

双面影印

18/00

申請日期	90. 4. 26
案 號	90110005
類 別	A61B19/00

A4
C4

506827

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書		
一、發明 名稱	中 文	用於將上皮幹細胞展開在羊膜上的方法以及所得之移植物
	英 文	METHOD FOR EXPANSION OF EPITHELIAL STEM CELLS ON AN AMNIOTIC MEMBRANE AND RESULTING GRAFT
二、發明 人	姓 名	蔡 瑞 芳
	國 籍	中 華 民 國
	住、居所	台灣省台北市內湖區成功路4段350號2樓
三、申請人	姓 名 (名稱)	蔡 瑞 芳
	國 籍	中 華 民 國
	住、居所 (事務所)	台灣省台北市內湖區成功路4段350號2樓
	代 表 人 姓 名	

裝

訂

線

承辦人代碼：
大類：
I P C分類：

A6
B6

本案已向：

美 國 (地區) 申請專利，申請日期： 案號： ，☒有 ☐無主張優先權
2000,04,27 60/200,036

有關微生物已寄存於：_____，寄存日期：_____，寄存號碼：_____

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（1）

發明的背景

發明的領域：

本發明是有關於表皮幹細胞和輪部幹細胞缺損的治療，特別是提出一個方法和移植膜片來治療表皮幹細胞缺損的問題，如眼角膜表層之重建。

前言：

眼睛方面，正常眼表層是被覆著角膜、輪部和結膜上皮細胞。它們特有的細胞形態伴隨著眼角膜上層的一穩定之淚液層，維持眼表層的完整。嚴重的輪部上皮細胞受損，如化學性灼傷、燒傷、史蒂芬—強生二氏症候群、眼癬痕類天庖瘡、接受多次手術及冷凍治療在輪部上皮區域、配戴隱形眼鏡和嚴重的細菌感染等會導致輪部和表皮幹細胞的減少。輪部表皮幹細胞減少通常表現出角膜結膜組織化，血管增生，慢性發炎和纖維膜長入角膜表面造成角膜混濁。

當單側或雙側不對稱輪部幹細胞缺損時，過去建議可以接受自體輪部組織移植。但自體輪部組織移植最主要令人擔心的是這一或二個包括兩至三點鐘幅度區域的輪部移植片，必須取自健康的另一眼。曾有一篇報告指出可能對捐贈眼有潛在性的併發症。兔子動物實驗也顯示捐贈眼在移除輪部組織後假使再移除角膜中央上皮，可能會發生輪部細胞缺損的現象。佩列格里尼(Pellegrini et al)等人在一九九七年在Lancet雜誌(1997;349:990-993)上發表角膜上皮細胞被覆層在3T3纖維細胞培養層擴展後，移植使用於兩

五、發明說明（2）

個全輪部幹細胞缺損的病人做眼表層重建。

近來曾及金兩位作者於1995年角膜醫學雜誌(Cornea 1995;15:473-84)上發表對於全輪部上皮幹細胞缺損的兔子，接受當作基層替補的羊膜移植手術，對眼表層的重建有很好的效果。

發明總論

此發明中一例取自健康眼的一小片輪部組織切片包含輪部幹細胞和上皮細胞，在特殊處理過的羊膜上培養和擴展，利用羊膜作為基質幫助重建無發炎的輪部基質層，並用來培養及擴展輪部幹細胞和上皮細胞群。然後這片含輪部幹細胞和上皮細胞的羊膜培養出的產物，可用來移植到經去除表面及長入的纖維血管組織的眼表層上。除眼睛之外的身體其他部位受傷害，從鄰近組織取得的健康上皮細胞切片，經由上述方法所得的衍生物，具有相同或類似的生物學及組織學的特性，換言之是與受損區有組織相容性。

提出具體陳述

取自健康眼的輪部組織切片，來源可以從病人的另一眼或是另一個人而來。眼瞼使用優碘(providone-iodine)消毒後，在無菌狀況下用六十六號刀片(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)以層狀角膜切除術在輪部邊緣，切一塊約一至二毫米平方的輪部組織切片，內包含上皮細胞和部份角膜基質。這塊輪部組織，置於35毫米培養皿，內含一點五毫升培養液，每毫升含DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)，Ham's F12(1:1 ratio)，並加上0.5%DMSO

五、發明說明 (3)

(dimethyl sulfoxide)、2 μ g 老鼠的上皮生長素(epidermal growth factor)、1 μ g 牛胰島素、0.1 μ g 霍亂毒素和5%牛胚胎血清，並且立刻送到無菌層流通風櫥培養。

羊膜(來自於Bio Tissue,佛羅里達州,邁阿密)當作一培養系統，並且合併曾教授(Tseng SCG)在1997年美國眼科雜誌(Am.J.Ophthalmol)雜誌124:765-774頁論文和其美國專利第6,452,142號的方法來取得、處理並保存羊膜。使用前一天將羊膜基底膜朝上，平整鋪於培養皿，置於攝氏三十七度，百分之五二氧化碳和百分之九十五空氣及有溼氣的保溫箱。輪部組織培養如同先前論文提到的方法(曾和蔡教授於1998; IOVS;29:97-108以及蔡教授等人於1994;IOVS;35:3865-2875)，並作某些修正。參考這些論文，將含上皮幹細胞的輪部組織切片轉殖於羊膜的基底膜面上，並一起放在含一毫升培養液的35毫米培養皿做培養，培養液每兩天換一次，培養維持二至三週後，上皮幹細胞長成一細胞層被覆約直徑二至三公分的區域，可用來作角膜表層重建。如有其他組織需要修補的話，應用上述方法合成的上皮幹細胞層的羊膜片也可以運用。

接著以角膜修補為例子，利用眼球周邊切開術將輪部週邊結膜下疤痕和發炎組織去除至鞏膜層。以異體輪部組織移植方式(蔡和曾教授於1994年角膜雜誌13:389-400頁發表)，使用五十七號及六十六號刀片將角膜纖維血管組織以層狀角膜切除術去除。這些病人具備部份或全部輪部缺損但角膜中央正常，根據眼缺損所需移植輪部角膜部位大

五、發明說明（4）

小(從九十度至三百六十度)，取由已含培養完成之輪部上皮幹細胞羊膜移植片，當做一輪部角膜移植片或替代輪部組織，種至所需部位。如果是全輪部及角膜表面缺損，這新奇的移植片能夠當作全層角膜組織或相當輪部角膜組織或是當作層狀角膜整形術來覆蓋整片面積。

一適當大小之處理後羊膜基質培養上皮幹細胞層移植片蓋在整個缺損區域，可由螢光染色或用來培養原輪部組織切片鬆散附著在眼表層，知道朝上的上皮細胞方向是否正確。然後這個移植片縫在受損的區域上，使用十個0的尼龍線間斷的縫在角膜端，八個0的縫線(Vicryl)用在結膜端並要釘住上鞏膜層。整個過程為了保護上皮幹細胞層，使用喜隆玻璃替代物(Sodium hyaluronic(hyaluronate) acid-Healon瑞典法瑪西雅普強公司)來保護，以避免暴露、乾燥或者撕裂。手術最後可以從羊膜上把原先用來培養的輪部組織切片移除。假如移植片超過角膜大小，使用加壓包紮一天，然後隔天開始戴治療性隱形眼鏡一週，第一週給與局部類固醇眼藥水(prednisolone acetate 1%)，每天四次。第二週一天兩次，接下來兩到三個月內依手術週邊結膜發炎情形，給與每天兩次局部類固醇眼藥水(0.1% fluorometholone)。

在上文中，在特殊處理過的羊膜基底膜上做人工培育，兩三週後，上皮幹細胞在羊膜上長出形成一層大約2-3平方公分大小的區域，染色結果上皮幹細胞層在PAS及Alcian blue染色呈現陰性，羊膜上沒有細胞的地方染成紫

五、發明說明（5）

色。組織學檢查顯示在細胞層邊緣具有四到五層的幹細胞層，另外在最先培育的組織到邊緣之間有一到四層的細胞層。超微膠粒構造檢查顯示，呈現寬鬆的細胞間空隙和基底膜構造，在羊膜與基底細胞交界處有局部稠密的帶電基本物質。

關於本發明特定於治療眼睛之一具體例

至於這特殊療法的發明，平均追蹤時間為 14.8 ± 1.9 月，依據Snellen視力表顯示有不同程度的視力進步。所有眼睛在二到四天內，平均 2.7 ± 0.8 天，上皮細胞完全長好。重建的眼角膜表層顯示在一至二週內減少了發炎且血管形成消退，術後一個月，角膜變澄清並且表面平滑且可濡濕。

根據輪部角膜缺損區域，培養的上皮幹細胞在特別處理過的羊膜基質擴展，可以被當做一輪部替代物或輪部角膜替代物。

在兔子動物實驗，捐贈眼的輪部缺損，可能是因為拿掉相當大的一片輪部組織來作移植所造成，如此，這新方法和新發明的移植片，因為只須一小片的輪部組織，降低了捐贈眼潛在性的併發症的發生，並且這方法也能夠使用在兩側輪部組織不對稱缺損。自體上皮幹細胞在特殊先處理過的羊膜上進行體外擴展在二至三週內能提供足夠的上皮細胞來移植。根據此一發明，對於有兩側全輪部缺損的病人，其輪部組織移植來源可以從組織相容的來源或另一人或親戚獲得。

使用獨特處理過之羊膜鋪上自體上皮幹細胞來移植，

五、發明說明（6）

提供了所有單獨羊膜移植的優點，包括促進上皮細胞生長、減少發炎及疤痕形成，以及其下的角膜基質受破壞而需要的基層替補。更重要的是依據曾教授的方法來處理的羊膜，提供了一個讓上皮幹細胞可以保存及擴展的自然基層，形成足夠提供角膜重建的自體細胞量。此外，因為只有自體細胞被移植，在移植後並不需要免疫抑制系統。對於異體幹細胞利用上述的方法培育及移植，由於只有移植上皮幹細胞，沒有其他細胞被移植，排斥率也可能減少。

如同前文提到，使人工培育的上皮幹細胞可以擴展在羊膜移植片的這個獨特的方法，已經不只用於眼部手術，也可如修補皮膚燒傷部位，特別是小部位的移植。同樣的人工培育所需的切片來源，不限定是輪部組織。凡是包含健康上皮幹細胞及對接受移植部分具相容性均可。如果切片不能從身體部位獲得與接受部份相同之組織，也可選擇類似部位來做培養，就如同一眼受傷，可從另一健康眼提供捐贈者組織。

相信此獨一無二、有創意的手術移植片和其方法，在無需顯著的實驗證明下已經發現有足夠技術來做此發明。並依據說明來修正發明的精神及範圍。

四、中文發明摘要 (發明之名稱： 用於將上皮幹細胞展開在羊膜上的方法以)
及所得之移植物

表皮幹細胞的移植，體外培養於特殊處理的羊膜，而連同羊膜的這一手術移植物使得上皮幹細胞得以擴展。發明此一羊膜手術移植物，提供了一個簡單而又有效的方法來重建受創的組織，最好的例子如角膜組織。表皮幹細胞的來源可以是一非常小的移植體從健康的自體和異體組織切片獲得。其羊膜經過特殊處理使它的細胞死亡而細胞外基質得以保留。

英文發明摘要 (發明之名稱： METHOD FOR EXPANSION OF EPITHELIAL STEM)
CELLS ON AN AMNIOTIC MEMBRANE AND RESULTING
GRAFT

Transplantation of epithelial stem cells, cultured ex vivo on specifically treated amniotic membrane, yields, with that amniotic membrane, a surgical graft having expanded epithelial stem cells. The method of creating this graft and the graft itself provide simple and effective means to reconstruct damaged tissue, a preferred example being corneal tissue. The source of the epithelial stem cells can be a very small explant from healthy autologous and allogeneic tissue biopsy. The amniotic membrane is treated such that its extracellular matrix is maintained, but its cells are killed.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

六、申請專利範圍

第090110005號專利申請案申請專利範圍修正本

修正日期：91年5月

1. 一種手術移植物，其將被施用於一受損部位，該移植物包含：
一羊膜；及
擴展於該羊膜上之上皮幹細胞。
2. 如申請專利範圍第1項之手術移植物，其中該羊膜有一側為基底膜；
且該上皮幹細胞擴展在此基底膜側。
3. 如申請專利範圍第1項之手術移植物，其中該羊膜有一側為間質組織側，該間質組織側即為欲被施加於該捐贈部位之側。
4. 如申請專利範圍第1項之手術移植物，其中由一健康眼輪部切片所得到的輪部組織，是上皮幹細胞的來源。
5. 如申請專利範圍第4項之手術移植物，其中該輪部組織是自體的。
6. 如申請專利範圍第4項之手術移植物，其中該輪部組織是異體的。
7. 如申請專利範圍第6項之手術移植物，其中該輪部組織是從屍體獲得。
8. 如申請專利範圍第4項之手術移植物，其中該輪部組織約呈一為1-2毫米平方之表面積。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

9. 如申請專利範圍第 1 項之手術移植物，
其中該羊膜具有一基底膜側，
並且該上皮幹細胞在該羊膜基底膜側做體外培養。
10. 如申請專利範圍第 9 項之手術移植物，其中從輪
部組織取得的上皮幹細胞係在培養基中進行處理，
然後轉移到該羊膜上。
11. 如申請專利範圍第 10 項之手術移植物，其中羊膜
上有細胞及完整的細胞外基質，並且
在體外培養之前，羊膜上的細胞被殺死，但細胞外
基質的完整性被保持。
12. 如申請專利範圍第 11 項之手術移植物，其中該擴
展的上皮幹細胞是從一健康眼取得當做它們原始的
輪部外植體組織。
13. 如申請專利範圍第 12 項之手術移植物，其中該受
捐部位為眼部，以及
該移植物施加至該受捐部位後，該輪部外植體組織
並不需要當做該移植物之一部份。
14. 如申請專利範圍第 12 項之手術移植物，其中該移
植物為經切割的輪部角膜移植物，俾供用於具部分
到全部輪部角膜缺損但中央角膜正常的受捐部分。
15. 如申請專利範圍第 12 項之手術移植物，其中該移
植物界定出一全層角膜組織，俾供用在全輪部和角
膜表面損壞的受捐部位。
16. 如申請專利範圍第 1 項之手術移植物，其中該上

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

皮幹細胞之來源為一取自與受捐部位具生物性相關性及具組織相容性之健康部位的活組織切片。

17. 一種製造供用於受捐部位的手術移植物之方法，該方法包含以下步驟：

(a) 將一活組織切片放在羊膜上，其中該活組織切片包含有上皮幹細胞；以及

(b) 使該上皮幹細胞在羊膜上擴展。

18. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該羊膜有一基底膜側；以及

該置放步驟包括將該外植體載置於該基底膜側上。

19. 如申請專利範圍第 18 項之方法，其中載置後致使經擴展之上皮幹細胞面朝受傷害之部位而定位。

20. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該該上皮幹細胞係源自一健康眼部輪部活組織切片。

21. 如申請專利範圍第 20 項之方法，其中該步驟係在一異體眼睛上進行。

22. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該獲得組織切片之步驟係取自於具組織相容性之捐贈部位。

23. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中使細胞能在羊膜擴展的步驟包括：在置放在羊膜之前，先將該外植體在培養基內進行培養。

24. 如申請專利範圍第 23 項之方法，其中該培養步驟是體外培養。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

25. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該羊膜上有細胞及細胞外間質，以及使細胞能在羊膜擴展的步驟包括：在置放步驟前，先殺死羊膜上的細胞但維持它的細胞外間質。
26. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中使細胞能在羊膜擴展的步驟包括：培養該羊膜及其外植體，歷時一段足使該等上皮幹細胞能擴展成一直徑大約 2-3cm 的區域的時間。
27. 如申請專利範圍第 26 項之方法，其中該培養包括：使用培養液，大約每兩天換一次，歷時三週以上。
28. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其包括：在移植手術性地固定至該受損部位後，將該外植體從羊膜移除。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線