



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3470018 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

(45) Translation Published 2021.11.22

(80) Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent 2021.07.28

(86) European Application Nr. 18197432.0

(86) European Filing Date 2014.03.13

(87) The European Application's Publication Date 2019.04.17

(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

(62) Divided application EP2967836, 2014.03.13

(73) Proprietor Stratatech Corporation, Suite 169, 505 South Rosa Road, Madison, WI 53719-1262, USA

(72) Inventor Allen-Hoffmann, B. Lynn, 3905 Council Crest, Madison, WI 53711, USA
Pirnstill, John C., 2765 Jacquelyn Drive, Fitchburg, WI 53711, USA
Gratz, Kenneth R., 733 Miami Pass, Madison, WI 53711, USA
Comer, Allen R., c/o Stratatech Corporation 505 South Rosa Road, Suite 169, Madison, WI 53719, USA

(74) Agent or Attorney BRYN AARFLOT AS, Stortingsgata 8, 0161 OSLO, Norge

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

(56) References
Cited: WO-A1-95/07611
WO-A1-2009/065005
WO-A1-96/24018
WO-A1-97/28402
WO-A2-96/14738
WO-A2-2005/012492
WO-A2-02/058588
WO-A1-96/33750
WO-A1-2008/088136

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

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>

ANNA DE BREIJ ET AL: "Three-Dimensional Human Skin Equivalent as a Tool To Study Acinetobacter baumannii Colonization", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 56, no. 5, 30 January 2012 (2012-01-30), pages 2459-2464, XP055545213, US ISSN: 0066-4804, DOI: 10.1128/AAC.05975-11

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,

J Demetrulias 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]

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 kryokonservering av en organotypisk dyrket hud som tilsvarer å opprettholde levedyktig vev, omfattende:

- 5 a) behandling av en organotypisk dyrket hudekvivalent i en kryobeskyttende løsning i et enkelt trinn, hvor den organotypisk dyrkede hudekvivalenten omfatter stratifisert plateepitel på et dermalt skikt omfattende fibroblast, hvor hudekvivalenten er konstruert for å uttrykke og tilveiebringe eksogene antimikrobielle polypeptider eller
- 10 proangiogene faktorer, og hvor kryobeskyttelsesmidlet tilveiebringes i en løsning som inneholder 21% til 70% av løsningen i volum, fortrinnsvis 21% til 45% av løsningen i volum eller 37,5% til 62,5% av løsningen i volum, mer foretrukket 25% til 40% av løsningen i volum eller 42,5% til 57,5% av løsningen i volum, avhengig av temperaturen,
- 15 og kryobeskyttelsesmidlet er glyserol;
- b) separasjon av den behandlede organotypisk dyrkede hudekvivalenten fra overflødig kryoprotektantopløsning, og emballering av den behandlede organotypisk dyrkede hudekvivalenten i fravær av ytterligere kryoprotektant for å tilveiebringe en emballert
- 20 hudekvivalent, hvor emballasjen fortrinnsvis ytterligere omfatter inneslutning av den kryokonserverte hudekvivalenten i en steril pose og inneslutning av nevnte sterile pose i en andre pose; og
- c) frysing av emballert organotypisk dyrket hudekvivalent for å gi en kryokonservert hudekvivalent.

25

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

30

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor frysingen videre omfatter frysing ved -80°C eller direkte eksponering for temperaturer fra -50°C til -

100°C.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor hudekvivalenten beholder levedyktigheten etter tining, hvor den kryokonserverte hudekvivalenten fortrinnsvis har en A_{550} på minst 50% av en referansehudekvivalent som bestemt ved en MTT-analyse.

5. Fremgangsmåte for tining av en kryokonservert hudekvivalent fremstilt ved metoden ifølge krav 1 før påføring på en pasient, omfattende:

a) oppvarming av den kryokonserverte hudekvivalenten, hvor oppvarmingen fortrinnsvis omfatter eksponering for romtemperatur på stedet for anvendelse; og

b) å bringe nevnte kryokonserverte hudekvivalent i kontakt med en diffusjonsmediator valgt fra gruppen bestående av et absorberende medium, et membran og en dialysepose, og som omfatter en vevskompatibel løsning, fortrinnsvis en bufret vevskompatibel løsning, for å tillate fjerning av nevnte kryoprotektantløsning ved diffusjon.

6. Fremgangsmåte ifølge krav 5, hvor diffusjonsmediatoren er et absorberende medium, hvor det absorberende mediet fortrinnsvis er valgt fra gruppen bestående av Telfa-pads, skumunderlag, gasbind og elektroder som inneholder det vevskompatible mediet.

7. Kryokonservert hudekvivalent fremstilt ved metoden ifølge krav 1.

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

9. Emballert kryokonservert hudekvivalent ifølge krav 7 for anvendelse ved behandling av sår, hvor hudekvivalenten er for påføring på et sår

under forhold slik at hudequivivalenten kommer i kontakt med såret.

10. Sett omfattende en kryokonserverte hudequivivalent ifølge krav 7, et absorberende medium og en vevskompatibel løsning.

5

11. Sett ifølge krav 10, hvor den kryokonserverte hudequivivalenten er pakket i en forseglbar innkapsling eller at den kryokonserverte hudequivivalenten er tilveiebrakt i et kulturbeholder pakket i en pose.

10

12. Fremgangsmåte ifølge krav 1, videre omfattende å danne den organotypisk dyrkede hudequivivalenten før trinn (a) ved å: tilveiebringe en dyrkningsskål som omfatter et cellekultursubstrat som kan beveges mellom definerte øvre og nedre posisjoner i dyrkningsskålen, og danner en hudequivivalent på cellekultursubstratet, hvor cellekultursubstratet er i den øvre posisjonen, og deretter
15 å senke cellekultursubstratet til den nedre posisjonen for å utføre trinn (a) ifølge krav 1.

20

13. Fremgangsmåte ifølge krav 1, videre omfattende å danne den organotypisk dyrkede hudequivivalenten før trinn (a) ved å:
å tilveiebringe en dyrkningsskål omfattende et innlegg som kan beveges mellom øvre og nedre posisjon i dyrkningsskålen, idet innsatsen har en plan bunnoverflate dannet av et porøst membran,
å danne en dermal ekvivalent omfattende fibroblastceller på det porøse
25 membranet i innsatsen, hvor innsatsen er plassert i den øvre posisjonen i dyrkningsskålen,
dyrking av fibroblastceller for å danne en dermal ekvivalent,
påføring av keratinocytter på den dermale ekvivalenten,
dyrking av keratinocytter i et kulturmedium under forhold slik at
30 keratinocytter danner en hudequivivalent som består av stratifisert epitel,
fjerne nevnte kulturmedium,

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

5 14. Emballasje av kryokonservert hudkvivalent fremstilt i henhold til krav 1, for anvendelse ved behandling av en pasient, hvor den kryokonserverte hudkvivalenten før påføring på pasienten er

a) tint og ikke skylt; eller

b) varmes, overføres aseptisk fra pakningen og bringes i kontakt med et absorberende medium omfattende en vevskompatibel løsning for å

10 tillate fjerning av nevnte kryobeskyttende løsning ved diffusjon.

15 15. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor trinn (a) forekommer ved en temperatur på 2°C til 8°C i 15 minutter til 60 minutter inkuberes hudkvivalenten i kryobeskyttelsesløsningen i 10 til 60 minutter, fortrinnsvis fra 20 til 30 minutter.