



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I866986 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 12 月 21 日

(21)申請案號：109120202

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 06 月 16 日

(51)Int. Cl.：

C12N5/071 (2010.01)

A61L27/60 (2006.01)

A61L27/24 (2006.01)

A61L27/38 (2006.01)

A61L27/58 (2006.01)

(30)優先權：2019/10/08

南韓

KR10-2019-0124693

(71)申請人：南韓商羅基醫療保健公司(南韓) ROKIT HEALTHCARE INC. (KR)

南韓

(72)發明人：柳石煥 YOU, SEOK HWAN (KR)

(74)代理人：陳豫宛

(56)參考文獻：

CN 206027182U

JP 2018-523559A

KR 20190098907A

WO 2019/136455A1

審查人員：周浩宇

申請專利範圍項數：11 項 圖式數：3 共 22 頁

(54)名稱

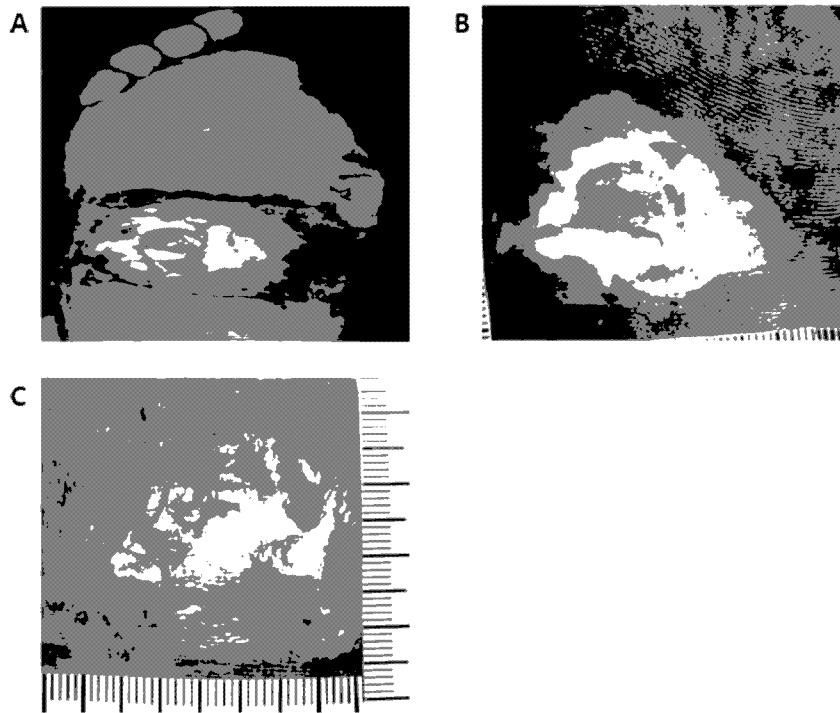
糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的製造方法及利用其製造的糖尿病足病患者定製型皮膚再生片

(57)摘要

本說明書係一種糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的製造方法及利用其製造的糖尿病足病患者定製型皮膚再生片，所述製造方法包括以下步驟：A)提取自體脂肪組織；B)利用具有 2 mm 至 3 mm 孔徑的第一過濾器，去除自體脂肪組織中的纖維質；C)使所述去除纖維質的自體脂肪組織，依次穿過具有 450 μ m 至 550 μ m 孔徑的第二過濾器及具有 150 μ m 至 250 μ m 孔徑的第三過濾器，以粉碎自體脂肪組織；D)提取由具有 25 μ m 至 75 μ m 孔徑的第四過濾器捕集的所述經粉碎的自體脂肪組織，獲取脂肪組織提取物；E)利用三維掃描儀，獲取患者的皮膚缺損區域的三維數據後，以此為基礎，利用三維打印機，製造與皮膚缺損區域對應的三維模具；F)將包含所述脂肪組織提取物和纖維蛋白原的第一液塗覆於所述三維模具內，以形成原型層；G)將包含凝血酶的第二液塗覆於所述原型層上，以固化成皮膚再生層；以及 H)去除所述三維模具。

The present invention provides a method of manufacturing a diabetic foot patient-specific skin regeneration sheet, which includes: A) extracting autologous adipose tissue; B) removing fibers in the autologous adipose tissue using a first filter having a pore diameter of 2-3 mm; C) crushing the autologous adipose tissue from which the fibers are removed by sequentially passing it through a second filter having a pore diameter of 450-550 μ m and a third filter having a pore diameter of 150-250 μ m; D) acquiring an adipose tissue extract by extracting the ground autologous adipose tissue collected on a fourth filter having a pore diameter of 25-75 μ m; E) obtaining 3D data of the skin defect area of a patient using a 3D scanner, and then based on the data, manufacturing a 3D mold corresponding to the skin defect area using a 3D printer; F) forming a proto-layer by applying a first solution containing the adipose tissue extract and fibrinogen to the inside of the 3D mold; G) curing the proto-layer into a skin regeneration layer by applying a second solution containing thrombin onto the proto-layer; and H) removing the 3D mold.

指定代表圖：



【圖3】



I866986

【發明摘要】

【中文發明名稱】

糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的製造方法及利用其製造的糖尿病足病患者定製型皮膚再生片

【英文發明名稱】

METHOD OF MANUFACTURING DIABETIC FOOT PATIENT-SPECIFIC DERMAL REGENERATION SHEET AND DIABETIC FOOT PATIENT-SPECIFIC DERMAL REGENERATION SHEET MANUFACTURED USING THE SAME

【中文】

本說明書係一種糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的製造方法及利用其製造的糖尿病足病患者定製型皮膚再生片，所述製造方法包括以下步驟：A)提取自體脂肪組織；B)利用具有2 mm至3 mm孔徑的第一過濾器，去除自體脂肪組織中的纖維質；C)使所述去除纖維質的自體脂肪組織，依次穿過具有450 μm 至550 μm 孔徑的第二過濾器及具有150 μm 至250 μm 孔徑的第三過濾器，以粉碎自體脂肪組織；D)提取由具有25 μm 至75 μm 孔徑的第四過濾器捕集的所述經粉碎的自體脂肪組織，獲取脂肪組織提取物；E)利用三維掃描儀，獲取患者的皮膚缺損區域的三維數據後，以此為基礎，利用三維打印機，製造與皮膚缺損區域對應的三維模具；F)將包含所述脂肪組織提取物和纖維蛋白原的第一液塗覆於所述三維模具內，以形成原型層；G)將包含凝血酶的第二液塗覆於所述原型層上，以固化成皮膚再生層；以及H)去除所述三維模具。

【英文】

The present invention provides a method of manufacturing a diabetic foot patient-specific skin regeneration sheet, which includes: A) extracting autologous adipose tissue; B) removing fibers in the autologous adipose tissue using a first filter having a pore diameter of 2-3 mm; C) crushing the autologous adipose tissue from which the fibers are removed by sequentially passing it through a second filter having a pore diameter of 450-550 μm and a third filter having a pore diameter of 150-250 μm ; D) acquiring an adipose tissue extract by extracting the ground autologous adipose tissue collected on a fourth filter having a pore diameter of 25-75 μm ; E) obtaining 3D data of the skin defect area of a patient using a 3D scanner, and then based on the data, manufacturing a 3D mold corresponding to the skin defect area using a 3D printer; F) forming a proto-layer by applying a first solution containing the adipose tissue extract and fibrinogen to the inside of the 3D mold; G) curing the proto-layer into a skin regeneration layer by applying a second solution containing thrombin onto the proto-layer; and H) removing the 3D mold.

【指定代表圖】圖 3。

【代表圖之符號簡單說明】無。

【特徵化學式】無。

【發明說明書】

【中文發明名稱】

糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的製造方法及利用其製造的糖尿病足病患者定製型皮膚再生片

【英文發明名稱】

METHOD OF MANUFACTURING DIABETIC FOOT PATIENT-SPECIFIC DERMAL REGENERATION SHEET AND DIABETIC FOOT PATIENT-SPECIFIC DERMAL REGENERATION SHEET MANUFACTURED USING THE SAME

【技術領域】

【0001】 本發明涉及糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的製造方法及利用其製造的糖尿病足病患者定製型皮膚再生片。

【先前技術】

【0002】 所謂糖尿病足病，尤其是指糖尿病病患足部皮膚創傷引起皮膚組織潰爛而產生的足部潰瘍。此為糖尿病引起的神經病變或周圍血管病變在糖尿病患者足部引發潰瘍或是傷口感染惡化而出現的現象。患有糖尿病的患者中約有20%必患一次以上糖尿病足病，其中有1~3%左右的患者接受腿部部分截肢手術。

【0003】 另外，除外傷導致之外，據所知，導致腿部部分截肢的原因有一半以上是糖尿病足病。如上所述，作為降低糖尿病患者生活質量的很重要原因，

對於糖尿病足病需要有一種治療手段。尤其，實情是，需要有一項研究，以恢復糖尿病足病壞死區域皮膚組織，使正常生活成為可能。

【發明內容】

技術問題

【0004】 本說明書旨在提供一種能夠使糖尿病足病患者壞死部位皮膚恢復為正常皮膚的糖尿病足病患者定制型皮膚再生片的製造方法及利用其製造的糖尿病足病患者定制型皮膚再生片。

問題解決方案

【0005】 本發明的一種實施方式提供一種糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的製造方法，包括：A)萃取自體脂肪組織；B)利用具有2 mm至3 mm孔(pore)徑的第一過濾器，去除自體脂肪組織中的纖維質；C)使所述去除纖維質的自體脂肪組織，依次穿過具有450 μm 至550 μm 孔徑的第二過濾器及具有150 μm 至250 μm 孔徑的第三過濾器，以粉碎自體脂肪組織；D)萃取自具有25 μm 至75 μm 孔徑的第四過濾器捕集的所述經粉碎的自體脂肪組織，獲取脂肪組織萃取物；E)利用三維掃描儀，獲取患者的皮膚缺損區域的三維數據後，以此為基礎，利用三維印表機，製造與皮膚缺損區域對應的三維模具；F)將包含所述脂肪組織萃取物和纖維蛋白原的第一液塗覆於所述三維模具內，以形成原型層(proto-layer)；G)將包含凝血酶的第二液塗覆於所述原型層上，以固化成皮膚再生層；以及H)去除所述三維模具。

【0006】 本發明的又一實施方式提供一種利用所述製造方法製造的糖尿病足病患者定製型皮膚再生片。

發明效果

【0007】 根據本發明的糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的製造方法，能夠迅速製造適合糖尿病足病患者的皮膚再生片，具有可預期的高細胞活性及細胞生長因子的皮膚再生促進效果，能夠有效實現患部的恢復。

【0008】 根據本發明的糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的製造方法製造與糖尿病足病患者的患部一致形狀(即，形狀及深度一致的形狀)的皮膚再生片，患部能夠更有效恢復。

【0009】 透過以下對發明的詳細描述、申請專利範圍及圖式，本發明的其他目的及優點能夠理解得更加明確。

【圖式簡單說明】

【0010】 圖1分步驟示出了根據實施例的脂肪組織萃取物的獲取過程。

【0011】 圖2示出了實施例的患者定製三維模具的製造過程。

【0012】 圖3示出了將根據實施例的患者定製型皮膚再生片應用於糖尿病足病患者的過程及其結果。

【實施方式】

【0013】 在本說明書中，當涉及某種部件位於其他部件「上」時，這不僅包括：某種部件接觸於其他部件，還包括：兩個部件之間存在另外的部件。

【0014】 在本說明書中，當涉及某部分「包括」某組件時，其所指的是，只要沒有尤其相反的記載，並不排除其他組件，並且還可以包括其他組件。

【0015】 下面對本發明進行詳細說明。

【0016】 本發明的一個實施方式提供一種糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的製造方法，包括：A)萃取自體脂肪組織；B)利用具有2 mm至3 mm孔徑的第一過濾器，去除自體脂肪組織中的纖維質；C)使所述去除纖維質的自體脂肪組織，依次穿過具有450 μm 至550 μm 孔徑的第二過濾器及具有150 μm 至250 μm

孔徑的第三過濾器，以粉碎自體脂肪組織；D)萃取由具有25 μm 至75 μm 孔徑的第四過濾器捕集的所述經粉碎的自體脂肪組織，獲取脂肪組織萃取物；E)利用三維掃描儀，獲取患者的皮膚缺損區域的三維數據後，以此為基礎，利用三維印表機，製造與皮膚缺損區域對應的三維模具；F)將包含所述脂肪組織萃取物和纖維蛋白原的第一液塗覆於所述三維模具內，以形成原型層；G)將包含凝血酶的第二液塗覆於所述原型層上，以固化成皮膚再生層；以及H)去除所述三維模具。

【0017】 下面對所述糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的製造方法的各步驟進行詳細說明。

【0018】 步驟A)：萃取自體脂肪組織。

【0019】 所述步驟A)可以是，利用普通的吸脂術，萃取糖尿病足病患者的自體脂肪組織。具體而言，所述步驟A)的自體脂肪組織可以是在吸脂術萃取物去除吸脂術所使用的鹽水以及混於其中一同流出的血液而得的。

【0020】 根據本發明的一種實施方式，所述步驟A)可以是，從利用吸脂術獲取的萃取物中去除血液及生理鹽水，以萃取自體脂肪組織。具體而言，所述步驟A)可以是，將利用吸脂術獲取的萃取物放置預定時間，以濾除與脂肪層分離的血液及生理鹽水層，萃取自體脂肪組織。以此方式去除血液及生理鹽水，能夠更有效地萃取下述脂肪組織萃取物，進而，所萃取的脂肪組織萃取物能夠更有效地包含適合治療的生長因子及活性細胞。

【0021】 步驟B)：去除自體脂肪組織中的纖維質。

【0022】 所述步驟B)可以利用孔徑相對較大的第一過濾器，去除所萃取的自體脂肪組織中的纖維質。具體而言，所述步驟B)中的所述第一過濾器可以為不銹鋼材質的針頭式過濾器。具體而言，所述第一過濾器具有高強度的不銹鋼材質的過濾器部，可以從所述自體脂肪組織有效分離纖維質。更具體而言，所

述步驟B)可以是在所述第一過濾器的兩端加裝注射器後，利用注射器的活塞運動，使萃取的自體脂肪組織穿過所述第一過濾器2次以上，具體而言為2至3次。在所述步驟B)的情況下，使得可以第一次濾除自體脂肪組織中的纖維質，更有效地在短時間內實現自體脂肪組織的粉碎。

【0023】 步驟C)：粉碎自體脂肪組織。

【0024】 所述步驟C)可以包括：使所述去除纖維質的自體脂肪組織穿過所述第二過濾器，以粉碎自體脂肪組織，使其過濾物穿過所述第三過濾器，以進一步粉碎自體脂肪組織。

【0025】 根據本發明的一種實施方式，所述步驟C)可以是，向過濾袋(filter bag)注入所述去除纖維質的自體脂肪組織後，施加外部壓力以使其穿過過濾器，從而粉碎所述去除纖維質的自體脂肪組織。具體而言，所述步驟C)可以是，向過濾袋注入所述去除纖維質的自體脂肪組織後，在外部利用諸如矽膠鏟等的工具，使所述去除纖維質的自體脂肪組織依次穿過第二及第三過濾器，以粉碎自體脂肪組織。

【0026】 在本說明書中，過濾袋作為一種柔軟塑料材質的密閉袋狀的過濾器試劑盒，可以是一側具有注入口、另一側具有排出口、內部空間由過濾器分隔的形態。

【0027】 所述步驟C)中的第二過濾器及第三過濾器的一個示例，可以變形使用Tiss'You公司的Lipocell試劑盒的過濾袋。不過，並非限於此，可以利用符合本發明目的的過濾器。

【0028】 如所述步驟C)，逐步利用孔徑漸小的過濾器粉碎自體脂肪組織，可極大縮短細微粉碎自體脂肪組織所需的時間，脂肪組織萃取物中的細胞能夠保持高細胞活性。具體而言，在利用所述步驟C)時，即使是以物理方法細微粉

碎脂肪組織，仍然具有能夠有效確保大量對治療有效的脂肪組織、活性細胞及活性蛋白質的優點。進而，當利用所述步驟C)時，能夠以最佳活性狀態收集細胞外間質及生長因子，還可以使其具有能夠執行(3D)生物列印的物性。

【0029】 D)獲取脂肪組織萃取物。

【0030】 所述步驟D)可以是，利用所述第四過濾器等對經所述步驟C)粉碎的自體脂肪組織進行過濾之後，丟棄濾出的物質，獲得由過濾器捕集的物質。具體而言，所述步驟D)可以是，將經步驟C)粉碎的自體脂肪組織與生理鹽水混合後，利用所述第四過濾器進行過濾，分離去除所濾出的物質之後，將由所述第四過濾器捕集的物質用作脂肪組織萃取物。所述濾出並被去除的物質可以包含過度細微粉碎而細胞活性下降的脂肪組織、血液、生理鹽水等，這些會妨礙本發明所意圖的最終皮膚再生片的活性，因而應去除。

【0031】 所述步驟D)可以是，向過濾袋注入所述去除纖維質的自體脂肪組織及生理鹽水後，去除由所述第四過濾器濾出的物質。具體而言，所述步驟D)可以是，在向過濾袋注入所述去除纖維質的自體脂肪組織及生理鹽水後，施加適當壓力，使所述經粉碎的自體脂肪組織被所述第四過濾器過濾。

【0032】 所述步驟D)中的第四過濾器的一個示例，可以變形使用Tiss'You公司的Lipocell試劑盒的過濾袋。不過，並非限於此，可以利用符合本發明目的的過濾器。

【0033】 根據本發明製造的所述脂肪組織萃取物，尤其能夠富含糖尿病足病患者皮膚恢復所需的生長因子、活性細胞及活性蛋白質等。進而，利用所述脂肪組織萃取物的生物列印組合物(例如，第一液)在生物列印過程中不堵塞噴嘴，進而能夠保持適當黏度而以穩定速度噴出，因而適合需要進行精密生物列印的皮膚再生片的製造。

【0034】 另外，所萃取的所述脂肪組織萃取物可以在短時間內最大限度地包含生長因子、活性細胞及活性蛋白質等，因而能夠使更有效的治療成為可能。

【0035】 步驟E)：製造與皮膚缺損區域對應的三維模具。

【0036】 所述步驟E)可以利用本領域公知的三維掃描裝備或三維列印裝備。進而，所述三維模具能夠在塗覆所述第一液及第二液時，保持患部的立體形態(即，形狀、大小、深度等三維形態)，可以在製造皮膚再生片後去除。所述三維模具可以利用本行業一般使用的生物兼容性高分子來形成。具體而言，所述三維模具可以利用聚己內酯(PCL)製造。所述聚己內酯具有低融點，並且具有高柔韌性，因而具有能夠易於與所製造的皮膚再生片分離的優點。進而，用聚己內酯能夠製作符合患部立體形狀的最佳模具，利用與患部立體形狀相同的三維模具製造的皮膚再生片，可以有效貼合於患部，以幫助恢復。

【0037】 步驟F)：形成原型層。

【0038】 步驟G)：固化成皮膚再生層。

【0039】 在本說明書中，所謂原型層，可以指，固化之前的塗覆了生物組合物的層。具體而言，可以指，塗覆於三維模具內，由包含凝血酶的組合物固化之前的層。

【0040】 所述步驟F)及步驟G)分別可以利用噴墨生物列印或三維生物列印執行。具體而言，所述步驟F)及步驟G)可以利用本領域公知的具有2個以上噴嘴的生物列印裝置，各個噴嘴分別噴吐所述第一液及第二液，可以形成立體形狀。進而，在形成所述原型層時，利用三維生物列印機或噴墨生物列印機，使得細胞及細胞外間質均質分佈，進而可以防止固化後皮膚再生層中的細胞結團現象等。

【0041】 根據本發明的一種實施方式，所述步驟G)可以在30秒至5分鐘以內，具體而言，可以在10秒至1分鐘以內完成固化。

【0042】 根據本發明的一種實施方式，所述步驟B)至步驟G)可以在30分鐘以內完成。具體而言，所述步驟B)至步驟G)可以在萃取脂肪組織後，在1分鐘至15分鐘，或在1分鐘至5分鐘以內完成。

【0043】 在利用所述製造方法的情況下，在萃取自體脂肪組織後，可以非常迅速地製造患者定製型皮膚再生片，因此具有可以使患者定製型皮膚再生片中的細胞及細胞外間質等的活性最大化的優點。

【0044】 步驟H)：去除三維模具。

【0045】 所述步驟H)可以是，使包括皮膚再生層的糖尿病足病患者定製型皮膚再生片(選擇性地包括後述的表皮再生層)從三維模具分離。從所述三維模具去除的糖尿病足病患者定製型皮膚再生片，可以貼於糖尿病足病患者的皮膚缺損部位，使患部的皮膚再生效果最大化。

【0046】 第一液及第二液

【0047】 所述第一液可以包含脂肪組織萃取物和纖維蛋白原。所述脂肪組織萃取物可以包含脂肪組織源性基質血管組分及脂肪組織源性細胞外間質。所述脂肪組織源性基質血管組分可以包含脂肪組織源性幹細胞(adipose-derived stem cells)。所述脂肪組織源性基質血管組分可以在糖尿病足病患者的患部分化成皮膚組織，與所述脂肪組織源性細胞外間質一同幫助患部的恢復。所述脂肪組織源性細胞外間質可以在糖尿病足病患者患部提供可供分化成皮膚組織的細胞固定的環境。

【0048】 根據本發明的一種實施方式，所述第一液可以包含選自胰島素、類胰島素生長因子(insulin-like growth factor)、粒細胞(granulocytes)、淋巴細胞

(lymphocytes)、內皮細胞(endothelial cells)、單核細胞(monocytes)、巨噬細胞(macrophages)、脂肪源幹細胞(adipose-derived stem cells)、脂肪細胞因子(adipocytokines)、脂聯素(adiponectin)、瘦素(leptin)、介白素-6(IL-6)、介白素-1 β (IL-1 β)、單核細胞趨化蛋白1(MCP-1)及纖溶酶原活化物抑制劑-1(PAI-1)所組成的群組的至少一種。具體而言，所述第一液可以包含含量高於糖尿病足病患者患部胰島素濃度的胰島素，或包含類胰島素生長因子，由此，可以彌補糖尿病足病患者患部微血管壞死導致的胰島素供應不足，有效實現患部恢復。

【0049】 所述第一液中的纖維蛋白原可以與所述第二液中的凝血酶反應，形成纖維蛋白網絡，這可發揮充分固定所述皮膚再生層中活性細胞的作用。

【0050】 根據本發明的一種實施方式，所述第一液中的纖維蛋白原可以是40%至60%稀釋的60 IU纖維蛋白原。

【0051】 另外，根據本發明的一種實施方式，所述第二液中的凝血酶可以是40%至60%稀釋的500 IU凝血酶。

【0052】 如果所述纖維蛋白原及凝血酶的濃度超過所述範圍，則所述皮膚再生層中的纖維蛋白膠含量過高，向皮膚細胞的分化不夠有效，會產生細胞存活率降低的問題，進而，所述皮膚再生層硬度過高，可能會使患部適合性降低。進而，當所述纖維蛋白原及凝血酶的濃度不及所述範圍時，所述皮膚再生層的硬度過低而難以操控，且所製造的皮膚再生片流動性過高，故在應用於患部時，會產生不夠有效的問題。即，所述纖維蛋白原及凝血酶的濃度在所述範圍以內時，可以使細胞存活率最大化，所製造的皮膚再生片硬度及流動性適宜，故應用於患部時，能夠體現最大效果，進而，使皮膚再生片中的蛋白質及活性細胞的分佈保持均勻，使有效治療成為可能。

【0053】 根據本發明的一種實施方式，所述第一液還可以包含抑肽酶 (aprotinin)。所述抑肽酶是胰臟分泌的蛋白質分解酶的抑制劑，是由共58個胺基酸組成的多肽。據所知，主要從牛肺中萃取，在血液中阻止纖維蛋白的分解，從而發揮止血作用。

【0054】 根據本發明的一種實施方式，1 ml的第一液可以包含900 KIU至1100 KIU (kininogen inactivator unit)的所述抑肽酶，具體可以包含1000 KIU。

【0055】 根據本發明的一種實施方式，所述第二液可以為氯化鈣溶液分散凝血酶。具體而言，所述第二液可以包含5 mg至6.5 mg的氯化鈣。

【0056】 所述第一液及第二液的溶劑可以為水，具體而言，可以為生理鹽水。另外，所述第一液中的纖維蛋白原與所述第二液中的凝血酶可透過常用的纖維蛋白膠試劑盒獲得。

【0057】 本發明將纖維蛋白原及凝血酶所組成的纖維蛋白膠用作黏合劑，這可以確保比透明質酸黏合劑或膠原蛋白黏合劑更高的黏性，因而所述皮膚再生層可以具有與患部的優異黏合力，進而，可以保持適當的強度。

【0058】 根據本發明的一種實施方式，所述第一液中的脂肪組織萃取物與纖維蛋白原的體積比可以為3：1至5：1。所述第一液中的脂肪組織萃取物與纖維蛋白原的體積比在所述範圍內時，所製造的皮膚再生片的強度及細胞分化能力能夠最有效地體現。

【0059】 皮膚再生層

【0060】 根據本發明的一種實施方式，所述皮膚再生層可以是在內部具備細微粉碎的脂肪組織源性細胞及活性因子的纖維蛋白矩陣。具體而言，所述皮膚再生層除了脂肪組織源性細胞外間質、脂肪組織源性基質血管組分之外，可以包含各式各樣的細胞及/或活性因子。

【0061】 表皮再生層

【0062】 根據本發明的一種實施方式，可以還包括：將包含脂肪組織萃取物、纖維蛋白原及角質細胞(keratinocyte)的附加的第一液塗覆於所述皮膚再生層上，形成附加的原型層後，將包含凝血酶的附加的第二液塗覆於所述附加的原型層上，以固化成表皮再生層。所述附加的第一液及附加的第二液可以利用與前述第一液及第二液的塗覆方法相同的方法，塗覆於所述三維模具內。

【0063】 根據本發明的一種實施方式，所述附加的第一液包含脂肪組織萃取物、纖維蛋白原及角質細胞，可以為前述第一液再包含角質細胞。此外，所述附加的第二液可以與前述第二液相同。

【0064】 所述附加的第一液可以塗覆於固化的所述皮膚再生層上，形成附加的原型層，附加的第二液塗覆於所述附加的原型層上，固化成皮膚再生層。

【0065】 即，所述表皮再生層如前述皮膚再生層，在纖維蛋白矩陣內具備細微粉碎的脂肪組織源性細胞及活性因子，在此基礎上，還可以具備角質細胞。

【0066】 所述表皮再生層可以作為一部分包含於所述糖尿病足病患者定製型皮膚再生片，特別是位於患部最外側，能夠更有效地幫助患部表皮再生。具體而言，所述皮膚再生層能夠有效地幫助患部真皮層恢復，所述表皮再生層位於患部最外側，能夠幫助所述患部表皮層恢復，因而具有能夠快速恢復的優點。

【0067】 糖尿病足病患者定製型皮膚再生片

【0068】 根據本發明的又一實施方式，提供一種利用所述製造方法製造的糖尿病足病患者定製型皮膚再生片。所述糖尿病足病患者定製型皮膚再生片既可以僅由前述皮膚再生層構成，還可以包括前述皮膚再生層和表皮再生層全部。

【0069】 根據本發明的一種實施方式，所述糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的厚度可以至少為1 mm。具體而言，當所述糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的厚度不足1 mm時，真皮層中的皮膚細胞無法再生，故患部恢復緩慢或恢復的皮膚表面會不均勻。更具體而言，所述糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的厚度可以為1 mm至10 mm，或者是1 mm至5 mm。

【0070】 下面為了具體說明本發明，將舉實施例進行詳細說明。但是，根據本發明的實施例可以變形為各種不同形態，本發明範圍不解釋為限定於以下所敘述的實施例。本說明書中實施例的提供，旨在向本領域普通技術人員更完整地說明本發明。

【0071】 [實施例]

【0072】 (1)脂肪組織萃取物的獲取

【0073】 對糖尿病足病患者進行麻醉後，利用吸脂術，在糖尿病足病患者的腹部萃取70 ml至150 ml的吸入物，放置約5分鐘，使混於脂肪組織一同流出的鹽水和血液沉澱而除去沉澱物，獲取自體脂肪組織。

【0074】 然後，將盛裝患者脂肪的注射器和新注射器加裝於包含2.4 mm孔徑不銹鋼針頭式過濾器(Adnizer, SKT-AN-2400, BSL)的連接器的雙向注入口，透過活塞運動使脂肪穿過過濾器2~3次，從而去除自體脂肪組織中的纖維質。

【0075】 然後，將去除纖維質的脂肪注入具備孔徑為500 μm 的聚乙烯(PET)過濾器的過濾袋(脂肪組織處理裝置，Tiss'You)，利用矽膠鏟進行過濾。然後，利用具備孔徑200 μm 的PET過濾器的過濾袋(脂肪組織處理裝置，Tiss'You)，以相同方法過濾已穿過500 μm 過濾器的脂肪。進而，將穿過200 μm 過濾器的脂肪與等量的生理鹽水一同注入具備孔徑為50 μm 的PET過濾器的過濾袋(脂肪組織處理裝置，Tiss'You)，濾除生理鹽水和其他雜質，獲取脂肪組織萃取物。

【0076】 圖1按步驟示出了實施例的脂肪組織萃取物的獲取過程。具體而言，圖1A示出了利用針頭式過濾器去除自體脂肪組織中的纖維質的過程。圖1B至C示出了將去除纖維質的自體脂肪組織注入過濾袋後，利用矽膠鏟使自體脂肪組織穿過過濾器的情形。圖1D示出了最終獲取的脂肪組織萃取物。

【0077】 (2)第一液及第二液的製造

【0078】 將Beriplast試劑盒(Beriplast P Combi-Set，美國傑特貝林生物製品有限公司(CSL Behring L.L.C.))的纖維蛋白原(60 IU)溶液和凝血酶(500 IU)溶液分別用生理鹽水稀釋為50%。

【0079】 將稀釋為50%的纖維蛋白原溶液和所述脂肪組織萃取物按1：4的體積比混合，製造第一液。然後，將所述稀釋為50%的凝血酶溶液用作第二液。

【0080】 (3)患者定製型三維模具的製造

【0081】 在經蒸氣滅菌消毒的、貼有10 cm×10 cm乳膠的玻璃板中央標記原點。然後，按照比患者患部大1 mm至2 mm的大小，將1張透析膜(dialysis membrane)裁剪成四邊形形狀後，浸於生理鹽水，並貼在貼有乳膠的玻璃板中點。將玻璃板的原點對準三維生物印表機(INVIVO, ROKIT HELTHCARE)列印平台(bed)原點，進行玻璃板列印平台調平(bed leveling)。進而，為了製作與患部形狀和大小相符的PCL三維模具，拍攝患部形狀照片，並轉換成三維建模文件。然後，將三維建模文件輸入三維生物印表機，將醫療級PCL (RESOMER C 209，贏創(EVONIK)，MW 45,000) 1 g至2 g放入三維生物印表機的空氣分配器(air dispenser)後，以80℃至100℃的溫度及600 kPa至800 kPa的壓力條件，輸出三維模具。

【0082】 圖2示出了實施例的患者定製型三維模具的製造過程。具體而言，圖2A示出貼上透析膜的貼有乳膠的玻璃板。圖2B示出了糖尿病足病患者的

患部，圖2C是對患者患部進行三維建模的結果。進而，圖2D示出了最終製造的患者定製型三維模具。

【0083】 (4)患者定製型皮膚再生片的製造

【0084】 將根據三維生物印表機列印平台原點輸出的三維模具加裝於三維生物印表機。並且，在設置為噴嘴尺寸0.5 mm、列印速度10 mm/s、擠出量300%、填充50%、外壁厚度0.5 mm的分配器1中加裝所述第一液，在設置為噴嘴尺寸0.5 mm、列印速度10 mm/s、擠出量500%及填充70%的分配器2中加裝所述第二液，然後向所述三維模具內輸出所述第一液，隨即輸出所述第二液並固化。進而，去除所述三維模具，獲取患者定製型皮膚再生片。

【0085】 (5)應用於糖尿病足病患者

【0086】 清潔糖尿病足病患者患部後，利用加裝於注射器的噴霧器，在患部黏合面充分噴灑凝血酶。然後，將所述製造的患者定製型皮膚再生片貼於患部，進行濕性敷料處理後，在患部周邊利用海綿泡沫保護患部及周圍。然後，每過一週更換患部的敷料並觀察經過。

【0087】 圖3示出了將實施例的患者定製型皮膚再生片應用於糖尿病足病患者的過程及其結果。具體而言，圖3A示出了糖尿病足病患者的患部，圖3B示出了將製造的皮膚再生片貼於患部。進而，圖3C示出了手術後第二週的患部。根據圖3可以確認，當將根據本發明的患者定製型皮膚再生片應用於糖尿病足病患者的患部時，損失的區域在短時間內恢復。具體而言，如果參考圖3C，可以確認手術後僅僅第二週的治療期間，缺損部位100%恢復，被皮膚組織填滿。

【0088】 以上詳細敘述了本發明內容的特定的部分，本領域普通技術人員應該明白，這種具體敘述只是優選的實施形式，而非用於限制本發明的範圍。因此，本發明的實質性範圍由所附申請專利範圍以及其等同物所定義。

【符號說明】 無。

【生物材料寄存】 無。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的製造方法，包括以下步驟：

A)利用具有2 mm至3 mm孔徑的第一過濾器等，去除自體脂肪組織中的纖維質；

B)使去除纖維質的所述自體脂肪組織，依次穿過具有450 μm 至550 μm 孔徑的第二過濾器等及具有150 μm 至250 μm 孔徑的第三過濾器等，以粉碎自體脂肪組織；

C)過濾由具有25 μm 至75 μm 孔徑的第四過濾器等經粉碎的所述自體脂肪組織，去除濾出的物質，並收集第四過濾器中被捕集的物質，獲取脂肪組織萃取物；

D)利用三維掃描儀，獲取患者的皮膚缺損區域的三維數據後，以此為基礎，利用三維印表機，製造與皮膚缺損區域對應的三維模具；

E)將包含所述脂肪組織萃取物和纖維蛋白原的第一液塗覆於所述三維模具內，以形成原型層；

F)將包含凝血酶的第二液塗覆於所述原型層上，以固化成皮膚再生層；以及

G)去除所述三維模具。

【請求項2】 如請求項1所述的糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的製造方法，其中所述步驟A)至步驟F)在30分鐘以內完成。

【請求項3】 如請求項1所述的糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的製造方法，其中所述第一過濾器等為不銹鋼材質的針頭式過濾器等。

【請求項4】 如請求項1所述的糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的製造方法，在所述步驟B)中，將去除纖維質的所述自體脂肪組織注入到過濾袋後，施加外部壓力以使所述自體脂肪組織穿過過濾器等，從而粉碎去除纖維質的所述自體脂肪組織。

【請求項5】 如請求項1所述的糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的製造方法，其中所述第一液中的纖維蛋白原是將60 IU纖維蛋白原稀釋到40%至60%。

【請求項6】 如請求項1所述的糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的製造方法，其中所述第二液中的凝血酶是將500 IU凝血酶稀釋到40%至60%。

【請求項7】 如請求項1所述的糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的製造方法，其中所述第一液中的脂肪組織萃取物與纖維蛋白原的體積比為3：1至5：1。

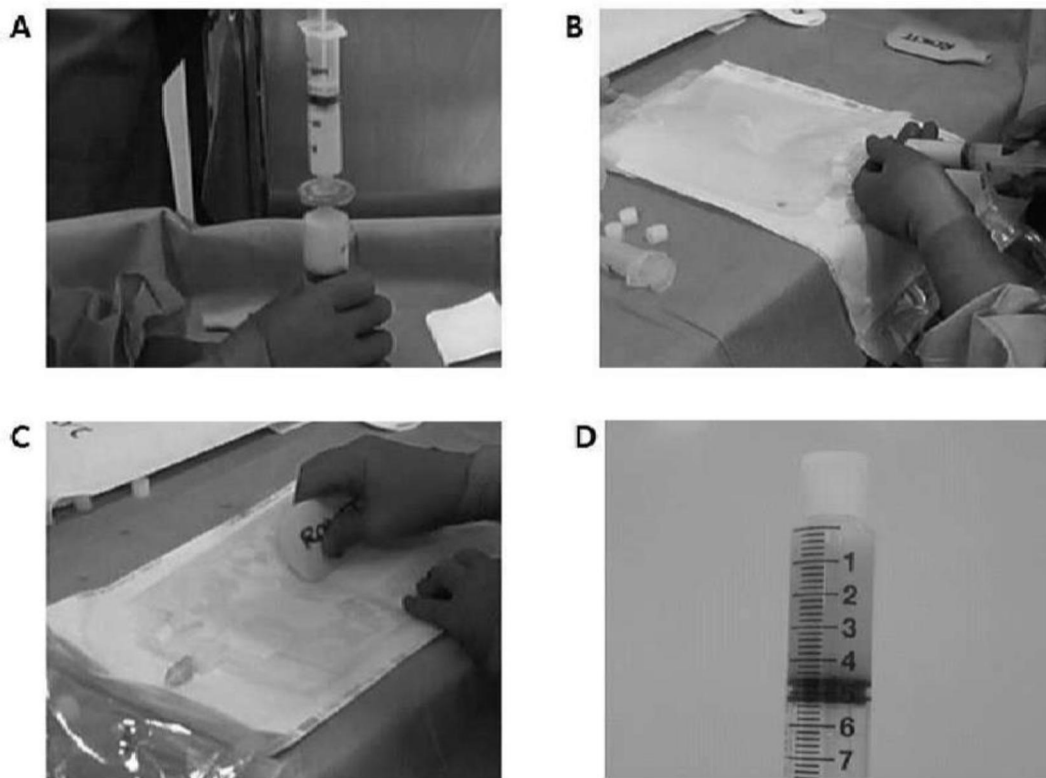
【請求項8】 如請求項1所述的糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的製造方法，其中所述第一液包含選自胰島素、類胰島素生長因子、粒細胞、淋巴細胞、內皮細胞、單核細胞、巨噬細胞、脂肪源幹細胞、脂肪細胞因子、脂聯素、瘦素、介白素-6、介白素-1 β 、單核細胞趨化蛋白1及纖溶酶原活化物抑制劑-1所組成的群組的至少一種。

【請求項9】 如請求項1所述的糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的製造方法，其中所述製造方法還包括：將包含脂肪組織萃取物、纖維蛋白原及角化細胞的附加的第一液塗覆於所述皮膚再生層上，形成附加的原型層後，將包含凝血酶的附加的第二液塗覆於所述附加的原型層上，以固化成表皮再生層。

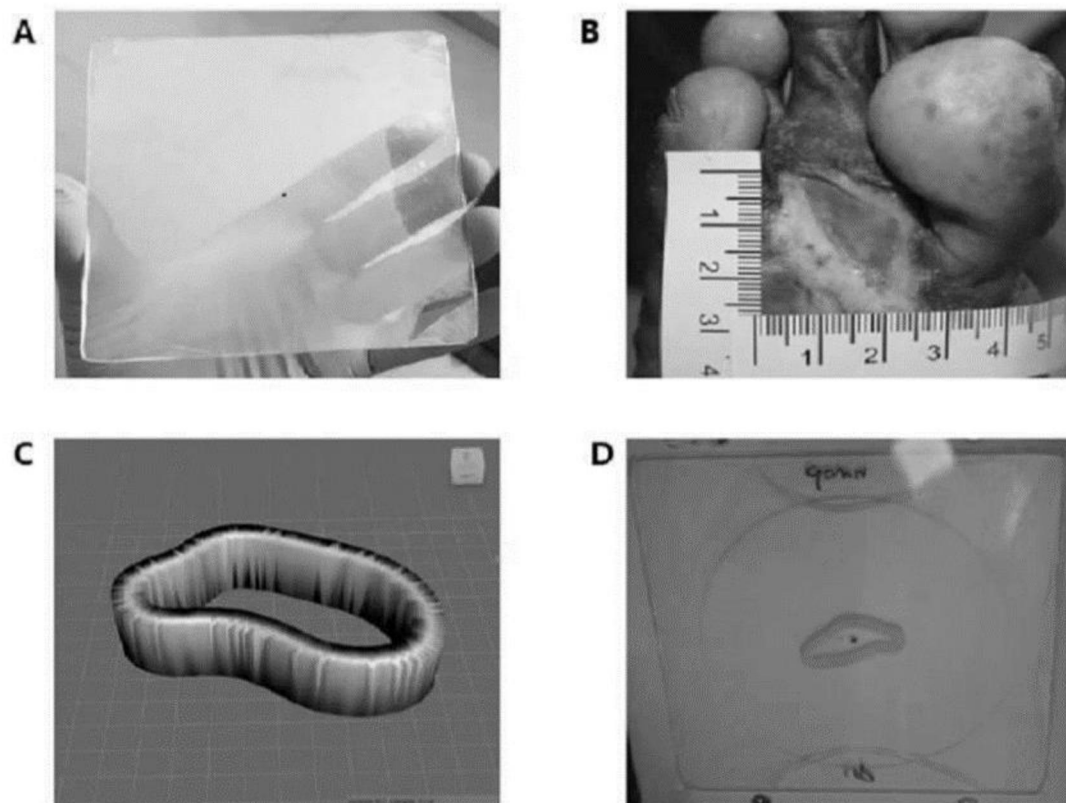
【請求項10】 如請求項1所述的糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的製造方法，其中所述糖尿病足病患者定製型皮膚再生片的厚度至少為1 mm。

【請求項11】 一種糖尿病足病患者定製型皮膚再生片，其利用請求項1所述的製造方法製造。

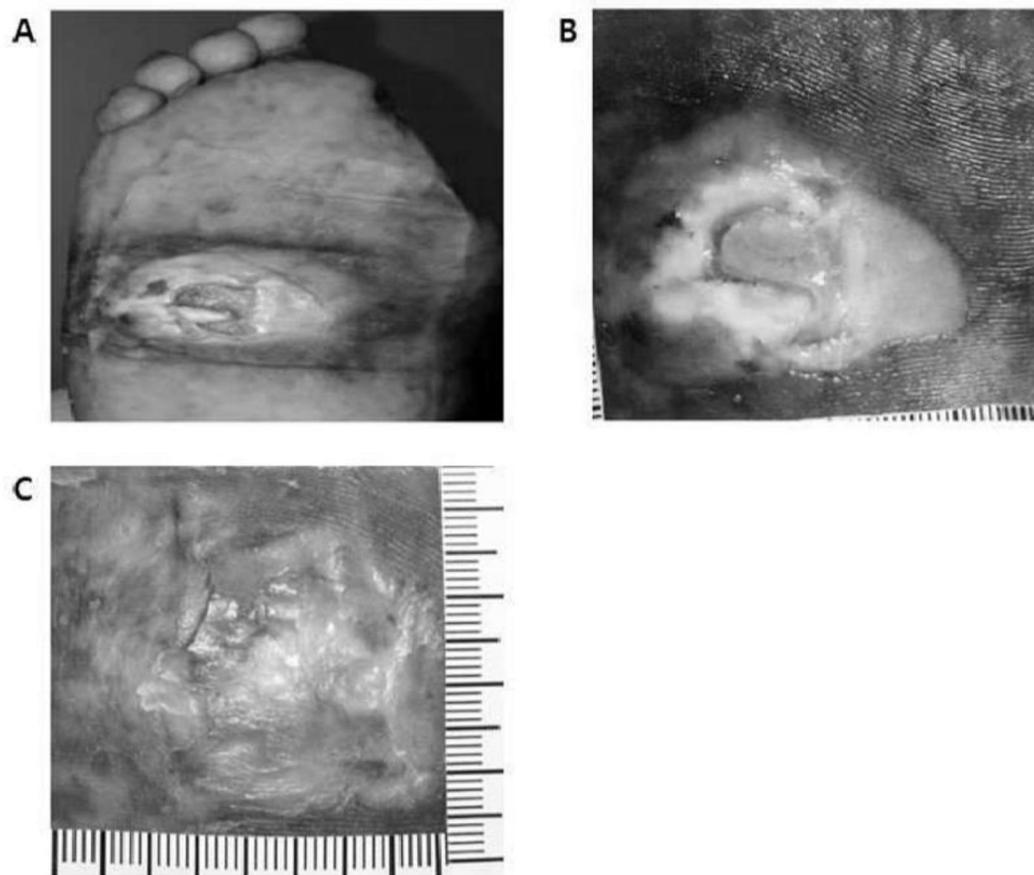
【發明圖式】



【圖1】



【圖2】



【圖3】