/或层粘连蛋白。纤连蛋白是产生于成纤维细胞中的结构或粘附蛋白，其体内功能是结合到其它大分子，

例如胶原上，并将细胞与相邻的细胞附着。层粘连蛋白是细胞能够粘附的基膜蛋白质。因此，在成纤维细胞-胶原基质中加入纤连蛋白和/或层粘连蛋白，能提高成纤维细胞与胶原的结合和与彼此的结合。两种蛋白质可以或在基质的生产过程中直接并入基质中，或在交联步骤之后，以溶解的形式，例如溶解在培养基中的形式并入基质中。这可在细胞播撒步骤之前进行或平行进行。

随后成纤维细胞在胶原基质中的培育优选以深层培养（submerge culture）进行。在本发明范围内，“深层培育”或“深层培养”应理解为是一种培养细胞的方法，细胞以营养液覆盖。因此，含有成纤维细胞的基质 B 优选被浸没在细胞培养基中，并在大约 30°C 至大约 40°C 的温度下孵育。

除了所述的用于培养依照本发明得到的全皮模型的方法外，该模型可以通过改变培养条件，例如培养基成分，而最优化至这样的程度：其获得了更好的屏障功能，甚至更加接近于体内条件。这对于，例如，开展渗透研究以及对于改善皮肤屏障功能的产品的生产是很重要的。另外，对屏障功能有医学有关的干扰，或是通过环境因素（与洗涤剂接触）或是遗传原因。具有最佳屏障功能的皮肤模型在此很重要。改进屏障功能可以通过修改培养条件（例如大气湿度、温度）、通过培养基中的化学成分（神经酰胺、维生素 C）或通过遗传修饰的角化细胞实现。屏障功能的改变可以通过测定表面电容来测定。改进屏障功能的详细信息可以在例如 US-A1-200220168768 中找到，其公开的全文在此作为参考。

为了改进真皮替代物中成纤维细胞的生长，可以在培养基质中加入因子，其在成纤维细胞和角化细胞共培养的情况下，由角化细胞释放。例如，可以用适合的培养上清液（即例如培养的角化细胞和/或角化细胞与其他细胞类型，例如内皮细胞、免疫细胞或成纤维细胞，共培养的培养基上清液）

在本发明另一个有利的实施方案中，成纤维细胞如上所述在基质 B 中培养，以这种方式可以随后得到真皮替代物。这优选通过生产真皮替代物的方法完成，该方法的特征在于

- a. 从含胶原的组织中得到难溶胶原，
- b. 将该难溶胶原依靠混合器转化成均匀的胶原悬液，
- c. 将所述胶原悬液冻干，进而产生第一基质 A，
- d. 第一基质 A 经过交联，进而产生机械稳定的第二基质 B，
- e. 将成纤维细胞播散到第二基质 B 上，并使之生长，以及最后，
- f. 在基质 B 内外生长的成纤维细胞被进一步培养，直至完全形成真皮替代物。

在本发明的范围内，“真皮替代物”应理解为结缔组织样的胶原和成纤维细胞层，其与天然真皮基本一致。

这样得到的真皮替代物可以用于筛选和诊断方法，更特别的是用于研究化学物质、植物提取物和金属的作用，例如潜在的药物或化妆品成分，或其它动因（agent）（物理量），如光或热、放射性、声音、电磁辐射、电场的作用，还用于研究光毒性，即不同波长的光对细胞结构的危害作用。依照本发明生成的真皮替代物还可以用于研究伤口愈合，并且也适用于研究气体、烟雾剂、烟和尘对细胞结构或者代谢或基因表达的作用。

在本发明范围内，“动因”应理解为物理介质，如作用于皮肤或皮肤细胞的光、热等。因此，本发明也涉及应用依照本发明制备的真皮替代物筛查和诊断的方法。

本发明的优选实施方案包括，在存在和不存在待研究的物质和/或待研究的动因下，对真皮替代物的处理，以及对在真皮替代物的细胞或细胞成分方面观察到的效果的比较。

本发明的另一个优选实施方案是研究物质渗透性的方法，其应用了依照本发明制备的真皮替代物，和应用了依照本发明由真皮替代物和表皮替代物组成的全皮替代物。

在另一个特别优选的实施方案中，本发明还涉及上述类型的方法用于在基质中培养真皮成纤维细胞和上皮角化细胞，以制备由真皮替代物和表皮替代物组成的全皮替代物。在该方法中，在如上所述制备和孵育含成纤维细胞的胶原基质之后一至三周，优选 10-14 天，将角化细胞被播散到所述基质上。

在本发明范围内，“角化细胞”应理解为上皮细胞，其形成角化板上皮细胞，遗传修饰的角化细胞或者来自自发突变或该角化细胞前体的角化细胞，其可以是动物或人源性的。由于具有完整角质化的分化良好的上皮的建立，很大程度上依赖于所用的角化细胞中的基础干细胞的比例，依照本发明的方法的步骤 f)，播散在基质上的角化细胞可以是来自人类活检组织的基本未分化的角化细胞干细胞。但是，细胞系或某些分化的细胞也可以使用。粘膜角化细胞或肠上皮细胞也可以用于基质，替代正常皮肤角化细胞。这些优选是预培养细胞，并且在特别优选的实施方案中为第一或第二细胞的传代中的角化细胞，虽然得自更高传代的细胞也可以用。

角化细胞在基质上的播散优选在细胞培养基中进行，并且在特别优选的实施方案中，在 DMEM/F12 培养基中进行，该培养基含有大约 1-30% 胎牛血清、NCS、确定的血清或血清替代品和——以变化的浓度——改进细胞增殖和分化的多种的添加剂。然后基质优选浸没在 DMEM 培养基中，所述培养基特别含有来自小鼠的 EGF 甚或来自其它动物的类似制剂、表皮生长因子(hEGF)(例如以 0.2 $\mu\text{g/l}$ 培养基的浓度)和例如 0.8 mM CaCl_2 ，并且所述基质经受深层培养优选 1-10 天，更特别为 3-7 天。

角化细胞层的完全分化，例如，在没有 hEGF 和 BPE（牛垂体提取物）的 DMEM 中，通过气升式（airlift）培养实现。在本发明范围内，“气升式培养”应理解为是一种培养方式，其中营养培养基水平面的高度与基质高度精确相配，而所述角化细胞或所述角化细胞形成的细胞层平铺在营养培养基水平面上，并且未被营养培养基覆盖，即培养在空气/营养培养基的交界面进行，培养物从下方进行给养。为此，例如，将皮肤模型从微孔板上掀起，放置于放在培养皿中金属垫片上的滤纸上。将所述培养基引入培养皿中，其水平没有完全盖住滤纸，而代以在皮肤模型的基底周围（气/液交界）出现的液体圈。气升式培养的时间可以根据专业人士的要求变化。典型地约为 1-4 周。在此期间，产生了由真皮替代物和表皮替代物组成的皮肤型的体外全皮模型。

依照本发明生产体外全皮的方法可以被有利地修改，使其它细胞类型，如黑素细胞、巨噬细胞、单核细胞、白细胞、浆细胞、中性细胞、脂肪细胞、Langerhans 细胞的诱导和非诱导前体、Langerhans 细胞、其它免疫细胞、内皮细胞、和皮肤肿瘤细胞或皮肤相关的细胞，可以在播散角化细胞之前、期间或之后，播散在基质上进一步培养。所提及的细胞可以是人源或动物源的。

因此，本发明还涉及一种皮肤型的体外全皮模型，更优选人类体外全皮模型，其通过依照本发明的方法以及任选的下述和/或前述传统培养方法产生，并且其在表皮部分，包括至少一个增殖细胞层、一些分化细胞层和至少一个角化的细胞层，真皮替代物包括基底层、棘层、颗粒层和角质层以及由特征性 BM 蛋白质（如层粘连蛋白和胶原 IV）组成的基底膜，例如存在于真皮替代物和表皮替代物之间，并且另外还有被表达的皮肤型的蛋白质，如转谷氨酰胺酶、外皮蛋白（involucrin）、胶原 IV、层粘连蛋白、聚角蛋白微丝蛋白（filaggrin）、纤连蛋白、K-67、细胞角蛋白 10 和特别是弹性蛋白。

但是，应激标记物细胞角蛋白 6 只被表达至最少程度，该程度表明在依照本发明的体外全皮模型中的细胞处于相对的低应激状态。观察到皮肤中 CK6 的强表达，例如，在伤口愈合或再生期间。

真皮和上皮细胞的增殖行为和分化，可以通过在培养期期间向真皮模型或全皮模型施加电场或电磁场而修改。

由于其的复杂性，制备的全皮模型可以特别用于在化学/制药工业和在化妆品工业中用于解决各种困难。更特别的是，依照本发明制备的皮肤替代物适合检测产品的，例如有效性，不希望的副作用比如物质的刺激性、毒性和发炎或过敏作用，或者相容性。这些物质可以是意于潜在用作药物的物质，更特别的是作为皮肤药，或者是化妆品成分的物质，甚或是与皮肤接触的日用品，如衣物洗涤剂，等。

依照本发明制备的皮肤替代物也可以用于，例如，研究物质的吸收、转运和/或渗透。它还适用于研究其它动因（物理量），如光或热、放射性、声音、电磁辐射、电场，例如用于研究光毒性，即不同波长的光对细胞结构的危害作用。依照本发明生成的皮肤替代物还可以用作研究伤口愈合，并且也适用于研究气体、烟雾剂、烟和尘对细胞结构或者代谢或基因表达的作用。

物质或动因对人类皮肤的作用可以从，例如，物质例如细胞因子或介体的释放，通过人或动物皮肤模型系统的细胞，和对所述细胞的基因表达、代谢、增殖、分化和识别的作用来确定。利用量化细胞损害所用的方法，尤其是利用活体染料，如四唑衍生物，其可能，例如，检测对皮肤细胞的细胞毒作用。利用依照本发明的人皮肤替代物对物质或动因的检测，可以既包括组织学方法，也包括免疫学和/或分子生物学方法。

因此，本发明的优选实施方案包括，利用依照本发明制备的人皮

肤替代物，研究物质或动因对人类皮肤的作用，尤其是药理作用的方法。在特别优选的实施方案中，进行 XTT 四唑还原实验（EZ4U 实验）或 Alamar Blue（刃天青[*resazurin*]还原实验，Promega）。EZ4U 是无毒水溶性黄色四唑盐，其能被活细胞还原成色彩强烈的甲月替（*formazane*）。还原反应需要完整的线粒体，使实验能用于评估细胞活力。依照本发明适用的活力分析，其也基于四唑化合物，是例如，MTT、MTS 或 WST-1 实验。它们是可以特别从 Roche 得到的试剂盒。细胞活力也能从具有细胞膜损伤的细胞中释放的乳酸脱氢酶(LDH)来评价。具有细胞膜损伤的细胞可以用台盼蓝选择性染色。

本发明的另一种优选实施方案包括研究物质渗透性的方法，其中依照本发明制备的真皮替代物和依照本发明制备的皮肤替代物二者都用待研究的物质处理，并且两个系统所得的结果彼此相当。

在本发明另一个特别优选的实施方案中，研究了化学物质或其它动因对特定皮肤类型的作用。在该实施方案中，将定义的皮肤类型的细胞，例如色素极少的皮肤类型和/或有大量色素的皮肤类型，用于建立本发明的用于检测物质或动因作用的皮肤替代物，。

在本发明的另一个特别优选的实施方案中，将依照本发明制备的皮肤替代物用作研究皮肤疾病的和用于开发皮肤疾病新的治疗方案的模型系统。例如，患有某种遗传或获得性皮肤疾病的患者的细胞可以用于建立患者特异性皮肤模型系统，该系统可以接下来用于研究和评价某些治疗和/或药物的有效性。

在优选实施方案中，依照本发明制备的皮肤替代物可以集居微生物，尤其是致病微生物。特别优选致病性或寄生性微生物的集居，具体而言包括人类致病微生物。本发明情况下的微生物是，特别是，真菌、细菌和病毒。微生物优选选自真菌或致病和/或寄生菌。特别优选的真菌是白色假丝酵母(*Candida albicans*)、须癣毛癣菌 (*Trichophyton*

mentagrophytes) 和糠秕马拉色菌 (*Malassezia furfur*) 属的种类。特别优选的致病和/或寄生菌是金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)。

使用相应地被集居的皮肤替代物, 可能去研究微生物自身的集居过程, 尤其是感染过程, 和研究皮肤对该集居的反应。另外, 在集居之前、期间或之后所施用的物质对集居本身的作用, 或对在皮肤替代物上的集居作用的影响, 可以用所讨论类型的皮肤替代物进行研究。

本发明也涉及交联基质, 在其中可以进行上述培养方法。如上所述, 依照本发明的基质和其中培养的成纤维细胞的组合可以用于制备真皮替代物、表皮替代物和/或类器官的全皮模型。

本发明还涉及制备表皮模型的方法, 其特征在于

- a. 从含胶原的组织得到难溶的胶原,
- b. 将难溶胶原依靠混合器转化成均匀的胶原悬液,
- c. 将胶原悬液被冻干, 进而产生第一基质 A,
- d. 第一基质 A 经过交联, 进而产生机械稳定的第二基质 B,
- e. 将角化细胞播散到第二基质 B 上, 并使之生长, 以及最后,
- f. 将在基质 B 内外生长的角化细胞进一步培养, 直至完全形成表皮替代物。

这种情况下, 与依照本发明制备全皮模型的方法相对照——只有作为表皮模型骨架或载体的角化细胞被播散到基质上, 并在如下条件下培养, 即所述角化细胞首先增殖, 然后自身分化, 从而形成由全部四层组成的表皮。所述基质优选细胞外基质或基底膜的蛋白预处理, 以便达到角化细胞对基质材料的更好粘附, 并提供由这些蛋白质提供的细胞信号。适用于本发明目的的蛋白质的实例是胶原 IV 或其它类型的胶原、粘连蛋白和层粘连蛋白。本发明还涉及因此形成的表皮模型, 其与全皮模型一样, 也用于各种检验。

优选的培养基是 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle 培养基)、M199 和 Ham's F12 培养基。但是,可以培养成纤维细胞的任何其它的细胞培养基也可用。虽然 NCS 和血清代用品也适用,但优选用胎牛血清(FCS)做血清,同时例如 Hepes 缓冲液,用作缓冲液。细胞培养基、缓冲液和血清的溶液 pH 值,优选在 6.0-8.0 的范围内,例如 6.5-7.5,并更优选 7.0。

根据本发明,培养基可以含有其它因子,例如激素、生长因子、粘附蛋白、抗生素、选择因子、酶和酶抑制剂等。

为了改善角化细胞在表皮替代物中的生长,在成纤维细胞和角化细胞共培养的情况下,由成纤维细胞释放的因子可以加入到培养基中。例如,可以用适合的培养上清液(即培养成纤维细胞和/或成纤维细胞与其它细胞类型例如内皮细胞、免疫细胞或角化细胞共培养的培养基上清液)。

下文的数据和实施例意在举例说明本发明,而不以任何方式对其限制。

实施例 1.

基质 A 的制备

将用 875 μ l 浓乙酸(冰醋酸)酸化的 700 ml 去离子水注入 1000 ml 的玻璃烧杯中。该溶液用含有搅拌子(stirring fish)的市售磁力搅拌器搅拌。7.0 g 牛腱胶原一次性全部搅拌入旋转的水柱中,其后混合物从搅拌器中取出,室温下不搅拌下静止 4 小时。每隔 30 分钟监测混合物 pH,应该在 3.5-4 的范围内。混合物每隔 30 分钟高速搅拌 1 分钟。这对于保证悬液温度不升高很重要。最后,将该悬液高速搅拌 3 分钟,从而均匀化。为了避免均匀化过程产生的加热,悬液置于室温。得到乳状胶原悬液。为了去除所有存在的气泡,可以将悬液在 20°C 下 400 r.p.m. (= 24.73 G)离心 1 分钟(Hettich Universal 16 R, 转子直径 138

mm)。然后气泡逃逸而不产生泡沫。悬液用分配器移液至 24 孔细胞培养板的孔中。然后用手拿起装有悬液的板，轻微倾斜并在所有方向上转动，使凝胶溶液润湿甚至高于基质表面的孔壁。这改善了培养基在孔中的粘附。这样处理过的装有悬液的板，直接放在冷冻干燥器中，并在其中冷冻。

注入 24 孔细胞培养板的胶原悬液，在配有可加热架子的冷冻干燥器中冷冻，然后在减压下干燥。

从凝胶溶液的 20°C 温度开始，冷冻速度为每小时 18°C-23°C。整个冷冻干燥过程持续约 20-27 小时。

实施例 2.

交联基质 A 以制备基质 B

为了得到表面大而平的皮肤模型，胶原基质在播散成纤维细胞之前被化学固定。戊二醛(GA)作为固定剂：C₅H₈O₂, MW = 100.12。

将戊二醛溶液仔细移液到 24 孔细胞培养板中 24 个基质 A 的每个基质上。为了不损害基质表面，使溶液从孔内缘缓慢流下。戊二醛溶液要用数分钟渗入胶原海绵体内部。饱和度增加反映在基质颜色的改变上，从纯白至灰-浅黄。然后在细胞培养板上加盖，边缘用 Para 膜严密封闭，以避免溶液的蒸发。处理过的板在室温下避光保存 24 小时。

基质的交联，包括清洗和平衡，可以在优选 5 天，但至少 4 天的期限内进行。

实施例 3.

真皮替代物的制备

在被播散到交联的胶原基质上之前，合适的继代培养成纤维细胞在含有成纤维细胞培养基的培养瓶中预培养。在达到所需的细胞密度

后，抽吸除去培养基。通过加入胰蛋白酶溶液，细胞从培养瓶底分离，用培养基清洗并离心去除。测定细胞记数后，将细胞悬液的浓度调整为 $1 - 6 \times 10^5$ 成纤维细胞/ml。从微孔板的孔中吸取培养基，其含有用成纤维细胞培养基平衡的基质，吸取的程度是基质保持潮湿。每个含有 $1 - 6 \times 10^5$ 成纤维细胞的大量 1ml 成纤维细胞培养基，被移液到基质表面而不伤害表面。完成播散后，在板上加盖，然后水平放在培养箱中。成纤维细胞在基质上的培养在 $37^\circ\text{C}/5\% \text{ v/v CO}_2$ 条件下进行。培养基定期更换。2-4 周后，真皮模型完全产生。

实施例 4.

全皮模型的制备

在被播散到交联的胶原基质上之前，合适的继代培养成纤维细胞在含有成纤维细胞培养基的培养瓶中预培养。在达到所需的细胞密度后，抽吸除去培养基。通过加入胰蛋白酶溶液(或适合分离贴附细胞的任何其它溶液)，细胞从培养瓶底分离，用成纤维细胞培养基清洗并离心去除。测定细胞记数后，将细胞悬液的浓度调整为 $1 - 6 \times 10^5$ 成纤维细胞/ml。从微孔板的孔中吸取培养基，其含有用成纤维细胞培养基平衡的基质，吸取的程度是基质保持潮湿。每个含有 $1 - 6 \times 10^5$ 成纤维细胞的大量 1ml 成纤维细胞培养基，被移液到基质表面而不伤害表面。完成播散后，在板上加盖，然后水平放在培养箱中。成纤维细胞在基质上的培养在 $37^\circ\text{C}/5\% \text{ v/v CO}_2$ 条件下进行。培养基定期更换。2-4 周的成纤维细胞培养期后，角化细胞播散到真皮模型上。为了达到这个目标，合适的继代培养角化细胞在含有角化细胞培养基的培养瓶中预培养。在达到所需的细胞密度后，抽吸除去培养基。细胞通过加入胰蛋白酶溶液从培养瓶底分离，用培养基（角化细胞培养基）清洗并离心去除。测定细胞记数后，将细胞悬液的浓度调整为 $1 - 6 \times 10^5$ 角化细胞/ml。从微孔板的孔中吸取培养基，其含有真皮替代物，吸取的程度是真皮替代物表面保持潮湿。每个含有 $1 - 6 \times 10^5$ 角化细胞的大量 1ml 角化细胞培养基，被移液到基质表面而不伤害表面。完成播散后，在板上加盖，然后水平放在培养箱中（深层培养）。成纤维细胞和角化

细胞在基质上的培养在 37°C/5% v/v CO₂ 条件下进行 3-7 天。培养基定期更换。

深层培养 3-7 天后，将角化细胞培养基从孔中抽吸去除。将尚未完成的全皮模型从孔中移出，放在滤纸上。滤纸平放在培养皿的金属隔离物上。在将未完成的全皮模型放在滤纸上后，用培养基充入培养皿（气升式培养基，气/液界面培养基），程度是培养基达到滤纸上缘并围绕皮肤模型的底部展开。皮肤模型表面没有被培养基覆盖（气升式培养基和/或气/液界面）。根据所需的分化程度，将皮肤模型留在气/液界面 1-4 周。培养基定期更换。

下表显示的是三种不同培养基的组成：

成纤维细胞：

	终浓度
DMEM (Glutamax I)	
FCS	10%
青霉素 G	100 UI/ml
庆大霉素	25 µg/ml
抗坏血酸-2-磷酸盐	1 mM

角化细胞：

	终浓度
DMEM (Glutamax I)	
HAM F 12	
胎克隆(Fetal Colon) II	10%
EGF	10 ng/ml
氢化可的松	0.4 µg/ml
胰岛素	0.12 UI/ml
霍乱毒素	10 ⁻¹⁰ M

三碘代甲状腺原氨酸 (Tri-iodothyronine)	2×10^{-9} M (5 μ g/ml)
腺嘌呤	2.43 μ g/ml
青霉素 G	100 UI/ml
庆大霉素	25 μ g/ml
抗坏血酸-2-磷酸盐	1 mM

气/液界面

	终浓度
DMEM (Glutamax I)	
HAM F 12	
氢化可的松	0.4 μ g/ml
胰岛素	0.12 UI/ml
青霉素 G	100 UI/ml
庆大霉素	25 μ g/ml
BSA	1.6 mg/ml
抗坏血酸-2-磷酸盐	1 mM

实施例 5

全皮模型中弹性蛋白的检测

已分化好的皮肤模型直接从气/液界面移出，冷冻在低温恒温器中并切割（厚度 8 μ m）。切片在 -20°C 冰冷丙酮中固定 10 分钟，然后用 TBS (TRIS-缓冲生理盐水) 反复清洗。抗弹性蛋白抗体（兔：Novotec）用 TBS 1:40 稀释，逐滴加到切片上，并保留在其上 60 分钟。然后切片在 TBS 中清洗 5 分钟，3 次。山羊/抗兔抗体用 Alexa 共轭体（来自 Molecular Probes）1:20 稀释，用作次级抗体。为了阻断胶原基质高的自然荧光，次级抗体稀释在 0.1% Evans Blue 溶液中。将次级抗体逐滴加到切片上，并保留在其上 60 分钟。然后用 TBS 三次清洗 5 分钟。最后，将抗体标记的切片覆盖（coverslipped）在 DAKO Faramount 包埋培养基中。以没有第一抗体的切片作为负对照孵育。