



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104685049 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 03

(21) 申请号 201380024737. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 03. 14

C12N 5/02(2006. 01)

C12N 5/071(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/614, 115 2012. 03. 22 US

61/614, 112 2012. 03. 22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 11. 11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/031316 2013. 03. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/142254 EN 2013. 09. 26

(71) 申请人 埃维塔医疗有限公司

地址 英国剑桥郡

(72) 发明人 A·奎克 W·多尔芬

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公  
司 31100

代理人 余颖

权利要求书3页 说明书24页 附图9页

(54) 发明名称

细胞悬液及其用途

(57) 摘要

本发明提供了适用于生产活组织可移植细胞悬液的方法和装置,其适用于在上皮相关过程中促进组织再生,以及由其产生的组合物。所述细胞悬液可包括位于分化不同阶段的活的且有功能的细胞,包括未分化的 / 祖细胞和分化的细胞,以及在两者之间的那些。在某些实施方式中,所述细胞悬液可经受应激以诱导其中的热激应答,或接触外源提供的试剂,如热激蛋白及其片段、透明质酸、富血小板血浆和 / 或生长因子。所述细胞悬液可直接应用于患者的受体位点以进行体内再生,或者培养或接种至基质以进行体外生长 / 再生。

1. 一种用于上皮相关过程的细胞悬液,所述细胞悬液包含:  
包括来源于上皮组织样品的活的且有功能的细胞的细胞群;  
在上皮相关过程过程中使用前,令所述细胞群处于选自应激和外源试剂的条件下;  
在所述上皮相关过程中使用并应用于受体位点时,所述细胞群促进上皮组织的处理、愈合、重建、表面重修、色素再沉着和 / 或再生。
2. 如权利要求 1 所述的细胞悬液,所述活的且有功能的细胞包括已分化细胞和能够分裂或分化的细胞。
3. 如权利要求 1 所述的细胞悬液,所述上皮组织样品获自皮肤上皮、呼吸上皮、血管上皮、角膜上皮和腺上皮中的一种或多种。
4. 如权利要求 1 所述的细胞悬液,当所述上皮组织样品是皮肤组织样品时,所述活的细胞来源于所述皮肤组织样品的真皮层、表皮层或真皮和表皮层。
5. 如权利要求 1 所述的细胞悬液,当所述上皮组织样品是皮肤组织样品时,所述细胞群包括角质形成细胞、黑素细胞、成纤维细胞、朗格汉斯细胞或上述细胞的任何组合。
6. 如权利要求 1 所述的细胞悬液,当所述上皮组织样品是皮肤组织样品时,所述细胞群包含皮肤干细胞。
7. 如权利要求 6 所述的细胞悬液,所述皮肤干细胞与非干细胞相混合。
8. 如权利要求 1 所述的细胞悬液,所述应激是缺氧、热、机械外伤、营养缺乏和酶暴露中的一种或多种。
9. 如权利要求 1 所述的细胞悬液,所述细胞群表现出应激诱导的特征。
10. 如权利要求 9 所述的细胞悬液,所述应激诱导的特征是选自 Hsp90 和 Hsp90  $\alpha$  的蛋白的表达水平升高。
11. 如权利要求 1 所述的细胞悬液,还包含所述外源试剂。
12. 如权利要求 11 所述的细胞悬液,所述外源试剂是热激蛋白或其片段、透明质酸、富血小板血浆、生长因子、脂肪干细胞或上述物质的任何组合。
13. 如权利要求 1 所述的细胞悬液,当所述上皮组织样品是皮肤组织样品时,所述上皮相关过程包括皮肤伤口处理、皮肤组织移植、皮肤美容过程或真皮处理。
14. 如权利要求 13 所述的细胞悬液,所述皮肤伤口是急性伤口、人工产生的伤口或慢性伤口。
15. 如权利要求 1 所述的细胞悬液,在受体位点处将所述细胞群体外或原位地接种至基质或支架,用于所述上皮相关过程。
16. 一种制备用于上皮相关过程的细胞的方法,所述方法包括:  
提供包括来源于上皮组织样品的活的且有功能的细胞的细胞群;以及  
使所述细胞群处于选自应激和外源试剂的条件下。
17. 如权利要求 16 所述的方法,所述活的细胞包括有功能的已分化细胞和能够分裂或分化的细胞。
18. 如权利要求 16 所述的方法,所述上皮组织样品获自皮肤上皮、呼吸上皮、血管上皮、角膜上皮和腺上皮中的一种或多种。
19. 如权利要求 16 所述的方法,当所述上皮组织样品是皮肤组织样品时,所述活的细胞来源于所述皮肤组织样品的真皮层、表皮层或真皮和表皮层。

20. 如权利要求 16 所述的方法, 当所述上皮组织样品是皮肤组织样品时, 所述细胞群包括角质形成细胞、黑素细胞、成纤维细胞、朗格汉斯细胞或上述细胞的任何组合。

21. 如权利要求 16 所述的方法, 当所述上皮组织样品是皮肤组织样品时, 所述细胞群包含皮肤干细胞。

22. 如权利要求 21 所述的方法, 所述皮肤干细胞与非干细胞相混合。

23. 如权利要求 16 所述的方法, 所述应激是缺氧、热、机械外伤、营养缺乏和酶暴露中的一种或多种。

24. 如权利要求 16 所述的方法, 所述应激诱导所述细胞群表现出应激诱导的特征。

25. 如权利要求 24 所述的方法, 所述应激诱导的特征是选自 Hsp90 和 Hsp90  $\alpha$  的蛋白的表达水平升高。

26. 如权利要求 24 所述的方法, 所述应激诱导所述细胞群表达热激蛋白, 从而获得所述用于上皮相关过程的细胞, 所述细胞中所述热激蛋白的水平高于不接触所述应激时所述热激蛋白的对照水平。

27. 如权利要求 26 所述的方法, 所述热激蛋白选自 Hsp90 和 Hsp90  $\alpha$ 。

28. 如权利要求 16 所述的方法, 所述外源试剂是热激蛋白或其片段、透明质酸、富血小板血浆、生长因子、脂肪干细胞或上述物质的任何组合。

29. 如权利要求 16 所述的方法, 当所述上皮组织样品是皮肤组织样品时, 所述上皮相关过程包括皮肤伤口处理、皮肤组织移植、皮肤美容过程或真皮处理。

30. 如权利要求 29 所述的方法, 所述皮肤伤口是急性伤口、人工产生的伤口或慢性伤口。

31. 如权利要求 16 所述的方法, 还包括将所述细胞群应用于受体位点。

32. 如权利要求 16 所述的方法, 还包括在受体位点处将所述细胞群体外或原位地接种至基质或支架。

33. 一种上皮相关过程中制备和使用细胞的方法, 所述方法包括:

将细胞群应用于需处理患者的受体位点, 所述细胞群包括来源于上皮组织样品的活的且有功能的细胞; 以及

向所述细胞群提供选自应激和外源试剂的条件以促进所述患者中的上皮处理、愈合、重建、表面重修、色素再沉着和 / 或再生。

34. 如权利要求 33 所述的方法, 所述活的细胞包括有功能的已分化细胞和能够分裂或分化的细胞。

35. 如权利要求 33 所述的方法, 所述上皮组织样品获自皮肤上皮、呼吸上皮、血管上皮、角膜上皮和腺上皮中的一种或多种。

36. 如权利要求 33 所述的方法, 当所述上皮组织样品是皮肤组织样品时, 所述活的细胞来源于所述皮肤组织样品的真皮层、表皮层或真皮和表皮层。

37. 如权利要求 33 所述的方法, 当所述上皮组织样品是皮肤组织样品时, 所述细胞群包括角质形成细胞、黑素细胞、成纤维细胞、朗格汉斯细胞或上述细胞的任何组合。

38. 如权利要求 33 所述的方法, 当所述上皮组织样品是皮肤组织样品时, 所述细胞群包含皮肤干细胞。

39. 如权利要求 38 所述的方法, 所述皮肤干细胞与非干细胞相混合。

40. 如权利要求 33 所述的方法,所述应激是缺氧、热、机械外伤、营养缺乏和酶暴露中的一种或多种。

41. 如权利要求 33 所述的方法,所述应激诱导所述细胞群表现出应激诱导的特征。

42. 如权利要求 41 所述的方法,所述应激诱导的特征是选自 Hsp90 和 Hsp90  $\alpha$  的蛋白的表达水平升高。

43. 如权利要求 41 所述的方法,所述应激诱导所述细胞群表达热激蛋白,从而获得用于所述上皮相关过程的细胞,所述细胞中所述热激蛋白的水平高于不接触所述应激时所述热激蛋白的对照水平。

44. 如权利要求 43 所述的方法,所述热激蛋白选自 Hsp90 和 Hsp90  $\alpha$  。

45. 如权利要求 33 所述的方法,所述外源试剂是热激蛋白或其片段、透明质酸、富血小板血浆、生长因子、脂肪干细胞或上述物质的任何组合。

46. 如权利要求 33 所述的方法,当所述上皮组织样品是皮肤组织样品时,所述上皮相关过程包括皮肤伤口处理、皮肤组织移植、皮肤美容过程或真皮处理。

47. 如权利要求 46 所述的方法,所述皮肤伤口是急性伤口、人工产生的伤口或慢性伤口。

48. 如权利要求 33 所述的方法,还包括将所述细胞群应用于受体位点。

49. 如权利要求 33 所述的方法,还包括在受体位点处将所述细胞群体外或原位地接种至基质或支架。

## 细胞悬液及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2012 年 3 月 22 日提交的美国临时专利申请 61/614, 112 号和 2012 年 3 月 22 日提交的美国临时专利申请 61/614, 115 号的优先权和权益, 其通过引用全文纳入本文。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及一种简单、快速且节约成本的制备细胞悬液的方法, 尤其是包含活的上皮细胞 (如未分化的 / 祖细胞和 / 或分化的细胞) 的悬液。这类悬液可用于处理需要上皮相关过程的患者。还提供了用于这类制备的装置和悬液的应用。

[0004] 背景

[0005] 人类组织再生非常有限且构成损伤器官功能修复的主要难题。伤口处理是需要组织再生的典型区域。哺乳动物组织中的伤口 (撕裂或开口) 可导致创面处组织破坏和微血管凝结。这类组织的修复代表了针对损伤有序、受控的细胞响应。无论大小如何, 所有软组织伤口都以类似的方式愈合。组织生长和修复的机制是生物系统, 其中在氧梯度存在时出现细胞增殖和血管生成。组织修复期间发生的连续形态和结构改变已得到非常详细的表征并在一些情况下对其进行了定量。参见 Hunt, T. K., 等, “Coagulation and macrophage stimulation of angiogenesis and wound healing (血管生成和伤口愈合的凝结和巨噬细胞刺激)”, The surgical wound (《外科伤口》), 第 1-18 页, F. Dineen 和 G. Hildrick-Smith 编 (Lea&Febiger 公司, 费城, 1981)。

[0006] 多个器官 (如皮肤和心脏) 中的组织再生依赖结缔组织恢复血液供应并使残余的器官特异性细胞 (如角质形成细胞或肌肉细胞) 重新建立器官完整性。因此, 间充质细胞 (例如血管的成纤维细胞或者另外的内皮细胞) 的相关功能是分泌促进愈合过程的因子, 例如促进新的血管形成 (血管形成) 的因子或者促进上皮重新形成的因子 (通过增殖和迁移角质形成细胞)。

[0007] 伤口的细胞形态由三个不同的区域组成。中央无血管伤口空间是缺氧、酸中毒且高度肥大的 (hypercarbic), 并且具有高乳酸盐水平。邻近伤口空间的是局部缺血的梯度区域, 其通过分割成纤维细胞而居于其中。前导区域后是以成熟的成纤维细胞和许多新形成的毛细血管 (即新血管形成) 为特征的活性胶原合成区域。虽然新的血管生长 (血管形成) 对于伤口组织的愈合是必需的, 但血管新生剂通常无法满足提供组织修复的其他生物合成作用的长期需要。除急性伤口 (例如烧伤或外伤导致的撕裂) 外, 人工产生的伤口 (例如移植固体位点、美容适应症 (aesthetic indication)、整形过程或真皮处理)、慢性伤口 (例如静脉或糖尿病性溃疡) 和其他适应症 (如疤痕重塑、无毛皮肤损失损伤、色素沉着问题、白斑病、白癜风和美容年轻化过程) 也需要快速且有效的处理。尽管存在对伤口 (例如严重烧伤、外科切口、撕裂和其他外伤) 更快速愈合的需要, 但迄今为止在使用药剂加速伤口愈合方面仅取得了有限的成功。

[0008] 伤口常规处理的主要目的是实现伤口闭合。开放的皮肤伤口代表一种重要的伤口

类型。该类型包括急性外科和外伤性伤口,例如慢性溃疡、烧伤伤口以及慢性伤口(如神经性溃疡、压疮、动脉和静脉(静态)或混合的动脉-静脉溃疡和糖尿病性溃疡)。开放的皮肤伤口通常通过包含六个主要要素的过程愈合:i)炎症、ii)成纤维细胞增殖、血管增殖、iv)结缔组织合成、v)上皮形成和vi)伤口收缩。当这些要素单独或作为整体无法正确发挥功能时,伤口愈合受损。许多要素可以影响伤口愈合,包括营养不良、感染、药剂(例如细胞毒性药物和皮质类固醇)、糖尿病和年龄过大。参见Hunt等,Current Surgical Diagnosis & Treatment(《新编外科诊断和治疗》)(Way ;Appleton 和 Lange),第86-98页(1988)。

[0009] 不能容易愈合的皮肤伤口会导致对象出现显著的物理、情绪和社交苦恼以及大量的财务花费。参见例如Richey等,Annals of Plastic Surgery 23(2):159-65(1989)。事实上,无法正确愈合的伤口最后可能需要积极的外科处理,如自体皮肤移植(移植多片皮肤)或培养的真皮移植。例如,培养的表皮自体移植(CEA)方法从患者身上取下皮肤细胞以在实验室中生长为片状的新皮肤细胞。新的片状皮肤被用作移植体。然而,这些移植的转换率并不令人满意。参见例如Sood等,Journal of Burn Care Research 31(4):559-68(2010)。较新的移植方法将CEA与基质组合以获得更多的支撑。例如,当前可用的经培养或工程改造的真皮是具有不同基质、基质中整合有成纤维细胞的产品,如TransCyte®和Dermagraft®。然而,这些产品在诱导大伤口的上皮形成中并不有效。经培养/工程改造的皮肤整合的表皮细胞和成纤维细胞是市售可得的,商品名称是Apligraf®(诺华制药公司(NOVARTIS Pharma))和VivoDerm®(百时美施贵宝公司(Bristol-Myers Squibb))。然而,存在关于培养的表皮层和真皮层之间亲和性以及所得临床效果不足的问题。

[0010] 存在对改进的伤口愈合(和更广泛的组织再生)技术的需要。本发明提供了一种适用于在多个受体位点应用的自体细胞悬液,其使用与伤口的类型或组织或患者群体的本质无关。还提供了制备和/或使用所述悬液的方法以及用于制备的装置。

## 发明内容

[0011] 本发明涉及一种独特的细胞悬液及其制备方法,可以迅速、有效且简单地制备并应用。还涉及一种使用所述独特的细胞悬液处理需要上皮相关过程的患者的方法,该方法不仅促进了伤口愈合/闭合,还促进了组织再生。本发明可应用于任何上皮相关过程以促进组织再生,包括皮肤上皮(例如无毛上皮)、呼吸上皮、血管上皮、腺上皮、角膜上皮等。还提供了适用于制备和/或处理方法的设备。所描述装置的使用有助于实施本发明的方法,并被发现可显著减少替代性过程中所用时间和与常规移植技术的使用相关的复杂性。此外,本发明的细胞悬液提供了活的功能性细胞,其可在患者体内或体上、或者在受体位点上的基质或支架或基底中体外或原位大面积存在。否则,临床医师将受到限制或无法取得这类自体上皮细胞。

[0012] 根据本发明的第一个方面,本发明提供了用于上皮相关过程的细胞悬液。所述细胞悬液包括细胞群,所述细胞群包括来源于上皮组织样品的活细胞。所述活细胞可处于多个分化阶段并且可以是功能性的(例如,发挥其预编程功能,如信号转导,产生某些蛋白,分泌某些因子,迁移或增殖)。所述细胞可包括成熟/分化的细胞以及能够分裂或分化的细胞。所述活细胞也可以是处于迁移和增殖状态。在上皮相关过程中使用前,所述细胞群处

于选自应激和外源试剂的状态下。在一些实施方式中,所述细胞群可表现出应激诱导的特征。在一些实施方式中,所述应激诱导的特征可导致细胞表达愈合过程介导的蛋白。在某些实施方式中,可向所述细胞群提供外源试剂或组分(如热激蛋白、透明质酸、富血小板血浆、生长因子、细胞因子和/或脂肪干细胞)。在所述上皮相关过程中使用并在体内应用于患者的受体位点时,具有或不具有外源供应性试剂的所述细胞群可促进上皮组织的处理、愈合、重建、表面重修、色素再生和/或再生。还可将所述细胞群接种至基质或支架或基底(体外或原位),其中细胞能够例如生长以形成人工组织或器官。

[0013] 在另一个方面,本发明提供了一种上皮相关过程中使用的组合物。所述组合物包括细胞群,所述细胞群包括来源于上皮组织样品的活细胞。所述活细胞可以处于多个分化阶段并包括具有功能的成熟/分化的细胞以及能够分裂或分化的细胞。所述细胞也可以是处于迁移和增殖状态。在上皮相关过程中使用前,所述细胞群处于选自应激和外源试剂的条件下。所述组合物可包括例如由细胞在应激下表达的热激蛋白或者分离或重组的热激蛋白或其片段。所述热激蛋白可以是以有效量促进所需患者的皮肤愈合。在一些实施方式中,所述组合物还可包括外源或外部供应的试剂或组分,如透明质酸、富血小板血浆、生长因子、细胞因子和/或脂肪干细胞。在上皮相关过程中使用并在体内应用于患者的受体位点时,所述组合物可促进上皮组织的处理、愈合、重建、表面重修、色素再沉着和/或再生。所述组合物还可在体外或原位应用于基质或支架或基底,其中所述细胞能够生长(例如体外培养或原位繁殖)以形成例如人工组织或器官。

[0014] 在另一个方面,本发明提供了一种在上皮相关过程中制备和使用细胞的方法。所述方法包括:提供包括来源于上皮组织样品的活且有功能细胞的细胞群;并使所述细胞群处于选自应激和外源试剂的条件下。所述活细胞可以处于多个分化阶段并包括具有功能的成熟/分化的细胞以及能够分裂或分化的细胞。所述细胞也可以是处于迁移和增殖状态。在一些实施方式中,所述方法包括诱导所述细胞群表达热激蛋白,从而获得上皮相关过程中使用的细胞,所述细胞中所述热激蛋白的水平高于没有所述应激条件下时所述热激蛋白的对照水平。在一些实施方式中,所述外源试剂可以是透明质酸、富血小板血浆、生长因子、细胞因子和/或脂肪干细胞中的一种或多种。

[0015] 本发明的另一个方面涉及一种在上皮相关过程中制备和使用细胞的方法。所述方法包括:在所需患者的受体位点上应用包含来源于上皮组织样品的活细胞的细胞群;并向所述细胞群提供选自应激和外源试剂的条件以促进所述患者中的上皮处理、愈合、重建、表面重修、色素再沉着和/或再生。在一些实施方式中,所述条件是能够诱导细胞表达热激蛋白或者外源性提供的分离或重组的热激蛋白或其片段的有效量的应激,从而促进所述患者中的上皮处理、愈合、重建、表面重修、色素再沉着和/或再生。在一些实施方式中,可向所述患者的受体位点单独或者与所述细胞群联合提供外源性热激蛋白。在某些实施方式中,所述外源试剂可以是透明质酸、富血小板血浆、生长因子、细胞因子和/或脂肪干细胞中的一种或多种。

[0016] 在某些实施方式中,当所述上皮组织样品是皮肤组织样品时,所述活细胞可来源于所述皮肤组织样品的真皮层、表皮层或者真皮和表皮层,且所述细胞群可包括角质形成细胞、黑素细胞、成纤维细胞、朗格汉斯细胞或前述细胞的任意组合。在一些实施方式中,所述细胞群可包括皮肤干细胞和/或其他皮肤细胞。

[0017] 在一些实施方式中,所述应激诱导的特征是选自 Hsp90 和 Hsp90  $\alpha$  的蛋白表达水平升高。所述应激诱导的特征可以与缺氧、热、机械外伤、营养缺乏、酶暴露或其他应激诱导的操作相关。

[0018] 在某些实施方式中,当所述上皮组织样品是皮肤组织样品时,所述上皮相关过程包括皮肤伤口处理、皮肤组织移植、皮肤美容过程或真皮处理。所述皮肤伤口可以是急性伤口、人工产生的伤口或慢性伤口。所述上皮组织样品也可获自呼吸上皮、血管上皮、角膜上皮或腺上皮,且其来源的细胞可用于处理相应的上皮病症。

[0019] 从参考以下示意图进行的后续描述中,本领域技术人员能够容易地了解本发明的其他方面和优势。

[0020] 附图简要说明

[0021] 图 1 显示了皮肤组织的典型结构和组成。

[0022] 图 2A 显示了开盖并在适当位置有第二部件的示例性设备的透视图。

[0023] 图 2B 显示了开盖且第二部件被移开并倒置的示例性设备的透视图。

[0024] 图 3A 显示了示例性设备的第一元件的透视图。

[0025] 图 3B 显示了示例性设备的第一元件的透视后视图。

[0026] 图 4 显示了示例性设备的底部的透视图。

[0027] 图 5 显示了使用不同透明质酸水凝胶进行的角质形成细胞细胞活力试验的结果。

[0028] 图 6 显示了使用不同透明质酸水凝胶进行的角质形成细胞跨孔迁移试验的结果。

[0029] 图 7 显示了使用不同透明质酸水凝胶进行的角质形成细胞体外刮擦试验的结果。

[0030] 发明详述

[0031] 本领域技术人员应理解,除了具体描述的那些以外,还可以对本文所述的发明进行变化和修改。应理解本发明包含所有这些变化和修改。本发明还包括说明书中单独或共同提到或指出的所有步骤、特征、组合物和化合物,以及所述步骤或特征中任意两种或更多种的任意和全部组合。

[0032] 本发明的范围不限于本文所述的具体实施方式,实施方式仅用于示例目的。功能等同的产品、组合物和适当方法明显属于本文所述本发明的范围内。

[0033] 除非上下文另有要求外,应理解在本说明书和所附权利要求书中的词语“包括”或其变体如“包含”和“具有”含有包括所指的整数或者多个整数的组的意思,但并不表示排除任何其他整数或者多个整数的组。

[0034] 参照上述说明,本发明提供了适用于产生活组织细胞悬液的独特方法和装置,所述细胞悬液适用于在上皮相关过程中应用于患者。在应用该方法和 / 或使用该装置的过程中,从患者中收获供体组织(例如皮肤上皮(如(如无毛上皮)、呼吸上皮、血管上皮、角膜上皮和腺上皮)并对其使用组织分离方法,并收集适用于回到相同患者受体位点应用的细胞。在一些实施方式中,可在对受体位点应用前对如此收集的细胞进行体外培养和扩增。也可将细胞接种至支架或基质或基底,使细胞能够生长和 / 或增殖成重生的组织或器官。

[0035] 在某些实施方式中,所述细胞包括干细胞(例如能够分裂或分化的细胞)和非干细胞(例如处于多个分化阶段的细胞,包括分化的细胞和功能细胞)。许多器官依赖未分化的干细胞和祖细胞进行组织再生。然而,不清楚驻留的干细胞能否再生特定损伤所需的组织完整体。此外,许多组织中尚未鉴定到干细胞,而且在那些鉴定到干细胞的组织中,诱导

其增殖和分化以掌握这些组织中细胞命运的因子并没有完全理解。因此,需要有诱导良好定义的已知特征的分化细胞的方法来协助体内细胞替换和组织再生。通过在细胞悬液中同时包括干细胞和非干细胞,本发明提供了一种改善组织再生的方法。

[0036] 所述细胞可以溶液中细胞悬液(在本文中“细胞的悬液”互换使用)的形式存在,所述溶液适用于受体位点上的即时分散(例如不经过细胞的体外培养直接在收获和/或过滤后)。所述细胞悬液可单独或与其他因子(如热激蛋白、透明质酸、富血小板血浆、生长因子、细胞因子和/或脂肪干细胞)联合分散至受体位点,以促进例如伤口愈合、皮肤表面重修或其他上皮处理。所述细胞悬液可通过喷雾、滴落或任何其他应用方法分散。也可将所述细胞悬液直接注射入组织。

[0037] 本发明对于现有的组织移植技术具有许多优势,其中一些如下所示:

[0038] 1. 本发明提供了一种用于制备细胞悬液的节约时间的方法,所述细胞悬液可在临床环境中容易地供应至受体位点。例如,在手术时如有需要可快速收获细胞并处理。上述优势能够实现是因为细胞的制备时间非常短,使得可在手术周围或专家医师或全科医师的房间中进行上皮处理。

[0039] 2. 本发明提供了一种方法和一种设备,其显著降低了常规方法使用相关的复杂性并在未能及时送医的紧急(例如烧伤)损伤情况下特别有用。在一些情况下,由于具有未愈合烧伤的患者转诊延迟,或者简单地因为培养自体抑制物的时间超过了用于受体伤口床制备的时间,可能在手术时无法获得用于移植的细胞。与CEA相比,本发明显著加快了细胞制备并改善了移植体制备的问题。

[0040] 3. 本发明有助于实现从供体至受体位点区域的快速细胞覆盖。其提供了减少供体位点大小的方法,本发明中使用的活检供体位点显著小于常规方法所需的移植供体位点。同样,本发明提高了从供体至受体位点的细胞覆盖扩展比;还提高了急性伤口(如烧伤和撕裂)和慢性伤口(如静脉或糖尿病性溃疡)的愈合速率,用于伤口重建(如去除疤痕或其他美容适应症),并改善了疤痕质量和/或最小化疤痕。

[0041] 4. 本发明改善了需要患者异种血清的常规组织培养过程中培养基或溶液使用相关的问题。根据本发明的制备和处理方法,所述细胞可以是细胞悬液、营养溶液(不含患者异种血清)的形式。随后,这类细胞悬液可使用、分散或直接置于受体位点上,降低或消除感染、病毒传播或其他异种血清相关并发症的机会。

[0042] 5. 本发明提供了一种处理多种皮肤异常、紊乱或疾病的方法。例如,它可用于表皮表面重修、皮肤损失后的替换、皮肤区域色素再沉着期间的位点匹配、烧伤伤口的处理、白斑病的治疗、白癜风的治疗、斑驳病的治疗、疤痕(由例如不准确的伤口愈合、不适当的疤痕方向或伤口收缩的疤痕变形导致)的处理、痤疮疤痕的处理、表面重修的美容擦皮法、美容适应症的改善(如在整形或重建过程中)、激光处理后和真皮重建相关的表面重修、皮肤完整但出现“伤口”的人工“伤口”(例如通过激光或真皮烧伤或擦皮法,或在移植供体位点上)的处理、加速伤口愈合、降低感染和/或最小化疤痕。此外,本发明的方法、细胞悬液和组合物可用于细胞替换疗法,包括例如神经细胞替换治疗、上皮细胞(如尿道细胞、口颊粘膜细胞和呼吸上皮细胞)替换治疗、内皮细胞替换治疗和成骨前体细胞替换治疗。此外,本发明可应用于任何上皮相关过程,包括皮肤上皮(如无毛上皮)、呼吸上皮、血管上皮、腺上皮、角膜上皮等。即,结合皮肤相关疗程描述一些实施方式时,经过本领域普通技术水平内

的稍许修改,相同的实施方式可应用于非皮肤上皮组织。

[0043] 6. 本发明提供了一种生产数种不同类型细胞悬液的方法,其中各细胞类型的量之间的比例与在患者供体和 / 或受体位点上可原位检测的细胞类型比例相当或基本相同。即,由于独特的细胞悬液制备方式,不同细胞类型的相对百分比(就皮肤组织而言,如角质形成细胞、朗格汉斯细胞、成纤维细胞和黑素细胞)与收获细胞的供体位点(就皮肤组织而言,靠近真皮-表皮连接部)通常具有相同的百分比。与标准的组织培养技术相比,如此制备的细胞还具有增强的存活率,其中标准的选择性细胞培养可导致某些细胞类型的损失同时其他细胞类型的生长超过它们。这提供了例如使皮肤在皮肤移植或其他处理或疗程后产生正确的表面重修或色素再沉着的优势。

[0044] 7. 本发明使手术和愈合的加快,从而减少了医疗护理期间对患者的创伤。

[0045] 8. 就皮肤组织而言,本发明提供了一种皮肤干细胞悬液。由于皮肤干细胞通常发现在表皮的基底层和毛囊基部,本发明允许从真皮-表皮连接部附近和从皮肤的真皮和 / 或表皮层中靶向收集这些细胞。皮肤干细胞可包括表皮干细胞和毛囊干细胞。通常表皮干细胞负责不同表皮层的再生。黑素细胞干细胞产生黑素细胞,而毛囊干细胞可产生毛囊和表皮。此外,毛囊的基部也是黑素细胞(可用于伤口愈合)的丰富来源并可包括在本发明的细胞悬液中。

#### [0046] 细胞悬液的制备

[0047] 根据本发明的第一个方面,本方面提供了一种制备细胞悬液的方法,所述细胞悬液适用于上皮组织的处理、愈合、重建、表面重修和 / 或再生。

[0048] 在一个实施方式中,可通过组织移植或再生领域已知的方法从患者中收获皮肤组织(优选对受体患者具有自体性质的皮肤组织)。这可通过从患者供体位点提取完全厚度或断层厚度组织活检样品来实现。对于活检样品的收获,考虑因素包括活检样品的深度和表面积大小。活检样品的深度和大小可影响疗程进行的难易程度和 / 或患者从疗程中恢复的速度。在一个实施方式中,可选择供体位点以匹配受体位点,例如头和颈的耳后组织、下肢的大腿、上肢的内上臂(inner-upper arm)或脚底的脚掌,反之亦然。

[0049] 随后,可对收获自供体位点的活检或组织样品使用能够分离组织样品中细胞层的物理和 / 或化学分离方法,从而将组织样品打断为较小片段,或者至少使组织样品的不同层(例如真皮和表皮)可以更容易地分离。

[0050] 可使用本领域已知的用于在组织内分离细胞层的多种方法。例如,分离方法可以是物理或化学方法或两者的组合。物理分离方法可包括例如使用解剖刀解剖组织样品、切碎组织、将层物理切开、使用研钵或网研杵或摩擦器进行分离和 / 或灌注组织。化学分离方法可包括例如使用酶消化,如胰蛋白酶、分散酶、胶原酶、胰蛋白酶-EDTA、嗜热菌蛋白酶、链霉菌蛋白酶、透明质酸酶、弹性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰酶。也可使用用于组织分离的非酶溶液。

[0051] 在某些实施方式中,可通过将组织样品置于酶溶液(含有足够分离组织样品中细胞层的酶量)中实现组织样品的分离。这可通过例如使用胰蛋白酶溶液来实现。也可使用其他酶或蛋白酶,如分散酶、胶原酶、胰蛋白酶-EDTA、嗜热菌蛋白酶、链霉菌蛋白酶、透明质酸酶、胰酶、弹性蛋白酶和木瓜蛋白酶。不希望受到理论的束缚,这类酶被认为会通过胞外蛋白的水解导致细胞与其他细胞脱离或从固体表面上脱落。当所用的酶是胰蛋白酶时,酶溶

液可以不含钙和镁。一种这类溶液是例如不含钙离子和镁离子的磷酸盐缓冲盐水。

[0052] 当组织样品来源于患者皮肤（包括表皮和真皮）时，该方法中使用的胰蛋白酶或其他酶量可以是每溶液体积约 0.1% 至 5% 胰蛋白酶或其他酶。在某些实施方式中，胰蛋白酶或其他酶浓度可以是约 0.25% 至 2.5%，或约 0.5%。本领域普通技术人员应理解使用酶的最佳浓度进行实验是常规实验方法。

[0053] 对组织样品使用酶溶液的时间量可根据组织的尺寸（例如厚度和表面积）而变化。通常，样品的尺寸越大，对样品使用酶溶液的时间越长。在一些实施方式中，可将组织样品置于溶液中足够长时间以削弱组织层之间（例如表皮和真皮之间）的结合或连接。例如，当组织样品取自患者皮肤时，可将样品在酶溶液中放置数秒至数小时，或 5 至 60 分钟期间。优选地，将组织样品浸没于酶溶液中 10 至 30 分钟或 15 至 20 分钟。本领域普通技术人员应理解使用酶处理的最佳时间进行实验是常规实验方法。

[0054] 将组织样品浸没在胰蛋白酶溶液（或其他酶溶液）中足够长时间后，可从溶液中取出样品并使用营养液洗涤。洗涤组织样品可涉及将经酶处理的样品部分或全部浸没在营养液中。或者，可将洗涤液以足够的体积滴或分散在组织样品上以从组织样品中除去或显著稀释任何过量的酶溶液。在某些实施方式中，稀释或洗涤后，残留不超过 0.05% 胰蛋白酶或其他酶。

[0055] 营养液可通过稀释和 / 或中和显著降低或除去酶的效果。所述营养液可以是：(i) 不含对于患者的异种血清，(ii) 能够维持收获的细胞的活力，以及 (iii) 适合直接应用于患者的受体位点。所述营养液可以是碱性盐溶液到较复杂营养液的任意一种。在一些实施方式中，所述营养液可包含多种盐，所述盐与在体液中发现的那些类似，如生理盐水。所述营养液可以不含所有血清。磷酸盐或其他无毒物质也可对溶液进行缓冲以将 pH 维持在约生理水平。一种合适的营养液是哈特曼溶液 (Hartmann's solution)。

[0056] 使用营养液洗涤组织样品后，可温和地刮擦组织样品以从组织样品中收获活的且有功能的细胞。所述细胞可包括能够繁殖（例如分离或分化）的干细胞，以及具有特定功能的分化的非干细胞（例如功能是生产黑色素的黑素细胞）。本发明的一个优势是纳入了有功能的非干细胞，其有助于促进上皮组织的处理、愈合、重建、表面重修、色素再沉着和 / 或再生。当组织样品是皮肤时，可首先刮擦表皮层以暴露表皮下层和真皮上层连接的真皮 - 表皮连接部；随后还可刮擦真皮 - 表皮连接部和真皮层中的细胞。如此收获的细胞包括皮肤干细胞和非干细胞。

[0057] 如图 1 所示，皮肤表面包含角质形成细胞、黑素细胞、朗格汉斯细胞和莫克细胞。所述表皮形成皮肤的表面。其由数层称作角质形成细胞的细胞构成。基底或生发层或组织层中的角质形成细胞（也称作角质形成细胞基底细胞或基底角质形成细胞）经历有丝分裂和增殖。经历分化的角质形成细胞逐渐移动至棘层，在棘层中它们变成多面体形形状并开始产生张力丝。角质形成细胞是表皮中含量最丰富的细胞类型。黑素细胞位于表皮基底层并占其中细胞的五分之一至十分之一。黑素细胞产生色素黑色素，因此在皮肤和毛囊色素方面起重要作用。朗格汉斯细胞位于基底上方并占表皮细胞的约 1%。

[0058] 仍然参考图 1，真皮位于表皮下方并含有皮肤附属物：毛囊、皮脂（油）腺和汗腺。真皮中的细胞类型包括产生细胞间支持基质（例如胶原和弹性蛋白）并参与伤口愈合的真皮成纤维细胞，以及肥大细胞、巨噬细胞、黑素细胞、莫克细胞和属于免疫系统和皮肤附属

物的细胞。

[0059] 能够繁殖的细胞可包括皮肤干细胞和 / 或成纤维细胞。皮肤干细胞可包括表皮干细胞、黑素细胞干细胞和毛囊干细胞。表皮干细胞发现于表皮的基底层并负责不同表皮层每天的再生。黑素细胞干细胞负责黑素细胞的再生。毛囊干细胞确保毛囊的稳定更新并还可在表皮和皮脂腺受损时再生这些组织。毛囊干细胞发现于毛囊的各个部位。

[0060] 因此,从完整皮肤样品(包括表皮、真皮和真皮-表皮连接部)收获的细胞可包括皮肤干细胞和 / 或成纤维细胞。在某些实施方式中,收获的细胞可包括角质形成细胞、黑素细胞干细胞、黑素细胞、成纤维细胞和 / 或朗格汉斯细胞。可通过本领域已知的任何适当方法从组织样品中收获这些细胞。例如,可使用诸如解剖刀的工具从样品表面刮下细胞,从表皮开始直至收集到样品中的基本所有细胞。还可使细胞通过合适尺寸网的筛选将其分解。在一个实施方式中,如此收获的细胞包括但不限于角质形成细胞、朗格汉斯细胞、成纤维细胞和黑素细胞。从组织样品中收获细胞后,其以悬浮的形式存在于营养液中(例如分散的)。

[0061] 随后可过滤细胞悬液。过滤可用于除去或收集过大的细胞聚集物以防止施涂机阻塞并促进细胞悬液在受体位点的平均分布。在本发明的该优选步骤中可使用能够从悬液中分离过大细胞聚集物的任何滤器。在一个实施方式中,所述滤器的尺寸可以是 50  $\mu\text{m}$  至 200  $\mu\text{m}$ 、75  $\mu\text{m}$  至 150  $\mu\text{m}$ , 或约 100  $\mu\text{m}$ 。

[0062] 在向受体位点应用 / 分散前或紧接在过滤后,可稀释细胞悬液以形成适用于悬液使用目的的合适细胞密度。

#### [0063] 细胞悬液的使用

[0064] 根据本发明的另一个方面,本发明提供了一种通过本文所述方法生产的水性细胞悬液。由该方法提供的细胞悬液适用于多种上皮相关过程。在上皮相关过程中使用这类悬液的一个重要优势是能够大量扩张能够通过有限数量的可繁殖细胞的原位繁殖进行快速处理的伤口或受体位点的面积或尺寸或体积。当涉及皮肤时,所述上皮相关过程可以是皮肤伤口处理、皮肤组织移植、皮肤美容过程或其他表皮和 / 或真皮处理。在伤口上均匀施涂细胞悬液模拟了产前皮肤的愈合能力,从而通过细胞悬液的完全覆盖使伤口均匀愈合并迅速闭合,产生最佳的结构和功能。所述皮肤伤口可以是急性伤口(例如烧伤或外伤导致的撕裂)、人工产生的伤口(例如移植供体位点、美容适应症、整形过程或皮肤处理)或慢性伤口(例如静脉或糖尿病性溃疡)。其他合适的适应症包括疤痕重塑、无毛皮肤损失损伤、色素沉着问题、白斑病、白癜风和美容年轻化过程。在多个实施方式中,接种在受体位点上的细胞数目和 / 或浓度可根据疗程和 / 或受体位点而变化,例如,通过改变悬液中细胞的浓度,和 / 或通过使用适当量的分布在给定面积或体积的受体位点上的悬液。

[0065] 通过将细胞置于营养液中,发现患者处理的结果得到改善,所述营养液至少 (i) 不含对于患者的异种血清, (ii) 能够维持收获的细胞的活力,以及 (iii) 适合直接应用于患者的受体位点。不希望受到理论的束缚,部分解释可以是归因于从细胞悬液中排除了异源血清,在某些实施方式中排除了任何血清。异源血清是标准的移植培养基中常见的添加剂且被怀疑会引起潜在的感染和过敏性反应。然而,这类血清通常是细胞的标准体外扩张和中和胰蛋白酶的作用所必需的。本发明中使用的营养液不需要这类血清,因为悬液中的细胞群在应用至受体位点前不需要扩张或繁殖。而是,与体外培养系统相反,在受体位点

出现细胞繁殖。需要体外培养时,也可使用无血清培养基,任选补充合适的生长因子、试剂(如透明质酸和/或重组蛋白(如热激蛋白和促血管生成素))。

[0066] 此外,营养液中可包含外源试剂或组分(如热激蛋白、透明质酸、富血小板血浆、生长因子、细胞因子和/或脂肪干细胞),使得用于向受体位点分散的最终组合物可包含这类试剂。或者,可向受体位点单独提供这类试剂。可向体外培养系统提供一种或多种这些试剂(在细胞培养中或当细胞被接种至生物和合成的胞外基质或基底时)。本文中较详细描述热激蛋白和透明质酸。富血小板血浆(也称作 PRP)是富含血小板的血液血浆,所述血小板通过由低速离心从外周血中除去血红细胞的方式获得。PRP 包含大量生长因子(如血小板中包含的血小板来源生长因子(PDGF)、转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ )、成纤维细胞生长因子(FGF)、胰岛素样生长因子(IGF)等),并通过这些因子的协同作用起效(如血管生成、骨生成、促进伤口愈合、组织再生等)。有用的生长因子和细胞因子包括但不限于表皮生长因子、转化生长因子- $\alpha$  和- $\beta$ 、肝实质细胞生长因子、血管内皮生长因子、血小板来源生长因子、成纤维细胞生长因子 1 和 2、胰岛素样生长因子 1 和 2、白介素 8、结缔组织生长因子和角质形成细胞生长因子。脂肪干细胞包括收集自脂肪组织且具有繁殖和分化潜能的多种干细胞。脂肪干细胞可在体外经历成脂、成骨、成软骨、神经原性和/或肌原性分化。单独步骤中也可提供外源试剂或组分。

[0067] 根据本发明的方法生产的细胞悬液的另一个独特特征是细胞悬液中的细胞组成与来自供体位点(例如对皮肤而言,靠近真皮-表皮连接部)的原位组成相当(即类似或基本相同)。一种可能的解释是,在标准技术中,皮肤细胞制备的培养利用角质形成细胞的选择性培养,导致细胞组成物(对皮肤而言,如成纤维细胞和黑素细胞)的部分或全部损失。相反的,根据本发明生产的细胞悬液具有与原位细胞组成类似或基本相同的细胞组成(即不同细胞类型的相对比例或百分比)。根据本发明生产的细胞悬液的另一个特征是细胞维持最高活力(由于其经历了最少的处理步骤和最短的收获时间)并在温和的营养液中收获。

[0068] 根据本发明的另一个方面,本发明提供了一种处理需要上皮相关过程的患者方法。通过该方法,可在收获和过滤后,直接向患者的受体位点应用根据本发明生产的细胞悬液。所述受体位点可以是急性伤口(例如烧伤或外伤导致的撕裂)、人工产生的伤口(例如移植供体位点、美学指征、整形过程或皮肤处理)或慢性伤口(例如静脉或糖尿病性溃疡)的位点。所述受体位点可以是任何经准备的伤口床,包括从中采集皮肤的标准移植过程中传统的“供体区”、需要传统皮肤移植的传统“受体区”以及无需传统皮肤移植的患者中的伤口床。例如,根据目前的护理标准,无需进行传统移植手术的相对轻的烧伤或伤口可通过本发明的“细胞移植”疗程处理。该细胞移植可用作独立疗程,或者与传统移植手术联用或作为其补充。例如,当传统移植中使用网状移植组织时,可向网状移植体应用本发明的细胞悬液以增强上皮再生。

[0069] 可通过本发明的细胞移植处理的上皮相关过程包括但不限于皮肤伤口处理、皮肤组织移植、皮肤疾病治疗(例如白斑病、白癜风和慢性溃疡)、皮肤美容过程(例如皱纹和痤疮疤痕)或其他表皮和/或真皮处理。

[0070] 可通过数种技术中的任意一种使含有本发明细胞的液体悬液分布至受体位点上,包括但不限于喷涂、铺展、移液和/或涂布。同样,所述悬液可用于随后对伤口使用的伤口

敷料,或导入原位敷料下方,或在使用前接种至敷料上。在一个实施方式中,可将细胞悬液喷涂至受体位点上。可通过将液体转化为小空气播散飞沫的任何类型喷嘴喷涂悬液。该实施方式有两项考虑。首先,不应对溶液中的细胞施加可能破坏或杀死大量细胞的过量剪切力或压力。其次,不应将细胞悬液与对其中细胞或伤口床有毒或有害的推进流体混合。容易获得的多种喷嘴都适用。这类喷嘴可以任意适当方式连接至包含细胞悬液的容器。

[0071] 或者,可通过移液器、类似滴眼剂滴管的装置、注射器及针头,和/或其他类似装置递送细胞悬液以将少量细胞悬液置于受体位点上。也可在受体位点上将细胞悬液注射至组织中。

[0072] 在将细胞悬液应用于受体位点后,可使用伤口敷料包扎该位点或伤口床。可使用多种类型的敷料,包括膜(例如聚氨酯膜)、水胶体(连接至聚氨酯泡沫的亲水性胶体颗粒)、水凝胶(包含约至少60%水的交联聚合物)、泡沫(亲水或疏水的)、藻酸钙(来自藻酸钙的纤维非织造复合材料)、透明质酸衍生物(例如酯)和玻璃纸(具有增塑剂的纤维素)。参见 Kannon 等, *Dermatol. Surg.* 21:583-590(1995); Davies, *Burns* 10:94(1983)。在一个实施方式中,所述敷料可以是 Surfasoft™(一种织造尼龙敷料)或 Hyalomatrix®(一种透明质酸酯基质)。通常,在本领域技术人员已知的用于皮肤移植处理的标准方案后伤口床愈合。

[0073] 本发明的细胞悬液也可用于组织或器官再生系统(体内或体外),如胞外基质或基质材料(例如在气管的再生长中)。在多个实施方式中,所使用的胞外基质或基质材料可以是合成的或生物的,如胶原、藻酸盐、藻酸盐珠、琼脂糖、纤维蛋白、纤维蛋白胶、纤维蛋白原、血浆纤维蛋白珠子、全血浆或其组分、层连蛋白、纤连蛋白、蛋白多糖、HSP、壳聚糖、肝素和/或其他合成聚合物或聚合物支架以及能够维持或粘附至细胞的固体支持材料(如伤口敷料)。在某些实施方式中,用于再生系统的细胞悬液可促进其上的上皮再生。一旦完成,即可将所述再生系统移植至所需患者。

#### [0074] 用于制备和使用细胞悬液的装置

[0075] 根据本发明的另一个方面,本发明提供了一种产生组织再生溶液的设备。所述设备可具有适用于将酶溶液加热至预设温度并能够在合适的时间中将溶液维持在所需温度下的加热装置。所述设备还可包括能够从细胞悬液中分离大细胞聚集物(例如直径大于约200 μm)的过滤装置。

[0076] 在一个实施方式中,所述设备还可包括能够使组织样品浸没在营养液中的容器,所述营养液能够维持组织样品中细胞的活力。在某些实施方式中,所述容器可以是具有足够尺寸以允许组织样品的操作,例如允许组织细胞层(例如表皮和真皮)的分离和从表皮和/或真皮中收获细胞,从而产生上皮相关过程中使用的细胞悬液。

[0077] 所述设备还可包括一种或多种流体容纳孔或囊以储存流体(如营养液)。或者,所述孔可用作接受容器,如容纳营养液的塑料或玻璃瓶。优选地,所述孔能够容纳至少10ml体积。这类孔使得流体能够方便地应用于组织样品。这类流体紧密相邻的储存方式还提供了降低流体意外泄露风险的优势,并可方便地获得流体以精确递送至组织样品或细胞悬液。

[0078] 在一些实施方式中,所述设备可包括第一和第二元件,其中:

[0079] (1) 所述第一元件包括:

[0080] (a) 至少一个适用于将酶溶液加热至预设温度并能够在合适的时间中将溶液维持在所需温度下的加热装置；

[0081] (b) 至少一个能够从细胞悬液中分离大细胞聚集物的过滤装置；以及

[0082] (c) 至少一个用于储存营养液的流体容器；

[0083] (2) 所述第二元件形成能够使组织样品浸没在营养液中的容器；以及

[0084] 所述第一元件提供了组织样品操作期间能够在其上放置所述第二元件的位置。

[0085] 在其他实施方式中，所述第一元件可提供储存本文所述方法中所用工具和溶液的储存隔室。当设备中提供这类隔室时，所述第二元件可为该隔室提供盖子或闭合。使用中，所述盖子可从所述隔室顶部移开并反转。所述盖子的底面优选形成储器，使得所述第二元件具有双重功能。可从所述隔室中获得该方法中所用工具和溶液。随后可将反转的盖子放回所述隔室上，为所述设备提供储器。

[0086] 所述设备可由金属、塑性或任何其他合适的材料制成。此外，所述容器可根据其预期用途和灭菌（如通过  $\gamma$  射线辐射和 / 或环氧乙烷处理）的需要制备成任何合适的尺寸。

[0087] 应理解所述设备中使用的所述加热装置可以是位于所述第一元件顶上的一个或多个加热垫。在一个实施方式中，为避免被加热容器的意外逸出，可将一个或多个加热装置放置于所述第一元件的凹陷处。该凹陷处还可放置至少一个容器，所述容器中可放入组织样品以使其接触酶溶液。在一个替代性实施方式中，可将一个或多个加热装置置于所述设备的基部。在这种构造中，所述第一元件可含有至少一个开口以接收用于容纳流体的容器，所述开口可使所述容器接触所述加热装置。

[0088] 应理解，如果所述设备被设计为多项用途，可重复加热和冷却所述加热装置。或者，可使所述设备配备多个加热单元以促进多个加热事件，其中各加热单元可设计为单次使用。

[0089] 在所述设备的一个示例性构造中，可将加热套放置于凹陷中，在所述第一元件中形成加热凹陷，所述第一元件中放置有酶的容器（例如药瓶）。可通过至少一个约束装置使所述容器保持原位，所述约束装置优选围绕所述容器上部的至少部分，从而避免所述容器从所述装置中意外释放。在某些实施方式中，当所述设备旨在用于单次使用时，所述约束装置可形成所述第一元件的整体部分，因此除非所述第一元件被物理打断或损坏，否则所述容器不会被移开。

[0090] 所述设备中使用的加热装置可由电路控制，从而在需要时激活加热元件。例如，可按下位于例如所述第一元件表面的开始按钮或通过触屏用户界面打开加热装置。或者，可通过使用足够的力向下推动所述容器以激活位于所述设备基部的开关，从而激活加热装置。本领域普通技术人员应理解，可使用多种电子装置激活所述设备中提供的加热单元。

[0091] 所述加热单元还可操作地连接至计时器机制，适用于对酶溶液加热预设的一段时间。在某些实施方式中，当所述设备旨在用于多次使用时，可对计时器进行设置以在预设时间届满时使加热元件停止工作。随后可激活警报器以告诉使用者时间已到。所述警报器可以是可听的或发光显示的形式。

[0092] 在另一个优选实施方式中，可使所述加热装置配备可调节的温度控制。在需要调节温度时，可通过使用加热控制电路以包括温度控制机制或与其通信，使得加热单元的温度在恒定范围内不断变化，或者其可具有一定范围的所选温度（所述温度是加热控制装置

所设置的),从而实现这类调节。当所述装置用于不同细胞类型的收获和制备和/或当收获方法中使用了不同的酶(所述设备为此具有独特应用)时,可在所述设备中包括温度控制装置。

[0093] 在一些实施方式中,所述设备可设计为单次使用。在这类情况下,所述计时器机制可以是控制加热装置的电路的一部分。一旦加热装置被激活,其对溶液加热预设的一段时间,随后自毁。本领域技术人员应理解,这类设备可配备能够显示以下一种或多种指标的多种监控装置:酶溶液已达到预设温度;酶在溶液中的时间长度;和/或电路自毁前剩余的时间长度。仅举例来说,所述监控装置可由某些事件发生时激活的一系列LED组成。在一个实施方式中,加热元件在加热模块中保持最高45分钟至1小时。

[0094] 可通过本领域已知的任何方式为加热装置供电。优选地,通过电池/电池组提供电源。在一个实施例中,所述电源是位于所述设备基部的一个电池或多个电池。

[0095] 在本发明的另一个实施方式中,所述设备可配备一个或多个装置以促进本发明中所用溶液(例如酶溶液)的混合。在这个方面,且仅举例来说,所述设备可包括用于涡旋溶液的装置,如适于搅拌磁珠的电磁系统。当所述设备包括电磁混合系统时,可在所述设备中储存溶液的容器(例如药瓶)中提供磁珠。或者,可在需要混合时将磁珠加入溶液中。

[0096] 在一个实施方式中,混合装置可与加热装置以单个单元或独立单元的形式联用以促进以均匀的方式对溶液进行恒定加热。使用这类混合装置可避免在加热溶液时最靠近加热单元的溶液受到过度加热。这类系统可以提供溶液的恒定加热。用于混合溶液的替代性装置是本领域已知的且包括例如机械、物理、电子和电磁装置。虽然任何混合装置都可用于所述设备,但优选地,所述混合装置经选择用于最小化所述设备的震动或者以最小化这类震动的方式整合在所述设备中。在这一方面,所述混合装置可置于一个或多个减震器上或者所述设备可在其基部上包括一个或多个减震器。

[0097] 当混合装置整合在所述设备中时,所述装置可在加热单元激活后自动激活,或者可以有独立的激活系统。此外,混合的速度可以是固定的或可变的。优选地,存在用于混合装置的独立激活系统。

[0098] 可在所述设备中整合过滤凹槽,所述过滤凹槽可以是促进细胞悬液过滤以除去或收集大细胞聚集物(例如大于200  $\mu\text{m}$ 、大于150  $\mu\text{m}$ 或大于100  $\mu\text{m}$ )的任何尺寸或形状。此外,所述凹槽可用于收集或容纳至少一个管或药瓶,细胞悬液被过滤至所述管或药瓶中。所述凹槽可具有锥形基部,使得在过滤后能够容易地得到细胞悬液的整个体积。过滤装置还可以是同轴滤器(in-line filter)。

[0099] 在一些实施方式中,凹陷经设计用于接收能够除去或收集大于约100  $\mu\text{m}$ 的细胞聚集物的100  $\mu\text{m}$ 细胞滤器。所述滤器的使用还可防止喷雾器/喷嘴被大聚集物堵塞。所述凹槽可容纳连接至锥形管的100  $\mu\text{m}$ 细胞滤器。优选地,所述管在侧面标记有面积/体积刻度。

[0100] 所述设备还可包括细胞收获所需的工具组。本领域技术人员应理解,细胞收获所必需的任何工具都可包括在装置中。优选的,所述工具组是无菌的。作为示例,所述工具组可包括玻璃管装的分离酶;用于悬浮酶的无菌溶液;无菌营养液;解剖刀;镊子;注射器;医用滴管;细胞滤器;伤口敷料和/或喷嘴。在一个实施方式中,所述工具组储存于所述设备的第一元件形成的隔室中,其在不使用时被第二元件所覆盖。

[0101] 在一个实施方式中,所述设备用于收获和制备细胞悬液,并进一步以任何合适的方式将细胞悬液应用于受体位点。

[0102] 例如,可将无菌水的等分样与一部分冻干的分离酶混合并置于加热凹槽中。随后激活加热元件,将容器中含有的物质(即酶溶液)加热至约 30 至 37℃的工作温度,优选约 33 至 37℃,或者例如在短时间(例如约 5 分钟、约 3 分钟、约 2 分钟或约 1 分钟)内加热至约 37℃,并维持工作温度足够时间以进行酶消化(例如约 30 分钟、约 45 分钟、约 0 分钟,或更长或更短)。一旦达到操作温度,则可将从供体位点取出的组织样品置于酶溶液中并在工作温度下孵育。将组织样品孵育足够长的时间(例如 5 至 60 分钟、10 至 45 分钟、20 至 30 分钟,或更长或更短)。本领域技术人员应理解,实现组织样品的层分离的时间取决于组织样品的厚度和尺寸以及孵育时间,并可通过常规实验确定。一旦实现组织层的酶促分离,则可将组织样品移出,使用营养液清洗,并置于容器中,在其中使用手术器械(如镊子)原位固定组织层。

[0103] 随后通过吸取的方式从流体容纳孔中提取小心测量的第二溶液(如营养液)等分样至注射器中并随后应用于层。使用解剖刀刮下来自全组织样品(例如包括表皮、真皮和真皮-表皮连接部)的细胞,并将其与营养液混合以进行悬浮。随后收集细胞悬液,优选使用注射器和套管。

[0104] 随后使收获的细胞悬液通过位于过滤凹槽的细胞滤器以除去大细胞聚集物和其他不需要的材料,并将过滤后的细胞悬液收集于过滤凹槽中。可选使用额外体积的第二溶液清洗储器,所得的额外细胞悬液也可过滤并收集在过滤凹槽中。

[0105] 随后可选将过滤后细胞悬液吸入分散装置(如注射器)中并直接应用于受体位点。所述悬液也可体外或原位地间接应用于需要修复的区域,例如支架/基底或敷料。

[0106] 在其他实施方式中,所述悬液的制备过程可以是自动的。自动装置可包括能够多次使用的加工单元和单次使用的耗材。例如,可提供具有一次性筒的自动装置。所述一次性筒可具有含有水、酶和缓冲液的水泡。辊或压板可用于产生压力以冲破单向阀,使水泡的成分导入含有活检样品的加工室中。酶孵育后,使用类似于研钵和研杵的方式加工活检样品,其中基部可含有网或任何其他刮擦装置以完成刮擦步骤。在一些实施方式中,所述装置可具有一个以上的一次性筒,因此可平行加工一块以上的活检样品。

#### [0107] 热激蛋白的使用

[0108] 热激蛋白(HSP)最初被发现为由热激和其他化学(例如化合物)或物理应激显著诱导的蛋白。从那时起,其被视作分子伴侣,通过其内在能力指导和修饰蛋白结构以使其从变性结构重折叠为天然结构。这些对于全天然功能蛋白的相互作用和平衡使得 HSP 具有丰富含量。HSP 通常根据其分子量分为数类。例如,Hsp27、40、70 和 110 基因已进化为对应激后或应激期间的物质合成特别有效,具有有力的转录激活、有效的信使 RNA(mRNA) 稳定化和选择性 mRNA 翻译。应激后,Hsp27、70、90 和 110 水平上升为主要表达的蛋白。

[0109] 热激蛋白在保护皮肤免遭环境应激方面发挥重要作用,并参与因处于光、热、化学损伤和其他创伤下而导致的损伤预防和修复。此外,UV-B 辐射也可诱导热激应答,其保护人皮肤免遭细胞损伤并是暴露于阳光辐射后天然防御的一部分。然而,在生理伤口愈合中,在任何特定时间几乎没有细胞受到应激,因此大多数细胞未被激活,或分泌 HSP 或增殖。

[0110] 因此,伤口愈合过程可受益于外源性导入热激应答。例如,通过将本发明的细胞悬

液放置在应激条件下,细胞可表现出热激应答。合适的应激条件包括但不限于缺氧、热激、pH 变化、渗透压和 / 或气压变化、化学化合物、辐射、机械外伤、营养缺乏和 / 或禁食或热量限制。可通过在缺乏足够氧气供应的环境中孵育细胞实现缺氧。此外,由于本发明的方法将活检样品从其正常维管联结中取走,活检样品中的细胞以及收获自活检样品的细胞可经历应激并由于维管联结的减少或缺失表现出受应激和 / 或激活的状态。热激的过程可在 CO<sub>2</sub> 培养箱、O<sub>2</sub> 培养箱或热水浴中完成。此外,可在制备和 / 或分散细胞悬液的整个过程中诱导应激,例如从维管联结中移除活检样品、使活检样品分解在细胞悬液中(例如通过酶促和 / 或机械方式)和 / 或雾化或其他分散细胞的过程中。在应激下,细胞可表现出应激诱导特征,例如热激蛋白表达水平升高。所述热激蛋白可以是 Hsp90 和 / 或 Hsp90  $\alpha$ 。

[0111] Hsp90 是 HSP 的多个类别之一,通常被合成以应答细胞应激或在一些情况下组成型表达。这些应激类型很多,但包括热激、金属毒性、营养缺乏、氧化应激以及多种疾病状态。Hsp90 是细胞中存在的最常见的伴侣蛋白之一——其可占未应激细胞蛋白的 1-2% 和应激细胞中高达 6% 的蛋白。它能够提供更多组分复合体,已证明所述复合体包括 p60/Hop、p50Cdc37、Hsp40/HDJ2、p23、Hsp70 和多种亲免素之一(如 FKBP51 和 FKBP52)。

[0112] Hsp90 通常以两种形式存在, Hsp90  $\alpha$  和  $\beta$ 。两种蛋白都高度相关且似乎具有相同的活性;然而,前者是可诱导的而后者是组成型表达的。Hsp90 还是一种磷酸-蛋白且具有每个单体具有两个或三个结合的磷酸分子并以同源二聚体的形式存在。使其成为潜在药物靶标的清晰差异之一是其客户蛋白(client protein)中很大一部分是蛋白激酶的事实。这些客户蛋白包括 ErbB2/Her-2、EGFR、Hif1  $\alpha$ 、c-Met、Akt/PKB、Raf-1、Cdk-1 和 4、Aurora B、Ask1、CHK1、CKII 以及突变体 p53。此外,由于调节细胞增殖和细胞死亡相关的相互作用和复杂网络的性质,鉴定一种特异性(药物)靶标和对其阻断或激活的方法可导致细胞简单地改变其调节以维持表型。

[0113] 最近发现 HSP 由细胞主动分泌并发挥重要的胞外功能,包括免疫细胞因子生成的刺激、抗原呈递细胞(APC)的激活和抗癌功能。缺氧导致表皮和真皮细胞中 Hsp90  $\alpha$  分泌。分泌的 Hsp90  $\alpha$  转而促进这些细胞的迁移。由于 HSP 蛋白在氨基端缺乏任意信号序列,这些蛋白不能通过经典的内质网 / 高尔基体输送通路分泌。相反,这些蛋白通过被称为外来体的离散纳米囊泡(直径 30-90nm)群体分泌至细胞外。因此,外来体分泌构成了细胞间通信的潜在模式并开辟了新的处理和诊断策略。TGF  $\alpha$  通过外来体途径将 Hsp90  $\alpha$  “推”出角质形成细胞,其转而促进表皮和真皮细胞通过细胞表面受体 CD91/LRP-1 (“LRP”指 LDL 受体相关蛋白-1)的迁移。

[0114] 因此,在某些实施方式中,可将本发明的细胞悬液(或其一部分)与热激蛋白(或其片段)共同给予至受体位点以促进伤口愈合或促进上皮相关过程中上皮组织的处理、再生和表面重修。细胞悬液和 HSP 可以混合物的形式供应并分散至受体位点。或者,细胞悬液和 HSP 可分开应用于受体位点。还可使用多种细胞悬液和 / 或 HSP 的应用或分散以实现所需的伤口愈合效果。可以处理有效量使用 HSP 或其片段以促进伤口愈合。所述 HSP 可以是 Hsp90 和 / 或 Hsp90  $\alpha$ 。可以约 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l 至约 100  $\mu$ g/ $\mu$ l、约 0.3  $\mu$ g/ $\mu$ l 至约 50  $\mu$ g/ $\mu$ l 或约 1  $\mu$ g/ $\mu$ l 至约 10  $\mu$ g/ $\mu$ l 的浓度配制 HSP 或其片段。

[0115] 美国专利号 8,022,037(其全文通过引用纳入本文)公开了 Hsp90  $\alpha$ (特别是其中间结构域加带电序列)作为人表皮角质形成细胞(HKC)、真皮成纤维细胞(DF)和微血管内

皮细胞 (HDMEC) 迁移的胞外前运动因子 (pro-motility factor)。

[0116] 在多个实施方式中,可使用常规的克隆和重组 DNA 技术大量生成并纯化 HSP (例如 Hsp90 和 Hsp90  $\alpha$ ) 或其片段。HSP 可作为本发明设备的组分提供,例如以干粉形式,或者以液体应用或绷带的形式提供。HSP 还可用作独立治疗并以多种形式提供;以液体应用形式提供时,可将 HSP 喷洒、滴加、分散或施涂至受体位点;以绷带形式提供时,可使用本领域已知方法将 HSP 配制为缓释制剂。还可以将 HSP 与具有单一细胞类型 (如皮肤干细胞、成纤维细胞、角质形成细胞等) 的单一培养物或其细胞混合物联用。

[0117] 在多个实施方式中, HSP 可通过加强上皮重新形成过程和细胞招募帮助或增强伤口愈合和组织再生。不受理论限制,机制指“主动应激”的角质形成细胞 (例如以缺氧形式或通过 ReCell 加工) 可使得能够调节和控制再生过程的关键蛋白 (例如 HSP90)、血小板 (释放 PDGF)、和干细胞 (释放增殖子,如 VEGF)、细胞因子 (免疫调节剂) 和趋化因子 (迁移子) 的释放加强;HSP90 能够阻断 TGF $\beta$  的作用,从而对内皮细胞和成纤维细胞对 VEGF 和 PDGF 的应答进行去抑制,所述应答导致伴随血管和神经快速发育的关键细胞类型的增殖和分化。抑制、去抑制和激活的相互作用产生了正反馈级联反应,导致生长因子、细胞因子和趋化因子的进一步释放。

#### [0118] 透明质酸的使用

[0119] 本文所用术语“透明质酸”包括碱金属盐,如透明质酸的钠盐、钾盐和锂盐。术语“透明质酸”还旨在不仅包括基本的透明质酸,还包括具有其他痕量元素或与其他元素共同存在于多种组合物中的透明质酸,前提是透明质酸的化学和物理特性维持不变。此外,本申请所用术语“透明质酸”旨在包括天然制剂、合成制剂或这些天然和合成制剂的组合。

[0120] 透明质酸 (也称作透明质酸盐或 HA) 是一种广泛分布于结缔、上皮和神经组织中的糖胺聚糖。更具体来说, HA 是一种线性、非分支的多糖,由交替的 N-乙酰基-D-葡萄糖胺和 D-葡萄糖醛酸形成,并可达到最多 20000 个二糖单元或更高的链长度。作为胞外基质的主要组分之一, HA 对细胞增殖和迁移有显著影响。已证明上皮组织中 HA 的存在促进了角质形成细胞增殖并增加了视黄酸的存在量,影响皮肤水合作用。透明质酸与 CD44 的相互作用驱动胶原合成和正常的皮肤功能。在基底角质形成细胞的胞外基质中主要存在的 HA 对于真皮胶原基质的结构完整至关重要。

[0121] 在正常皮肤中,发现 HA 在表皮基底层 (其中发现有增殖的角质形成细胞) 中具有相对高浓度。CD44 与 HA 在表皮基底层中共定位,其中已证明 CD44 优先在朝向富 HA 基质囊 (matrix pouch) 的质膜上表达。维持胞外空间和为营养物的通过提供开放且水合的结构是表皮中 HA 的主要功能。

[0122] HA 还可影响或促进伤口愈合。皮肤伤口愈合是一个复杂的过程,且包括许多由凝血和血小板来源因子释放启动的相互作用过程。以下阶段包括炎症、肉芽组织形成、表皮重新生成和重塑。HA 在介导这些细胞和基质事件中起多方面的作用。首先,在炎症过程中,生成了许多生物因子,如生长因子、细胞因子、类花生酸等。由于这些因子在促进炎症细胞、成纤维细胞和内皮细胞迁移至伤口位点中的作用,这些因子是伤口愈合的后续步骤所必需的。伤口修复的早期炎症阶段中的伤口组织含有丰富的 HA,可能是 HA 生物合成提高的反映。HA 可作为早期炎症的促进剂,这在全皮肤伤口愈合过程中至关重要。

[0123] 肉芽组织是代替愈合伤口中纤维蛋白凝块的灌注、纤维状的结缔组织。HA 在肉芽

组织基质中含量丰富。对组织和伤口修复重要的多种细胞功能可归因于该富 HA 网络,包括促进细胞迁移至临时性伤口基质、细胞增殖和肉芽组织基质的组织。例如,富 HA 网络或胞外基质可作为细胞迁移至临时性伤口基质的有利环境。

[0124] HA 还在表皮重新生成过程中起作用。其作为基底角质形成细胞胞外基质的完整部分,后者是表皮的重要组分;其在角质形成细胞增殖和迁移中的作用也是重要的。在伤口愈合过程中,HA 在伤口边缘、结缔组织基质中表达并在迁移的角质形成细胞中与 CD44 表达共定位,HA 和 CD44 在其中共同作用以调节角质形成细胞增殖和迁移。HA 还可减少胶原沉积从而使得疤痕减少。

[0125] 因此,在某些实施方式中,本发明的细胞悬液或其部分可与 HA(或其药学上可接受的盐,如透明质酸钠)共同给予至受体位点以促进伤口愈合。细胞悬液和 HA 可以混合物的形式供应并分散至受体位点。或者,细胞悬液和 HA 可单独地应用于受体位点。还可使用多种细胞悬液和/或 HA 的应用或分散以实现所需的伤口愈合效果。可以治疗有效量提供 HA 以促进伤口愈合,如约 0.01mg/mL 至约 60mg/mL、约 1mg/mL 至约 50mg/mL、约 5mg/mL 至约 40mg/mL、约 10mg/mL 至约 30mg/mL,或约 20mg/mL 至约 25mg/mL。例如,根据本发明,组合物中 HA 的量可以是 0.1、1、2、4、6、8、10、20、30、40、50 或 60mg/mL。所述 HA 可具有任何合适的分子量,范围根据来源、降解和纯化过程从数 kDa 至数百万道尔顿。所述 HA 可以是约 0.01 至  $9 \times 10^6$ Da、约 0.5 至  $9 \times 10^5$ Da 或约 0.8 至  $8 \times 10^5$ Da,或更高或更低。

[0126] 在多个实施方式中,所需分子量的 HA 可使用常规的克隆和重组 DNA 技术(例如在重组细胞中使用透明质酸合成酶和/或其他 HA 生物合成基因)大量生成并纯化。HA 还可通过购买从公鸡鸡冠、天然合成该化合物以作为其外囊的部分的 C 群链球菌的某些减毒菌株或牛玻璃体处获得。此外,经纯化 HA 的分子量组分可从商业来源购买,包括但不限于伏路卡化学公司(Fluka Chemical Corporation)(朗肯科玛,纽约州,美国)、健赞公司(Genzyme Corporation)(剑桥,马萨诸塞州,美国)、生命核心股份有限公司(Lifecore Inc.)(查斯卡,明尼苏达州,美国)、海尔药物公司(Hyal Pharmaceutical Corporation)(米西索加,安大略省,加拿大)和伯尼奇生命科学股份有限公司(Bioniche Life Sciences, Inc.)(贝尔维尔,安大略省,加拿大)。

[0127] HA 可以多种形式提供,如溶液、水凝胶、或者纳米颗粒或微粒。美国专利号 6,660,853 和 7,371,399 描述了制备 HA 和含 HA 聚合物凝胶的方法并通过引用纳入本文。

[0128] HA 可作为本发明设备的组分提供,例如以干粉形式,或者以液体应用或绷带的形式提供。HA 还可用作独立治疗并以多种形式提供;以液体应用形式提供时,可将 HA 喷洒、滴加、分散或施涂至受体位点;以绷带形式提供时,可使用本领域已知方法将 HA 配制为缓释制剂。还可以将 HA 与具有单一细胞类型(如皮肤干细胞、成纤维细胞、角质形成细胞等)的单一培养物或其细胞混合物联用。

## 实施例

[0129] 本发明的其他特点描述于以下非限制性实施例中。但应理解,这些实施例仅被包括用于示例性描述本发明的目的。不应以任何方式理解为对上文所成列的本发明全面描述的限制。

[0130] 下面给出实施例,以便为本领域的普通技术人员示例性描述本文所要求专利保护

的组合物和 / 或方法是如何实现和评价的, 这些实施例完全是出于对本发明进行示例的目的, 不是为了限制对发明人而言其发明的范围。以下实施例的多个方面的修改和变化对本领域技术人员而言是显而易见的并包括在本发明的范围内。例如, 结合皮肤相关疗程描述一些实施例时, 经过本领域普通技术人员水平内的稍许修改, 相同的实施方式可应用于非皮肤上皮组织 (如呼吸上皮、血管上皮、腺上皮、角膜上皮等)。

#### [0131] 实施例 1

##### [0132] 受体位点的准备

[0133] 为最优化上皮相关过程的成功, 清洗伤口并评估为合适深度。此外, 建立血液平衡且检查伤口是否有周边蜂窝织炎或感染的迹象。准备该区域的技术包括但不限于锐性分离、擦皮或激光表面重修。

##### [0134] 供体位点活检样品

[0135] 选择供体位点以与受体位点适当地匹配。在靠近皮下组织的皮肤下方, 使用局部麻醉剂和肾上腺素渗透供体位点。这使得供体位点固定并有助于提取活检样品。活检样品的尺寸取决于所覆盖受体位点表面积的大小。通常, 本发明允许膨胀比为约 1:10 至 1:80 (供体活检样品尺寸: 受体位点尺寸) 的活检样品尺寸。在一个实施例中, 从供体位点取出 2cm x 2cm 尺寸的活检样品, 使得膨胀比为 1:60。

##### [0136] 使用 **ReCell**<sup>®</sup> 技术的皮肤表面重修

[0137] 伤口的治疗使用 **ReCell**<sup>®</sup> 快速技术细胞收获设备进行, 这在下文实施例 2 中有详细描述。该设备含有伤口治疗所需的所有装置、溶液、酶和敷料。

[0138] 通过按下“开始按钮”激活加热元件。将溶液 A (用于注射的无菌水) (10ml) 从提供的标有溶液 A 的塑料容器中转移至含有分离酶 (冻干的胰蛋白酶) 的玻璃容器中以使胰蛋白酶的终浓度为 0.5%。随后混合酶溶液, 转移至已放置在加热元件凹槽中的容器内并加热至约 37°C。

[0139] 将含溶液 B (营养液) 的容器从提供的容器中转移至流体容纳孔中。

[0140] 随后将先前获得的样品组织置于酶溶液中并在约 37°C 下孵育 10 至 15 分钟。孵育后, 使用一对镊子从酶溶液中移出组织样品, 通过浸没在含溶液 B 的流体容纳孔中进行清洗并以真皮一侧朝下表皮一侧朝上的方式置于储器中。

[0141] 随后将溶液 B 从孔吸入注射器中, 并从注射器滴加至活检样品的全部两层上。

[0142] 使用镊子和解剖刀处理皮肤层、真皮和表皮。从表面的上层开始, 随后是表皮下层和真皮上层相连的真皮 - 表皮连接部区域, 从样品中刮下细胞直至收集了样品中基本所有细胞以在储器中产生一团细胞。随后通过搅拌和 / 或吹打将细胞与溶液 B 混合。随后通过 19 号插管将细胞团吸入注射器中。

[0143] 将提供的滤器 (100  $\mu$ m 细胞滤器) 固定在过滤凹槽中并使溶液 B 中的细胞团通过滤器。使用额外的少量溶液 B 清洗储器 (例如培养皿) 并收集任何残留的细胞, 也使其通过滤器。

[0144] 将锥形凹槽中收集的所得细胞悬液吸入注射器中并将喷嘴与注射器相连用于喷洒或滴加至伤口区域上。

[0145] 再次检查伤口以确保其是干净的且不含碎片且没有细菌污染的迹象。此外, 检查

伤口以确定是否已实现凝血。一旦受体位点准备就绪,即使用喷嘴将细胞悬液应用于伤口表面。

[0146] 使用设备中提供的 Surfasoft™(一种织造尼龙敷料)包扎伤口。之后使用皮肤移植治疗的标准方案进行伤口愈合。

#### [0147] 实施例 2

[0148] 在图 2A 中所示的实施方式涉及 ReCell®快速技术细胞收获设备 10,用于生成活组织的可移植细胞悬液,适于在上皮相关过程中应用于患者。

[0149] 如图 2A 所示,该设备包括具有锁紧机构 14 的闭合盖 12,用于可释放地啮合基底部分 16。锁紧机构 14 提供了在不用时关闭设备 16 的方式。基底部分 16 中放置有第一元件 18,其中有孔 20,孔 20 中有用于酶的药瓶 22。孔旁提供了激活开关 24,能够激活加热元件(未显示)。第一元件还提供了流体容纳孔 26 和过滤凹槽 28。如图所示,滤器 29 位于过滤凹槽中。通常滤器是任选的物品,其包括在设备中作为独立的物品。

[0150] 第一元件 18 中的孔 20 理想地具有使药瓶 22 的颈穿过第一元件 18 并位于其上方的直径。孔 20 的外周与略小于药瓶 22 本体直径的套环 21 匹配。因此,在使用时,由于药瓶 22 被位于孔 20 外周的套环 21 固定,无法从设备 10 中移开药瓶 22。

[0151] 位于孔 20 旁的流体容纳孔 26 和过滤凹槽 28 是第二元件 30,其位于第一元件 18 中储存隔室(未显示)中基座(未显示)上。反转时,第二元件 30 形成储器,在其中进行组织操作。为促进第二元件 30 和第一元件 18 的分离,在第二元件 30 的一部分的侧面提供了凹痕 32,其具有适当尺寸从而使人能够从第一元件 18 中放置第二元件的基座上提起第二元件。

[0152] 过滤凹槽 28 中放置有滤器 29(与其他组分分开提供),其中含有能够从细胞上清液中分离大于 100  $\mu\text{m}$  的细胞材料的网。

[0153] 图 2B 提供了设备 10 的部分分解透视图,其中第二元件 30 从第一元件 18 处移开并反转。第二元件 30 的反转使第二元件 30 的侧壁 32 得以显示,其形成储器的流体容纳障碍以及在其中进行组织操作的储器区域 34。

[0154] 从第一元件 18 处移开第二元件 30 还使第一元件 18 中的储存隔室 36 得以显示,设备 10 不使用时可在其中储存溶液和工具。储存隔室 36 中有基座 38,其上第二元件 30。基座 38 优选位于储存隔室 36 外周,位于第一元件 18 表面的下方一定深度,所述深度与第二元件 30 的侧壁 32 的高度相当。

[0155] 图 3A 提供了第一元件 18 的透视图,显示了储存隔室 36、加热激活开关 24、孔 20、流体容纳孔 26 和第一元件中形成的过滤凹槽 28。图 3B 提供了第一元件 18 的后视图,显示了过滤凹槽 28、流体容纳孔 26、加热激活开关 24、孔套环 21 和储存隔室 36 的后壁。如该图所示,过滤凹槽具有锥形基部,从而提供了一种容易地获取过滤至其中的细胞悬液的方法。在靠近流体容纳孔和过滤容纳孔的反面还提供了电池定位元件 40,其突出朝向设备(未显示)基部 16 并提供了一种将电池固定在适当位置的方法,这是激活加热装置所必需的。

[0156] 图 4 提供了设备 10 的基部 16 的透视图,显示了位于容纳部件 42 中的药瓶 22。容纳部件 42 和药瓶 22 之间是加热套环 44,其围绕药瓶本体。靠近容纳部件的是电路板 46,其通过电路板容纳装置 48、50 和 52 固定在适当位置。所述电路板 46 通过电线 54 与加热套环 44 电连通。该电路板还通过电线 58 与加热器激活开关(未显示)电连通。靠近电路

板 46 处提供了电池容纳装置 58, 其将 4 个 AA 电池固定在不可移动的位置 (未显示)。电池通过电线 60 与电路板 46 电连通。当第一元件 18 固定在基部 16 上时, 电池通过电池容纳装置 58、电池定位装置 40 和各流体容纳孔 26 的基部和过滤凹槽 28 固定在适当位置。优选地, 过滤凹槽 28 的锥形基部也从电池之间突出, 从而提供其他方式将电池固定在不可移动的位置。

### [0157] 实施例 3

[0158] 测试了 HA 水凝胶是否可增加来自成年供体的人基底层表皮角质形成细胞的活力和迁移。使用包括下文所述 Transwell 细胞迁移、CellTiter 96® 水性细胞扩增试验和体外刮擦试验的试验测试了多种水凝胶。

### [0159] Transwell 细胞迁移的实验方案

[0160] 1. 在补充有角质形成细胞生长试剂盒和庆大霉素-两性霉素 B 溶液的真皮细胞基底培养基 (完全培养基) 中维持原生表皮角质形成细胞 (PEK)、正常、人、成人细胞的储用培养物。将细胞的储用培养物再次培养至  $2.5 \times 10^4$  细胞 / ml (估算) 并每 2 天或达到接近铺满的密度时再次提供培养基。

[0161] 2. 向 24 孔板的各孔中加入 500  $\mu$ l 的培养基。使用测试材料预先包被具有 8  $\mu$ m 孔和 0.3  $\text{cm}^2$  面积的插入物并将其置于 24 孔培养皿的孔中。

[0162] 行 A, 列 1-3: 空白, 无细胞, 仅培养基。

[0163] 行 B, 列 1-3: 基线, 仅细胞, 无涂料。

[0164] 行 C, 列 1-3: 1 型胶原 (阳性对照)

[0165] 行 D, 列 1-3, 和行 A-D, 列 4-6: 梯度稀释系列的测试物质 (如下所示)。

[0166]

|    | 列1      | 列2      | 列3      | 列4                  | 列5                              | 列6                  |
|----|---------|---------|---------|---------------------|---------------------------------|---------------------|
| 行A | 仅培养基    | 仅培养基    | 仅培养基    | 培养基 + HA (30 mg/ml) | 培养基 + 1:1 HA/胶原 (30 mg/ml 总聚合物) | 培养基 + 胶原 (30 mg/ml) |
| 行B | 细胞——无涂料 | 细胞——无涂料 | 细胞——无涂料 | 培养基 + HA (15 mg/ml) | 培养基 + 1:1 HA/胶原 (15 mg/ml 总聚合物) | 培养基 + 胶原 (15 mg/ml) |

[0167]

|    |                |                |                |                          |                                     |                       |
|----|----------------|----------------|----------------|--------------------------|-------------------------------------|-----------------------|
|    |                |                |                |                          | 物)                                  |                       |
| 行C | 1型胶原——<br>阳性对照 | 1型胶原——<br>阳性对照 | 1型胶原——<br>阳性对照 | 培养基 + HA<br>(7.5 mg/ml)  | 培养基 + 1:1<br>HA/胶原 (7.5 mg/ml总聚合物)  | 培养基 + 胶原 (7.5 mg/ml)  |
| 行D |                |                |                | 培养基 + HA<br>(3.75 mg/ml) | 培养基 + 1:1<br>HA/胶原 (3.75 mg/ml总聚合物) | 培养基 + 胶原 (3.75 mg/ml) |

- [0168] 3. 收获细胞并通过  $150\times g$  离心 3 至 5 分钟清洗培养基中的 PEK 细胞。
- [0169] 4. 确定细胞数目和活力 (通过台盼蓝排除法), 并在培养基中悬浮细胞至终浓度为  $3\times 10^5$  细胞 /ml。
- [0170] 5. 将插入物置于板中。
- [0171] 6. 将  $100\ \mu\text{l}$  的细胞悬液 (30,000 个细胞) 分散至步骤 2 中制备的板的所有孔中。各孔中的总体积应为  $165\ \mu\text{l}$ 。
- [0172] 7. 将板在潮湿、5%  $\text{CO}_2$  的气氛中,  $37^\circ\text{C}$  孵育 6-12 小时。
- [0173] 8. 使用 PBS 轻柔清洗滤器, 使用棉签除去上表面上不迁移的细胞。
- [0174] 9. 使用 4% 多聚甲醛对下表面上的细胞固定 2 小时。
- [0175] 10. 使用哈里斯苏木精对下表面上的细胞染色 30 分钟。
- [0176] 11. 对于各膜, 在 400X 下对四个随机选择的视野进行计数, 确定平均值。可获取膜的图像。

[0177] 使用 **CellTiter 96®** 水性细胞扩增试验进行细胞活力测试的实验方案

[0178] 1. 在补充有角质形成细胞生长试剂盒和庆大霉素-两性霉素 B 溶液的真皮细胞基底培养基 (完全培养基) 中维持原生表皮角质形成细胞 (PEK)、正常、人、成人细胞的储用培养物。将细胞的储用培养物再次培养至  $2.5\times 10^4$  细胞 /ml (估算) 并每 2 天或达到接近铺满的密度时再次提供完全培养基。

[0179] 2. 加入  $50\ \mu\text{l}$  / 孔的待测样品或标准品, 在完全培养基中稀释。

[0180] 行 A, 列 1-3 : 空白, 无细胞, 仅培养基。

[0181] 行 B-C, 列 1-3 : 基线, 仅细胞。

[0182] 行 D-H, 列 1-3 : 血根碱, (毒素) 剂量反应 (50、10、5、1、0.1  $\mu\text{M}$ )

[0183] 行 A-H, 列 4-6、7-9、8-12 : 梯度稀释系列的测试物质

[0184] 在潮湿、5%  $\text{CO}_2$  的气氛中,  $37^\circ\text{C}$  下对板进行平衡, 同时收获细胞用于试验。

[0185] 3. 收获细胞并通过  $150\times g$  离心 3 至 5 分钟清洗完全培养基中的 PEK 细胞。

[0186] 4. 确定细胞数目和活力 (通过台盼蓝排除法), 并在完全培养基中悬浮细胞至终浓度为  $6\times 10^5$  细胞 /ml。

[0187] 5. 将  $50\ \mu\text{l}$  的细胞悬液 (30,000 个细胞) 分散至步骤 2 中制备的板的所有孔中。

各孔中的总体积应为 100  $\mu$ l。

[0188] 6. 将板在潮湿、5% CO<sub>2</sub>的气氛中,37℃孵育 48-72 小时。

[0189] 7. 向每个孔中加入 20  $\mu$ l 的 MTS/PMS 溶液。

[0190] 8. 将板在潮湿、5% CO<sub>2</sub>的气氛中,37℃孵育 1-4 小时。为测量由 MTS 的细胞还原所生成的可溶性甲臌的量,立即进行步骤 9。

[0191] 注:为稍后测量吸光度,向各孔中加入 25  $\mu$ l 的 10% SDS 以终止反应。将 SDS 处理的板避光储存于潮湿培养箱中,室温下储存最多 18 小时。进行步骤 9。

[0192] 9. 使用 ELISA 酶标仪记录 490nm 处的吸光度。

[0193] 10. 使用经校正的 490nm 处吸光度(Y 轴)相对于测试产品浓度(X 轴)作图并通过确定最大(平台)和最小(无生长因子对照)吸光度值之差的一半所对应的 X 轴值确定 ED50 值。ED50 = 生成最大反应一半所必需的生长因子浓度。

[0194] 注:根据测试物质所见反应,可制作细胞/孔标准曲线以用数字估算增殖。这可通过每孔放置多种已知数量的活细胞并测量甲臌生成来实现。

[0195] 细胞迁移-刮擦试验的实验方案

[0196] 1. 在补充有角质形成细胞生长试剂盒和庆大霉素-两性霉素 B 溶液的真皮细胞基底培养基(完全培养基)中维持原生表皮角质形成细胞(PEK)、正常、人、成人细胞的储用培养物。将细胞的储用培养物再次培养至  $2.5 \times 10^4$  细胞/ml(估算)并每 2 天或达到接近铺满的密度时再次提供完全培养基。

[0197] 2. 向 24 孔板的各孔中加入适量测试物质。

[0198] 行 A,列 1-3:空白,无细胞,仅培养基。

[0199] 行 B,列 1-3:基线,仅细胞,无涂料。

[0200] 行 C-D,列 1-3,和行 A-D,列 4-6:之前确定的测试物质,以所需梯度稀释系列形式。

[0201] 3. 收获细胞并通过  $150 \times g$  离心 3 至 5 分钟清洗培养基中的 PEK 细胞。

[0202] 4. 确定细胞数目和活力(通过台盼蓝排除法),并在培养基中悬浮细胞至终浓度为  $5 \times 10^4$  细胞/ml。

[0203] 5. 将 600  $\mu$ l 的细胞悬液(30,000 个细胞)分散至步骤 2 中制备的板的所有孔中。

[0204] 6. 将板在潮湿、5% CO<sub>2</sub>的气氛中,37℃孵育 24 小时。

[0205] 7. 使用移液器吸头刮擦单层细胞以在孔的中心建立无细胞区。

[0206] 8. 吸出耗费的培养基和细胞。

[0207] 9. 使用 300  $\mu$ l 培养基清洗以除去所有细胞碎片和松散的细胞。

[0208] 10. 在潮湿、5% CO<sub>2</sub>的气氛中,使用测试物质(或培养基)重新包被裸露的表面,37℃下反应 1 小时。

[0209] 11. 吸出耗费的培养基/测试物质。

[0210] 12. 使用培养基清洗细胞层一次。

[0211] 13. 使用 600  $\mu$ l 培养基进行补充。

[0212] 14. 将板在潮湿、5% CO<sub>2</sub>的气氛中,37℃孵育 16 小时。在受伤后 16 小时获取图像。

[0213] 注:根据所见到的结构,可使用丝裂霉素 C 对细胞进行预处理。该预处理将评估不发生增殖的情况下细胞迁移对体外伤口闭合的相对影响。

[0214] 所有实验所用的细胞都接种自美国典型培养物保藏中心(目录编号

PCS-200-011,批号 59098517)。这些细胞是来自正常成年人的原生表皮角质形成细胞。细胞保持在真皮细胞基底培养基(ATCC 编号:PCS 200-030)中,补充有角质形成细胞生长试剂盒(ATCC 编号:PCS 200-040),其包含牛垂体提取物、重组人TGF- $\beta$ 、L-谷氨酰胺、氢化可的松半琥珀酸酯、胰岛素、肾上腺素和转铁蛋白。还将庆大霉素-两性霉素B溶液加入培养基中(ATCC 编号:PCS 999-025)。根据ATCC建议对细胞进行解冻、培养并亚培养。

[0215] 按下文所述制备透明质酸(HA)和NINJA™水凝胶(带有胶原的透明质酸)。

[0216] 透明质酸通过美国专利号 6,660,853 中所述方法制备。总之,将来源于公鸡鸡冠的粗透明质酸以估算 1 至 5mg/ml 浓度溶解在纯水中。随后使用具有开放通道构型的 Pall-Filtron 30kDa MWCO PES 膜型 Centramate 夹持器,用 5 倍体积的纯水对溶液进行膜渗滤。该膜型是具有 1.0 平方英寸过滤区域的  $\omega$  聚醚砜膜。维持不超过 8.0psig 的跨膜压(TMP),以及至少 1,000ml/分钟的交叉流速。用于进行膜渗滤的泵是具有超过 1700ml/分钟能力的 Cole-Parmer Masterflex® L/S. RTM. 精确标准管道泵,SKU#EW-77911-00。通过 Pall 生物惰性尼龙 0.22 微米滤器实现灭菌。随后将溶液冻干并用于无菌制剂,按需使用 0.9% 盐水或细胞培养基。最初将溶液配制为 30mg HA/ml (“HA30”),随后按需要稀释(例如,至 10mg/mL,“HA10”)。

[0217] 使用上述纯化的透明质酸制备 NINJA™,并使用与美国专利号 7,371,399 中类似的方法将其与天然(非交联)型 I/III 胶原混合。随后将溶液冻干并用于无菌制剂,按需使用 0.9% 盐水或细胞培养基。最初将溶液配制为 30mg 聚合物/ml (“NINJA30”),随后按需要稀释(例如,至 10mg/mL,“NINJA10”)。

[0218] 购买市售可得的试剂盒(CellTiter,普洛麦格(Promega))并根据生产商的说明使用以测试细胞活力(MTS 细胞增殖试验)。该试验是一种比色法,用于确定线粒体酶的活性。简言之,将角质形成细胞以每孔  $3 \times 10^4$  个细胞的密度接种在 96 孔板上,并在存在和不存在水凝胶的情况下孵育过夜。随后将含四唑化合物和电子偶联试剂的 20 微升 CellTiter 试剂加入各孔中以使其被代谢活性细胞中的线粒体脱氢酶催化。将板孵育 1-4 小时并使用酶标仪记录 490nm 处的比色吸光度。此外,读取空白孔和全细胞计数孔的数值。读取全细胞计数孔,减去空白并确定活力百分比。结果如图 5 所示。

[0219] 在 HA 水凝胶的浓度高于 0.3mg/ml 时观察到体外细胞活力的下降。这可能是由于两种情况之一。首先,可能是水凝胶的粘度降低了营养物向细胞的扩散。这被 NINJA 水凝胶浓度高于 1.25mg/ml 时观察到的活性再次下降所支持。在相同聚合物浓度下,NINJA 的粘性高于 HA。其次,同样有可能在较高聚合物浓度下细胞实际未死亡。有可能染料 MTS 未能扩散至细胞中,因此不能被线粒体还原酶加工成甲臍。这还显示 490-500nm 读数时低的吸光度,并作为假的低活力读数。但是应注意,分子扩散机制可能不是体内的主要机制。体内情况可涉及酶促降解、对流传质(血液供应)和其他仍未定量的机制。因此,在体内设定中,可耐受 0.3mg/mL 体外限值的至少 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍或更高浓度的聚合物。

[0220] 跨孔迁移试验根据上述实验方案进行。总体来说,将配有 8um 孔和 0.3cm<sup>2</sup> 膜、使用水凝胶预包被的细胞培养插入物置于 24 孔培养皿中,分别形成试验的上和下隔室。对照培养基中培养的角质形成细胞(每孔  $3 \times 10^4$  个)接种至具有不同水凝胶包被、不同粘度的顶孔和对照培养基上并孵育 3 天。所有孵育都在空气/CO<sub>2</sub>95%/5%和 37℃下进行。实验

后,使用 PBS 对滤器清洗两次,并使用棉签除去上表面上的细胞。在 4%多聚甲醛中固定滤器下表面上的细胞(2 小时)并使用哈里斯苏木精染色 30 分钟。在四个随机选择的高倍视野下对迁移至膜底面的细胞进行计数,并从重复实验中确定平均计数。结果如图 6 所示。所有水凝胶制剂都胜过对照情况(仅培养基),其中 NINJA10 领先。

[0221] 体外刮擦试验根据上述实验方案进行。总体来说,将培养的角质形成细胞( $5 \times 10^4$  个/mL)置于用不同特性的水凝胶和非水凝胶对照预先包被的组织培养皿中并孵育过夜。将对照培养基中培养的角质形成细胞接种至不同水凝胶包被的 24 孔培养皿上 3 天。随后以标准方式使用塑性设备刮下单层细胞以在各皿中建立无细胞区。随后吸去培养基,通过充分清洗除去细胞碎片。在 37°C 下使用水凝胶和角质形成细胞培养基重新包被裸露的表面,反应 1 小时。随后吸出含水凝胶的培养基并对细胞层清洗一次。使用新鲜的角质形成细胞培养基补充培养皿。受伤后以 24 小时的间隔拍摄照片,持续最多 4 天。通过摄影记录体外上皮重新形成,并通过计算机辅助图像分析对迁移量进行手动定量。该数据以被角质形成细胞充满的刮擦面积百分比表示(图 7)。结果获自“刮擦”的整个视野,重复取两次。此外,在额外的丝裂霉素 c(MMC+/-)存在的条件下测试第二重复组的孔。MMC 的使用延缓了细胞增殖。因此,存在和不存在 MMC 条件下体外刮擦愈合的差异可提供水凝胶在迁移中作用的指示(对比仅增殖),且反之亦然。

[0222] 如图 7 所示,对于所有测试的水凝胶,NINJA10 产生了最高的愈合。它到第 2 天就显著优于培养基对照,并持续直至测试完成。第二好的水凝胶是 NINJA30。NINJA30 表现出延迟的生长反应。在最后一天前无法将它与其他水凝胶和培养基区分,最后一天时它在 24 小时内从 33%上升至 75%。最高粘度的 NINJA30 可延缓必要细胞营养物的扩散直至水凝胶因反扩散而受到稀释。

[0223] 存在和不存在(+/-)MMC 条件下体外刮擦愈合的差异可提供水凝胶在迁移中作用的指示(对比仅增殖),且反之亦然。在 MMC- 培养基/对照组中,对愈合的效果和预期一致。与 MMC- 细胞相比,MMC+ 细胞显示出延迟的愈合,但差异并不显著。然而,该效果在 HA30 组中反转,其中 MMC+ 显示愈合增强。与 HA10MMC- 相比,HA10MMC+ 在最初 3 天显示延迟的愈合,但随后在第 4 天反转。NINJA30 和 NINJA10MMC+ 也显示愈合方面的轻度延迟。

[0224] 因此,水凝胶可使细胞增殖和迁移同时上调。考虑到所有凝胶对愈合产生影响的基本趋势以及 NINJA10 组(和部分 NINJA30 组)的显著性,NINJA 可以是一种增强 ReCell® 和伤口愈合的合适技术。

[0225] 如上文所述,任何体外系统中的主要机制都是分子扩散。培养基营养物随时间扩散至水凝胶且聚合物随时间扩散出水凝胶。这种现象称作反扩散。体内条件通过引入额外的机制(包括强制对流(血流)和酶促降解)增加了任何模型的复杂性。因此,虽然上述测试暗示 0.3mg 聚合物/mL 是活力极限,但这可能仅在体外系统中是正确的。体内的活力极限可能更高。事实上,在过去的数年间,已经广泛地将 NINJA™ 技术注射入患者体内,尤其是包含多种软骨细胞、成纤维细胞和其他细胞群的颞颌关节中。30mg 聚合物/mL 的注射显示出愈合方面的显著增强。因此,在体外似乎会影响细胞活力的浓度范围中较高的聚合物凝胶浓度可能在体内得以耐受。

[0226] 最初积极的结果暗示具有较高粘度的溶液可作为载剂用于自体细胞的应用。该溶液可包括制剂 NINJA10 或其变体。

[0227] 对本发明所述方法和装置的改进和变动对本领域技术人员是显而易见的,而不偏离本发明的范围和精神。虽然已结合具体的优选实施方案对本发明作了描述,但应了解,如权利要求所述,本发明不应过分地受限于这些具体实施方案。实际上,对本发明所涉及相关领域技术人员显而易见的用于实施本发明的方式的各种改进都落在权利要求的范围内。

[0228] 通过引用纳入

[0229] 本文提到的所有发表物和专利在此通过引用全文纳入,就好像各个单独发表物或专利特定和单独地表明是通过引用纳入。

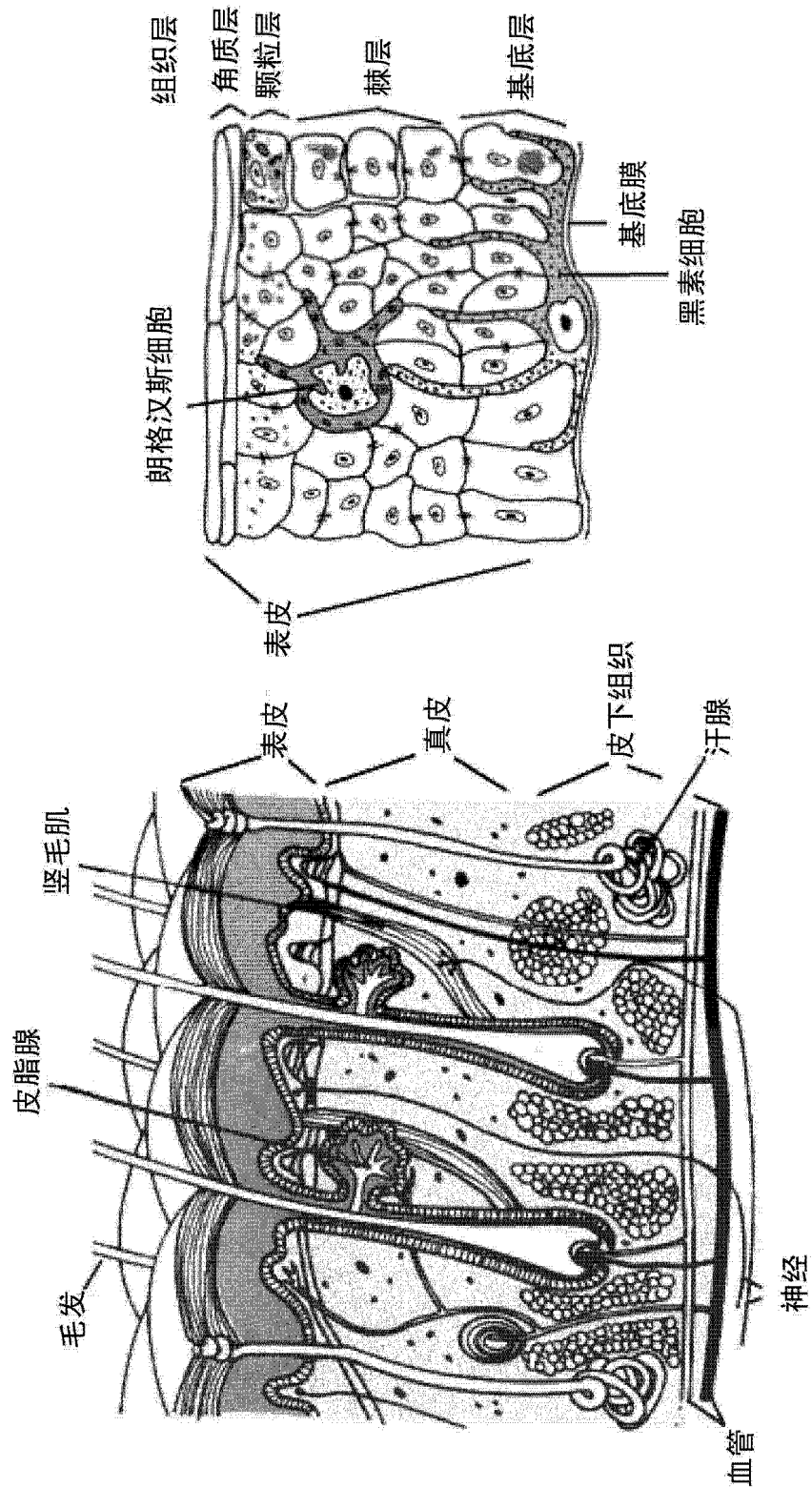


图 1

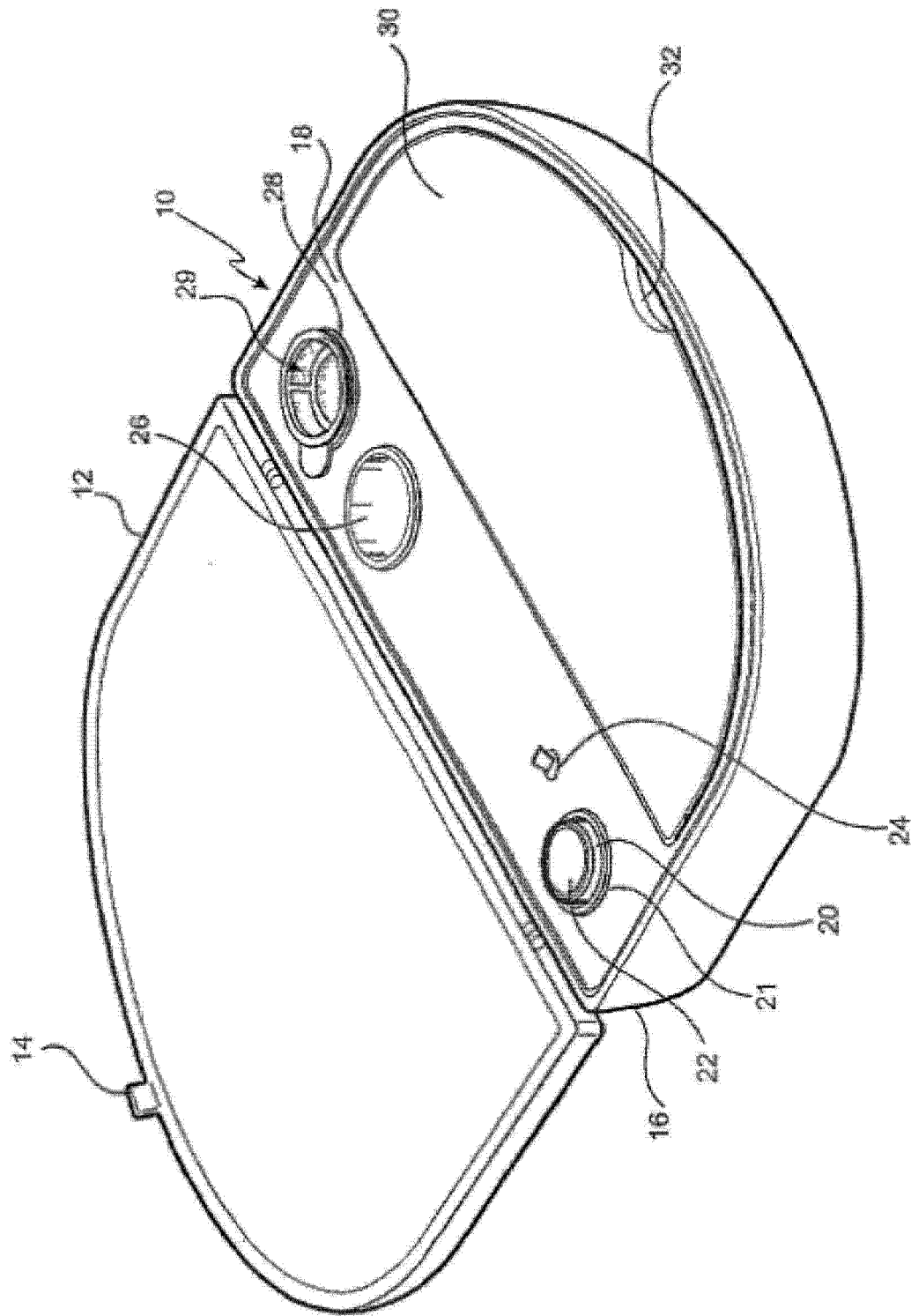


图 2A

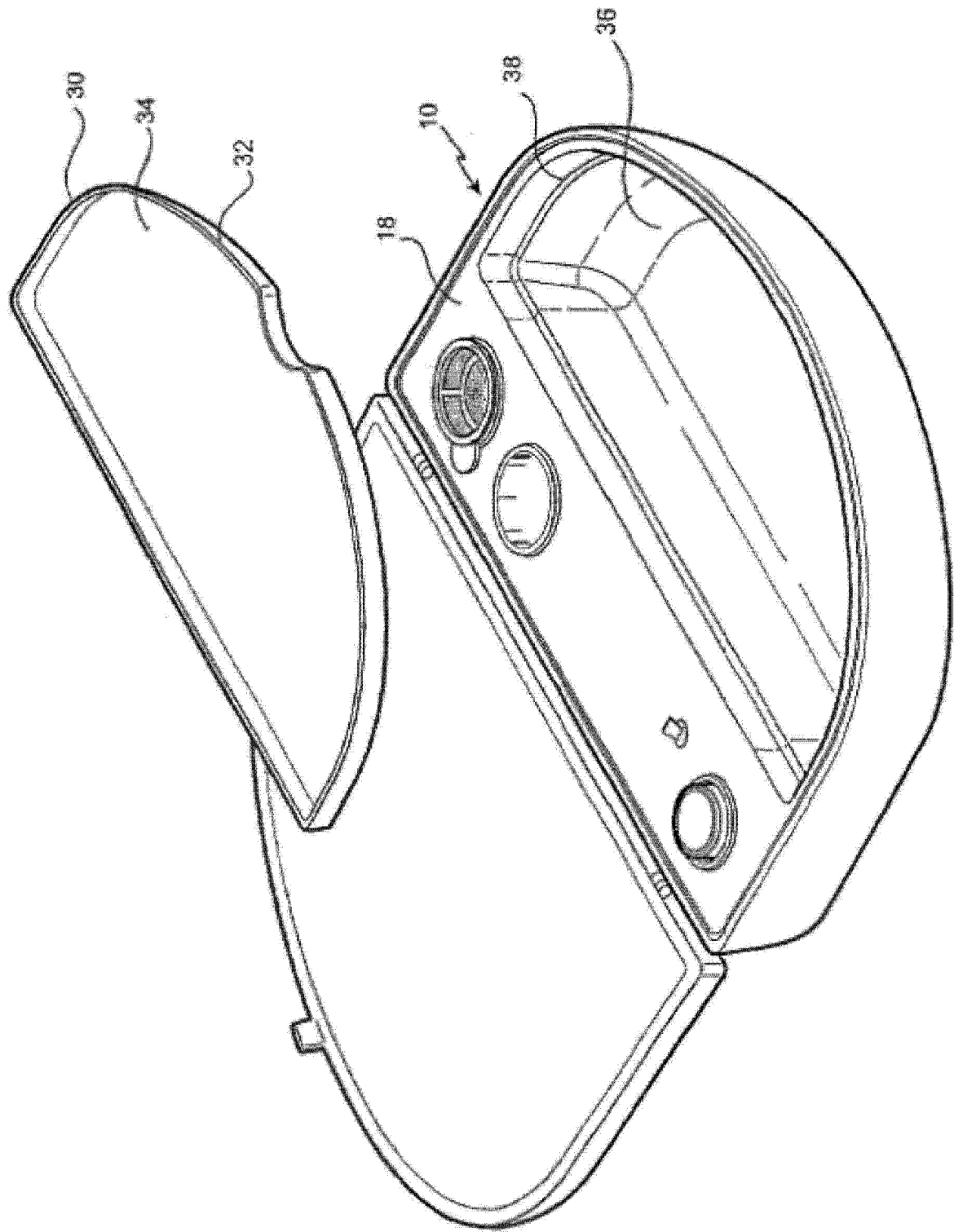


图 2B

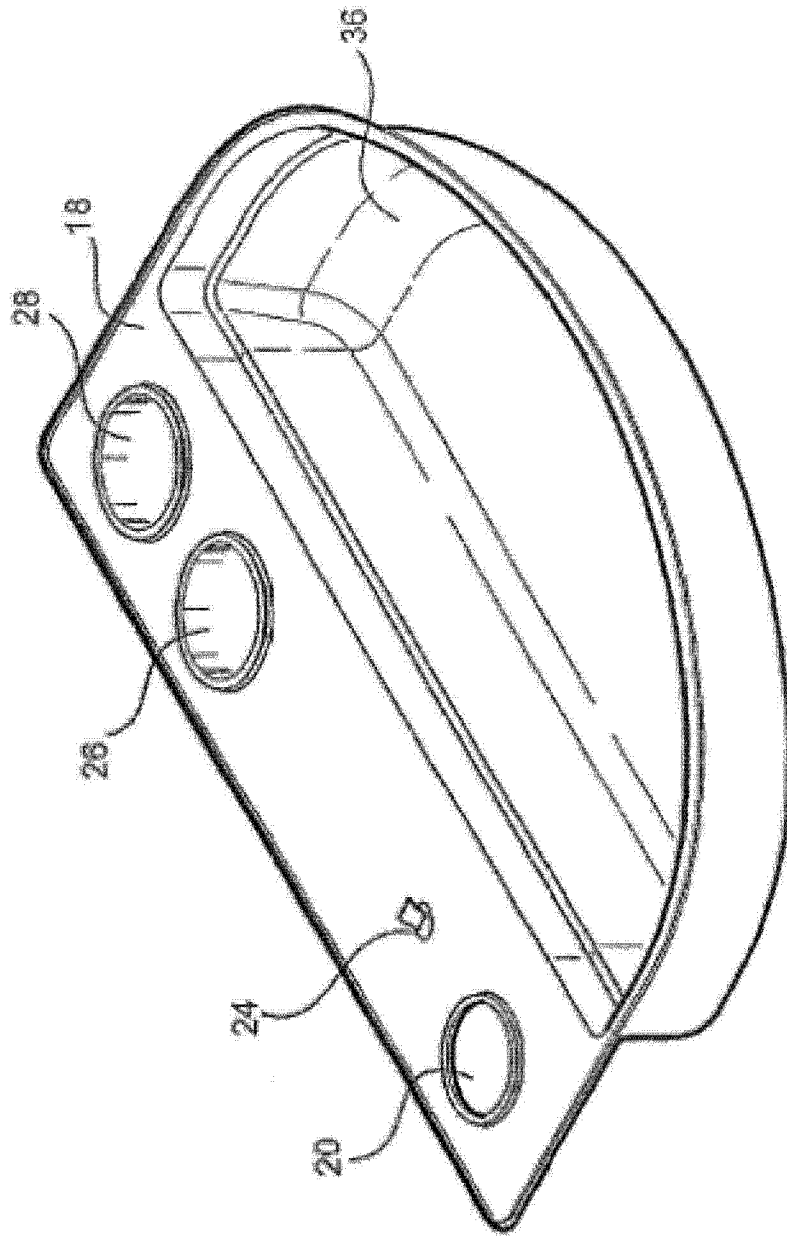


图 3A

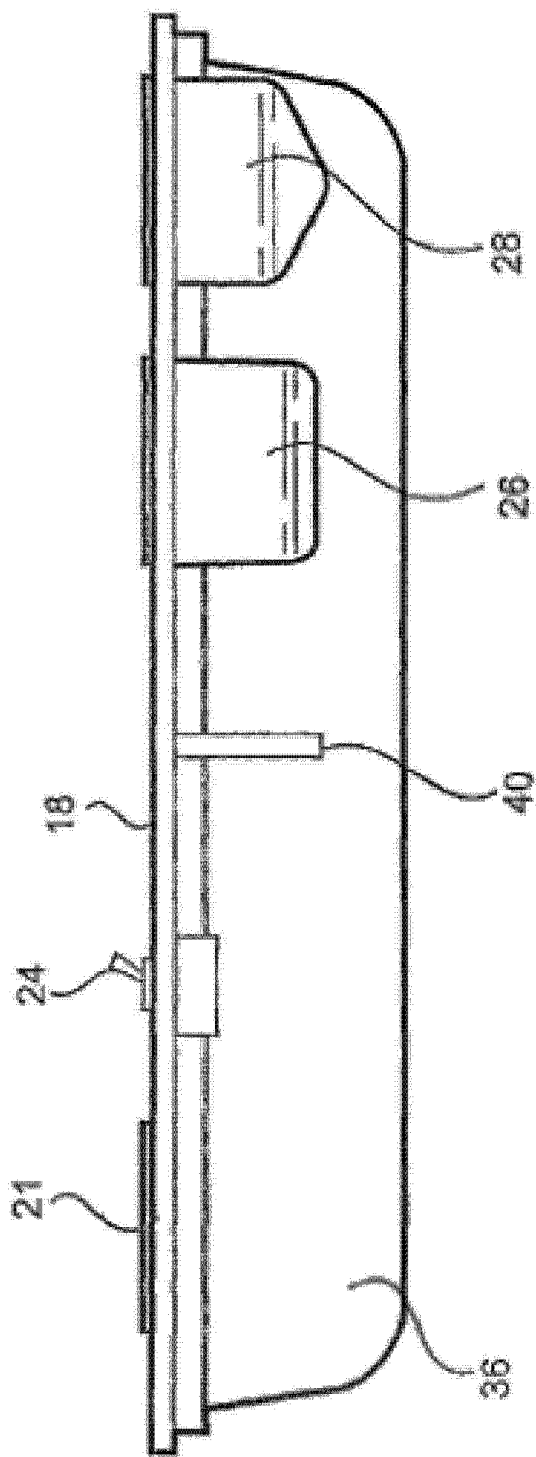


图 3B

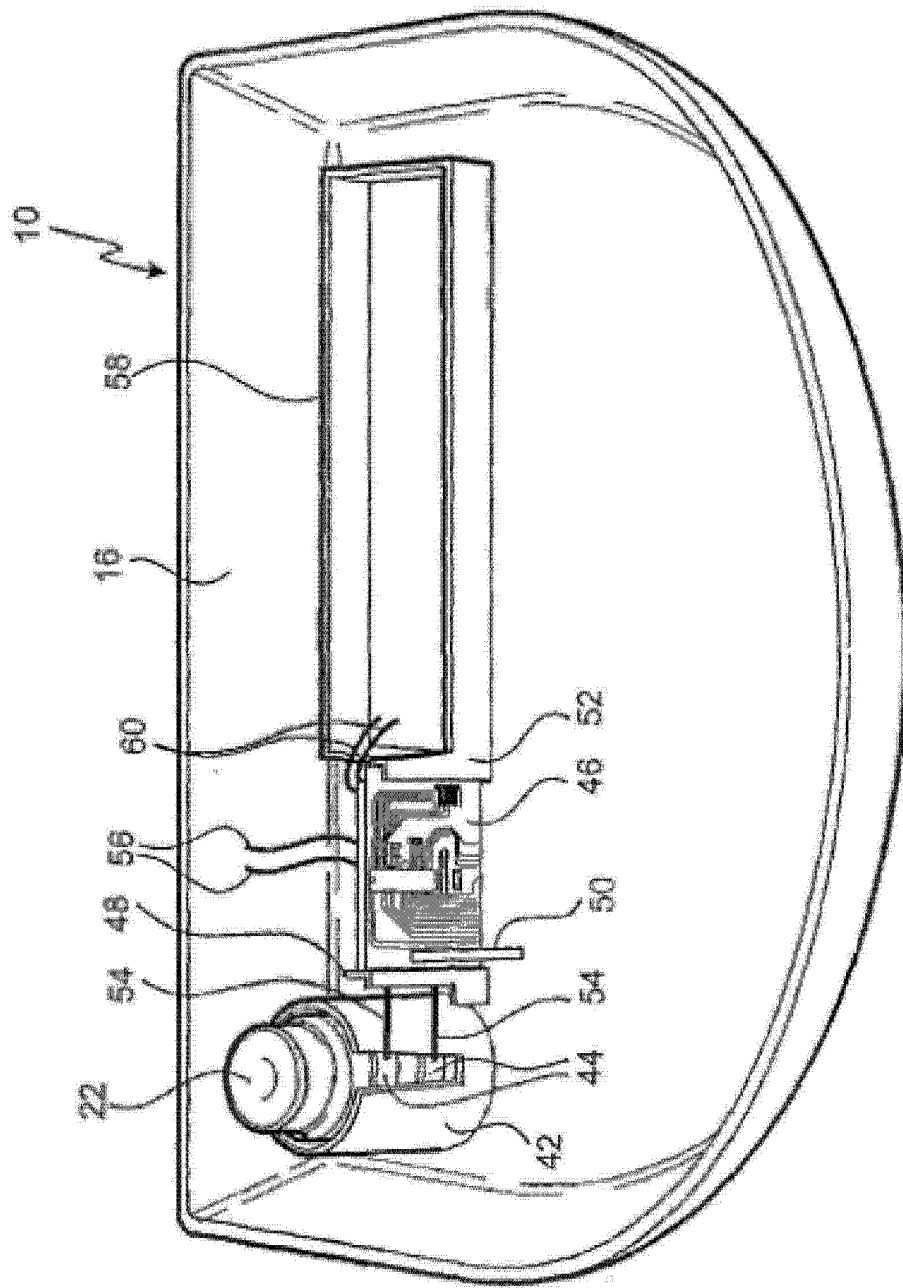


图 4

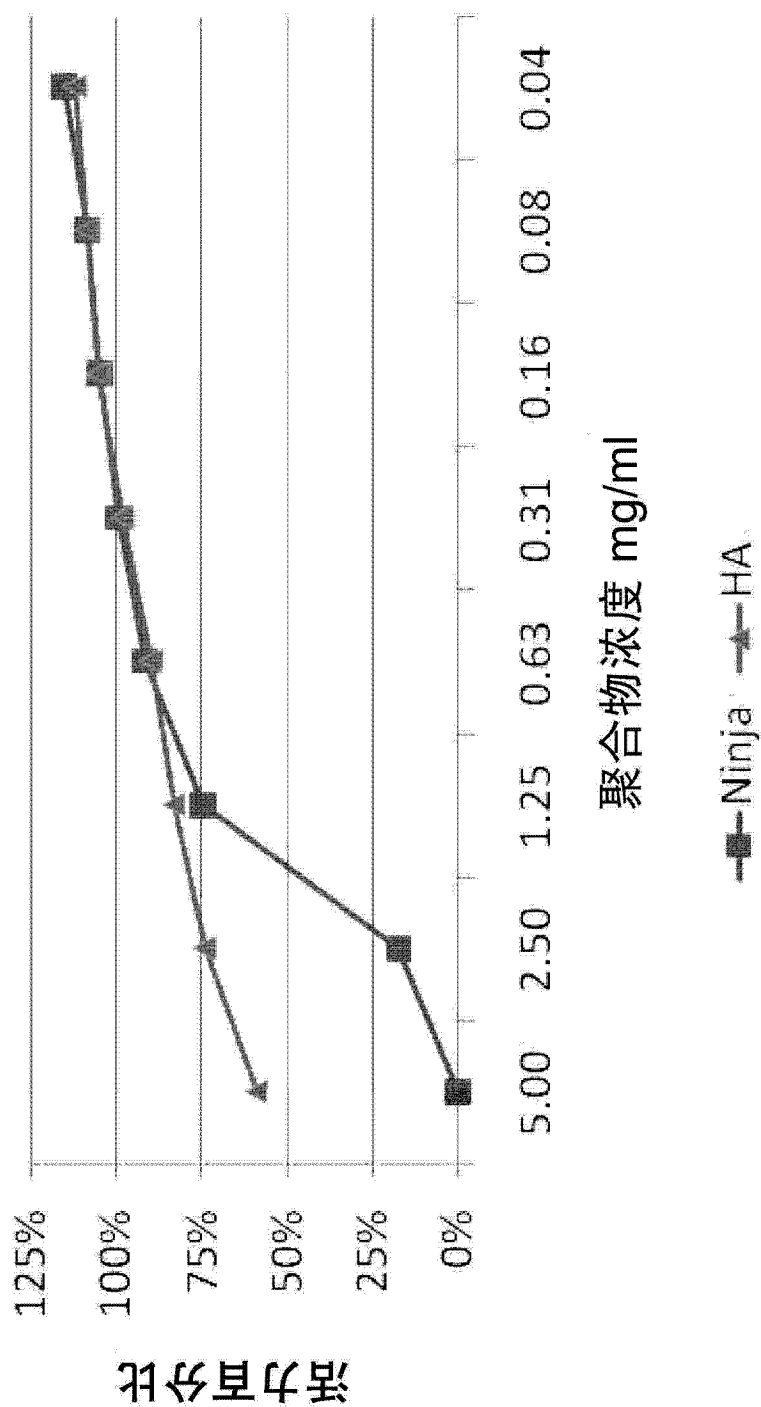


图 5

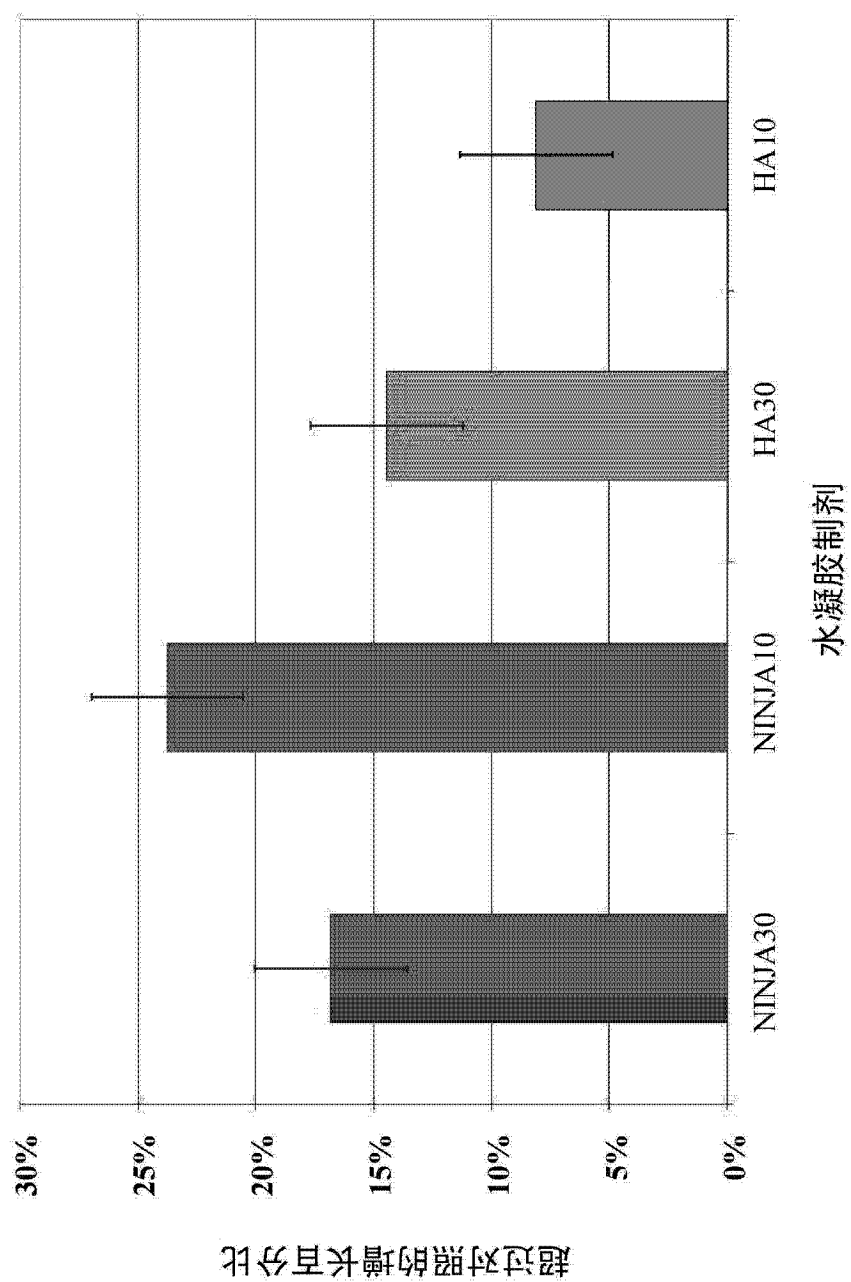


图 6

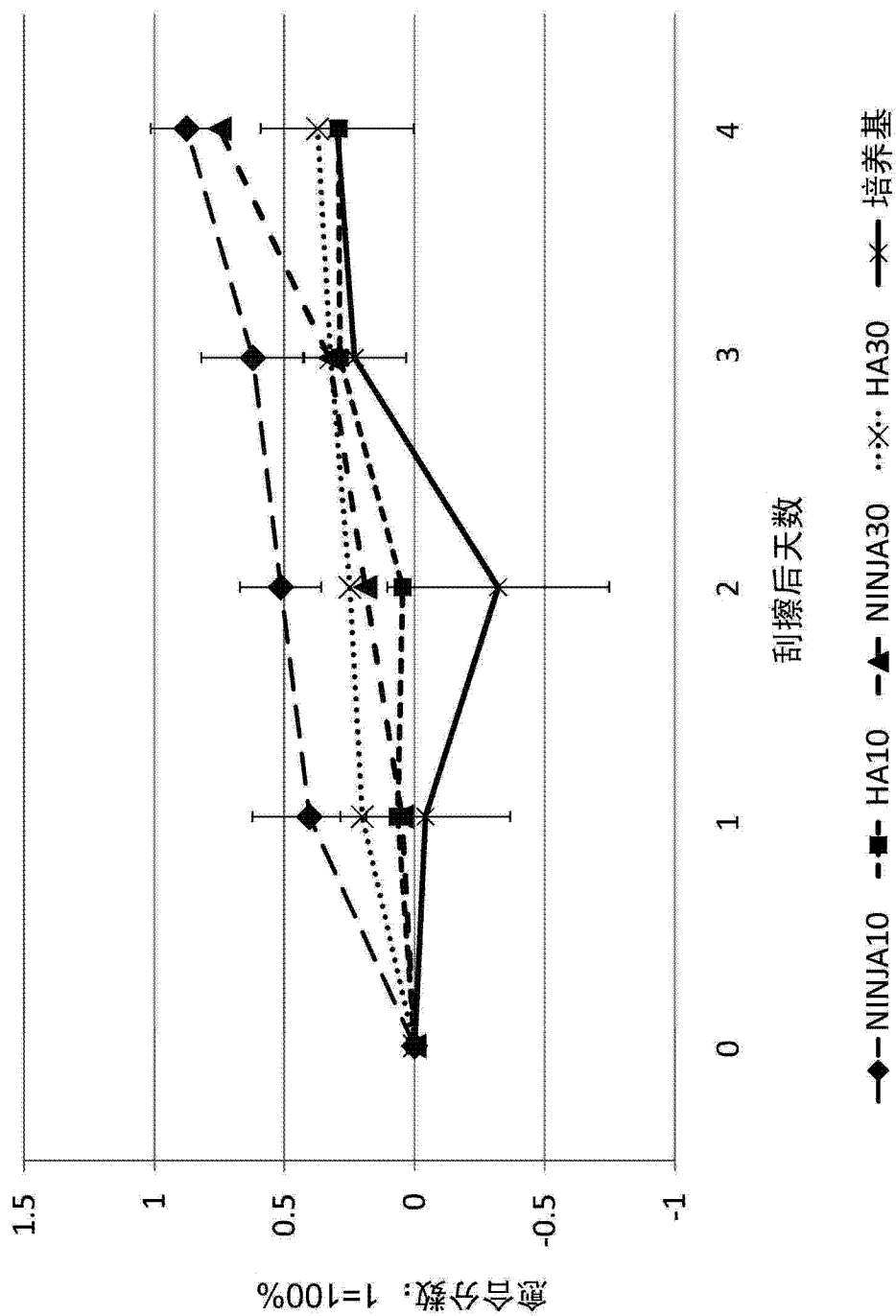


图 7