



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **303562**

(13) B1

(51) Int Cl<sup>6</sup> A 23 L 27/00, A 61 F 2/10

## Patentstyret

---

(21) Søknadsnr	19912058	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	29.05.1991	(85) Videreføringssdag	
(24) Løpedag	29.05.1991	(30) Prioritet	01.06.1990, IT, 20513/90
(41) Alm. tilgj.	02.12.1991		
(45) Meddelt dato	03.08.1998		

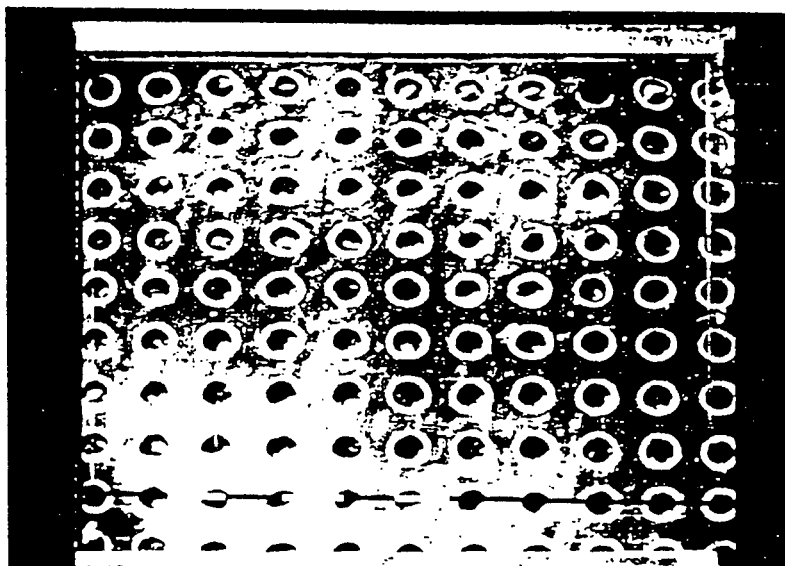
(73) Patenthaver	Fidia SpA, Via Ponte della Fabbrica 3/A, I-35031 Abano Terme, IT
(72) Oppfinner	Francesco della Valle, Padova, IT Alessandro Rastrelli, Padova, IT Gabriella Calderini, Carrara San Giorgio, IT Aurelio Romeo, Roma, IT
(74) Fullmektig	J.K. Thorsens Patentbureau AS, 0134 Oslo

---

(54) **Benevnelse** **Bioforlikelige membraner og fremgangsmåte for fremstilling derav, samt fremgangsmåte for fremstilling av kunstig hud**

(56) **Anførte publikasjoner** DE C2 3539270, US 4765985, WO A1 88/08305

(57) **Sammendrag** Bioforlikelige membraner oppbygget av materialer av naturlig, syntetisk eller halvsyntetisk opprinnelse, og med en tykkelse på mellom 10 og 500 µm, inneholdende et regelmessig seriemønster av hull med konstant størrelse mellom 10 og 1000 µm, separert fra hverandre med en konstant gjensidig avstand på mellom 50 og 100 µm, og oppnådd ved perforering ved hjelp av mekaniske, termiske laser- eller ultrafiolette bestrålingsinnretninger. De bioforlikelige membraner er egnet for bruk som en bærer for in vitro vekst av epitelceller. De bioforlikelige membraner er egnet for anvendelse som kunstig hud og ved poding og transplantasjon.



Den foreliggende oppfinnelse vedrører nye bioforlikelige perforerte membraner, fremgangsmåte for deres fremstilling, og fremgangsmåte for fremstilling av kunstig hud som omfatter slike membraner.

5

Tap av kutant materiale som skyldes traumatiske eller patologiske årsaker blir vanlig avhjulpet ved hjelp av autotransplantasjonsteknikk, under anvendelse av hudeksplan-  
tater fra donorområder. For å dekke større områder kan disse  
10 eksplantater ekspanderes ved hjelp av kirurgiske metoder, som  
f.eks. nettpoding beskrevet av J. Mauchahal, J. Plast.  
Surgery, 42, 88-91 (1989). Disse metoder gir positive  
resultater bare med skader av mindre dimensjoner og pasienter  
med en tilfredsstillende generell helseprofil. Hvis eldre  
15 pasienter eller pasienter i en alvorlig svekket tilstand  
behandles, oppnås utilfredsstillende resultater og tallrike  
problemer oppstår i en grad slik at slike prosedyrer ikke kan  
anvendes. I tillegg tillater de ikke en donorvev-ekspansjon  
på mer enn 10 ganger.

20

Et viktig vendepunkt ved behandlingen av disse skader ved  
rekonstruktiv kirurgi var utviklingen av teknikken som  
involverer in vitro dyrking av keratinocytter (J. Rheinwald  
og H. Green, Cell, 6, 331-344, 1975), som tillot in vitro  
25 ekspansjon av disse kulturer, for oppnåelse av epidermiske  
cellemembraner som potensielt er egnet for å dekke skade-  
områder.

Denne teknikk er blitt hyppig anvendt ved klinisk praksis,  
30 for det meste i tilfellet av pasienter som lider av forbrenn-  
inger (G.G. Gallico et al., M. Engl. J. Med., 311, 448-451,  
1984), men tallrike problemer oppsto fra denne ide, som  
f.eks. manglende antagelse av noen podinger, skjørheten av  
epitelfilmene og den derav følgende vanskelighet med  
35 kirurgens håndtering av filmen, den lengde av tid som kreves  
for å oppnå tilstrekkelige mengder av epidermiske kulturer og  
vanskeligheten med å oppnå donorarealer med tilstrekkelig  
størrelse fra pasienter med store områder av skadet kropps-  
overflate. De in vitro epidermiske kulturer krever også

nøyaktig orientering for å muliggjøre at podingen skal antas, idet dette er en særlig risikabel operasjon med henblikk på skjørheten av in vitro dyrkede, epidermiske filmer.

5 En annen metode for å løse disse problemer er beskrevet av Yannas et al., Science, 215, 174-176 (1982), som anvender dermiske erstatninger i form av reabsorberbare porøse materialer bestående av kopresipitater av kollagen og glykosaminoglykaner (GAG), spesielt kondroitin-6-sulfat, 10 dekket med en tynn silikonmembranfilm. Egenskapene av disse materialer er at de omfatter ikke-standardiserte porer som interkommuniserer på en måte liknende en svamp.

Zang et al. foreslår i Burns, 12, 540-543 (1986) en metode, 15 kjent som mikrohudpoding, bestående i auto-poding av meget små hudporjoner, som så utvikles til å gå sammen til et eneste epitelium. Med denne metode er det maksimale donoroverflate/dekkbare overflate-ekspansjonsforhold som kan oppnås 1:15.

20 S. Boyce og J. Hansborough beskriver i Surgery, 103, 421-431 (1988) bruken av membraner tildannet fra kollagen og GAG for på deres overflate å fremme veksten av keratinocytter, slik at overflateporøsiteten av materialet reduseres. Et konti- 25 nuerlig ikke-porøst lag er også innlagt for å begrense den epidermiske kulturutvikling til membranoverflaten. Den mulige antigenisitet av disse dermiske substituenten, som kan resultere i avstøtning av podingen, er ikke ennå sikkert fastslått.

30 Formålet for den foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe bioforlikelige membraner som muliggjør in vitro dyrking av keratinocytter, med kulturutvikling i løpet av en mye kortere tid enn det tidligere var mulig. Et viktig resultat med 35 membranene i samsvar med den foreliggende oppfinnelse, er muligheten til å oppnå kolonisering av homologe eller heterologe epitelceller i løpet av en tid som er overraskende kort (6-10 dager) sammenliknet med den tid som normalt kreves

(20-40 døgn) ved tradisjonelle metoder for fremstilling av sammenlignende arealer av in vitro epidermis-kulturer.

Denne fordel resulterer i fremstilling i løpet av kort tid av  
5 en kunstig hud som tillater meget hurtig dekning av et areal, hvorpå en epiteltransplantasjon kreves, slik at farene i forbindelse med for sterkt organisk væsketap eller infeksjon reduseres.

10 Et ytterligere formål for den foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe bioforlikelige membraner som tillater hurtig utvikling av keratinocyt-kulturer med et utmerket forhold donoroverflate/dekkbar overflate, på mellom 1:20 og 1:200, idet dette forhold er betraktelig høyere enn det som tid-  
15 ligere kunne oppnås med tradisjonelle metoder.

Et ytterligere formål for den foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe en bioforlikelig og foretrukket bioreabsorberbar kunstig hud, som kan frembringes i løpet av en kort tid,  
20 er sterk, og lett kan håndteres ved tidspunktet for transplantasjonen, og som videre kan påføres setet for skaden uavhengig av dens opprinnelige orientering i dyrkingsbeholderen, og som lett kan lagres. I denne forbindelse er en fordel ved den kunstige hud fremstilt i samsvar med den  
25 foreliggende oppfinnelse at den lett kan kryokonserveres, slik at dannelse av en bank av epitellev, inkluderende heterologt epitellev, tillates. Muligheten til kryokonservering reduserer betraktelig eller eliminerer også, etter minst to sykluser, det antigeniske potensial av overflate-  
30 antigenene som uttrykkes av epitelcellene.

Disse og andre formål oppnås ved de bioforlikelige membraner i samsvar med den foreliggende oppfinnelse.

35 Den foreliggende oppfinnelse vedrører således bioforlikelige membraner, som er tildannet av materialer som tilhører en av de følgende klasser:

- a) materialer av naturlig opprinnelse valgt fra gruppen bestående av kollagen eller kopresipitater av kollagen og

- glykosaminoglykaner, cellulose, geldannede polysakkarider slik som chitin, chitosan, pektiner eller pektinsyrer, agar, agarose, xantangummi, gellan, alginsyre eller alginater, polymannaner eller polyglukaner, stivelser, naturgummier og blandinger derav,
- 5 b) bioreabsorberbare materialer av syntetisk opprinnelse valgt fra gruppen bestående av polymelkesyre, polyglykolsyre eller kopolymerer derav eller deres derivater, polydioksanoner, polyfosfazener, polysulfoner og polyuretaner
- 10 og blandinger derav,
- c) materialer av syntetisk opprinnelse valgt fra gruppen bestående av silikon-, silan- eller siloksangummier, polytetrafluoretylen, perfluorpolyetere, polystyren eller vinylpolyklorid, polyakrylat eller derivater derav, polyhydroksyakrylat, polyhydroksymetakrylat, karboksylvinylpolymerer og deres derivater, maleinsyreanhydridpolymerer
- 15 og deres derivater, polyvinylklorid, polyvinylalkohol og dens derivater, polyetylen og polypropylen og blandinger derav,
- 20 d) materialer av halvsyntetisk opprinnelse, valgt fra gruppen bestående av kollagen kryssbundet med kryssbindingsmidler valgt fra gruppen bestående av dialdehyder, bikarboksylyssyrer eller halogenider derav, diaminer, og estere av hyaluronsyre, gellan og alginsyre, og
- 25 som har en tykkelse på mellom 10 og 500  $\mu\text{m}$  og hull med en størrelse på mellom 10 og 1.000  $\mu\text{m}$ , som er kjennetegnet ved at de er perforert og ved det faktum at nevnte hull har en definert og konstant størrelse og danner en regelmessig rekke hvori de er separert ved en konstant avstand på mellom 50 og
- 30 1.000  $\mu\text{m}$ .

Den foreliggende oppfinnelse vedrører også en fremgangsmåte for fremstilling av de bioforlikelige membraner i samsvar med oppfinnelsen, som er kjennetegnet ved at den omfatter å

35 perforere en kontinuerlig membran via et egnet skreeningssystem under anvendelse av mekaniske eller laserperforeringsinnretninger.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører videre en fremgangsmåte for fremstilling av kunstig hud som er sammensatt av de bioforlikelige membraner i samsvar med oppfinnelsen og autologe eller heterologe keratinocytter eller andre epitelceller i det aktive formeringstrinn til stede i hullene i de bioforlikelige membraner, som er kjennetegnet ved at de bioforlikelige membraner inkuberes med epitelcellene i nærvær av dyrkingsmedier.

10 Membranene består foretrukket av halvsyntetiske derivater av hyaluronsyre, særlig esterderivater derav som beskrevet i eksempler 6, 7 og 24 i EP-A-0216453, idet disse er bioforlikelige og bionedbrytbare materialer i stand til å frigi hyaluronsyre ved påføringsstedet, idet denne syre er vel  
15 kjent å begunstige reparative vevsprosesser. En ytterligere egenskap som gjør disse materialer særlig egnet for bruk ved den foreliggende oppfinnelse, er at de ikke frembringer intoleranse-fenomener, idet de ikke er immunogene.

20 De bioforlikelige membraner, bestående av ett eller flere av de ovennevnte materialer, har en tykkelse på mellom 10 og 500  $\mu\text{m}$  og foretrukket mellom 20 og 40  $\mu\text{m}$  og er karakterisert ved nærvær av en regelmessig rekke av hull med definert og konstant størrelse på mellom 10 og 1000  $\mu\text{m}$ , og foretrukket  
25 mellom 40 og 70  $\mu\text{m}$ , separert fra hverandre med en konstant avstand på mellom 50 og 1000  $\mu\text{m}$ , og foretrukket 80  $\mu\text{m}$ .

Kontinuerlige bioforlikelige membraner, bestående av ett eller flere av de ovennevnte materialer, kan fremstilles ved  
30 hjelp av de konvensjonelle metoder som er beskrevet i litteraturen.

De perforerte bioforlikelige membraner i samsvar med den foreliggende oppfinnelse oppnås under anvendelse av mekaniske  
35 perforeringsinnretninger, som f.eks. passende anordnede hullstansmaskiner, eller metoder som involverer bruk av termiske eller ultraviolettlasere som arbeider i et frekvensbånd slik at det frembringes hull med den ønskede størrelse og gjensidig avstand i membranen.

Det følgende eksempel viser fremstilling av en perforert bioforlikelig membran i samsvar med den foreliggende oppfinnelse.

5 **EKSEMPEL 1**

En membran av hyaluronsyre-benzylester med 100 % forestring (som beskrevet i EP-A-0216453) i form av et kvadrat av 12 x 12 cm og 25  $\mu\text{m}$  tykkelse, ble perforert under anvendelse av en datastyrt UV-laserinnretning som arbeider ved en frekvens på 10 273  $\mu\text{m}$  under følgende arbeidsbetingelser: Arbeidsfrekvens 200 Hz, avgitt energi 250 mJ. Under anvendelse av et passende skreeningsystem ble hull med diameter 40  $\mu\text{m}$  oppnådd med avstand fra hverandre på 80  $\mu\text{m}$ , som vist i figurene 1a og 1b.

15 De perforerte bioforlikelege membraner i samsvar med den foreliggende oppfinnelse kan fordelaktig anvendes for in vitro dyrking av epitelceller, spesielt keratinocytter.

For dette formål kan membranene fikseres til bunnen av celle- 20 dyrkingsbeholderne, til metallgittere eller hvilken som helst annen struktur egnet for cellekulturer ved luft/dyrkingsmedium-grenseflaten, under anvendelse av steril vaselin, sterilt silikon eller andre lim-systemer, som tillater lett fjernelse av membranen, eller ved systemer som involverer 25 bruk av biologisk materiale som kollagen, fibrin eller fibrinlim. Disse membraner kan inkuberes i dyrkingsmedia egnet for vekst av epitelceller, enten alene eller i nærvær av andre celler, som bestrålte fibroblaster, som beskrevet i den anførte litteratur, uten at det i løpet av den tid som er 30 fastsatt for vekst og hullkolonisering bevirkes endring i mekaniske egenskaper som ville nedsette deres håndterbarhet og styrke for den spesielle anvendelsen.

Noen av de tester som er gjennomført er beskrevet i det 35 følgende for å illustrere bruken av membranene i samsvar med oppfinnelsen.

**EKSEMPEL 2**

Den følgende test ble gjennomført for å vise fravær av enhver inhibering av hyaluronsyrederivat-membranene på in vitro vekst av humane keratinocyttekulturer.

5

Membraner benevnt HYAFF 11 oppkuttet sterilt til 2 x 2 cm kvadrater og bestående av hyaluronsyre-benzylester med 100 % forestring (som beskrevet i EP 0216453) ble anbragt på bunnen av dyrkingsbeholderne ved hjelp av sterilt silikon.  $2 \times 10^5$  humane keratinocytter ble tilsatt derpå i et volum på 0,5 ml, i nærvær av  $4 \times 10^5$  letalt bestrålte 3T3 fibroblaster ved den andre gjennomgang.

Kapslene ble inkubert ved 37°C i to timer i en 5 % CO<sub>2</sub> atmosfære for å tillate at cellene festet seg til matriksen. Etter denne periode ble 5 ml CEC dyrkingsmedium (Green H. et al., J. Proc. Nation. Acad. Sci., 76, 5665-5668, 1979) tilsatt og kapslene på nytt inkubert. Dyrkingsmediet ble byttet hvert 2. døgn. Cellene ble behandlet med trypsin 9 døgn etter tilsetning og talt. Alle forsøk ble gjennomført in duplo.

**RESULTATER**

	Antall humane keratinocytter pr. plate ( $\times 10^5$ )	% inhibering
25 Kontroll	27	0 %
HYAFF 11 membran	27	0 %

Disse resultater viser at det anvendte biomateriale ikke har noen inhiberende virkning på keratinocyttekulturer.

30

**EKSEMPEL 3**

Vekst av humane keratinocytter under anvendelse av de perforerte bioforlikelige membraner i samsvar med oppfinnelsen, oppnådd ved hjelp av fremgangsmåten beskrevet i eksempel 1.

35

HYAFF 11 membraner bestående av hyaluronsyre-benzylester med 100 % forestring (som beskrevet i EP-A-0216453) i form av 3 x 3 cm kvadrater ble limt til bunnen av 6 cm diameter Petri skåler under anvendelse av steril vaselin. Letalt bestrålte



3T3 fibroblaster ble tilsatt på membranene til en konsentrasjon på 700.000 celler pr. flate, under betingelsene beskrevet i eksempel 2. Etter adhesjon av 3T3 cellene, dvs. etter omtrent 24 timer, ble en cellesuspensjon av humane  
5 keratinocytter som skrev seg fra sekundære kulturer, tilsatt med en konsentrasjon på 38.000 celler pr. cm<sup>2</sup>. Dyrkingsbetingelsene var analoge med dem som er beskrevet i eksempel 2. Utviklingen av keratinocyttkulturen ble fulgt daglig under anvendelse av et fasekontrastmikroskop. Utviklingen av  
10 inokulerte epitelceller ble iaktatt på membranen, idet disse hadde nådd sammenflyting 8-10 døgn etter tilsetningen.

Av særlig viktighet er det forhold at selv på den andre dag etter tilsetningen inneholder tallrike hull keratinocytter,  
15 idet deres vekst er mer aktiv i hullene enn på overflaten, til totalt å fylle dem ved omtrent den 6. dag (Figurene 2, 3 og 4).

Et ytterligere faktum av stor betydning er at når de  
20 analyseres ved histologiske metoder viser cellene inne i hullene et basaloid utseende som dokumenteres ved funn i figurene som viser hyppig mitose (Figurene 5 og 6), som betyr høy reproduktiv vitalitet. Disse funn ble bekreftet ved hjelp av immunohistokjemiske metoder under anvendelse av  
25 spesifikke antistoffer (Mab).

Epitelcellene dyrket inne i hullene kan derfor totalt ansees til å være i det aktive formeringstrinn og således effektivt brukbare på transplantasjonsområder.

30

Den kunstige hud, oppnådd ved de ovennevnte prosedyrer, består derfor av en bioforlikelig og foretrukket bio-reabsorberbar bærermembran bestående av materialer av naturlig, syntetisk eller halvsyntetisk opprinnelse, og med  
35 en tykkelse på mellom 10 og 500  $\mu\text{m}$ , og foretrukket mellom 20 og 40  $\mu\text{m}$ , karakterisert ved å omfatte en regelmessig rekke av hull med en definert og konstant størrelse mellom 10 og 1000  $\mu\text{m}$ , separert fra hverandre ved en konstant avstand på mellom 50 og 1000  $\mu\text{m}$ , sammen med autologe eller heterologe

keratinocyt-mikrokolonier i det aktive formeringstrinn tilstede i hullene. Denne kunstige hud kan lett formes av operatøren på basis av de områder som skal behandles, og har en mekanisk styrke som muliggjør at den kan håndteres uten vanskelighet og sutureres. Så snart de er implantert på det skadede området, skaper keratinocyt-mikrokoloniene vekst- kjerner med hurtigvoksende epitellev, som i løpet av en kort tid fullstendig re-epitelialiserer det området hvorpå transplantasjonen er blitt gjennomført.

10

Membranen anvendes ved å trekke den ut fra dyrkings- beholderen, fjerne alle spor av dyrkingsmedium ved hjelp av en steril fysiologisk oppløsning og påføre den det området som skal behandles uten at det behøver å ofres særlig oppmerksomhet på påføringsretningen, idet membranen er like effektiv om den påføres med den ene eller den andre av sine to sider, i motsetning til tradisjonelle keratinocyt- kulturer.

20

Den kunstige hud fremstilt i samsvar med den foreliggende oppfinnelse kan anvendes for å dekke selv omfattende skader på kroppsoverflaten av traumatisk opprinnelse som forbrenninger, av kirurgisk opprinnelse som f.eks. uttrekningsområder ved plastisk kirurgi, eller patologisk opprinnelse som f.eks. stasis-sår eller liggesår.

25

#### **PATENTKRAV**

30

1. Bioforlikelige membraner, som er tildannet av materialer som tilhører en av de følgende klasser:

35

- a) materialer av naturlig opprinnelse valgt fra gruppen bestående av kollagen eller kopresipitater av kollagen og glykosaminoglykaner, cellulose, geldannede polysakkarider slik som chitin, chitosan, pektiner eller pektinsyrer, agar, agarose, xantangummi, gellan, alginsyre eller alginater, polymannaner eller polyglukaner, stivelser, naturgummier og blandinger derav,
- b) bioreabsorberbare materialer av syntetisk opprinnelse valgt fra gruppen bestående av polymelkesyre, polyglykol-

syre eller kopolymerer derav eller deres derivater, polydioksanoner, polyfosfazener, polysulfoner og polyuretaner og blandinger derav,

5 c) materialer av syntetisk opprinnelse valgt fra gruppen bestående av silikon-, silan- eller siloksangummier, polytetrafluoretylen, perfluorpolyetere, polystyren eller vinylpolyklorid, polyakrylat eller derivater derav, polyhydroksyakrylat, polyhydroksymetakrylat, karboksyvinylpolymerer og deres derivater, maleinsyreanhydridpolymerer og deres derivater, polyvinylklorid, polyvinylalkohol og dens derivater, polyetylen og polypropylen og blandinger derav,

10 d) materialer av halvsyntetisk opprinnelse, valgt fra gruppen bestående av kollagen kryssbundet med kryssbindingsmidler valgt fra gruppen bestående av dialdehyder, bikarboksylysyre eller halogenider derav, diaminer, og estere av hyaluronsyre, gellan og alginsyre, og

som har en tykkelse på mellom 10 og 500  $\mu\text{m}$  og hull med en størrelse på mellom 10 og 1.000  $\mu\text{m}$ ,

20 k a r a k t e r i s e r t v e d at de er perforert og ved det faktum at nevnte hull har en definert og konstant størrelse og danner en regelmessig rekke hvori de er separert ved en konstant avstand på mellom 50 og 1.000  $\mu\text{m}$ .

25 2. Bioforlikelige membraner som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at tykkelsen er mellom 20 og 40  $\mu\text{m}$ .

3. Bioforlikelige membraner som angitt i krav 1, 30 k a r a k t e r i s e r t v e d at hullstørrelsen er mellom 40 og 70  $\mu\text{m}$ .

4. Bioforlikelige membraner som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at avstanden mellom 35 hullene er 80  $\mu\text{m}$ .

5. Bioforlikelige membraner som angitt i krav 1,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at den bioforlikelige  
membran består av hyaluronsyrebenzylester med 100 % for-  
estring.

5

6. Fremgangsmåte for fremstilling av de bioforlikelige  
membraner som angitt i krav 1,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter å  
perforere en kontinuerlig membran via et egnet skreening-  
10 system under anvendelse av mekaniske eller laser-  
perforeringsinnretninger.

7. Fremgangsmåte for fremstilling av bioforlikelige membraner  
som angitt i krav 6,

15 k a r a k t e r i s e r t v e d at den mekaniske perforer-  
ingsinnretning er en hullstanse.

8. Fremgangsmåte for fremstilling av bioforlikelige membraner  
som angitt i krav 6,

20 k a r a k t e r i s e r t v e d at laser-perforeringsinn-  
retningen er en UV-strålingslaser.

9. Fremgangsmåte for fremstilling av kunstig hud som er  
sammensatt av de bioforlikelige membraner som angitt i krav 1  
25 og autologe eller heterologe keratinocytter eller andre  
epitelceller i det aktive formeringstrinn til stede i hullene  
i de bioforlikelige membraner,

k a r a k t e r i s e r t v e d at de bioforlikelige  
membraner inkuberes med epitelcellene i nærvær av dyrkings-  
30 medier.

Fig. 1a

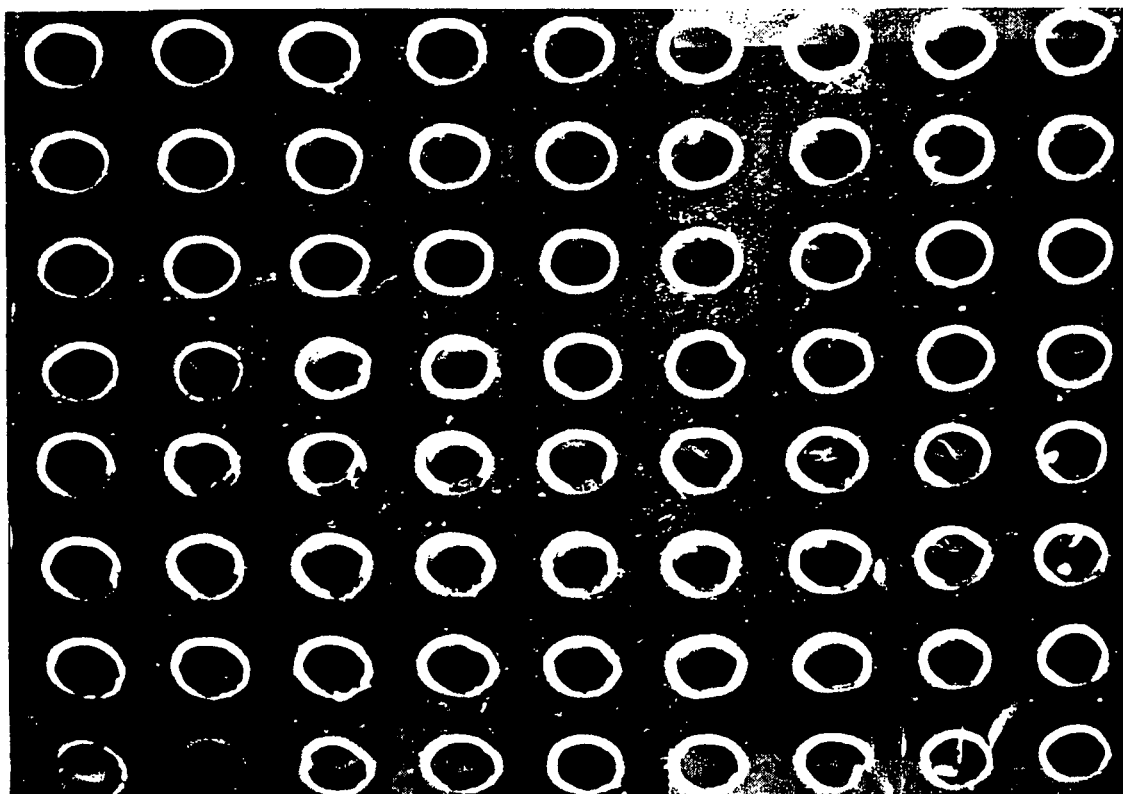


Fig. 1b



Fig. 2

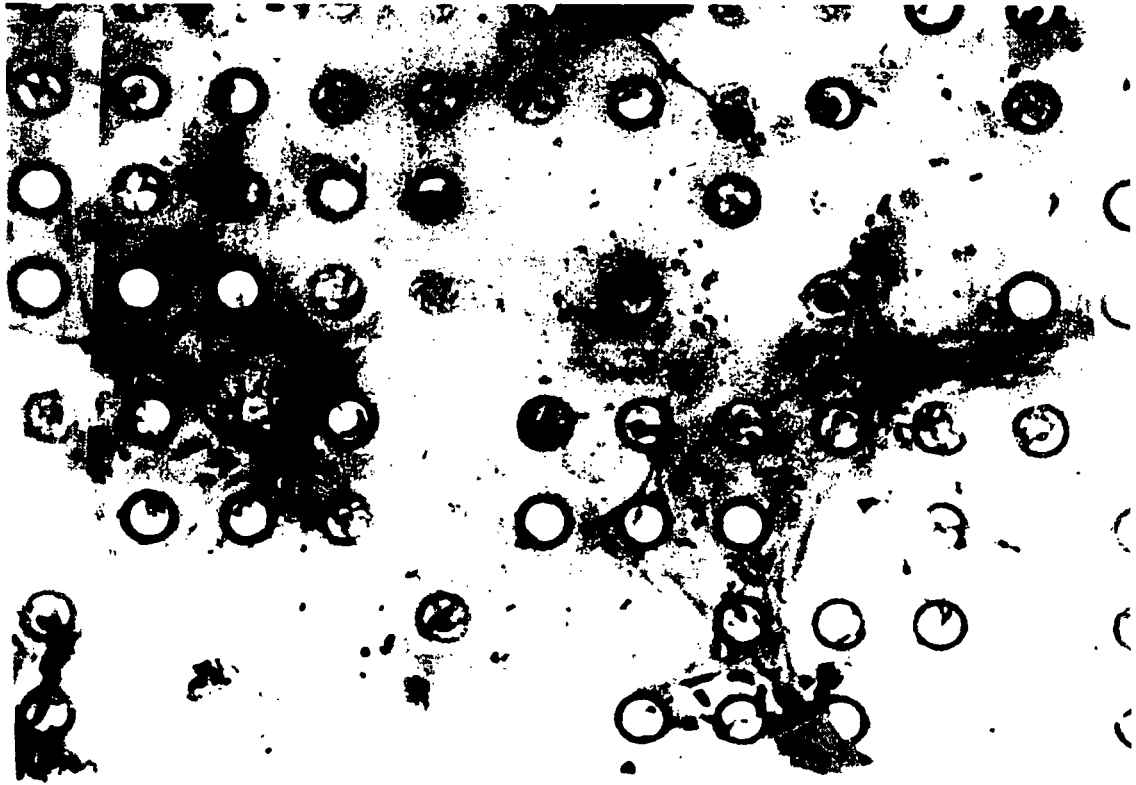


Fig. 3



Fig. 4

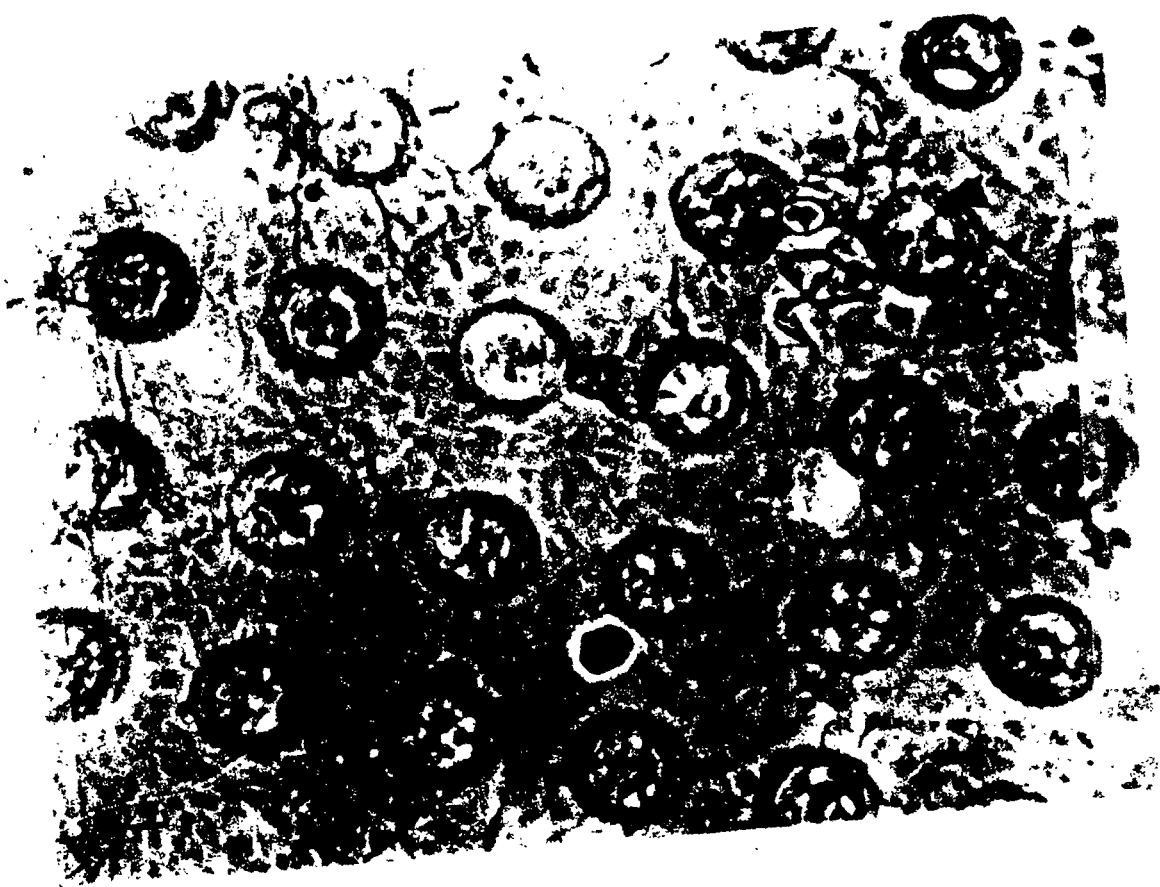




Fig. 5

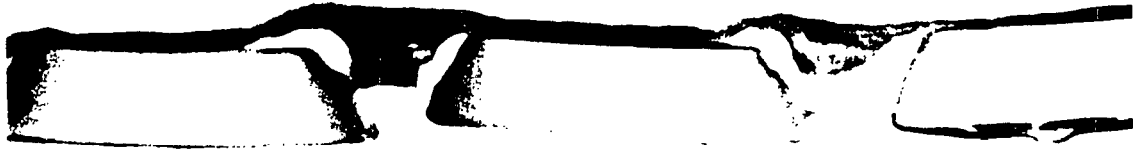


Fig. 6

