

PREKLINISKA STUDIER AV PATIENTSPECIFIKT FÖRBAND

Innovationsplattformen

2018-12-21



FORMAS



STRATEGISKA
INNOVATIONS-
PROGRAM

Sammanfattning

Denna rapport är en sammanslagning av arbetspaket två och fyra inom projektet Onskin. Rapporten tar upp pre-kliniska studier på materialet nanocellulosa samt av den modul som ligger närmast huden i den framtagna Onskin-prototypen som gjordes i arbetspaket tre. Denna modul är fuktgivaren som ska ha direktkontakt med såret och är därför av yttersta vikt att den är hudvänlig och inte hämmar läkning.

Tester som gjorts innefattar test av cytotoxicitet, hudirritation, förekomst av mikroorganismer, test av endotoxiner, test av hudsensibilisering samt migrering/proliferation av celler.

Resultaten från dessa in vitro-studier visar att varken materialet nanocellulosa i ren form eller i 3D-printad prototyp i den utformning som designades i Onskin-prototypen, är toxisk eller irriterande mot huden. Hela processen från materialtillverkning till 3D-printad design visade sig också kunna göras sterilt, vilket är lovande för framtida tillverkning.

Att kunna säkerställa en good manufacturing process där slutprodukten är steril är dock i framtiden viktigt att etablera vid en större produktion. Mer utveckling av de fyra lager som ingår i Onskin-prototypen måste göras för att säkerställa att sårförbandet säkerställer de krav som framtagits i behovsstudien under arbetspaket noll. Efter det krävs fler pre-kliniska studier i enlighet med de som ingår för att få en godkänd medicinsk produkt. Dessa studier måste göras både på materialet nanocellulosa i ren form men också av alla lager i Onskin-prototypen (fuktgivaren, absorbenten, barriärfilmen och stödstrukturen). Därefter kan kliniska studier påbörjas. Under behovsstudien uppmärksammades två andra problemområden kring sårvård och behandling, *Bedömning* och *kommunikation*. I behovsstudien *WPO* framkom det att finns behov av bättre verktyg för att bedöma svårläkta sår. *Kommunikationen* handlar om brister mellan medarbetare-medarbetare och medarbetare-patient för att föra vidare information om behandlingen av svårläkta sår. Dessa områden behöver tas i beaktning vid vidare arbete.

Det framtagna koncept av ett patientspecifikt sårförband som utvecklats i projektet Onskin skulle kunna ha en stor nytta i framtiden. Sårförbandet är baserat på behov från användare och utvecklat med hållbara material från Sveriges skogar. Att kunna utgå från behovet och anpassa sårförband efter ett specifikt sår hade inneburit en stor nytta för patienten och vårdpersonal för att lättare kunna tillgodose den enskilde patientens behov. Att också kunna nyttja den tillgång av skog som Sverige har till nya framtida användningsområden gynnar även Sveriges samhälle.

Innehåll

1.	Inledning.....	7
1.1.	Bakgrund.....	7
1.2.	Projektplan	7
1.3.	Omfattning.....	7
1.4.	Syfte och mål.....	8
2.	Ett patientspecifikt förband.....	9
3.	Metoder och genomförande.....	11
3.1.	Test av cytotoxicitet	11
3.2.	Test av hudirritation.....	11
3.3.	Förekomst av mikroorganismer (Bioburden).....	12
3.4.	Test av endotoxiner	12
3.5.	Test av hudsensibilisering (GARDskin-studie).....	12
3.6.	Test av migrering/proliferation av celler	12
4.	Diskussion.....	13
5.	Indelning för vidare arbete	14
5.1.	Tester.....	14
5.2.	Övrigt.....	14
6.	Slutsats	15
7.	Referenser	15

1. Inledning

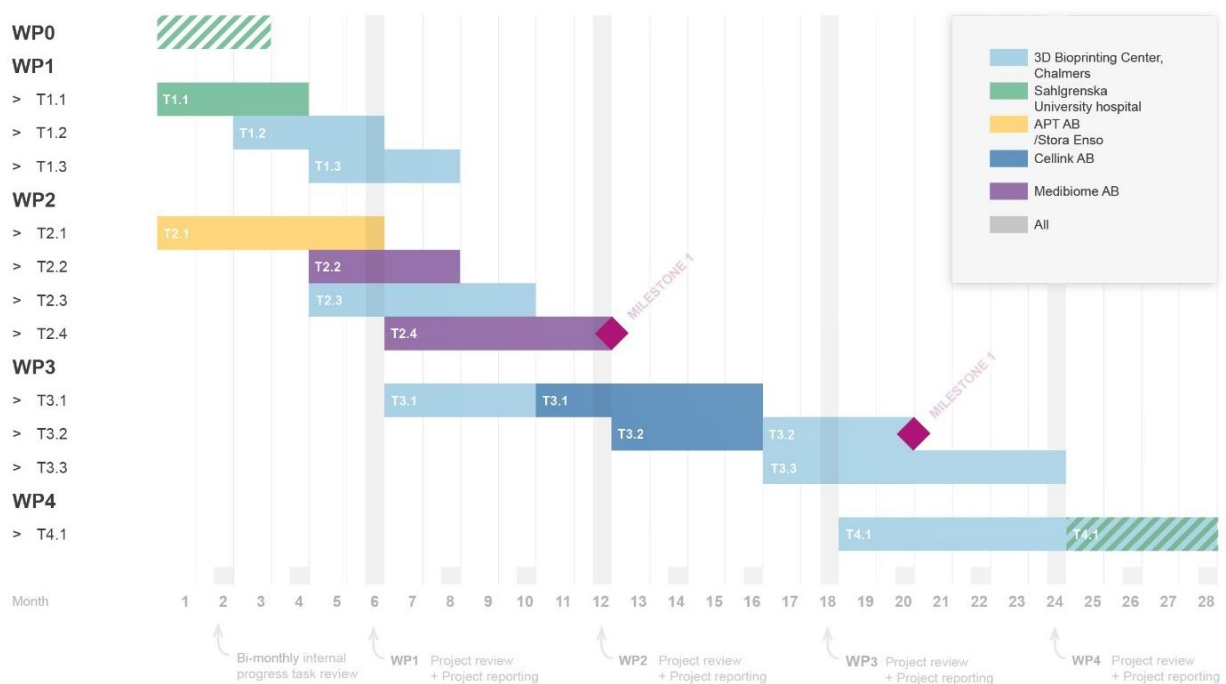
1.1. Bakgrund

Arbetet som beskrivs i denna rapport är en sammanslagning av två delprojekt inom det Vinnovafinansierade projektet Onskin. Delprojekten som ingår i rapporten är ”work package 2” (WP2) samt ”work package 4” (WP4). Dessa behandlar prekliniska studier av det utvecklade sårförbandet av 3D-printat biomaterial i form av nanocellulosa. Studierna i rapporten fokuserar på prekliniska studier av biomaterialet i sig, men också på färdig 3D-printad form i den design som togs fram under WP3.

1.2. Projektplan

I Figur 1 visas projektplanen för hela projektet Onskin med tidsplan samt medverkande projektpartners.

Figur 1 - Projektplan Onskin



1.3. Omfattning

Denna rapport innefattar två arbetspaket inom projektet Onskin, WP2 och WP4. Aktiva parter i dessa arbetspaket var 3D Bioprinting Center Chalmers, Advanced Polymer Technology AB, Stora Enso, Medibiome AB samt Sahlgrenska Universitetssjukhuset. Information, analyser och resultat som delprojektet baserades på samlades in från Sahlgrenska Universitetssjukhuset, Medibiome AB och Chalmers.

Förändring av arbetspaket

Arbetspaketen för projektet Onskin har förändrats efter tid ifrån den ursprungliga planen. Den ursprungliga planen var följande:

- WP1: Skanna patient och transformera bilder till en 3D-modell som kan 3D-printas.
- WP2: Förbereda materialet nanocellulosa för medicinsk tillämpning och testa biokompatibilitet av materialet i form av gel, skum och film.
- WP3: 3D-printa nanocellulosa med komplex geometri samt bevara struktur även när materialet är i torkat format.
- WP4: Kliniska studier på utvecklat 3D förband och implementering av resultat.

Förändringar från denna plan är bland annat att ett tidigare arbetspaket tillkommit, kallad WP0. En annan förändring var att det inte ansågs vara lämpligt att genomföra kliniska tester i WP4 efter att WP3 avslutats, även om en prototyp av ett sårförband hade designats (Onskin-prototypen). Därför fokuserade det på att under WP4 utföra prekliniska studier av materialet nanocellulosa och Onskin-prototypen. Då liknande studier gjordes under WP2 beslutades det att resultat av WP2 och WP4 presenteras i samma rapport. Vid projektets avslut innefattas följande arbetspaket:

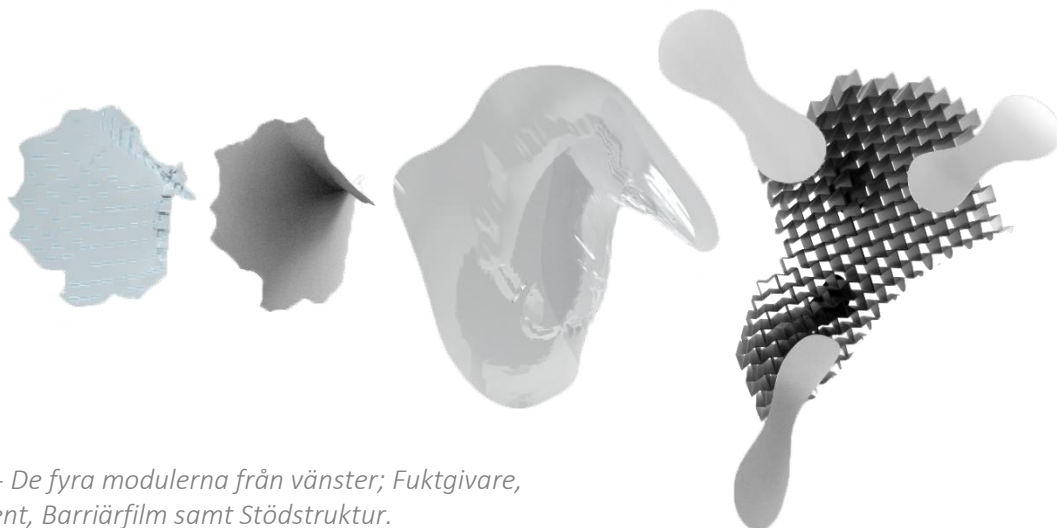
- WP0: Behovsstudie för att identifiera behov och orsaker till problem vid läkning av sår efter hudtransplantationer.
- WP1: Se ovan.
- WP3: 3D-printa och designa nanocellulosa med komplex geometri samt bevara struktur även när materialet är i torkat format. Dessutom utreda möjligheten att tillverka sårförband av 3D-printad nanocellulosa utifrån behoven från WP0.
- WP2 och WP4: Ta fram biokompatibel nanocellulosa för tillämpning i ett sårförband. Dessutom pre-kliniska studier på utvecklad sårförbands-prototyp från WP3.

1.4. Syfte och mål

Syftet med WP2 var att ta fram biokompatibel nanocellulosa för tillämpning i ett sårförband. Syftet med WP4 var att utföra pre-kliniska studier av den utvecklade sårförbands-prototypen från WP3.

2. Ett patientspecifikt förband

Utifrån de behov och den kravlista som togs fram på ett sårförband under WP0, utvecklades och designades en prototyp av ett sårförband under WP1 och WP3. Konceptet för sårförbandet (Onskin-prototypen) går att läsa mer i detalj i rapporten *Utveckling av ett patientspecifikt förband – Med mikrofibrillär cellulosa från skogen*. Onskin-prototypen är en patientspecifik lösning som består av fyra olika lager, modul 1–4. Dessa lager har olika funktioner som tillsammans uppfyller de krav på ett sårförband som uppkommit från behovsstudien. För illustration av Onskin-prototypen se Figur 2.



Figur 2 - De fyra modulerna från vänster; Fuktgivare, Absorbent, Barriärfilm samt Stödstruktur.

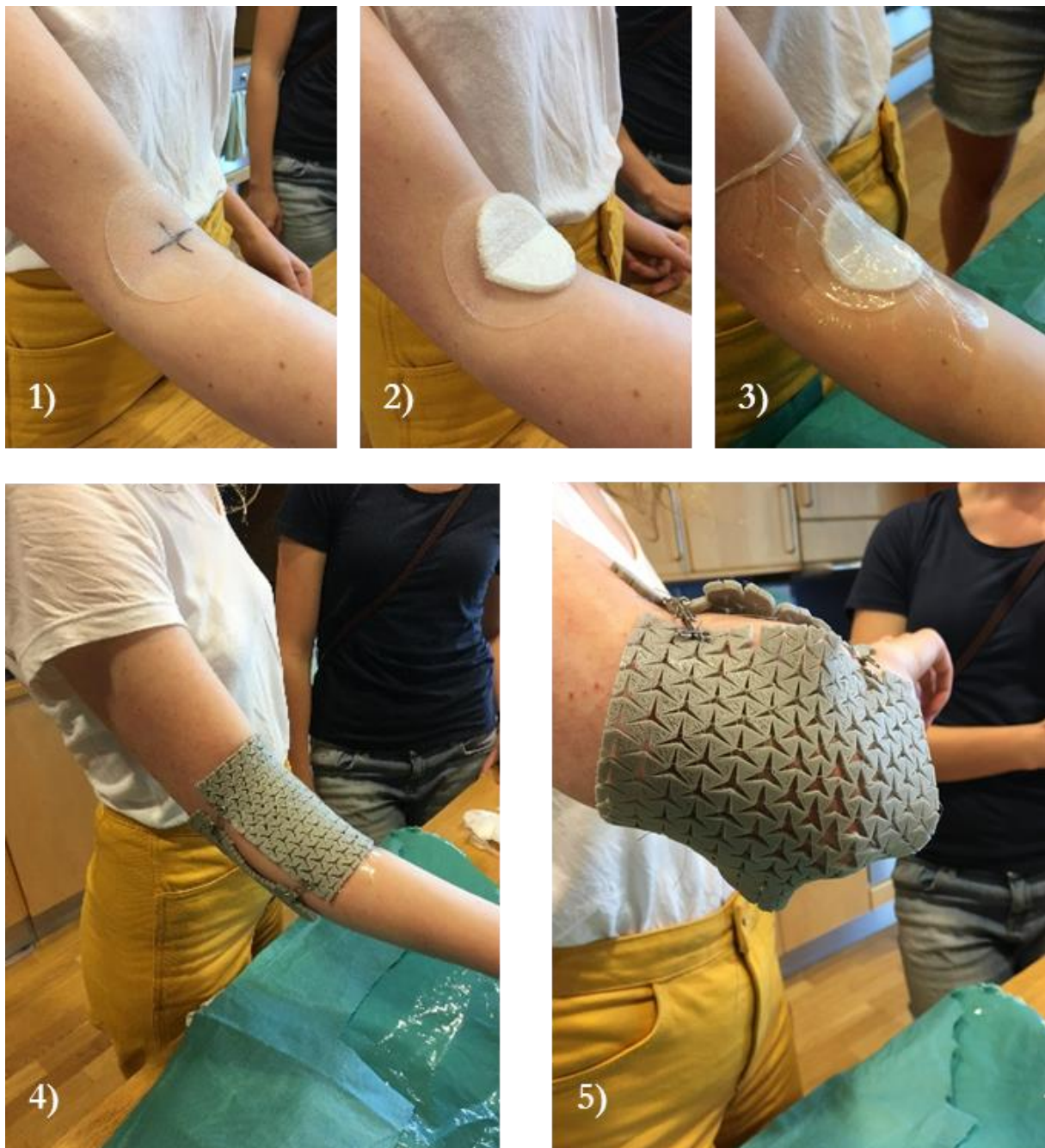
Sammanfattat är konceptet följande:

- Modul 1, fuktgivaren, består av nanocellulosa i kombination med alginat som 3D-printats för att uppnå bästa passform för det specifika såret. Fuktgivaren ger fukt till såret för att förbandet inte ska torka in och orsaka smärta för patienten, samt för att forskning visar att sårhäkning sker bäst i fuktig miljö.
- Modul 2, absorbenten, är en aerogel av nanocellulosa vilken har en bra absorberande förmåga. Absorbenten avlägsnar fri sårvätska, då sådan kan orsaka att ett hudtransplantat förhindras att läka fast, att infektioner uppstår, samt skada såret.
- Modul 3, barriärfilmen, är en elastisk och hydrofob film som i framtiden också skulle kunna bestå av nanocellulosa. Barriärfilmen motverkar att vätska läcker ut från förbandet, samt att bakterier och andra skadliga organismer tar sig in.
- Modul 4, stödstrukturen, designades som ett meta-material som kan ändra form efter rörelse och är till för svåra konkava sårområden och främst till sår med hudtransplantat. För att ett hudtransplantat ska växa fast, och för att fuktgivarens och absorbentens funktioner ska kunna nyttjas, krävs att förbandet hela tiden har kontakt med såret. Stödstrukturen möjliggör detta genom ett lätt konstant tryck som håller förbandet mot sårbottnen.

I projektet Onskin utvecklades modul 1, 2 och 4 vidare under WP3. Modul 3, barriärfilmen, utvecklades inte vidare, men i framtiden är tanken att denna modul också ska bestå av hållbara

material från skogen. Resultatet av utveckling av dessa moduler kan ses i Figur 3, där modul 3 är ersatt av en befintlig film på marknaden och används enbart här för att illustrera hela konceptet. Den modul vars egenskaper bäst uppfyllde för modulen satta krav var fuktgivaren, vars syfte var att bevara fukt och transportera överflödigt sårvätska.

Denna modul ska placeras i direktkontakt med såret och därför bedömdes det som extra kritiskt att material och lagret inte hämmar läkningen och funkar bra mot hud. Av dessa anledningar var fokus för de prekliniska analyserna som presenteras i denna rapport olika tester på fuktgivaren.



Figur 3. Utveckling av Onskin-prototypen. 1) Fuktgivaren (modul 1), 2) Absorbenten (modul 2), 3) Barriärfilmen (modul 3), 4) Stödstrukturen (modul 4) i utsträckt läge samt 5) Stödstrukturen i böjt läge.

3. Metoder och genomförande

Detta avsnitt innefattar de analyser som utfördes under WP2 och WP4. Litteraturstudier och råd från experter användes som metod för informationsinsamling. Avsnittet ger en sammanfattad beskrivning av de analyser som genomfördes samt resultaten för respektive analys. Detaljerade beskrivning av analyserna kan läsas i bilagor, till vilka hänvisningar finns i respektive avsnitt nedan.

Olika pre-kliniska analyser genomfördes både på biomaterialet nanocellulosa samt på den prototyp av modul 1 (fuktgivaren) som utvecklades under WP3. Den 3D-printade prototypen av modul 1 kallas nedan antingen MFC1_8020 eller MFC8_8020. MFC1_8020 står för enzymatisk nanocellulosa mixad med 20% alginat. MFC8_8020 står för karboxymetylerad nanocellulosa mixad med 20% alginat. Analyserna på materialen innefattade följande:

1. Test av cytotoxicitet (utfört på nanocellulosa samt printad prototyp)
2. Test av hudirritation (utfört på printad prototyp)
3. Förekomst av mikroorganismer (bioburden) (utfört på nanocellulosa och printad prototyp)
4. Test av endotoxiner (utfört på nanocellulosa och printad prototyp)
5. Test av hudsensibilisering (GARDskin studie) (utförd på printad prototyp)
6. Migrering/proliferation av celler (Scratch analys) (utfört på printad prototyp)

3.1. Test av cytotoxicitet

Metod och resultat kan läsas i Bilaga A, B, C utfört på nanocellulosa och Bilaga D utfört på printad prototyp.

Sammanfattat utfördes tester på följande: MFC1 (Stora Enso), MFC8 (Stora Enso), NFC Gen 1 (annan producent) samt MFC1_8020 och MFC8_8020. Både direkt och en indirekt metod användes i enlighet med ISO 10993-5: *In vitro cytotoxicity*. Tester genomfördes främst på prover i hydrogel-form, men enstaka tester gjordes även på frystorkad nanocellulosa. I samtliga tester studerades cellmorfologin av MRC-5 (human lung normal fibroblasts).

Resultaten visade att varken ren nanocellulosa eller i printad prototyp påvisar cytotoxicitet.

3.2. Test av hudirritation

Metod och resultat kan läsas i Bilaga E.

Sammanfattat har tester utförts på MFC1_8020 och MFC8_8020 i form av hydrogel. Analys har gjorts i enlighet med ISO/TC 194 WG 8. Extrakt från dessa prover testades på epiderm tissue (EPI-200-SIT-MD, Mat tek). Cellöverlevnad och inflammationsmarkör IL1-alpha analyserades.

Resultatet av testerna visar att ingen av prototyperna av modul 1 gav inflammatorisk respons som skapar hudirritation. Således klassas MFC8_8020 och MFC1_8020 som icke-irriterande material.

3.3. Förekomst av mikroorganismer (Bioburden)

Beskrivning av metod och resultat kan läsas i Bilaga F. Protokoll återfinns i Bilaga G.

Sammanfattat har tester utförts på MFC8 hydrogel och MFC8_8020. Printade diskar skickades till Mikrolab för analys. Analyserna gjordes enligt gällande protokoll EP 2.6.12 och USP<61> för printade prover av MFC8_8020 samt EU pharm 2.6.12 och USP<61> för hydrogel av MFC8.

Förekomsten av mikroorganismer ligger på <1 CFU/mL för MFC8_8020 samt <10 CFU/g för MFC8 hydrogel. Resultatet av testerna visar ingen tillväxt av mikroorganismer. Det betyder att steriliseringsprocessen fungerar och prototypen av modul 1 går att framställas sterilt.

3.4. Test av endotoxiner

Beskrivning av metod och resultat kan läsas i Bilaga F. Protokoll återfinns i Bilaga G.

Sammanfattat har tester utförts på MFC8 hydrogel och Onskin-prototypen MFC8_8020. Extrakt från prover i vattenlösning skickades för analys till Mikrolab i Stockholm. Analys utfördes enligt gällande EP 2.6.14 metod D och USP<85>.

Resultatet för analyserna finns i Bilaga G. Endotoxinnivåerna för MFC8 låg mellan <0.5-5.75 EU/mL och för MFC8_8020 mellan 12.4-14.25 EU/mL. Värdena för både MFC8 och MFC8_8020 är väldigt låga, således betyder det låga halter av endotoxin och låg risk att skapa infektion.

3.5. Test av hudsensibilisering (GARDskin-studie)

Beskrivning av metod för test och resultat kan läsas i Bilaga F respektive H.

Sammanfattat har tester utförts på Onskin-prototypen MFC8_8020. Printade prover skickades till Senzagen i Lund för analys. Analysen går ut på att studera om proverna skapar en allergisk reaktion på hud via användning av en så kallad GARD plattform (Genomic Allergen Rapid Detection).

Resultatet av testerna av MFC8_8020 gav ingen allergisk reaktion och kan klassas som icke-hudsensibiliserande.

3.6. Test av migrering/proliferation av celler

Beskrivning av metod och resultat kan läsas i Bilaga I.

Tester har utförts på nanocellulosa från annan producent än Stora Enso samt materialet cellink som består av nanocellulosa med alginat. Analysen är en modell för att studera sårsläkning av celler.

En reva skapas (artificiellt sår) på ett lager av celler som fastnat på botten av en brunn. Önskade materialet att studera placeras ovanpå cellerna och hastigheten för hur snabbt cellerna stänger revan studeras (läkningsprocessen). Denna process jämförs mot att inte ha något liggandes på cellerna, dvs. blankprov.

Resultatet av testerna indikerar att celler läker ihop sig snabbare i blanka prover än vid användning av printad konstrukt av nanocellulosa eller cellink (obs. inte prototyp av modul 1 som testades). Inga skillnader sågs mellan grupperna med konstrukt, vare sig med SVF (syntetisk sårvätska) eller FBS (fetal bovine serum) tillsatt. Anledningen till att den hämmande läkningen i 3D-printade konstrukt beror inte på att materialet är toxiskt, i och med tidigare referenser [1, 2]. Istället resonerades det att den hämmande läkningen beror på en kombination av att konstrukten utgör en direkt fysisk inhibering av cellmigration samt att hanteringen av konstrukten vid mikroskopering kan ha skadat cellerna. Upprepning av försöken samt fler tidpunkter för analys behövs för att säkerställa om våra preliminära resultat stämmer. Denna analys är under metodutveckling och testerna bör tas som en indikation och inget definitivt.

4. Diskussion

De prekliniska analyserna som gjorts på materialet nanocellulosa och i den kombination med alginat som utvecklades i WP3 för modul 1 av Onskin-prototypen tyder på god potential för vidare utveckling av ett patientspecifikt sårförband. Varken nanocellulosa i sig eller i 3D-printad form med alginat visar på cytotoxicitet, hudirritation, hudsensibilitet och går att tillverkas sterilt. I vidare steg måste sterilitet också kunna påvisas vid framtagning av de andra modulerna i Onskin-prototypen. Processen för framställning, från tillverkning av nanocellulosan till 3D-printat förband måste således följa en GMP (Good Manufacturing Process) där bland annat sterila komponenter ska garanteras.

Analyserna har enbart gjorts på ren nanocellulosa (från olika producenter och med olika laddning) och modul 1 i Onskin-prototypen av ett sårförband. Det återstår att göra liknande tester för de andra modulerna i Onskin-prototypen, framförallt modul 2 (absorbenten). I ett senare steg bör kliniska tester genomföras för att studera förbandets egenskaper och hur det står sig mot de produkter som idag finns på marknaden.

5. Indelning för vidare arbete

5.1. Tester

- Prekliniska analyser på modul 2 och 3, samma analyser som i denna rapport som gjorts på modul 1.
- Fler tester i enlighet med de som krävs för att få en produkt godkänd som en medicinsk produkt. Detta innefattar t.ex. ISO 10993–13: Identifiering och kvantifiering av degraderingsprodukter och ISO 10993–18: Kemisk karakterisering.
- Tester av de olika modulerna på hud (frisk hud på människa eller t.ex. gris).
- Mekaniska tester på modul 1 och 2, t.ex. hur de håller ihop både i torr sårmiljö under en långre tid (inte går sönder) och under blöta förhållanden (stabilitet av material över tid).
- Studera i sårmiljön för att se om proteiner och enzymer transporteras genom första modulen eller om det ansamlas på sårytan.
- Utröna vilka typer av sår som är mest lämpade att utveckla de första prototyperna för.

5.2. Övrigt

Generellt sett behöver alla moduler utvecklas och testas mer då de är långt ifrån färdiga produkter. Viktigt är att i detta tidiga skede utveckla modulerna i enlighet med klassificering av medicinska produkter så att utvecklingen inte går åt fel håll. Fokuset borde ligga på att utveckla det fuktgivande lagret, modul 1, då det har mest potential när det kommer till att bli ett innovativt förband som är både 3D-printat efter patientens form och består av ett hållbart material. Dessutom har det fuktgivande lagret potential för förbättrad läkning, men det behövs mer tester för att bekräfta detta. Till exempel har ett företag s2 Medical utvecklat biosyntetiska cellulosa förband för att läka brännskador, större sår och liggsår. De har gjort kliniska studier som bland annat visade att det var bättre att behandla brännskador med mikrobiell cellulosa jämfört med behandling av silver sulfadiazine [3].

Även om modul 1 har mest potential i det här skedet är det även intressant att fortsätta utveckla absorbenten och barriären, modul 2 och 3 respektive. Dessa moduler är inte lika innovativa i sitt koncept och ännu har inga tester gjort som indikerat att de står sig bättre än produkter med motsvarande funktion som idag finns på marknaden. Å andra sidan är det viktigt att vi går mot en vård som är hållbar och ett steg är att utveckla modul 2 och 3 till att bli konkurrerande produkter som innehåller det hållbara materialet nanocellulosa.

Tidigt i Onskin-projektet lades fokuset på brännskadesår och förband för patienter som genomgått en hudtransplantation. Detta fokus har under projektets gång skiftats under till att även innefatta förband för svårsläktade sår. I ett vidare arbete behövs det utredas *vilket typ av sår där behovet av bättre förband är som störst och vart man ska lägga fokus på att utveckla*. En anledning till att projektet fokuserat på hudtransplantationer är att det är väldigt kostsamt att behöva göra en omoperation på grund av

att transplantatet inte har läkt. Värdet i att tillverka ett dyrt och potentiellt tidskrävande 3D-printat förband ligger i att kunna förhindra en ytterligare operation. I den framtagna Onskin-prototypen är det modul 4, stödstrukturen, som främst utvecklats till att vara ett förband för hudtransplantat, då den ser till att förbandet hålls mot såret med ett lätt konstant tryck. Därför vore det fördelaktigt att fortsätta utveckla stödstrukturen men för detta krävs studier som visar att stödstrukturens stöttar läkning av hudtransplantat.

Utöver att modulerna behöver vidareutvecklas, finns det en del ytterligare funktioner som är intressanta för ett fortsatt arbete. Exempelvis är det intressant att diskutera processen kring hur ett 3D-printat förband skulle framställas rent praktiskt. Vad händer om såret krymper, behöver man då 3D-printa ett nytt förband? Här skulle en lösning vara att förbandet innehåller så kallade 4D-funktioner som skulle möjliggöra att förbandet krymper tillsammans med såret. Dessutom skulle man kunna skapa mer avancerade förband som kan mäta pH-värde för att se hur såret läker, använda elektricitet i förbandet för att stötta läkningen eller integrera antimikrobiella medel.

6. Slutsats

Det framtagna koncept av ett patientspecifikt sårförband som utvecklats i projektet Onskin skulle kunna ha en stor nytta i framtiden. Sårförbandet är baserat på behov från patienter och vården och utvecklat med hållbara material från Sveriges skogar. Att kunna utgå från behovet och anpassa sårförband efter ett specifikt sår hade inneburit en stor nytta för patienten och vårdpersonal för att lättare kunna tillgodose den enskilde patientens behov. Att också kunna nyttja den tillgång av skog som Sverige har till nya framtida användningsområden gynnar även Sveriges samhälle. Nanocellulosa, som redan tillverkas idag i Svenska skogsindustrier, har visat stor potential att kunna användas i ett sårförband. Det har också visat sig kompatibelt med hud. Ytterligare tester behöver göras och konceptet behöver utvecklas vidare för att se till att förbandet uppfyller de funktioner och behov som finns. Dessutom har vi två till problemområden som bör ses över, problemkategorierna bedömning och kommunikation.

7. Referenser

- 1) Möller, T., et al., *In Vivo Chondrogenesis in 3D Bioprinted Human Cell-laden Hydrogel Constructs*. *Plast Reconstr Surg Glob Open*, 2017. **5**(2): p. e1227.
- 2) Markstedt, K., et al., *3D Bioprinting Human Chondrocytes with Nanocellulose–Alginate Bioink for Cartilage Tissue Engineering Applications*. *Biomacromolecules*, 2015. **16**(5): p. 1489-1496.
- 3) Aboelnaga, A., et al., *Microbial cellulose dressing compared with silver sulphadiazine for the treatment of partial thickness burns: A prospective, randomised, clinical trial*, 2018. **44**(8); p. 1982-1988. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.burns.2018.06.007>.