



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 2967836 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
A61F 2/10 (2006.01)
A01N 1/02 (2006.01)
A61F 2/00 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(21)	Translation Published	2019.02.25
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2018.10.10
(86)	European Application Nr.	14775892.4
(86)	European Filing Date	2014.03.13
(87)	The European Application's Publication Date	2016.01.20
(30)	Priority	2013.03.13, US, 201361779661 P
(84)	Designated Contracting States:	AL ; AT ; BE ; BG ; CH ; CY ; CZ ; DE ; DK ; EE ; ES ; FI ; FR ; GB ; GR ; HR ; HU ; IE ; IS ; IT ; LI ; LT ; LU ; LV ; MC ; MK ; MT ; NL ; NO ; PL ; PT ; RO ; RS ; SE ; SI ; SK ; SM ; TR
(73)	Proprietor	Stratatech Corporation, 505 South Rosa Road Suite 169, Madison, Wisconsin 53719, USA
(72)	Inventor	ALLEN-HOFFMANN, B. Lynn, 3905 Council Crest, Madison, Wisconsin 53711, USA PIRNSTILL, John C., 2765 Jacquelyn Drive, Fitchburg, Wisconsin 53711, USA GRATZ, Kenneth R., 733 Miami Pass, Madison, Wisconsin 53711, USA COMER, Allen R., 5809 Chester Circle, Madison, Wisconsin 53719, USA
(74)	Agent or Attorney	ZACCO NORWAY AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54) Title **CRYOPRESERVATION OF VIABLE HUMAN SKIN SUBSTITUTES**

(56) References
Cited:

WO-A1-97/28402, HANS-JÜRGEN STARK ET AL: "Organotypic cocultures as skin equivalents: A complex and sophisticated in vitro system", BIOLOGICAL PROCEDURES ONLINE, vol. 19, no. 4, 12 April 2004 (2004-04-12) , pages 55-60, XP055268292, DOI: 10.1251/bpo72, J Demetruilas ET AL: "Skin2(R) - an in vitro human skin model: the correlation between in vivo and in vitro testing of surfactants", Exp Dermatol, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 18-26, XP055286322, Retrieved from the Internet: URL:<http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1600-0625.1998.tb00298.x/asset/j.1600-0625.1998.tb00298.x.pdf?v=1&t=iqas0eww&s=5689b9b94b21794735fa1894ac95049a933f5727> [retrieved on 2016-07-06], WO-A1-96/24018, US-A- 5 891 617, T Rupf ET AL: "Cryopreservation of Organotypical Cultures Based on 3D Scaffolds", Cryoletters, 1 March 2010 (2010-03-01), pages 157-168, XP055285494, England Retrieved from the Internet: URL:<http://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2010/00000031/00000002/art00008?token=004b1623dac778437a63736a6f5e47745d36664670502e796f644a467b4d616d3f4e4b34a25>, WO-A1-96/33750, US-A- 6 110 208, C C

BONDOC ET AL: "Clinical Experience with Viable Frozen Human Skin and a Frozen Skin Bank", ANN. SURG., vol. 174, no. 3, 1 September 1971 (1971-09-01), pages 371-381, XP055285286,, WO-A1-2009/065005, US-A1- 2013 108 670, WO-A1-2008/088136, US-A1- 2010 119 615, BONDOC, CC ET AL.: 'Clinical Experience With Viable Frozen Human Skin And A Frozen Skin Bank.' ANN. SURG. vol. 174, no. 3, 1971, pages 371 - 381, XP055285286, WO-A2-96/14738, US-A1- 2013 108 683, WO-A1-95/07611, WO-A2-02/058588, US-A1- 2004 053 409

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for kryopreservering av en organotypisk dyrket hudekvivalent for å opprettholde levedyktig vev omfattende:

- 5 a) å behandle en organotypisk dyrket hudekvivalent i en kryobeskyttende løsning i et enkelt trinn, hvori den organotypisk dyrkede hudekvivalenten omfatter stratifisert skvamøs epitel på et dermallag som omfatter fibroblast, og hvori kryobeskyttelsesmiddelet tilveiebringes i en løsning omfattende 21 til 70 volum-%, foretrukket 21 til 45 volum-% eller 37,5 til 62,5 volum-%, mer foretrukket 25
- 10 til 40 volum-% eller 42,5 til 57,5 volum-% av løsningen, og der kryobeskyttelsesmiddelet er glyserol;
- b) å separere den behandlede organotypisk dyrkede hudekvivalenten fra overskyttende kryobeskyttende løsning og pakke inn den behandlede organotypisk dyrkede hudekvivalenten i fravær av ekstra kryobeskyttelsesmiddel for å
- 15 tilveiebringe en innpakket hudekvivalent, hvori innpakningen foretrukket ytterligere omfatter å omslutte den kryopreserverte hudekvivalenten i en steril pose og å omslutte den sterile posen i en andre pose; og
- c) å fryse den innpakkede organotypisk dyrkede hudekvivalenten for å tilveiebringe en kryopreservert hudekvivalent.

20

2. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori behandlingen av en organotypisk dyrket hudekvivalent i en kryobeskyttende løsning i et enkelt trinn foregår ved en temperatur på 2 °C til 8 °C eller 15 °C til 30 °C.

25

3. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori frysingen ytterligere omfatter frysing ved -80 °C eller direkte eksponering til temperaturer i området fra -50 °C til -100 °C.

30

4. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori de organotypisk dyrkede hudekvivalentene omfatter Near-Diploid Immortalized Keratinocytes (NIKS)-celler, hvori NIKS-cellene foretrukket omfatter en eksogen nukleinsyresekvens som koder for et eksogent polypeptid.

35

5. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori hudekvivalenten beholder levedyktighet etter tining, hvori den kryopreserverte hudekvivalenten foretrukket har en A₅₅₀ på minst 50 % av en referansehudekvivalent bestemt ved en MTT-analyse.

6. Fremgangsmåte for tining av en kryopreservert hudekvivalent fremstilt ved fremgangsmåten ifølge krav 1 før påføring på en pasient, omfattende:

a) å varme opp den kryopreserverte hudekvivalenten, hvori oppvarmingen foretrukket omfatter eksponering til romtemperatur på bruksstedet; og

b) å bringe den kryopreserverte hudekvivalenten i kontakt med en diffusjonsmediator omfattende en vevskompatibel løsning, foretrukket en bufret vevskompatibel løsning, for å tillate fjerning av den kryobeskyttende løsningen ved diffusjon, og hvori diffusjonsmediatoren er valgt fra gruppen bestående av et absorberende medium, hvori det absorberende mediet er foretrukket valgt fra gruppen bestående av

- Telfa-puter, skumputer, gasputer og celluloseputer inneholdende det vevskompatible mediet,

- en membran og

- en dialysepose.

7. Kryopreservert hudekvivalent fremstilt ved fremgangsmåten ifølge krav 1.

8. System omfattende hudekvivalenten ifølge krav 7, plassert på et absorberende medium.

9. Innpakket kryobeskyttet hudekvivalent ifølge krav 7, for anvendelse i behandling av sår, hvori hudekvivalenten er til påføring på et sår under betingelser som er slik at hudekvivalenten bringes i kontakt med såret.

10. Sett omfattende en kryopreservert hudekvivalent ifølge krav 7, en diffusjonsmediator og en vevskompatibel løsning.

11. Sett ifølge krav 10, hvori den kryopreserverte hudekvivalenten er innpakket i en tettbar kapsling eller der den kryopreserverte hudekvivalenten tilveiebringes i et dyrkingskar som er innpakket i en pose.

12. Fremgangsmåten ifølge krav 1, ytterligere omfattende å danne den organotypisk dyrkede hudekvivalenten før trinn (a) ved:

å tilveiebringe en dyrkingsskål omfattende et celledyrkesubstrat som er bevegelig mellom definerte øvre og nedre posisjoner i dyrkingsskålen,

å danne en hudequivallent av celledyrkesubstratet, hvori celledyrkesubstratet er på den øvre posisjonen og deretter senke celledyrkesubstratet til den nedre posisjonen for å utføre trinn (a) ifølge krav 1.

5

13. Fremgangsmåten ifølge krav 1, ytterligere omfattende å danne den organotypisk dyrkede hudequivallenten før trinn (a) ved:

å tilveiebringe en dyrkingsskål omfattende en innsats som er bevegelig mellom øvre og nedre posisjoner i dyrkingsskålen, der innsatsen har en nedre plan flate dannet av en porøs membran,

10

å danne en dermal ekvivalent omfattende fibroblastceller av den porøse membranen i innsatsen, hvori innsatsen er plassert i den øvre posisjonen i dyrkingsskålen,

å dyrke fibroblastcellene for å danne en dermal ekvivalent,

15

å tilføre keratinocytter på den dermale ekvivalenten, å dyrke keratinocytene i et dyrkingsmedium under betingelser slik at keratinocytene danner en hudequivallent omfattende stratifisert epitel,

å fjerne dyrkingsmediet,

å senke innsatsen til den nedre posisjonen for å utføre trinn (a) ifølge krav 1.

20

14. Innpakket kryopreservert hudequivallent fremstilt ifølge krav 1, for anvendelse i behandling av en pasient, hvori før påføring på pasienten den kryopreserverte hudequivallenten er

25

a) tint og ikke skylt; eller

b) oppvarmet, aseptisk overført fra innpakningen og brakt i kontakt med et absorberende medium omfattende en vevskompatibel løsning for å tillate fjerning av den kryobeskyttende løsningen ved diffusjon.

30

15. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori hudequivallenten i trinn (a) inkuberes i den kryobeskyttende løsningen i 10 til 60 minutter, foretrukket fra 20 til 30 minutter.