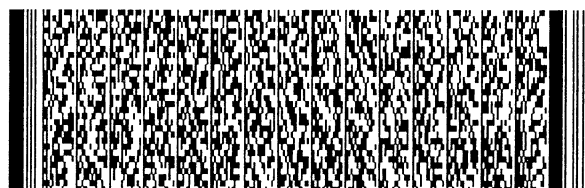
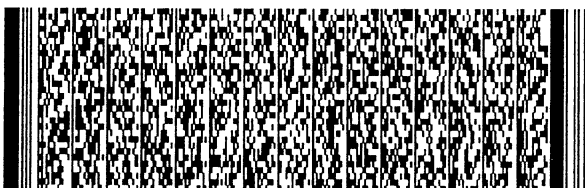


申請日期	9/12/27	案號	9/1103519
類別	C12N 5/08, A61L 29/00, A61F 2/10		

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、 發明名稱	中文	人造皮及其製作方法
	英文	ARTIFICIAL DERMIS AND METHOD OF PREPARATION
二、 發明人	姓名 (中文)	1. 荷西·路易斯·何卡諾·諾瓦 2. 費南多·拉哲爾·拉古奇 3. 阿瓦羅·美亞納·印費斯達 4. 莎拉·葛美斯·雅內斯
	姓名 (英文)	1. José Luis Jorcano Noval 2. Fernando Larcher Laguzzi 3. Alvaro Meana Infiesta 4. Sara Gómez Llames
	國籍	1. 西班牙 2. 西班牙 3. 西班牙 4. 西班牙
	住、居所	1. 西班牙馬德里市28040康浦魯田西路22號 2. 西班牙馬德里市28040康浦魯田西路22號 3. 西班牙阿斯圖里亞斯市33006耶密里歐羅得里給斯維吉爾路 4. 西班牙阿斯圖里亞斯市33006耶密里歐羅得里給斯維吉爾路
三、 申請人	姓名 (名稱) (中文)	1. 能源、環保暨技術研究中心 2. 西班牙紅十字會阿斯圖里亞斯社區傳播中心 3. 馬西林諾波丁基金會
	姓名 (名稱) (英文)	1. CENTRO DE INVESTIGACIONES ENERGETICAS, MEDIOAMBIENTALES Y TECNOLOGICAS(C. I. E. M. A. T.) 2. CENTRO COMUNITARIO DE TRANSFUSION DE ASTURIAS-CRUZ ROJA ESPAÑOLA 3. FUNDACION MARCELINO BOTIN
	國籍	1. 西班牙 2. 西班牙 3. 西班牙
	住、居所 (事務所)	1. 西班牙馬德里市28040康浦魯田西路22號 2. 西班牙阿斯圖里亞斯市33006耶密里歐羅得里給斯維吉爾路 3. 西班牙聖坦德爾市39003佩德魯卡街1號
	代表人 姓名 (中文)	1. 西沙·多巴索·賈西亞 2. 瑪莉亞·米拉葛羅斯·賈西亞·厄南德斯 3. 恩利給·馬丁內斯·貝羅
	代表人 姓名 (英文)	1. CESAR DOPAZO GARCIA 2. MARIA MILAEROS GARCIA HERNANDEZ 3. ENRIQUE MARTINEZ BERRO



I258506

申請日期：	案號：
類別：	

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、 發明名稱	中 文	
	英 文	
二、 發明人	姓 名 (中文)	5. 馬西拉·戴里·歐內·恰夫斯基
	姓 名 (英文)	5. Marcela Del Rio Nechaevsky
	國 籍	5. 西班牙
	住、居所	5. 西班牙馬德里市28040康浦魯田西路22號
三、 申請人	姓 名 (名稱) (中文)	
	姓 名 (名稱) (英文)	
	國 籍	
	住、居所 (事務所)	
	代表人 姓 名 (中文)	
	代表人 姓 名 (英文)	



本案已向

國(地區)申請專利
西班牙 ES

申請日期 案號
2001/03/01 P200100494

主張優先權
有

有關微生物已寄存於

寄存日期 寄存號碼

無



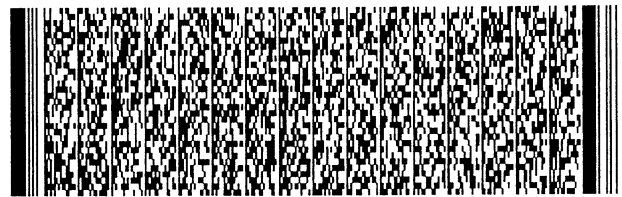
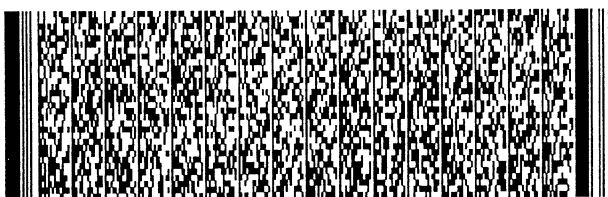
五、發明說明 (1)

目的及應用範圍：

本發明係指經添加鈣而在存有血小板的情況下讓血漿凝塊而製成的一種人造皮，其中埋置有結締組織細胞或其它皮細胞。接著，可將角質形成細胞播種在這人造皮的表面上，使其特別能用於治療重大灼傷，慢性潰瘍，和控制對各種產品之過敏性的測試等。如採用基因改變的細胞，亦可用來當作一種基因療法的媒介物。

發明背景：

皮膚是種由兩部份構成的組織，即上皮或外部，與上皮位於其上的真皮或內部。這兩部份具有截然不同的特性。表皮實際上並無細胞外的組織，但這成分顯然主宰了真皮中的細胞。皮膚是種能以組織工程技術予以重建的組織(Parenteau N., Sci. Am., 280 : 83-84, 1999)。就這些技術而言，細胞成分大體上是以細胞培養技術在「活體外」產生。從取自小型皮膚活組織檢體之少量細胞開始的這些技術，可在短期間內獲得大量的細胞。這些「活體外」擴張的細胞可用來建立大面積的人造皮膚。雖然細胞培養無法產生細胞外的基質，但它已事先在體外設計和製造。細胞外的基質必須能提供促使原先培養之真皮細胞黏附和刺激該等細胞正常生長的結構。在這人造基質上，細胞開始製造用以構成天然真皮基質的正常蛋白質，同時它們也讓原始結構退化，以便這人造基質會隨著時間而被與天然者完全類似的一種真正的細胞外基質取代。原先培養



五、發明說明 (2)

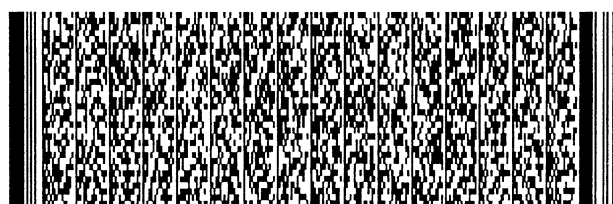
的上皮細胞(就皮膚而言，即為角質形成細胞)可被播種在這人造基質上，藉助新的細胞培養技術，這些細胞就能在該處產生一種與其起源之正常上皮極為類似的結構。換句話說，皮膚組織工程的關鍵因素之一，就是儘可能仿造人體的自然條件來設計真皮基質，若是引入的細胞能起動一個複雜的過程時，其目的就在於開發出一種儘可能與天然皮膚類似的結構。皮膚組織工程的另一個關鍵因素，則是真皮基質促使播種於其上之細胞生長的能力。開發出能對真皮與上皮二者促進生長的真皮組織，表示可從甚小的活組織檢體培養出大面積的人造皮膚。對於身體總表面面積的90-95%，必須儘快用患者剩餘的小面積健康皮膚來更換的重大灼傷，以這人造皮膚從事治療時尤其重要。缺乏可從甚少活組織檢體來產生該等大面積人造皮膚的真皮基質，正是前述真皮基質的限制之一(Sheridan R. 和 Tompkins, Burns 25 : 97-103, 1999)。

人造皮模型共有幾種。茲將習用的一些模型簡要說明於後：

源自動物的I型膠原蛋白質。因為這是真皮所含各種蛋白質中最豐富者(Maraguchi T. 等人, Plast Reconstr. Surg., 135 : 537-544, 1994, Muhart 等人, Arch Dermatol, 135 : 913-918, 1999)。

硫酸軟骨膠(Boyce S. 等人, Surgery, 103 : 421-431, 1988)。

結合或未結合到一種不透水Sylastic薄膜的尼龍



五、發明說明 (3)

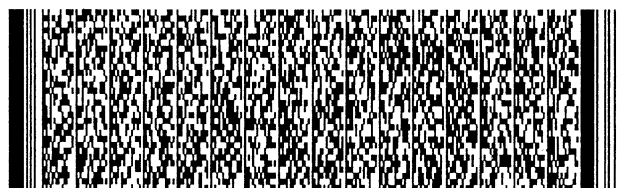
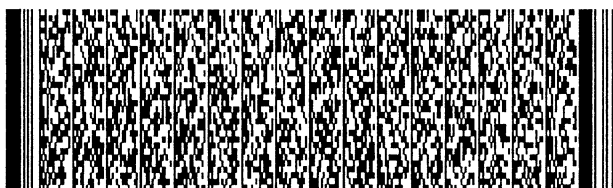
(Naughton 和 Mansbridge, Clin. Plast. Surg., 26 : 579-586, 1999)。

聚乳酸交酯/聚乙醇酸交酯(Giardino 等人, J. Trauma 47 : 303-308, 1999)。這些聚合物形成一種網狀物，以供當作可讓結締組織細胞植入、生長和能分離正常真皮基質蛋白質的結構。

纖維蛋白。先質為纖維蛋白原的這種蛋白質，係從人體血漿取得，並已採取各種不同方式用於培養角質形成細胞。纖維蛋白為上皮細胞的生長提供良好的基地，因而這種蛋白質曾被用來當作一種栽培角質形成細胞的惰性支托(Ronfard 等人, Burns 17 : 181-184, 1991) (Broly 等人, ES2060803)。纖維蛋白不會妨礙損傷基床與培養角質形成細胞之間日後發展出正確的真皮/上皮結合。因為這些特性，纖維蛋白已被廣泛用於當作一種角質形成細胞的運輸系統(Pellegrino 等人, Transplantation 68 : 868-879, 1999, Kaiser 和 Stark, Burns 20 : 23-29, 1994)。

纖維蛋白和/或人體血漿蛋白質凝塊後所製成的凝膠體，已被用來當作一種運送原先「在試管內」擴張之皮膚細胞的媒介物(Sadak I, JP10277143)。

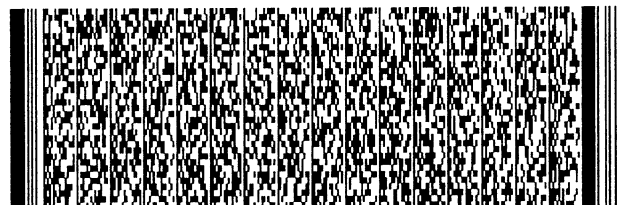
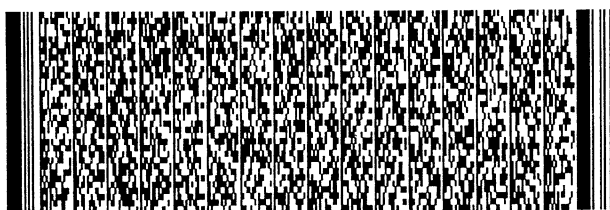
纖維蛋白亦可用來當作一種生產大面積培養皮膚的真皮基底(Meana 等人, Burns 24 : 621-630, 1998)。埋置在纖維蛋白凝膠體中的結締組織細胞能生長。同時，這些結締組織細胞具有如同角質形成細胞生長之可靠誘發劑的作用，



五、發明說明 (4)

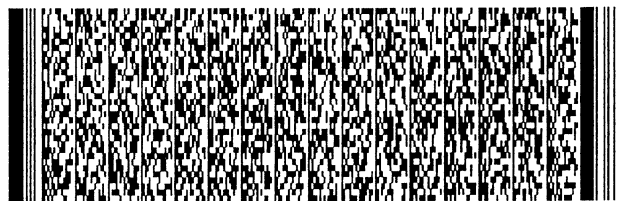
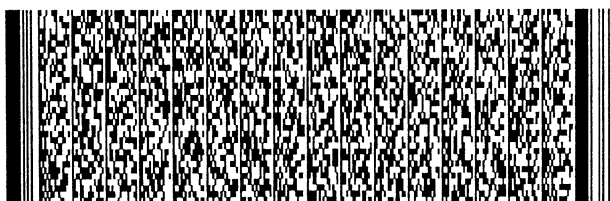
以致只要在由纖維蛋白和結締組織細胞構成之凝膠體上，擺放數量極少的培養角質形成細胞，於8-12日便獲得一種與正常人體上皮相似的複層融合上皮。纖維蛋白凝膠體可供發展上皮細胞的這種能力，也被用於另一人造皮膚模型(Meana等人，P9701533)。此外，纖維蛋白可在存有增進其剛性和促進其用途之其它成分的情況下，用來當作一種真皮支托(Meana A., P9601684)。纖維蛋白凝膠體和結締組織細胞的這種，可從小型皮膚活組織檢體獲取大面積人造皮膚的能力，是以其它組分之人造皮為基礎的模型所缺乏的。關於這點的原因在於，纖維蛋白為基礎的凝膠體，能模仿生理性的傷口修補機制(Martin P., Science 276 : 75-81, 1997)。

然而，生產以纖維蛋白濃縮物為基礎的真皮基質，僅為模仿該生理過程而已。可供形成組織修補及防禦機制一部份的真正纖維蛋白凝塊，則是要以人體血漿為代價。細胞外血液部份有許多蛋白質，屬於其中一種的纖維蛋白原是纖維蛋白的可溶性先質，也是凝塊中的主要會並非唯一的蛋白質。組織遭受侵襲後，血漿的漏洩即為開始進行整個凝塊過程的方法之一。發生侵襲和各組織產物與皮膚接觸時，若是血漿中所含的失活凝血酵素先質經活化，便促動所謂的外源性凝塊途徑，即最後結果。這凝血酵素開始把纖維蛋白原轉化成纖維蛋白，最後再變成可溶性纖維蛋白，當其結合到血球時，即形成纖維蛋白凝塊的一部份，此為治療及隨後修補人身體損傷的第一步(Singer和



五、發明說明 (5)

Clark, N. Engl. Med. 341 : 736-746, 1999)。在形成凝塊的相關細胞中，應特別提及的是血小板。這些細胞是細胞活素的重要儲藏所，而細胞活素則是在傷口最後修補過程中負責引發細胞反應的物質。血小板也涉及纖維蛋白凝塊在靜脈中的發展。此舉稱為內源性凝塊途徑，其中係以一種刺激物去激發血小板聚集的發展，屆時將使一系列的血漿蛋白質活化，再轉而由該等蛋白質利用一種級聯過程(cascade process)的機制去刺激其它的蛋白質。最後，便獲得將開始形成凝塊的凝血酵素。在這兩種過程中，即外源性和內源性凝塊途徑，游離鈣離子是完成其發展的要件，因為該等途徑的一些蛋白質依賴這種離子使其活化。從血液的血漿形成纖維蛋白凝塊後，最初由血小板釋放的細胞活素將會吸引其它的細胞，例如巨噬體、嗜中性白血球等，屆時它們將開始摧毀凝塊，並以在侵襲前已存在的正常組織取代這種纖維蛋白。接著，該等細胞又轉而製造其它的細胞活素，以保持和控制對這侵襲的反應。它們會將真皮結締組織細胞和內皮細胞吸引到傷口處，由其完成修補反應。這些新的修補細胞會製造其它的細胞活素，並由其把上皮細胞吸引到傷口處，以覆蓋這傷口的整個表面。反之，上皮細胞能製造許多可在下方真皮細胞激發不同細胞反應的物質。上皮細胞也對纖維蛋白凝塊具有分解代謝的影響，因為它們需滲透和消除該凝塊，以便重新塗佈傷口的表面(Singer和Clark, N. Engl. J. Med. 341 : 738-746, 1999)。一當損傷處被上皮覆蓋時，治療過程即



五、發明說明 (6)

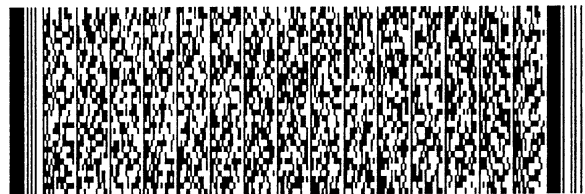
完成。

傷口的生理性修補可認為是以富含血漿細胞活素的纖維蛋白凝塊為基礎，而這凝塊則以溶解於血漿中的纖維蛋白原為基礎。這凝塊將起動身體的初步修補反應，並將誘發附近的上皮細胞，從最接近傷口的各點移動，最後將傷口閉合。然而，此修補過程具有限度，當損傷完全摧毀所有存在的上皮細胞時(寬又深的傷口)，即需大量的人造上皮，以培養角質形成細胞，懸浮角質形成細胞，或人造皮的移植來完成這過程(Navsaria 等人，TIBTECH 13：91-100，1995)。

如果傷口修補的起端在於取自血漿的纖維蛋白凝塊，那麼基礎在於以人體血漿當作細胞外基質之初步來源的人造皮膚模型，因為重建了身體傷口修補過程的各種生理性條件，所以可發揮高度效用，和能對細胞生長提供額外的激勵。

發明綱要說明：

本發明係說明使用人體血漿作為細胞外基質的根本基礎，據以發展人造皮的情形。人體血漿係對全血進行初步分離而取得，在其成分中包括血小板。讓先前培養的真皮結締組織細胞重新懸浮在血漿中，等凝塊後，即產生一種人造皮。「在體外」擴張的角質形成細胞隨後將被播種在這人造皮上。於這人造皮上，角質形成細胞「在試管中」顯現出如同傷口修復過程「在體內」類似的行為。它們的



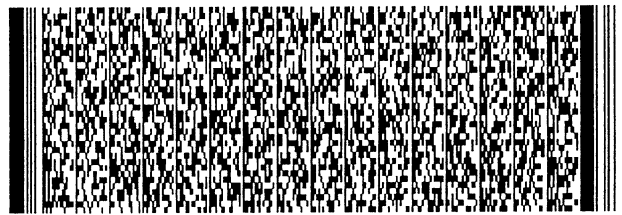
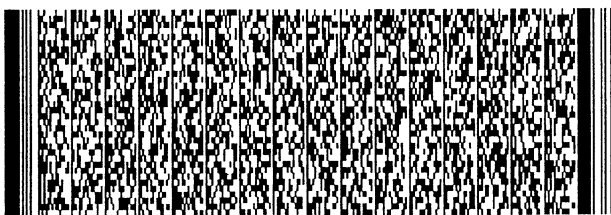
五、發明說明 (7)

黏連、移動及生長方法是從幾個細胞開始，接著在8到12日就覆蓋血漿凝膠體的整個表面和形成複層上皮。結果經過幾日後，我們便從最初的少數幾個細胞獲得一種由兩部份構成的組織，即上部的複層上皮細胞，和由佈滿稠密結締組織細胞之細胞外基質組成的下部。

採用前述技術(Meana等人，第P9701533號專利)和將這些凝膠體固定到一固體支托上，即可將其製備以供移植，因而能用於治療皮膚損傷。這些凝膠體如採用大於平常的用量，則不必固定到固體支托上就可使用，以致更進一步的降低處理的困難度，和減少最終成本。在實驗動物身上移植這種人造皮時，顯示出若將它置於傷口上即能植入，而且能發展出成人皮膚上通常可見到的所有各層，包括角質層。迄今所完成的各種研究也顯示出這種上皮的形成可持續到動物的整個生命期限。該等實驗結果表示這種人造皮亦可用於灼傷病患的永久性上皮形成。

這種皮所用材料的易於取得性，及其簡易的操控性，表示產品最終成本可大幅降低，而成本正是人工培養皮受到限制不能廣泛用於治療上的一個重要因素(Philips T. J., Arch Dermatol 135:977-978, 1999)。

本發明的人造皮係在存有血小板且事先已添加人工培養之人體結締組織細胞的人體血漿，經凝塊後產生的一種凝膠體所構成。凝塊是添加鈣鹽的結果。或者，亦可利用外源性凝血酵素及鈣離子而使血漿中含有的纖維蛋白原轉化，據以產生凝膠體。



五、發明說明 (8)

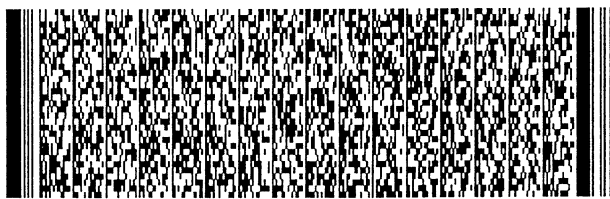
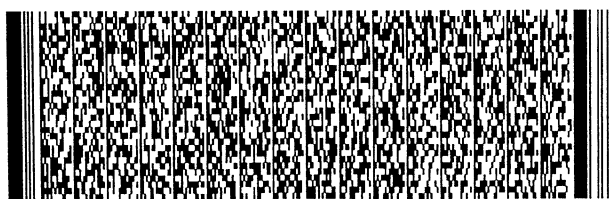
視凝膠體中之纖維蛋白原的濃度而定，這種凝塊可在存有或未存有抗纖維蛋白原溶解劑時發生，但每ml之凝膠體所含的纖維蛋白原如低於2 mg時，建議添加。

血漿是在存有宜為能使鈣離子螯合之抗凝劑的情況下，以靜脈穿刺抽取全血再經輕度離心分離而取得。另外，亦可利用血漿分離法抽取血漿。

其後，可將角質形成細胞播種於這個以血漿及人工培養結締組織細胞為基礎的凝膠體上。在存有促使角質形成細胞生長的另一不同媒介物的情況下，按低密度編排及人工培養8-12日的這些細胞，即會生長並能形成一種複層上皮。這種由血漿/結締組織細胞凝膠體與自體培養上皮所組成的皮膚，可供用於重大灼傷患者的永久性上皮形成。它也可以跟捐贈者的上皮共用來當作灼傷的暫時性覆蓋，或用於治療慢性皮膚潰瘍。除了皮膚外，這種培養系統也可應用到其他人體上皮，以供產生其它的上皮組織，例如口腔黏膜、泡狀黏膜等。

這種原型可供移植到一個傷口，植入而使損傷生成上皮。

這種凝膠體可能需要被固定到一固體支托上，以便能用於移植。這支托可以是個浸漬或未浸漬凡士林的紗布。以臨床用的惰性無機黏合劑或另一種機械系統便可將這紗布固定到凝膠體上。矽薄膜亦可用來當作支托，屆時可用諸如纖維蛋白之類的有機黏合劑從事固定。就後者而言，不需為了提供真皮基底而用結締組織細胞層把皮膚損傷處



五、發明說明 (9)

暫時覆蓋住，即可使用這種凝膠體。

人體血漿與結締組織細胞凝膠體的優點如下：

1. 原料易於取得。血漿通常是在存有螯合鈣的情況下以靜脈穿刺抽取人體全血而產生。只需採用離心分離法便可從全血取得血漿。使用分離性輸血程序亦可從全血取得人體血漿。

2. 確保角質形成細胞迅速生長。縱然結締組織細胞開始的濃度極低，但它們能在血漿凝膠體內迅速生長，以致能促進角質形成細胞的生長。在血漿和結締組織細胞凝膠體中，該等細胞於生長時會分泌出讓它們變成真正餵食細胞的物質，因而刺激與控制角質形成細胞的生長。在這種凝膠體上培養角質形成細胞，若與採行習用方法者相較，則於執行活組織檢查後只要3到4個星期，就能產生總面積更大的培養皮膚。

3. 凝膠體在生長的前30日內不會收縮或減低其表面面積與總容積。

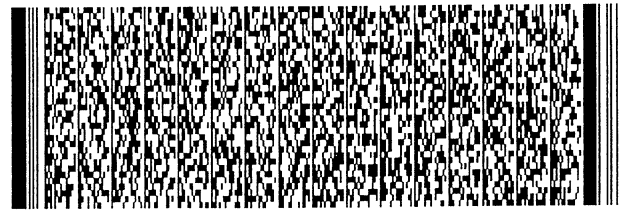
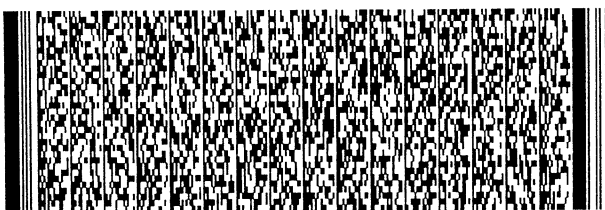
4. 真皮結締組織細胞可用另一來源的細胞取代。在用血漿製成的凝膠體中，結締組織細胞的功能可用其它細胞取代。骨髓中找到的間質幹細胞(Young等人，J. Ortho Res. 16； 406-413，1996)若被埋置在這些凝膠體之內時，即可發揮如同結締組織細胞的作用。其它也能增進角質形成細胞之生長的細胞是內皮細胞。使用皮膚以外其它不同部份所取得的真皮細胞，是種新的可行辦法，尤其對難以取得可供細胞開始生長之皮膚的重大灼傷患者來說。



五、發明說明 (10)

5. 不需添加外源性酵母蛋白質(牛或人體凝血酵素)即可促發凝塊。不同於纖維蛋白原濃縮物,人體血漿具有凝塊級聯(cascade)的所有成分,包括以先質形式(失活性者)存在的凝血酵素,即凝血酵素原。添加鈣和在存有源自血小板的磷脂體(也存在,如後文所述)時,則只運用內源性途徑(intrinsic pathway)即可進行凝塊,因而產生人造皮。使用這種凝塊途徑表示不需外源性凝血酵素,因為它是在與濃縮的纖維蛋白原一起運作時始需要。利用存有血小板的血漿,如今第一次能讓人造皮中之所有蛋白質的起源來自最後會把這皮移植至其本身的患者。

6. 強化源自血小板的各種生長因子。在由直接血漿凝塊所產生的凝膠體中存有一部份在纖維蛋白凝膠體中也存有的生長因子與細胞黏著分子。然而,在由直接血漿凝塊之血漿所產生的凝膠體中也存有血小板細胞活素,因為這些細胞有一部份在離心分離後始終存在。另外也可修改離心分離參數,據以強化血漿中的血小板部份。存有血小板時,皮便極富含PDGF和TGF- β (Anitua E., Int. Oral Maxillofac Implants 14:529-535, 1999)。開始進行組織修補的這兩種關鍵因素(Marx等人, Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol Oral Radiol Endod., 85:638-646, 1998)。這全表示由人體血漿和血小板產生並佈有結締組織細胞的凝膠體,可保持與增進纖維蛋白凝膠體的能力,以便在相當短的時間內獲得大面積的培養人造皮膚,並使它們適於培養角質形成細胞,以供治療重大灼傷患者。在

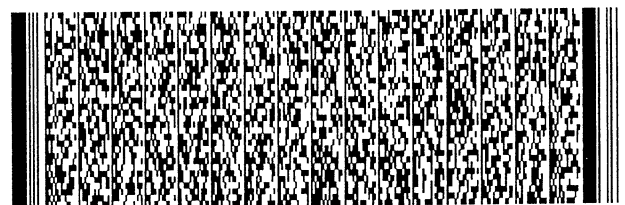
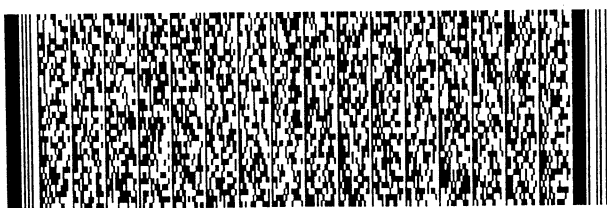


五、發明說明 (11)

纖維蛋白內之結締組織細胞和播種於表面上之角質形成細胞這二者的細胞生長非常重要，以致可從甚小的活組織檢體取得足夠用於真皮及表皮成分二者的充分細胞。換句話說，本發明之人造皮的細胞成分完全來自日後將對其移植的患者本身。

7. 因為使用血漿，所以可用極低的纖維蛋白原濃度產生穩定的凝膠體。使凝膠體在整個培養期間保持其完整性所需的纖維蛋白原濃度可以低於千分之0.5 mg。縱然在這些濃度條件下，由血漿產生的凝膠體仍穩定，不會被結締組織細胞和播種於其上的角質形成細胞迅速消化掉。此外，如果它們被結合到一種抗纖維蛋白原溶解劑時(抑胰月太酵素(aprotinin)，抗血纖溶環酸(tranexamic acid)， ϵ -氨基己酸(ϵ -aminocaproic acid))，纖維蛋白原的濃度甚至可更低，以致從2-3 ml的血漿便可獲得高達70-90平方公分的皮膚。若使血漿凝膠體結合到一固體支托時(vicryl，polactic-聚乙醇酸等)，血漿總濃度就可進一步減低。這些凝膠體的另一優點(因為每一平方公分之凝膠體的血漿用量極少)是它能让人造皮所用的血漿來自患者本身。使用來自患者本身的血漿，連同這皮中無外源性蛋白質，再加上人造皮膚的所有細胞都能來自患者本身，即為本發明的眾多新面向之一，因為這是第一次能以所有成分均來自患者本身的人造皮膚去治療大灼傷部位，亦即利用完全的自體人造皮膚治療重大灼傷患者。

因為這些凝膠體的生物特性，它們可用來當作各種細



五、發明說明 (12)

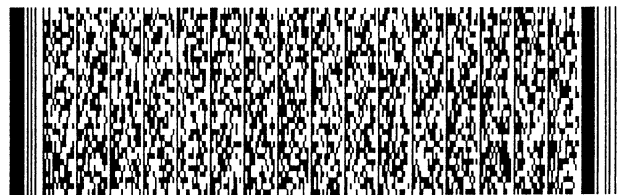
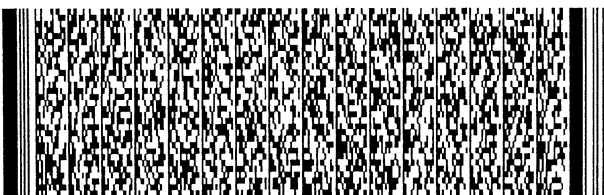
胞(結締組織細胞或其它細胞種，包括基因改變的細胞)的支托，和能產生可用於不同疾病的蛋白質(內皮生長因子等)。

發明詳細說明：

以下是如何取得皮基底各主要組分的說明。

從全血(4)取得含有血小板的血漿(2)。這是在存有臨床用抗凝劑的情況下，尤其是利用全血(4)中離子化鈣濃縮之螯合作用而發揮效用的抗凝劑，以靜脈穿刺所抽取者。全血(4)可從出血治療(haemotherapy)常用的一個血袋中取得，或需用數量較少時，可從VacutainerR式小型容器中收集的血來取得。帶有血小板的血漿(2)是以離心分離法取得，若欲取得富於血小板者即採用低速，而如欲取得濃度較低的產物時，則採用高速。一當血液業經離心分離時，便將相關的血漿成分直接用於形成凝膠體，或在 -20°C 的溫度下冷凍，以便日後使用。儲存前，血漿如不打算自體使用時(從準備治療的患者身上取得)，則可先用亞甲藍(methylene blue)處理這血漿，使可能的病毒失去活性。

凝膠體是從血漿中所含有的纖維蛋白原製成，其方法是利用人體或牛的凝血酵素及鈣離子的作用，或只用血漿本身所含有的凝血酵素原，經添加宜為氯化鈣形式的鈣，以便重建可在血漿中自發存在，但已被當作抗凝劑之乙二胺四醋酸(EDTA)的檸檬酸鈉使其失效的離子鈣值。纖維蛋



五、發明說明 (13)

白是凝膠體中的主要結構組分，但卻不是唯一的一種，因為在這模型中，纖維蛋白係被共價結合到原漿纖維連結蛋白。另外須指出的一個要點是，人體血漿蛋白素，球蛋白，生長因子，和血漿素原等之中還有許多其它的蛋白質，會影響到凝膠體的生產和穩定性，以及凝膠體中培養之細胞的生長。

可供使用的人體結締組織細胞，其來源有下列幾種：

1) 同種結締組織細胞。係由取自包皮手術之包皮和/或健康成人的皮結締組織細胞培養而成。患者或其法定代表人必須表示同意。

2) 自體結締組織細胞。係從患者(8)的皮膚活組織檢體(5)而取得，其專供用於準備移植到同一患者的皮。

凝膠體的取得方式如下：

一方面，使結締組織細胞重新懸浮於培養基或0.9%氯化鈉的溶液中。把血漿添加到這溶液，再添加抗纖維蛋白溶解劑。等這溶液準備妥時，可用二種不同方式使其凝塊：

1) 添加一種溶解於0.9%氯化鈉中的1%氯化鈉溶液。

2) 添加一種溶解於40 mM 氯化鈣中的凝血酵素(2到4個單位之間)。

第一種方法係採用血漿中所存有，並因鈣的存在而使其活化的凝塊因子。這是一種最後會將血漿中所存有之凝血酵素原轉化成凝血酵素的緩慢過程。接著這種蛋白質將對纖維蛋白原起作用，使其轉化成纖維蛋白，最後再經由



五、發明說明 (14)

其它凝塊因子的作用而轉化成不溶解性纖維蛋白，亦即本發明之皮的主要結構蛋白質。

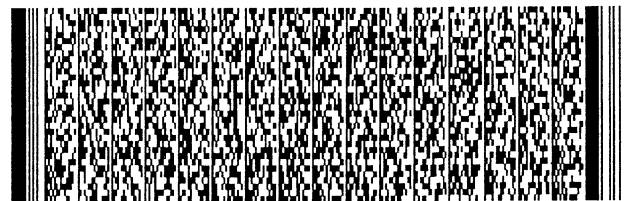
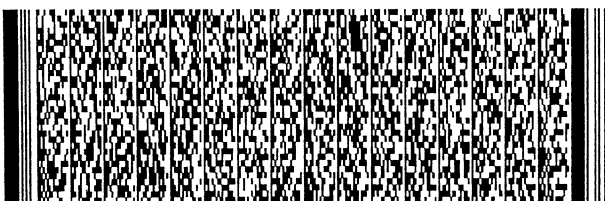
第二種辦法是把凝塊酵素直接添加到血漿，因而過程加快許多。對照之下，如把人或牛的另一種蛋白質添加到這產品，就會導致與各種疾病傳染有關的問題。

把這混合物導入一個細胞培養皿中，於37°C的溫度條件下靜待30到120分鐘，直到完全形成凝膠體為止。等這時間結束時，凝膠體已變成固體，可用一種完全的培養基覆蓋。

所生產的凝膠體在被用於培養成的角質形成細胞之前，係於5%二氧化碳的培養器(incubator)中以37°C的溫度儲存，但最多不得超過14日。在正常的培養條件下，這些凝膠體始終保持安定和黏附在培養皿的底部，並未觀察到退縮或容積損失的情形。

所需要的若是完全的皮膚(7)生長，便把取自初級培養的角質形成細胞(6)添加到這皮基底。在存有飼養細胞的時，可用鈣量低的培養基或完全限定的培養基而以各種大不相同的方法來培養該等細胞(Myers等人，Am. J. Surg 170 ; 75-83，1995)。以這些系統中的任一種所生產的角質形成細胞(6)均可用於這種人造皮(1)上。

一當播種的角質形成細胞即將融合或完全融合時，凝膠體便可供臨床使用，和準備移植。完成此舉的方法是把它們固定到一支托上，以致能在不損失凝膠體或不使移植部立破裂的情況下運送該等凝膠體。若是凝膠體非常厚



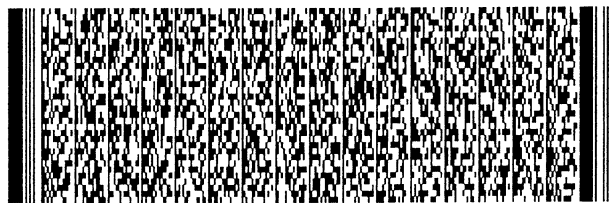
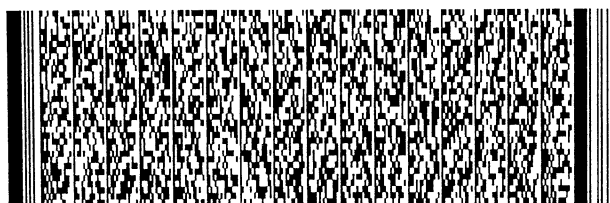
五、發明說明 (15)

時，就不需要這種固定過程。大體上，如需在短時間內讓角質形成細胞從事大面積的生長(重大灼傷患者)，就要用小型凝膠體，因而需要固體支托(9)以便移植。至於其它用途(慢性潰瘍)的培養物，在處理及移植時則不需這種固定過程。凝膠體係以一種臨床使用的無機黏合劑，再施用極少量的縫線而被固定到這固體支托(9)上。一當培養物被固定到固體支托(9)上，即用手使其與培養皿的底部分開。

作為含有血小板之血漿(2)的一種來源，所用的人體全血(4)係在存有抗凝劑時以靜脈穿刺所抽取者。

如需從單一捐贈者取得大量的血漿，即使用一種裝有抗凝塊/保鮮溶液(SAG-Manitol)，通常稱為三袋組(triple bag set)的450 ml抽血袋來進行抽血。一當抽取完時，便對全血進行離心分離。如需富含血小板的血漿(PRP)，則在20°C的溫度條件下，以大約1500 rpm的轉速進行5分鐘的離心分離。若需較不富含血小板的血漿(PPP)，就以大約2900-3000 rpm的轉速進行10分鐘的離心分離。經離心分離後，再對血袋從事正常的分離，以便分出所獲得的血漿。這血漿可供直接使用，以亞甲藍處理便可使病毒失去活性。這種血漿在-20°C的溫度條件下可保存至少一年。

所需者如為少量血漿，以供用於小的皮部位，即以無菌真空管(VacutainerR式)或具有類似特性的其它同等品，採用按照原廠建議比例、屬於飽和狀況的鈣螯合劑

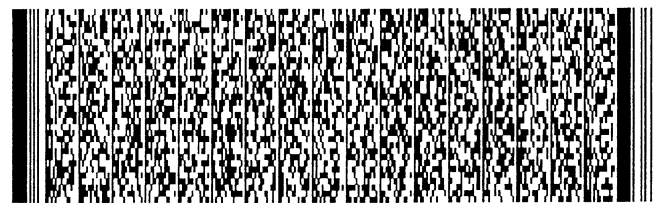
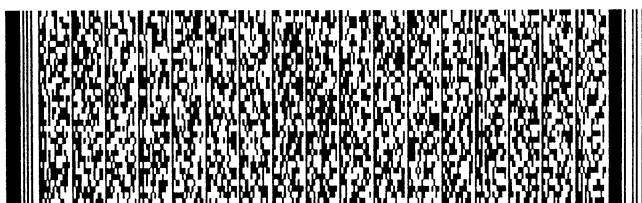


五、發明說明 (16)

(檸檬酸鈉，EDTA)當作抗凝塊溶液來執行全血的抽取。另一種亦可採用的抗凝劑是鈉肝磷脂(sodium heparin)。視所需者究竟是PRP或PPP而定，離心分離分別以160 g (PRP)或400 g (PPP)條件下進行10分鐘。從真空管取出帶有血小板的血漿(2)部份，以求不取出紅血球。為增加血漿抽取量，再以3000 g的條件對含有這血球部份的粒料(pellet)進行10分鐘的離心分離。等這作業結束時，便將取出血漿與前一離心分離所獲得的浮起物(supernatant)混合。由於這培養系統通常係用於生產準備移植到提供該血液(自體血漿)之患者身上的皮，所以不需亞甲藍處理。

不論選用那種方法來取得全血(4)和分離出血漿，均將以出自Kraus當初所述方法而衍生的商用方式(MultifibrenR U, Dade Behring)來測量溶解於血漿中的纖維蛋白原。

從計劃性包莖手術之後取得的人體包皮，或從皮膚活組織檢體(5)，將可獲得不同種類的人體結締組織細胞(3)。樣本係被收集在一運輸媒質中(DMEM, 10%的牛胚胎血清, 100 u/ml的盤尼西林, 100 μ g/ml的鏈黴素)。在實驗室中，以無菌的PBS將它清洗三次，再仔細切成若干片。接著在37°C的溫度條件下將其導入30 ml的0.05%胰蛋白酵素(trypsin) - 0.02% EDTA的溶液中，同時攪拌。每隔30分鐘，便收集胰蛋白酵素和換新。添加完全的培養基(DMEN, 10%的牛胚胎血清)，使胰蛋白酵素中和。重複這作業，直到不再獲得細胞為止。對於所獲得的細胞，以



五、發明說明 (17)

每平方公分培養表面100,000個細胞的密度將其置於培養皿中。培養基每隔72小時換一次，直到細胞融合為止。等融合時，便將這些細胞予以胰蛋白酶化(trypsinated)，並按照對前一階段各培養皿採用二培養皿的比例進行第二次培養。當細胞顯現出一層與結締組織細胞(3)類似的細胞時，就以習用的技術將其一部份冷凍，並將其儲存在液態氮的低溫瓶(cryovial)內。取用這些結締組織細胞的理想道數(pass)是在第4和第12道之間。

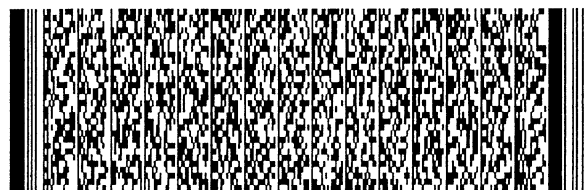
準備把同一患者(8)的人體結締組織細胞(3)用於人造皮時，係以相同方式進行。患者(8)的皮膚活組織檢體(5)係照前述程序處理。一當取得細胞時，便以每平方公分100,000個細胞的密度將其一部份培養在DMEM 10%的牛胚胎血清中。製備相關的次培養物，直到取得足以製造患者(8)所需人造皮(1)之充分數量的人體結締組織細胞(3)為止。

將培養成的人體結締組織細胞(3)予以胰蛋白酶化，計數和使其重新懸浮在培養基中，以便立即用於人造皮(1)。

一當取得基本材料時，便開始製造凝膠體。

如同在製造皮基底時所用的計算法，足夠一個75平方公分培養皿的所需。至於其它的尺寸，亦將使用相同的數值，僅按照培養皿之表面的比例予以增減而已。

人造皮(1)的製備：

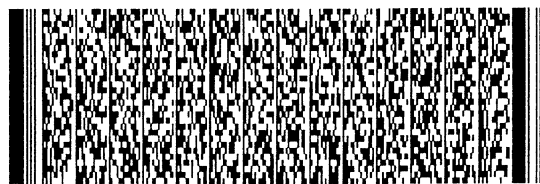


五、發明說明 (18)

製備一種溶液，該溶液基本上含有培養基，0.9%的氯化鈉溶液和人體結締組織細胞(3)（在30,000到250,000個細胞之間）。如有必要時，即添加抗纖維蛋白原溶解劑（10,000單位的抑胰月太酵素，5到20 mg之間的抗血纖溶環酸或200-300 mg的ε-氨基己酸，最後是1 ml的0.04 M一鈣化二氯(C12Ca)溶液，其中已先溶解有2到4個國際單位的凝血酵素。混合好這些組分時，即添加3到6 ml之間帶有血小板的血漿(2)（視纖維蛋白原的濃度而定）。視所用的血漿量而定，完成的最終容積為15 ml，多少帶點氯化鈉。將這溶液迅速導入培養皿，並均質分散在其整個表面上。接著以37°C的溫度將其留在二氧化碳烘箱中，直到發生凝塊情形和凝膠體被聚合化為止。

作為使用外源性凝血酵素的另一種選項，凝膠體可用下列方式製備：

製備一種溶液，該溶液基本上含有培養基，0.9%的氯化鈉溶液和人體結締組織細胞(3)（在30,000到250,000個細胞之間）。如有必要時，即添加抗纖維蛋白原溶解劑（10,000單位的抑胰月太酵素，5到20 mg之間的抗血纖溶環酸或200-300 mg的ε-氨基己酸，最後是1 ml的溶解於0.9%氯化鈉溶液中的1% 一鈣化二氯(C12Ca)溶液。混合好這些組分時，即添加含有血小板(2)的血漿。視所用的血漿量而定，完成的最終容積為15 ml，多少帶點氯化鈉。將這溶液迅速導入培養皿，並均質分散在其整個表面上。接著以37°C的溫度將其留在二氧化碳烘箱中，直到發生凝塊



五、發明說明 (19)

情形和凝膠體被聚合化為止。以這方法，凝膠體的聚合極慢。

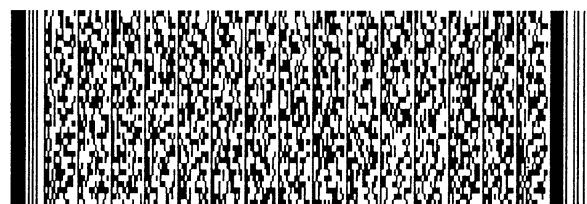
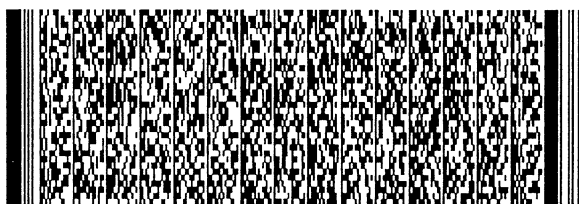
纖維蛋白原在凝膠體中大約的最終濃度係每一ml的凝膠體有0.4到2 mg之間的纖維蛋白原。但在某些情況下，血漿不必先用氯化鈉稀釋即可使用，以致纖維蛋白原的濃度可高達每一ml的凝膠體有4 mg。

凝膠體中之人體纖維蛋白原(3)的初始濃度可以有相當大的變化。一般說來，建議的濃度是每平方公分凝膠體表面存有不低於500個的結締組織細胞，但更多時也可以。結締組織細胞的初始數目最好不要超過每平方公分4,000個，因為濃度較高時，凝膠體易於在生長的第6到第7日被消化掉，以致不能從事移植處理。

視所需的生長量而定，角質形成細胞係以差異甚大的密度(在每平方公分皮具有1,500到15,000個細胞之間)被播種在這凝膠體上。

採用的角質形成細胞(6)可從皮膚活組織檢體(5)的初級培養物取得。利用前述的任一種角質形成細胞培養系統，即可在這凝膠體上培養角質形成細胞(6)，但培養基如以牛胚胎血清增補時，所獲得的結果最佳。

當角質形成細胞融合或即將融合時，通常這是在生長的第8日，便製備可供移植的皮片(sheet)。這層人造皮膚(7)必須直接從培養皿的底部分開，或被固定到一固體支托(9)上。凝膠體如果不太稠密時(纖維蛋白原的初始濃度低，大面積等)，即需固定到一固體支托(9)上，這表示若



五、發明說明 (20)

不將凝膠體固定到一固體支托(9)上，就無法臨床使用。此程序係由下列各階段構成：

取走最後的培養基和打開培養皿。以無菌紗布(可塗佈或不塗佈凡士林)蓋住凝膠體，讓紗布確切蓋住整個凝膠體表面。用解剖刀使凝膠體的各邊與培養皿分開。一當完成這作業行動，使用一種無機黏合劑Cyanoacrylate (氰基丙烯酸酯)，HistoacrylR，Braum或具有類似特性的其它同等品)將其固定到凝膠體的上表面(角質形成細胞所在的那一面)。Cyanoacrylate (氰基丙烯酸酯)的用法是對凝膠體的邊緣滴上幾小滴，另可對中間滴幾滴黏合劑。一當黏合劑變乾時，使用壓舌板使凝膠體與培養皿分開。紗布有助於使含有皮基底的凝膠體和培養成的角質形成細胞上層保持成一體。接著即可在不致損失其完整性或造成破裂的情況下運送這原型達16小時以上。

表一是習用技術與本發明標的之人造皮的基本特性比較。

表一

	習用技術(Sadaki)	本發明
血小板	無	有
凝血酵素	有	非強制性
纖維蛋白原	60 mg/ml	0.5 - 2 mg/ml
結締組織細胞	50,000/平方公分	< 4,000 /平方公分
凝膠體培養時間	22 小時	8 到 12 日
凝膠體中的細胞生長	極少	是
角質形成細胞	50,000/平方公分	1,500 - 15,000/平方公分
活組織檢體尺寸	X 83	X 1000 - 5000

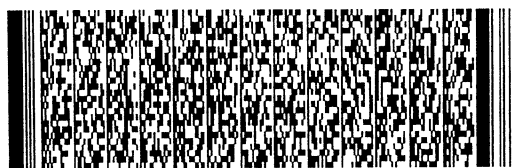
圖式簡單說明

圖示摘要說明：

第一圖所示者係使用本發明之人造皮而對重大灼傷患者移植皮膚所需作業的圖表。

主要元件圖號說明：

人造皮	 1	帶有血小板的血漿	 2
結締組織細胞	 3	全血	 4
皮膚活組織檢體	 5	角質形成細胞	 6
皮膚	 7	患者	 8
固體支托	 9		



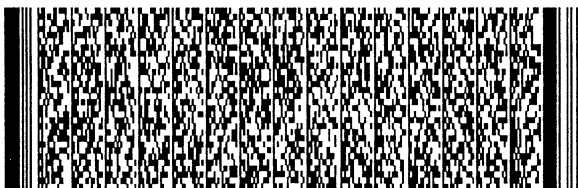
四、中文發明摘要 (發明之名稱：人造皮及其製作方法)

本發明係一種人造皮及其製作方法，其係從帶有血小板之血漿和人體結締組織細胞取得的人造皮。帶有血小板之血漿係以輕度離心分離方式使患者全血分離而取得，人體結締組織細胞則是從皮膚活組織檢體取得。這種人造皮可促使播種於其表面上的角質形成細胞迅速生長，以建立一種易於移植的人造皮膚。從小型的皮膚活組織檢體和極少量帶有血小板的血漿，即可獲得大面積的人造皮，再對其添加細胞活素和血小板生長因子，就可強化播種於其表面之內或之上細胞的增殖。取得的人造皮膚可用於治療重大灼傷和慢性皮膚潰瘍等，或運用基因改變的細胞，將其用來當作一種基因療法的媒介物。

英文發明摘要 (發明之名稱：ARTIFICIAL DERMIS AND METHOD OF PREPARATION)

Artificial dermis (1) obtained from plasma with platelets (2) and human fibroblasts. The plasma with platelets (2) is obtained from the fractionating of total blood (4) from the patient (8) by light centrifugation, and the human fibroblasts (3) from a skin biopsy (5). Clotting is obtained by adding calcium.

this artificial dermis (1) provides for the rapid growth of the keratinocytes (6) seeded on its surface to build an artificial skin (7) which



四、中文發明摘要 (發明之名稱：人造皮及其製作方法)

英文發明摘要 (發明之名稱：ARTIFICIAL DERMIS AND METHOD OF PREPARATION)

can easily be transplanted. Large areas of artificial dermis (1) are obtained from a small skin biopsy (5) and minimal quantities of plasma with platelets (2), which being enriched with cytokines and platelet growth factors, strengthens the proliferation of the cells seeded, both inside and on the surface.

The artificial skin (7) obtained can be used to treat major burn treatments, chronic skin ulcers, etc., or be used, by employing genetically altered



四、中文發明摘要 (發明之名稱：人造皮及其製作方法)

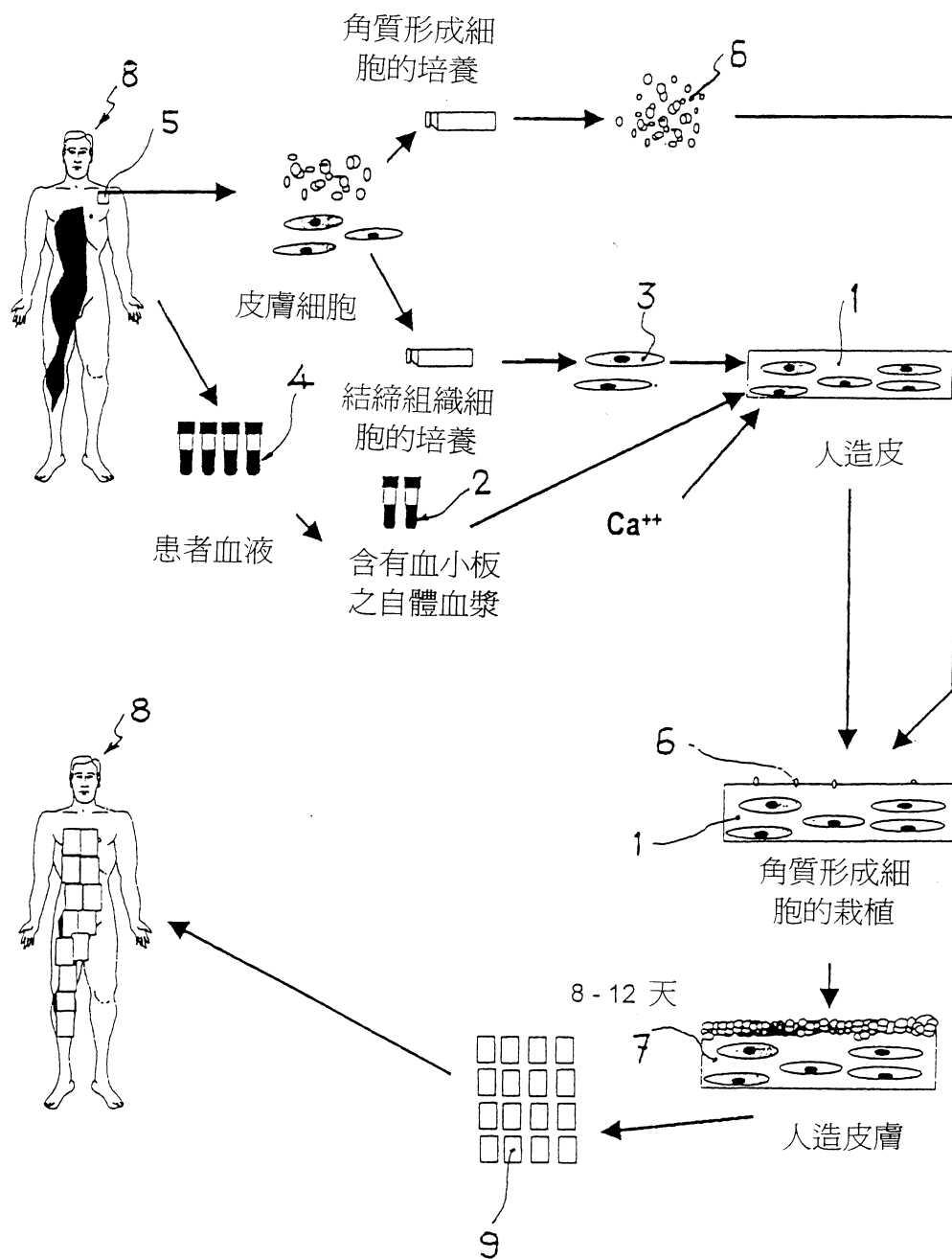
英文發明摘要 (發明之名稱：ARTIFICIAL DERMIS AND METHOD OF PREPARATION)

cells, as a vehicle for gene therapy.



圖式

公告本



第一圖

六、申請專利範圍

1、一種人造皮的製作方法，該方法包括下列各階段：

對患者的全血進行低速離心分離，而取得帶有血小板的血漿，隨後將其冷凍；

使用已知的方法從皮膚活組織檢體培養皮細胞；
添加鈣鹽使事先解凍的帶有血小板的血漿凝結成塊，以便取得一種纖維蛋白基質；

把皮細胞埋置於纖維蛋白內。

2、如申請專利範圍第1項所述的製作方法，其特徵在凝塊過程中，添加凝血酵素。

3、如申請專利範圍第2項所述的製作方法，其中該凝血酵素的添加濃度為0.2 IU/ml。

4、如申請專利範圍第1項所述的製作方法，其特徵在對每3到6 ml帶有血小板的血漿而言，鈣鹽係由1 ml溶液中的1%一鈣化二氯(Cl_2Ca)構成。

