



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

215 534 B

(21) A bejelentés ügyszám: 1834/91

(22) A bejelentés napja: 1991. 05. 31.

(30) Elsőbbségi adatok:

MI 20513/90 1990. 06. 01. IT

(51) Int. Cl.⁶

A 61 F 2/10

C 12 N 5/06

B 26 F 1/02

B 26 F 1/31

(40) A közzététel napja: 1992. 09. 28.

(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1999. 01. 28.

(72) Feltalálók:

Calderini, Gabriella, Carrara San Giorgio (IT)

Della-Valle, Francesco, Padova (IT)

Rastrelli, Alessandro, Padova (IT)

Romeo, Aurelio, Róma (IT)

(73) Szabadalmas:

FIDIA S.p.A., Abano Terme (IT)

(74) Képviseelő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54)

Biokompatibilis, perforált membránok, eljárás előállításukra, hámszövet sejtek in vitro növekedésének elősegítésére való alkalmazásuk és az így kapott mesterséges bőr

KIVONAT

A találmány olyan, természetes, szintetikus vagy fél-szintetikus eredetű anyagokból felépülő membránokra és előállítási eljárásukra vonatkozik, amelyek vastagsága 10–500 µm, és jellemző tulajdonságuk, hogy egymástól állandó, 50–1000 µm távolságban lévő, 10–1000 µm méretű, sorokba rendezett lyukakat tartal-

maznak; a lyukak előállítása mechanikus vagy hőlézerrel vagy ultraibolyasugár-berendezéssel történik; és hordozóként hámszövetsejtek in vitro tenyésztésére alkalmasak. A találmány a membrán alkalmazásával előállítható mesterséges bőrre is vonatkozik.

Találmányunk új biokompatibilis, perforált membránokra, eljárási előállításukra, hámszövetsejtek in vitro növekedésének elősegítésére való alkalmazásukra és az így kapott mesterséges bőrre vonatkozik.

A sérüléses vagy patológiai eredetű bőrhányosságok helyreállítása általában valamilyen donor területről származó bőrbeültetést alkalmazó úgynevezett autotranszplantációs eljárással történik. Nagyobb területek befedéséhez az ilyen beültetéseket sebészeti eljárásokkal növelik. Ilyen eljárás például a J. Mauchohal J. Plast által a *Surgey*, 42, 88–91 (1989) irodalmi helyen ismertetett hálóoltás. Ezek az eljárások általában csak kis mértékű méretkárosodással együtt járó, megfelelő gyógyulási folyamatot eredményeznek. Ha azonban a kezelt beteg idős vagy súlyosan leromlott állapotú, az eredmények nem kielégítőek, számos nehézség lép fel, és ezek a hátrányok olyan mértékűek, hogy a fenti eljárások nem alkalmazhatók. Emellett ezek az eljárások nem teszik lehetővé valamely donorszövet több, mint 10-szeresére való növelését.

Az ilyen károsodások helyreállítására irányuló sebészeti törekvések fordulópontja volt a keratinociták in vitro tenyésztési eljárásának kifejlesztése (J. Rheinwald és H. Gree, *Cell*, 6, 331–344, 1975), amely lehetővé tette a tenyészetek in vitro növelését, és ezáltal potenciálisan sérült felületek beborítására való felhámsejt membránok kialakítását.

Ezt az eljárást a klinikai gyakorlatban elsősorban égési sérülteknél elterjedten alkalmazzák (amint ezt G. G. Gallico és munkatársai által az *M. Engl. J. Med.*, 311, 448–451, 1984 irodalmi helyen megjelentetett közleményben ismertetik), de az eljárásnak számos hátránya van. Ilyenek például az ojtási hiányosságok, a hámszövetsejtek törékenysége és ennek következtében a sebész általi kezelésének nehézsége, a megfelelő mennyiségű hámszövettenyészeteknél szükséges az ojtás pontos irányítása; ez a művelet különben in vitro tenyésztett hámszövetfilm törékenysége miatt kockázatos.

A problémák másik megközelítését ismertetik Yannas és munkatársai a *Science* 215, 174–176 (1982) irodalmi helyen. Ők olyan felszívódó por alakú szövetet alkalmaznak, amely kollagén és glükóz-amino-glikán (GAG) együttes kicsapásával keletkezett terméket, elsősorban kondroitin-6-szulfátot tartalmaz, és egy vékony szilikon membránfilm borítja. Az ilyen anyagok jellemző tulajdonsága, hogy egymással a szivacshoz hasonló kapcsolatban lévő, nem szabványos pórusokat tartalmaznak.

Zang és munkatársai a *Burns*, 12, 540–543 (1986) kiadványban egy olyan, mikrobőrojtás néven ismert eljárást javasolnak, amelyben nagyon kis bőrrészeket autoojtásnak vetnek alá, amelyek sima hámszövetté fejlődnek tovább. Az eljárás alkalmazásával a maximálisan elérhető donor/befedendő felület aránya 1 : 15.

S. Boyce és J. Hansborough a *Surgey*, 103, 21–431 (1988) irodalmi helyen olyan kollagénből és GAG-ból előállított membránokat ismertetnek, amelyek elősegítik, hogy felületükön keratinociták alakuljanak ki, és ezáltal az anyag felületi porozitása csökkenjen. A membránfelületen kialakuló felhámtenyészet fejlődé-

sét egy folytonos nem porózus réteg is akadályozza. A bőrképző anyagok ojtás kidobását eredményező anti-gén hatása még nem teljesen bizonyított.

5 Találmányunk célkitűzése olyan biokompatibilis membránok előállítási eljárásának kidolgozása, amelyek lehetővé teszik olyan in vitro keratinocitatenyészetek kialakítását, amelyek a korábban ismert eljárásokban szükséges időnél sokkal kevesebb idő alatt fejlődnek ki. A találmányunk szerinti eljárással előállított membránok nagyon nagy előnye, hogy azonos vagy különböző hámszövetsejt-telepek nagyon rövid idő alatt (6–10 nap) kifejlődését teszik lehetővé. A hagyományos eljárásokkal előállított in vitro felhámtenyészetek időigénye általában 20–40 nap.

15 Ez a rövid idő a mesterséges bőr kialakítási idejét nagyon lecsökkenti, és ez lehetővé teszi, valamely bőrbeültetést igénylő terület nagyon gyors befedését, és ezáltal elkerülendő a túl sok szerves folyadék veszteség és a fertőzés kockázata.

20 Találmányunk másik célkitűzése olyan, biokompatibilis membránok előállítási eljárásának kidolgozása, amellyel rövid idő alatt kiváló donor felület/befedendő felületarány elérését biztosító keratinocita tenyészetek állíthatók elő. Ez az arány (1 : 20)–(1 : 200), amely jóval nagyobb, mint a hagyományos eljárásokkal elérhető.

25 Találmányunk további célkitűzése olyan biokompatibilis és előnyösen biológiailag felszívódó mesterséges bőr előállítására alkalmas eljárás kidolgozása, amely rövid idő alatt képződik, erős, a beültetéskor könnyen kezelhető, emellett a tenyésztartályban kialakult eredeti irányától függetlenül alkalmazható a sérült területre, és könnyen tárolható. Ebben a vonatkozásban a találmányunk szerinti eljárással előállított mesterséges bőr fagyasztással könnyen konzerválható, ami lehetővé teszi a bőrszövet, közöttük a nem azonos bőrszövetbankok létrehozását. A fagyasztva konzerválás, ha legalább két ciklusban végzik, a hámszövetsejtekkel kifejezhető felületi antigének antigén potenciálját is csökkentik.

40 A találmányunk szerinti eljárással előállított természetes, szintetikus vagy félszintetikus eredetű, biokompatibilis membránok vastagsága 10–500 µm, előnyösen 20–40 µm, és jellemző tulajdonságuk, hogy egymástól állandó, 50–1000 µ, előnyösen 80 µm távolságban lévő, állandó, 10–1000 µm, előnyösen 40–70 µm méretű, sorokba rendezett lyukakat tartalmaznak. Ezek a membránok tartalmazhatnak biokompatibilis és előnyösen biológiailag felszívódó, természetes eredetű anyagokat, mint például kollagént vagy kollagén és glükóz-amino-glikán kettős csapadékot, cellulózt, gélesített poliszacharidokat, mint például kitint, kitozánt, pektineket vagy pektinsavakat, agart, agrózt, xantangumit, gellant, alginsavat vagy alginátokat, polimannánokat vagy poliglukánokat, keményítőket vagy természetes gumikat, amelyeket önmagukban vagy egymással vagy szintetikus és félszintetikus eredetű műanyagokkal keverve, megfelelő kicsapó vagy gélképző szerek, mint például fém sók, polikationok vagy polianionok jelenlétében alkalmazhatunk.

55 A találmány további tárgya mesterséges bőr, amelyre jellemző, hogy egy biokompatibilis hordozómembránt tartalmaz, ahol a membrán természetes, szintetikus

vagy felszintetikus anyagokból épül fel, vastagsága 10–500 µm, előnyösen 20–40 µm, és egymástól állandó 50–1000 µm távolságban lévő állandó 10–1000 µm méretű, sorokba rendezett lyukakat tartalmaz, valamint a lyukakban aktív szaporodási állapotban lévő, azonos vagy különböző hámszövetsejteket tartalmaz.

A membránok tartalmazhatnak még szintetikus eredetű biokompatibilis, előnyösen biológiailag felszívódó anyagokat, mint például polilaktonsavat, poliglükolsavat vagy ezek kopolimerjeit vagy származékait, polidioxánokat, polifoszfózanokat, poliszulfonokat vagy poliuretánokat vagy természetes polimerek felszintetikus származékait, mint például térhálósító szerrel, mint például dialdehidekkel, prekursoraikkal, dikarbonsavakkal vagy halogénszármazékaikkal, diaminokkal térhálósított kollagén vagy cellulóz-, alginsav-, keményítő-, kitin-, kitozán-, gellán-, xantén-, pektin-, pektinsav-, poliglukon-, polimannán-, agar-, agaróz-, természetes gumi vagy glükóz-amino-glikán-származékot is.

A membránok tartalmazhatnak még akár biológiailag nem lebomló szintetikus polimereket, mint például szilikon-, szilán- vagy sziloxángumikat, fluorpolimereket, mint például poli(flúor-etilén)-poli(flúor-propilén)-t, poli(flúor-éter)-eket, polisztirolt, poli(vinil-klorid)-ot, poliakrilátot vagy származékát, poli(hidroxil-akrilát)-ot, poli(hidroxil-metakrilát)-ot, karboxil-vinil polimereket és származékait, maleinsav-anhidrid polimereket és származékait, poli(vinil-alkohol)-t és származékait, polietilént és polipropilént is.

A membránok előnyösen hialuronsav felszintetikus származékot, elsősorban észterszármazékot, mint például a 0216 453 számú európai közrebocsátási irat 6., 7. és 24. példájában ismertetett észterszármazékokat is tartalmaznak. Ezek olyan biokompatibilis és biológiailag lebontható anyagok, amelyek az alkalmazás helyén a szövetfelújító eljárásokban jól ismert hialuronsavat szabadítanak fel. A találmányunk szerinti eljárással előállított anyagok további, nagyon fontos jellemzője, hogy alkalmazásukkor nem lép fel az intolerancia jelensége, azaz nem immunogén.

A találmányunk szerinti eljárással előállított, fentiekben ismertetett anyagokat tartalmazó, biokompatibilis membránok vastagsága 10–500 µm, előnyösen 20–40 µm, és jellemző tulajdonságuk, hogy egymástól állandó, 50–1000 µm, előnyösen 80 µm távolságban lévő, állandó, 10–1000 µm, előnyösen 40–70 µm méretű, sorokba rendezett lyukakat tartalmaznak. Az egy vagy több, fentiekben ismertetett anyagot tartalmazó, folytonos biokompatibilis membránok az irodalomban ismert, hagyományos eljárásokkal állíthatók elő, elsősorban az alábbiakban ismertetett művek szerint:

1. „Reconstructed skin from Co-cultured Human Keratinocytes and Fibroblasts on a Chitosan Crosslinked Collagen-GAG matrix” [L. Shahabeddin és munkatársai, Journal of Material Science, Materials in Medicine 2, 222–226. oldalak (1991)].

2. „Burn Wound with Cultured Autologous Keratinocytes and Fibroblasts Attached to a Collagen Glycosaminoglycan Substrate” (J. F. Hansbrough és munkatársai, JAMA SEA, 1989. december).

3. „Morphologic aspects of different cells types during in vitro biocompatibility testing of PLA: a preliminary study” (A. Van Sliedgret és munkatársai, Clinical Implant Materials Advances in Biomaterial, 9. kötet, 213–218. oldal).

4. „A new cell seeded Artificial Skin for the treatment of deep dermal wounds” (G. J. Beumer és munkatársai, Clinical Implant Materials Advances in Biomaterials, 9. kötet, 169–174. oldal).

5. „Porous biomedical material based on mixtures of polylactide polyurethanes [Silwester Goglewski és munkatársai, Makromol. Chem. Rapid Comm., 3, 839–845 (1982)].

A találmány megvalósításához alkalmazható további ismert anyagok közül a következőket soroljuk fel:

1. Goretex regeneratív anyagok, melyek lényegében politetrafluor-etilén (PTFE)-termékek, melyeket széles körben alkalmaznak klinikai és biológiai területeken.

20 2. ICN Katalógus (1992–1993) 114. oldalán, 150 207 szám alatt hivatkozott polihidroxi-metakrilát, melyet széles körben alkalmazunk sejtkultúrák szubsztrátjaként.

25 3. Szintetikus polimerek, mint például polietilén, polipropilén, poli(tetrafluor-etilén), poli(vinil-klorid), poli(vinil-alkohol), poli(dimetil-sziloxán), melyeket beültethető eszközök előállítására alkalmaznak, és így a megfelelő biokompatibilitással rendelkeznek [„Postheric and biomedical devices” (Kirt Othmer Encyclopedia of Chemical Technology Third Edition, 19. kötet, 275–313. oldal)].

30 4. Mesterséges bőr előállítására alkalmas szilikon-gumi (lásd a fent említett mű 289. oldalán a 23. és 24. sorokat).

35 5. Önmagában vagy más természetes eredetű polimerekkel keverékben alkalmazott kollagén [ICN Katalógus (1992–1993) 114. oldalán, 158 223-tól 158 225-ig hivatkozva].

40 6. Mikrobiológiai és bakteriológiai felhasználásra alkalmas agar [ICN Katalógus (1992–1993) 32. oldalán, 150 178 szám alatt hivatkozva].

45 A találmány szerinti perforált biokompatibilis membránok hagyományos perforáló eszközökkel, mint például megfelelően kialakított lyukasztógéppel vagy olyan hő- vagy ultraibolya lézerek alkalmazásával állíthatók elő, amelyek a membránon a kívánt méretű és távolságú lyukak előállítására alkalmas frekvenciasávban működnek.

50 A következő példákat a találmányunk szerinti eljárás részletes ismertetésére mutatjuk be.

1. példa

Egy 12×12 cm-es négyzet alakú, 25 µm vastag, 100%-ban észterezett hialuronsav-benzil-észter-membránt (0216 453 számú európai közrebocsátási irat) perforálunk egy számítógép-vezérlésű, 273 µm-es frekvenciával működő UV-lézer berendezéssel a következő körülmények között:

üzemi frekvencia 200 Hz;

60 kimenő energia 250 mJ.

Megfelelő szitarendszerrel az 1a. és 1b. ábrán bemutatott, egymástól 80 μm távolságú, 40 μm átmérőjű lyukakat kapunk.

A találmányunk szerinti eljárással előállított, perforált, biokompatibilis membránok előnyösen alkalmazhatók in vitro hámszövetsejt, elsősorban keratinocitatenyészetek létrehozásához.

Ebből a célból a membránok sejtenyésztő edények aljához, fémhálókhoz, valamint bármilyen egyéb, sejtenyésztéshez alkalmas szerkezethez rögzíthetők, amelyek a levegő/tenyészközeg határfelületén, steril vazelin, steril szilikon vagy egyéb ragasztórendszer vagy biológiai anyagok, mint például kollagén, fibrin vagy fibrinnyv alkalmazásával lehetővé teszik a sejtenyésztés kialakulását.

Ezek a membránok a hámszövetsejtek önmagában vagy egyéb sejtekkel, mint például az idézett irodalmi helyén ismertetett besugárzott fibroblasztal együtt megvalósított tenyésztéséhez megfelelő tenyészközegben inkubálhatjuk úgy, hogy fejlődés és lyuktelep kialakulására rendelkezésre álló idő alatt nem változnak meg a membránok adott alkalmazási területen megfelelő kezelhetőségét és szilárdságát biztosító mechanikai tulajdonságok.

A találmányunk szerinti eljárással előállított membránok vizsgálatát a következőkben ismertetésre kerülő eljárásokkal végezhetjük.

2. példa

A következő vizsgálatot annak bemutatására végeztük, hogy a hialuronsavszármazék membránok semmilyen gátló hatást nem fejtenek ki a humán keratinocitatenyészetek fejlődésére.

100%-ban észterezett hialuronsav-benzil-észtert (0216453 számú európai szabadalmi bejelentés) tartalmazó, steril körülmények között 2×2 cm-es négyzet alakúra vágott, HYAFF 11 jelű membránokat steril szilikon segítségével a tenyészedények aljára helyeztük. A membránokba 4×10^5 , a második fázisban letálisan besugárzott 3T3 fibroblaszt sejtek jelenlétében 2×10^5 humán keratinocitát oltottunk.

A kapszulákat 5 térfogat%-os szén-dioxid-atmoszférában, 37 °C-on, 2 órán át inkubáltuk, hogy a sejtek az anyaghoz tapadjanak. A kapszulákba ezután 5 ml CEC tenyészközeg, amely (Green H. és munkatársai a J. Proc. Nation. Acad. Sci., 76, 5665–5668, 1979 irodalmi helyen ismertetnek) adtunk, majd ismét inkubáltuk. A tenyészközeg minden 2 napban cseréltük. A beoltás után 9 nappal a sejteket tripszinnel kezeltük, majd megszámloltuk. Mindegyik kísérletet két ismétléssel végeztük.

A kapott eredményeket a következő táblázatban foglaljuk össze:

	Humán keratinocita- szám lemezenként ($\times 10^5$)	Gátlás [%]
Kontroll	27	0
HYAFF 11 membrán	27	0

Az eredmények azt mutatják, hogy az alkalmazott bioanyag nem gátolja a keratinocitatenyészetek fejlődését.

3. példa

Az 1. példában ismertetett eljárással előállított perforált, biokompatibilis membránok alkalmazása humán keratinocitatenyészetek létrehozására.

100%-ban észterezett hialuronsav-benzil-észtert (0216453 számú európai közrebocsátási irat) tartalmazó, 3×3 cm-es négyzet alakú, HYAFF 11 jelű membránokat steril vazelin segítségével 6 cm-es átmérőjű Petri-csésze aljához ragasztottunk. A membránokra lemezenként 700 000 sejt koncentrációban letálisan besugárzott 3T3 fibroblaszt sejteket oltottunk a 2. példában ismertetett körülmények között. A 3T3 sejtek feltapadása után, azaz 24 óra múlva egy második tenyészetből származó humán keratinocitaszuszpenziót adtunk a lemezekre cm^2 -enként 38 000 sejt koncentrációban. A tenyészkörülmények a 2. példában ismertetettekkel azonosak voltak. A keratinocitatenyésztés fejlődését fáziskontraszt mikroszkóp alkalmazásával naponta megfigyeltük. A membránokon látható volt a beoltott hámszövetsejtek fejlődése; a sejtek a beoltás után 8–10 nappal összetömörültek.

Különösen jelentős az a tény, hogy már a beoltás utáni második napon számos lyuk tartalmazott keratinocitát, amelyek a lyuk belsejében sokkal jobban fejlődtek, mint a felületen, és a 6. nap körül teljesen megtöltötték a lyukakat (2., 3. és 4. ábra).

A második nagy jelentőségű tény, hogy a lyukakban kialakuló sejtek történeti fejlődésvizsgálatok tapasztalt bazaloid megjelenés, amit az ábrákon (5. és 6. ábra) látható gyakori sejtosztódás mutat, és a sejtek nagymértékben reprodukálódó vitalitását bizonyítja. Ennek igazolására specifikus antitestek alkalmazásával megvalósított immunohisztokémiai vizsgálatot (MaG) végeztünk.

A lyukakban tenyésztett hámszövetsejtek teljes egészében aktív szaporodási állapotúnak tekinthetők, és ezért beültetendő területeken hatásosan alkalmazhatók.

A találmányunk szerinti mesterséges bőrt a fentiekben ismertetett eljárásokkal állíthatjuk elő, és ennek megfelelően az ilyen természetes, szintetikus vagy félszintetikus eredetű anyagokból felépülő hordozómembránok biokompatibilisak és előnyösen biológiailag felszívódó tulajdonságúak, vastagságuk 10–500 μm , előnyösen 20–40 μm , és jellemző tulajdonságuk, hogy egymástól állandó, 50–1000 μm távolságban lévő, állandó, 10–1000 μm méretű, sorokba rendezett lyukakat, valamint a lyukakban aktív szaporodási állapotban lévő azonos vagy különböző keratinocita mikrokolóniákat tartalmaznak.

Ez a mesterséges bőr a kezelendő területen könnyen alakítható, és mechanikai tulajdonságai könnyen kezelhetővé és varrhatóvá teszi. A sérült területre való beültetés után a keratinocita mikrokolóniák gyorsan növekvő hámszövetmagot képeznek, majd rövid idő alatt teljesen behamosítják a beültetett területen.

A beültetést úgy végzik, hogy a mesterséges bőrt kivesszük a tenyészedényből, steril fiziológiai oldattal eltávolítják a tápközegnyomokat, majd az elhelyezés irányának különleges figyelembevétele nélkül a kezelendő területre helyezik. Az elhelyezési irány figyelembevétele azért nem szükséges, mert ez a mesterséges bőr a hagyományos keratinocitatenyészetekkel ellentét-

ben a két oldala közül bármelyik oldalon egyaránt hatáson alkalmazható.

A találmányunk szerinti eljárással előállított mesterséges bőr traumatikus eredetű, például égésből származó, sebészeti eredetű, például plasztikai eltávolításból származó vagy betegség eredetű, például pangó fekélyből vagy felfekvésből származó károsodások, akár nagy mértékű testfelületi károsodások befedésére alkalmas.

4. példa

Egy 12×12 cm-es négyzet alakú, 25 µm vastag, 100%-ban észterezett alginsav-benzil-észter-membránt (251 905 számú európai közrebocsátási irat) perforálunk egy számítógép-vezérlésű, 273 µm-es frekvenciával működő UV-lézer berendezéssel a következő körülmények között:

üzemi frekvencia 200 Hz;

kimenő energia 250 mJ.

Megfelelő vizsgálórendszerrel ellenőrizve azt találtuk, hogy egymástól 100 µm-es távolságban lévő 80 µm átmérőjű lyukakat kaptunk.

5. példa

Egy 12×12 cm-es négyzet alakú, 35 µm vastag, 100%-ban észterezett gellán-benzil-észter-membránt (518 710 számú európai közrebocsátási irat) perforálunk egy számítógép-vezérlésű, 273 µm-es frekvenciával működő UV-lézer berendezéssel a következő körülmények között:

üzemi frekvencia 200 Hz;

kimenő energia 250 mJ.

Megfelelő vizsgálórendszerrel ellenőrizve azt találtuk, hogy egymástól 80 µm-es távolságban lévő 60 µm átmérőjű lyukakat kaptunk.

6. példa

Az 1. példában leírt módon a szintén ott leírt kiindulási anyagból a következő paraméterekkel rendelkező membránt állítottuk elő:

méret: 120×120 mm²,

száraz film vastagsága: 18–24 µm,

nedves film vastagsága: 40–60 µm,

kilyuggatott terület: 86×76 mm²,

40 µm-es lyukak száma: 151 000,

a 40 µm-es lyukak közti távolság: 80 µm,

1000 µm-es (1 mm-es) lyukak száma: 72,

az 1000 µm-es lyukak közti távolság: 1000 µm.

Az így előállított membránból a 3. példa szerint készített mesterséges bőr különösen előnyösnek mutatkozik a gyakorlatban, mivel a nagyobb lyukakon a nemkívánatos sejtnedvek is távozhatnak.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Biokompatibilis membránok, melyek természetes, szintetikus vagy félszintetikus eredetű anyagokból épülnek fel, és vastagságuk 10–500 µm, előnyösen 20–40 µm, *azzal jellemezve*, hogy egymástól állandó,

50–1000 µm távolságban lévő, állandó, 10–1000 µm átmérőjű, sorokba rendezett lyukakat tartalmaznak.

2. Az 1. igénypont szerinti biokompatibilis membránok, *azzal jellemezve*, hogy 40–70 µm méretű lyukakat tartalmaznak.

3. Az 1. igénypont szerinti biokompatibilis membránok, *azzal jellemezve*, hogy egymástól 80 µm távolságban lévő lyukakat tartalmaznak.

4. Az 1. igénypont szerinti biokompatibilis membránok, *azzal jellemezve*, hogy biokompatibilis anyagként kollagént vagy kollagén és glükóz-amino-glikán kettős csapadékot, cellulózt, gélesített poliszacharidot, amely előnyösen kitin, kitozán, pektin vagy pektinsav, agar, agaróz, xantángumi, gellán, alginsav vagy alginát, poli-mannán vagy poliglukán, keményítőt vagy természetes gumit önmagukban vagy egymással vagy szintetikus vagy félszintetikus eredetű polimerekkel összekeverve, továbbá megfelelő kicsapató- vagy gélképző szereket, előnyösen fémsókat, polikationokat vagy polianionokat tartalmaznak.

5. Az 1. igénypont szerinti biokompatibilis membránok, *azzal jellemezve*, hogy szintetikus eredetű biokompatibilis anyagként polilaktonsavat, poliglükolsavat vagy ezek kopolimereit vagy származékait, polidioxanont, polifoszfazént, poliszulfont vagy poliuretánt tartalmaznak.

6. Az 1. igénypont szerinti biokompatibilis membránok, *azzal jellemezve*, hogy félszintetikus eredetű biokompatibilis anyagként természetes polimer, előnyösen kollagén térhálósító szerrel, előnyösen dialdehiddel vagy prekursorával, dikarbonsavakkal vagy halogénszármazékaikkal vagy diaminokkal alkotott félszintetikus származékát vagy cellulóz-, alginsav-, keményítő-, hialuronsav-, kitin- vagy kitozán-, gellán-, xantán-, pektin- vagy pektinsav-, poliglukán-, polimannán-, agar-, agaróz-, természetes gumi- vagy glükóz-amino-glikán-származékot tartalmaznak.

7. A 6. igénypont szerinti biokompatibilis membránok, *azzal jellemezve*, hogy a biokompatibilis membrán 100%-ban észterezett hialuronsav-benzil-észtert tartalmaz.

8. Eljárás biokompatibilis membránok előállítására, amelyek természetes, szintetikus vagy félszintetikus eredetű anyagokból épülnek fel, vastagságuk 10–500 µm, és egymástól állandó, 50–1000 µm távolságban lévő, állandó, 10–1000 µm méretű sorokba rendezett lyukakat tartalmaznak, *azzal jellemezve*, hogy egy folytonos membránt megfelelő berendezéssel, mechanikus vagy lézer lyukasztóeszközzel perforálunk.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás biokompatibilis membránok előállítására, *azzal jellemezve*, hogy perforáló eszközként mechanikus lyukasztót használunk.

10. A 8. igénypont szerinti eljárás biokompatibilis membránok előállítására, *azzal jellemezve*, hogy lézer perforáló berendezésként ultraibolyasugár-lézerberendezést alkalmazunk.

11. Eljárás mesterséges bőr előállítására, *azzal jellemezve*, hogy hámszövetsejteket olyan membránokra ol-tunk, melyek természetes, szintetikus és félszintetikus eredetű anyagokból épülnek fel, vastagságuk

10–500 µm, előnyösen 20–40 µm egymástól állandó, 50–1000 µm távolságban lévő, állandó, 10–1000 µm méretű, sorokba rendezett lyukakat tartalmaznak.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás mesterséges bőr előállítására, *azzal jellemezve*, hogy hámszövetsejtként keratinocitákat alkalmazunk.

13. Mesterséges bőr, *azzal jellemezve*, hogy egy biokompatibilis hordozómembránt tartalmaz, ahol a membrán természetes, szintetikus vagy félszintetikus anyagokból épül fel, vastagsága 10–500 µm, előnyösen 20–40 µm, és egymástól állandó 50–1000 µm távolságban lévő, állandó 10–1000 µm méretű, sorokba rendezett lyukakat tartalmaz, valamint

a lyukakban aktív szaporodási állapotban lévő, azonos vagy különböző hámszövetsejteket tartalmaz.

14. A 13. igénypont szerinti mesterséges bőr, *azzal jellemezve*, hogy hámszövetsejtként keratinocitákat tartalmaz.

15. A 13. vagy 14. igénypont szerinti mesterséges bőr, *azzal jellemezve*, hogy a membránban lévő lyukak mérete 40–70 µm.

16. A 13. vagy 14. igénypont szerinti mesterséges bőr, *azzal jellemezve*, hogy a lyukak távolsága 80 µm.

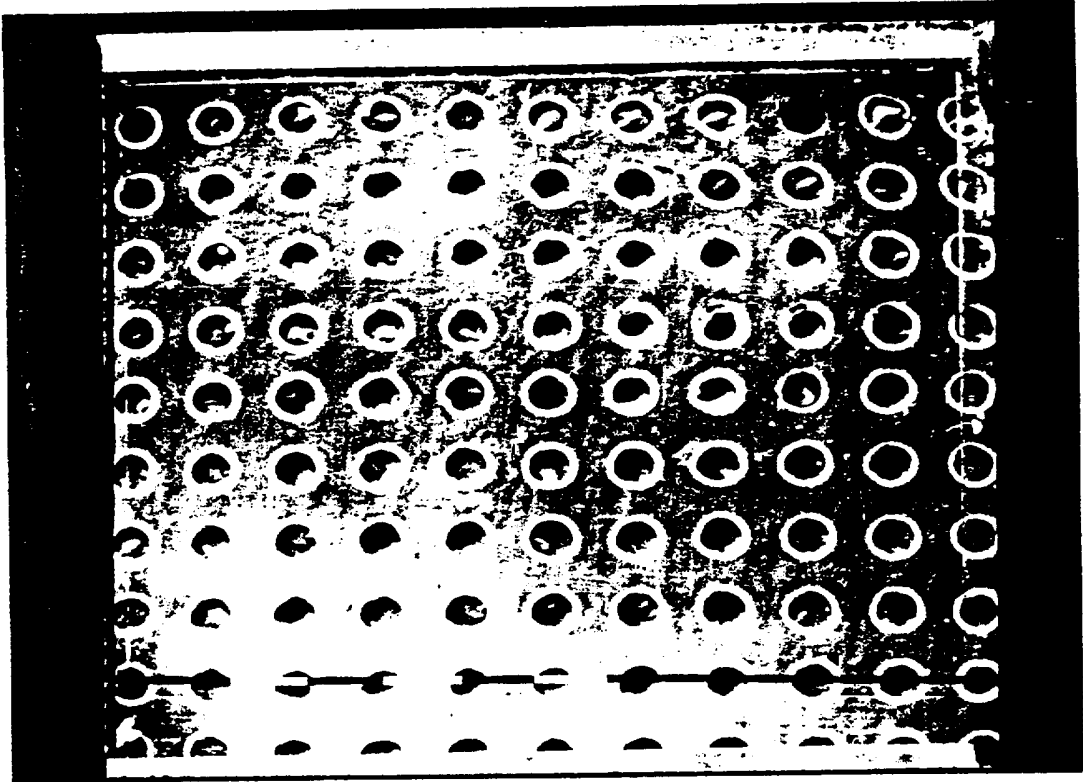
17. A 13. vagy 14. igénypont szerinti mesterséges bőr, *azzal jellemezve*, hogy biokompatibilis anyagként kollagént vagy kollagén és glükóz-amino-glikán kettős csapadékot, cellulózt, gélesített poliszacharidot, előnyösen kitint, kitozánt, pektint vagy pektinsavat, agart,

agarózt, xantángumit, gellánt, alginsavat vagy alginátot, polimannánt vagy poliglukán keményítőt vagy természetes gumit, önmagukban vagy egymással vagy szintetikus vagy félszintetikus eredetű polimerekkel összekeverve, továbbá megfelelő kicsapató- vagy gélképző szereket, előnyösen például fémsókat, polikationokat vagy polianionokat tartalmaz.

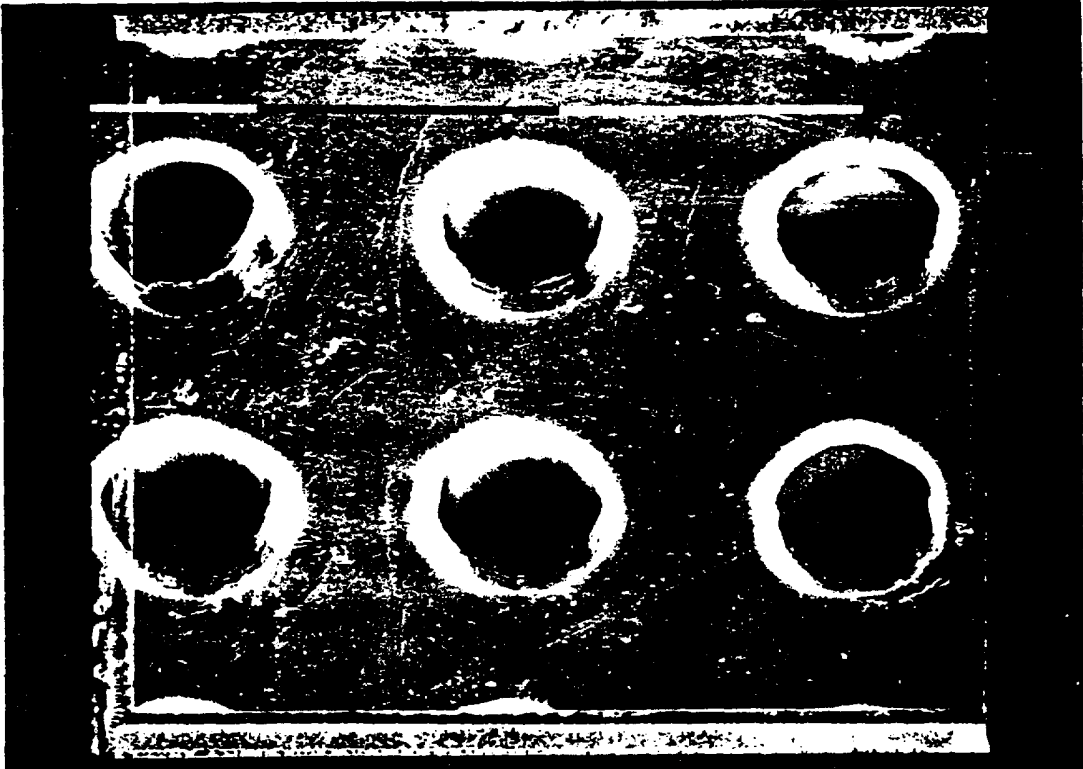
18. A 13. vagy 14. igénypont szerinti mesterséges bőr, *azzal jellemezve*, hogy szintetikus eredetű biokompatibilis anyagként poliaktonsavat, poliglikolsavat vagy ezek kopolimerjeit vagy származékait, polidioxanont, polifoszfazént, poliszulfont vagy poliuretánt tartalmaz.

19. A 13. vagy 14. igénypont szerinti mesterséges bőr, *azzal jellemezve*, hogy félszintetikus eredetű biokompatibilis anyagként természetes polimer, előnyösen kollagén térhálósító szerrel, előnyösen dialdehiddel vagy prekursorával, dikarbonsavakkal vagy halogén-származékaikkal vagy diaminokkal alkotott félszintetikus származékát vagy cellulóz-, alginsav-, keményítő-, hialuronsav-, kitin- vagy kitozán-, gellán-, xantán-, pektin- vagy pektinsav-, poliglukán-, polimannán-, agar-, agaróz-, természetes gumi- vagy glükóz-amino-glikán-származékot tartalmaz.

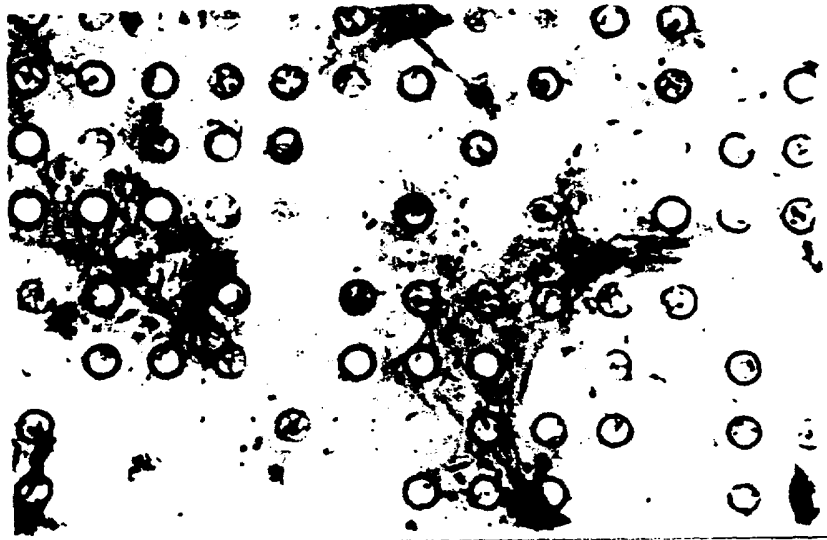
20. A 13. vagy 14. igénypont szerinti mesterséges bőr, *azzal jellemezve*, hogy a biokompatibilis membrán 100%-ban észterezett hialuronsav-benzil-észtert tartalmaz.



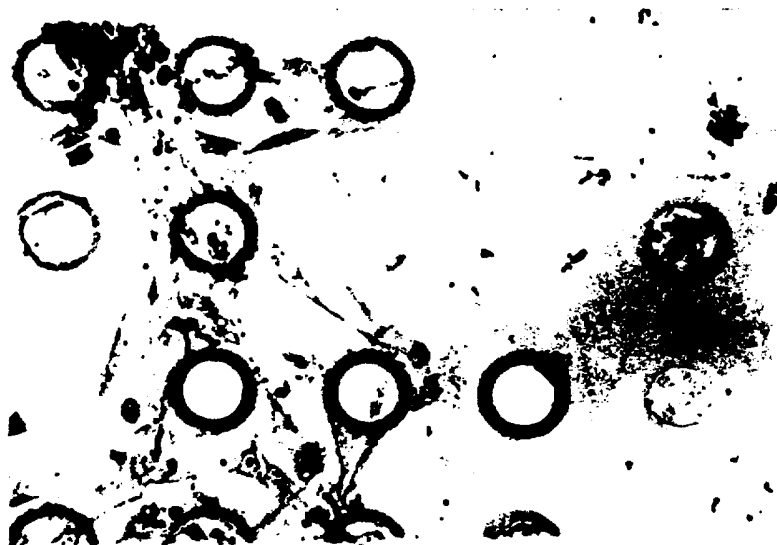
1a. ábra



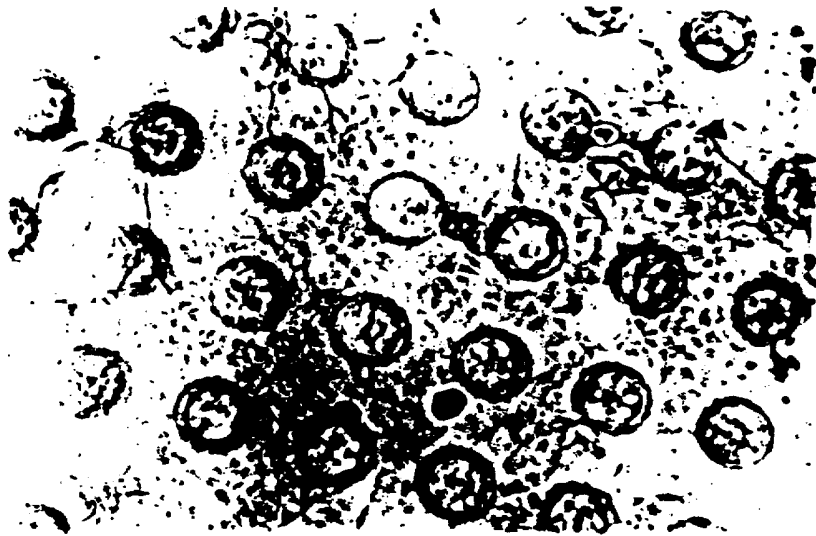
1b. ábra



2. ábra



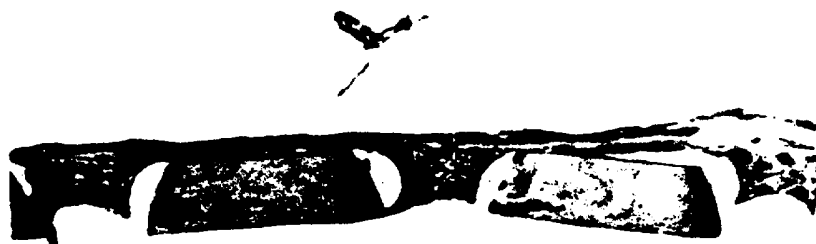
3. ábra



4. ábra



5. ábra



6. ábra