



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102015000078236
Data Deposito	30/11/2015
Data Pubblicazione	30/05/2017

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	L	27	36

Titolo

METODO PER L'INATTIVAZIONE DI XENOANTIGENI IN TESSUTI BIOLOGICI
--

METODO PER L'INATTIVAZIONE DI XENOANTIGENI IN TESSUTI BIOLOGICI

DESCRIZIONE

Il presente trovato ha per oggetto un metodo per l'inattivazione di xenoantigeni in tessuti biologici, in particolare per l'inattivazione di xenoantigeni in tessuti impiegabili per la manifattura di sostituiti bioprotesici, destinati ad un utilizzo in campo clinico umano o veterinario.

In particolare il trovato riguarda un metodo per garantire l'inattivazione di xenoantigeni in tessuti connettivali nativi e/o fissati, eterologhi od omologhi, in particolare dell'epitopo alpha-Gal, in particolare in tessuti cardiovascolari attraverso l'impiego di attività biologiche individuate in composti fenolici, polifenolici e loro derivati.

La produzione di sostituti bioprotesici è attualmente un mercato soggetto ad una forte espansione. Il miglioramento in ambito clinico delle procedure chirurgiche, la diminuzione delle complicazioni post-intervento, lo sviluppo e la gestione di nuovi farmaci immuno-modulatori oltre

ad una più approfondita conoscenza dei meccanismi di interazione tra graft e ospite, tendono a favorire dove possibile l'utilizzo di protesi biologiche costituite da tessuto animale o omologo. In questo senso è da considerarsi rappresentativo, ma non limitante, il settore cardiovascolare soprattutto per l'impatto socio-sanitario che la consolidata prassi della sostituzione valvolare cardiaca può generare.

La tecnologia biomedica è in grado di sviluppare ed applicare chirurgicamente a scopi sostitutivi protesi valvolari capaci di imitare la funzione di apertura e chiusura di valvole native disfunzionanti.

La protesi valvolare ideale dovrebbe essere in grado di consentire un flusso trans-valvolare sovrapponibile a quello della analoga valvola originale sana, garantire una lunga durata e non generare effetti emolitici o trombogenici.

I sostituti valvolari più usati sono protesi biologiche derivate da tessuti xenogenici, in particolare da valvole di maiale o prodotte con pericardio bovino o equino.

Tali protesi e sostituti valvolari hanno lo

svantaggio di andare incontro a processi degenerativi di distrofia calcifica e/o deterioramento con rottura delle cuspidi, dimostrando una maggior sensibilità verso l'instaurarsi di infezioni endocardiche. Allo scopo di migliorarne le caratteristiche meccaniche, diminuirne l'antigenicità intrinseca e permetterne la conservazione vengono usualmente trattate con agenti chimici cross-linkanti/sterilizzanti quali, come esempio non esclusivo, la glutaraldeide. Possono in aggiunta essere sottoposti a trattamenti secondo protocolli di decalcificazione o detossificazione.

Per tessuto xenogenico s'intende un tessuto che appartiene a un organismo di specie differente dall'uomo; tali materiali possiedono antigeni di superficie specifici e tollerabili all'interno della stessa specie d'origine, ma incompatibili nel caso d'impianto nell'uomo dove, se non adeguatamente trattati, sono in grado di scatenare l'attivazione della cascata del complemento con aggregazione piastrinica, generando una situazione simile a quella che si verifica nel caso di incompatibilità tra gruppi sanguigni.

Tale fenomeno è conosciuto con il nome di rigetto iperacuto. La principale causa dell'instaurarsi di tale meccanismo è la presenza dello xenoantigene alpha-Gal. Questo epitopo è un di-galattoside (galattosio-alpha1,3-galattosio) rinvenuto su glico-proteine e glico-lipidi di membrana (principalmente di cellule endoteliali), oltre che in diversi tipi cellulari quali monociti, granulociti e globuli rossi ed importanti distretti tissutali come miocardio e osso. Tale determinante antigenico è costitutivamente espresso in tutti i mammiferi, ad eccezione dei primati superiori e dell'uomo.

L'organismo umano, fin dalla nascita, esprime anticorpi diretti contro tale epitopo come risultato di una continua stimolazione da parte della flora batterica intestinale.

Ad oggi, la biocompatibilità dei tessuti xenogenici destinati alla fabbricazione di bioprotesi è ottenuta attraverso il trattamento con la già citata glutaraldeide.

Nonostante tale procedura, l'epitopo alpha-Gal è dimostrato permanere in maniera reattiva nei sostituti valvolari attualmente commercializzati

determinando, dopo l'impianto, un aumento degli anticorpi anti alpha-Gal circolanti sia in pazienti pediatrici che in adulti.

Inoltre, il complesso antigene-anticorpo che viene a formarsi sembra sia direttamente coinvolto nella promozione della deposizione di sali di calcio favorendo la formazione di episodi di distrofia calcifica della valvola.

Il compito del presente trovato è quello di realizzare un metodo per l'inattivazione di xenoantigeni in tessuti biologici capace di ovviare ai limiti dei trattamenti noti.

In particolare, è scopo del trovato mettere a punto un metodo applicabile a tessuti connettivali nativi e/o fissati, eterologhi od omologhi, impiegabili per la manifattura di sostituiti bioprotesici, per uso in campo clinico umano o veterinario.

Ulteriore scopo del trovato è quello di mettere a punto un metodo per l'inattivazione di xenoantigeni in tessuti biologici atto a garantire l'inattivazione dell'epitopo alpha-Gal in tessuti cardiovascolari.

Un altro scopo del trovato è quello di mettere a

punto un metodo per l'inattivazione di xenoantigeni in tessuti biologici con cui si riescano ad inattivare i suddetti epitopi garantendo un efficace trattamento applicabile ai diversi tipi di sostituti bioprotesici attualmente in commercio.

Ancora uno scopo del trovato è quello di mettere a punto un metodo che non favorisca, dopo un impianto, un aumento degli anticorpi anti alpha-Gal circolanti.

Ancora uno scopo del trovato è quello di mettere a punto un metodo che non promuova la deposizione di sali di calcio, limitando quindi la formazione di episodi di distrofia calcifica della valvola.

Un ulteriore scopo del trovato è quello di mettere a punto un metodo realizzabile con attrezzature e macchine di tipo noto.

Questo compito, nonché questi ed altri scopi che meglio appariranno in seguito, sono raggiunti da un metodo per l'inattivazione di xenoantigeni in tessuti biologici, in particolare in tessuti impiegabili per la manifattura di sostituti bioprotesici e/o in sostituti bioprotesici già allestiti e destinati ad uso clinico umano o

veterinario, caratterizzato dal fatto di prevedere le seguenti fasi:

- realizzare una soluzione a base di composti fenolici, polifenolici o loro derivati, per la inattivazione di almeno parte degli epitopi xenogenici da detti tessuti;
- incubare i campioni da trattare nelle diverse soluzioni a base di fenoli/polifenoli in condizioni controllate;
- sottoporre i tessuti trattati ad una serie di lavaggi.

Forma oggetto del trovato anche un tessuto connettivale ottenuto con un metodo per l'inattivazione di xenoantigeni in tessuti biologici secondo il trovato come sopra descritto, caratterizzato dal fatto di presentare almeno parte della componente antigenica in forma inattiva.

Forma oggetto del trovato anche un uso di tessuto connettivale, ottenuto con un metodo per l'inattivazione di xenoantigeni in tessuti biologici secondo il trovato come sopra descritto, per la manifattura di sostituiti bioprotesici e/o facenti parte di sostituti bioprotesici già

allestiti, per uso in campo clinico umano o veterinario.

Forma oggetto del trovato anche un kit per l'esecuzione di un metodo per l'inattivazione di xenoantigeni in tessuti biologici secondo il trovato come sopra descritto, che si caratterizza per il fatto di comprendere almeno:

- uno o più contenitori contenenti il tampone in cui sciogliere la dose di composti fenolici, polifenolici o loro derivati più adatta;
- uno o più contenitori contenenti la dose di composti fenolici, polifenolici o loro derivati in polvere da unire al tampone;
- uno o più contenitori contenenti i tamponi di lavaggio;
- libretto di istruzioni riportante la descrizione delle tempistiche e delle modalità di applicazione della procedura.

Ulteriori caratteristiche e vantaggi del trovato risulteranno maggiormente dalla descrizione di una forma di esecuzione preferita, ma non esclusiva, del metodo per l'inattivazione di xenoantigeni in tessuti biologici secondo il trovato.

Negli uniti disegni:

- la figura 1 rappresenta i risultati, in percentuale, relativi all'applicazione di un metodo secondo il trovato in una sua prima variante applicativa;
- la figura 2 rappresenta i risultati, in percentuale, relativi all'applicazione di un metodo secondo il trovato in una sua seconda variante;
- la figura 3 rappresenta i risultati, in percentuale, relativi all'applicazione di un metodo secondo il trovato in una sua terza variante;
- la figura 4 rappresenta i risultati, in percentuale, relativi all'applicazione di un metodo secondo il trovato in una sua quarta variante applicativa.

DEFINIZIONI

Con il termine "composti fenolici" si identificano molecole caratterizzate, almeno in loro parte, dalla presenza di un nucleo aromatico (anello benzenico) legato a uno o più gruppi funzionali ossidrilici. Tra i suddetti sono da considerare come esempio non limitante: i fenoli semplici (molecole con un solo anello benzenico e

contenenti come sostituenti solo gruppi ossidrilici, es. fenolo ed idrochinone), le aldeide fenoliche (contenenti sia il gruppo fenolico che il gruppo aldeidico, es. aldeide vanillica), gli acidi fenolici (es. acidi cinnamici), le fenilammine (molecole di natura anfotera contenenti un gruppo debolmente acido e uno particolarmente basico, es. fenilalanina), i fenoli composti (l'anello fenolico è legato ad un altro anello benzenico o ad altri composti eterociclici aventi gruppi funzionali ossidrilici/lattonici/chetonici, es. cumarine e xantoni), i flavonoidi (composti da due anelli benzenici collegati mediante una catena a tre atomi di carbonio costituente un anello eterociclico ossigenato, es. catechine, flavononi, flavoni, calconi, flavanonoli, flavanoli, leucoantocianidine, antocanidine), i fenilpropanoidi (caratterizzati dalla presenza di un anello aromatico con una catena alifatica laterale a tre atomi di carbonio, es. acidi idrossicinnamici) e i tannini. Nel presente trovato i termini "fenoli" e "polifenoli" possono sottendere allo stesso significato e possono

essere utilizzati assieme o in sostituzione uno dell'altro per gli scopi preposti.

Con il termine "xenoantigene" si identificano molecole di origine animale in grado di essere riconosciute dal sistema immunitario e capaci di indurre una risposta di tipo anticorpale/immuno-mediata/infiammatoria nell'organismo umano ospite. Nel presente trovato i termini "xenoantigene", "antigene", "antigene xenogenico", "epitopo" e "determinante antigenico" possono sottendere allo stesso significato e possono essere utilizzati assieme o in sostituzione uno dell'altro.

Con il termine "tessuto connettivale" sono compresi tra gli altri: vasi, valvole cardiache, tendini, legamenti, pericardio, fasce muscolari, dura mater, membrana timpanica, sub-mucosa intestinale, cartilagine, tessuto adiposo e osseo.

Con il termine "fissati" si comprendono quei tessuti sottoposti all'azione di agenti chimici o biologici quali esempi non esclusivi: glutaraldeide, formaldeide e quercitina.

Con il termine "fissati" si comprendono quei tessuti che, sottoposti all'azione di agenti chimici o biologici, sviluppano cross-link intra-

tessuto con la funzione di stabilizzare strutture proteiche, lipidiche e cellulari oltre ad abbassare la potenziale azione antigenica nei confronti dell'ospite. Nella descrizione del presente trovato, i termini "fissati" e "cross-linkati" possono descrivere uno stesso tipo di trattamento e/o sottendere allo stesso significato e possono essere utilizzati assieme o in sostituzione uno dell'altro.

Con il termine tessuti "eterologhi" si intendono tessuti di origine diversa da quella umana. Tali tessuti possono presentarsi all'utilizzo clinico come nativi o non trattati, piuttosto che essere sottoposti a trattamenti che ne potenzino le proprietà rigenerative (quali come esempi puramente illustrativi le procedure di decellularizzazione o di coating/assorbimento di principi pro-rigenerativi/conservativi per la componente cellulare). Nella descrizione del trovato, il termine "eterologo" può sottendere allo stesso significato di "xenogenico" ed essere utilizzato assieme od in sostituzione uno dell'altro.

Con il termine tessuti "omologhi" si intendono

tessuti di origine umana. Tali tessuti possono presentarsi all'utilizzo clinico come nativi o non trattati, piuttosto che essere sottoposti a trattamenti conservativi (quali come esempio puramente illustrativo la criopreservazione) o trattamenti che ne potenzino le proprietà rigenerative (quali come esempi puramente illustrativi le procedure di decellularizzazione o di coating/assorbimento di principi pro-rigenerativi/conservativi per la componente cellulare).

Per "procedure di decellularizzazione" si intendono tutti quei trattamenti singoli o multipli che utilizzano come esempi non limitanti soluzioni saline (iper-, iso- o ipo-toniche), detergenti (ionici, non ionici o zwitterionici) ed enzimi e il cui scopo è la rimozione parziale, selettiva o totale della componente cellulare presente nel tessuto originale.

Con il termine "sostituti bioprotesici" si identificano i dispositivi biologici atti a sostituire una parte dell'organismo mancante (un arto, un organo o un tessuto) o a integrarne una danneggiata, destinati ad uso clinico umano o

veterinario. Nella descrizione del presente trovati i termini "sostituti bioprotesici", "bioprotesi", "protesi biologiche" o "device" possono sottendere allo stesso significato e possono essere utilizzati assieme o in sostituzione uno dell'altro.

Con il termine "animale knockout per l'antigene alpha-Gal" si intende un animale in cui è stato silenziato il gene che codifica per l'enzima alpha-galattosiltransferasi. Tale enzima è responsabile dell'attacco sulle glico-, lipoproteine di membrana dell'epitopo alpha-Gal. La sua assenza determina la produzione di tessuti completamente privi dell'epitopo in questione e del tutto comparabili in quest'ottica al tessuto dell'organismo umano. Nel presente trovato tessuti vascolari di animale knockout per l'antigene alpha-Gal sono stati utilizzati come controllo negativo assoluto.

Di seguito alcuni esempi applicativi, non limitativi, del metodo secondo il trovato.

Un metodo per l'inattivazione di xenoantigeni in tessuti biologici secondo il trovato, in particolare per tessuti impiegabili per la

manifattura di sostituiti bioprotesici e/o in sostituiti bioprotesici già allestiti e destinati ad uso clinico umano o veterinario, comprende le seguenti fasi:

- realizzare una soluzione a base di composti fenolici, polifenolici o loro derivati, per la inattivazione di almeno parte degli epitopi xenogenici da detti tessuti;
- incubare i campioni da trattare nelle diverse soluzioni a base di fenoli/polifenoli in condizioni controllate;
- sottoporre i tessuti trattati ad una serie di lavaggi.

Il metodo comprende anche una successiva procedura di valutazione dell'avvenuta inattivazione dell'epitopo alpha-Gal mediante comparazione di tessuti trattati/non trattati e tessuti porcini knockout per il gene dell'enzima alpha-galattosiltransferasi.

Una simile procedura può essere realizzata ad esempio come descritto nel Brevetto Italiano n° PD2012A000029 e nel Brevetto Europeo n° EP2626701.

I tessuti biologici sono costituiti da tessuti connettivali che possono essere nativi, o nativi e

fissati, o fissati.

I tessuti biologici possono essere eterologhi od omologhi.

L'epitopo antigenico è costituito dall'antigene alpha-Gal.

Le condizioni controllate della fase di incubazione comprendono almeno un trattamento alla temperatura di $40 \pm 2^\circ\text{C}$.

I composti fenolici, polifenolici o loro derivati, per la inattivazione di almeno parte di detti epitopi xenogenici da detti tessuti, sono costituiti da derivati dell'acido cinnamico, dal tannino e dalla oleuropeina.

In particolare, e a titolo esemplificativo, i derivati dell'acido cinnamico, sono costituiti da acido caffeico.

In particolare, e a titolo esemplificativo, i derivati del tannino, sono costituiti da acido tannico.

In particolare, e a titolo esemplificativo, i derivati dell'oleuropeina, sono costituiti da idrossitirosolo.

In particolare, e a titolo esemplificativo, almeno un derivato fenilico dell'acido cinnamico è

costituito da acido caffeico.

In particolare, e a titolo esemplificativo, almeno un derivato fenilico del tannino è costituito da acido tannico.

In particolare, e a titolo esemplificativo, almeno un derivato fenilico dell'oleuropeina è costituito da idrossitirosolo.

Un metodo relativo all'inattivazione di xenoantigeni da tessuti biologici secondo il trovato, tessuti da intendersi impiegabili per la manifattura di sostituiti bioprotesici, è applicato a titolo esemplificativo e non limitativo del trovato stesso, alla inattivazione dell'epitopo alpha-Gal in tessuti costituenti i seguenti modelli di sostituti bioprotesici:

- Hancock II [™] Porcine Heart Valve (mod. T510, Medtronic Inc., Minneapolis, USA) indicato nelle figure come 'HANCK';
- Freestyle [®] Aortic Root Heart Valve (mod. 995, Medtronic Inc., Minneapolis, USA) indicato nelle figure come 'FREE';
- Carpentier-Edwards S.A.V. (mod. 6650, Edwards Lifesciences LCC, California, USA) indicato nelle figure come 'SAV';

- Carpentier-Edwards Perimount Plus (mod. 6900P, Edwards Lifesciences LCC, California, USA) indicato nelle figure come 'PERI';
- CardioCel Cardiovascular Patch (mod. C0404, Admedus Regen Pty Ltd, Perth, Australia) indicato nelle figure come 'CC'.

Il metodo per l'inattivazione di xenoantigeni in tessuti biologici, ed in particolare per l'inattivazione degli epitopi alpha-Gal in campioni bioprotesici, è di seguito descritto nel dettaglio di un esempio realizzativo.

Vengono effettuate delle campionature di tessuto dai sostituti bioprotesici come da modelli già menzionati attualmente disponibili sul mercato. Tali campioni vengono pesati umidi dopo leggero blotting su carta da filtro (range 30-50 mg) e tagliati in piccoli pezzi per aumentarne la superficie di esposizione.

Per ogni sostituto bioprotesico sono allestiti 4 diversi set di campioni (n=8 per ogni set).

Ogni set sarà sottoposto a un diverso metodo.

Vengono allestite 4 diverse soluzioni a base di derivati fenolici corrispondenti a 4 diverse varianti applicative del metodo secondo il trovato

a cui saranno sottoposti i campioni in un volume finale di 5ml, nello specifico:

- metodo T1: Acido Caffeico alla concentrazione compresa tra 5mM e 50mM (nel trovato è stata adottata quella a 20mM) / tampone sodio fosfato con 600 ± 50 U/ml di Tirosinasi in rapporto [1:20];
- metodo T2: Acido Caffeico alla concentrazione compresa tra 5mM e 50mM (nel trovato è stata adottata quella a 20mM) in 0.2 ± 0.1 M di NaOH;
- metodo T3: Acido Tannico alla concentrazione compresa tra 0.1M e 1.5M (nel trovato è stata adottata quella a 1M) in tampone sodio fosfato;
- metodo T4: Idrossitirosolo alla concentrazione compresa tra 0.3mM e 10mM (nel trovato è stata adottata quella a 6mM) in 0.2 ± 0.1 M di NaOH;

Tali soluzioni sono lasciate agire sotto moderata ma costante agitazione per un totale di 12 ± 2 ore alla temperatura di $40 \pm 2^\circ\text{C}$.

Al termine dell'incubazione i campioni sono sottoposti a due lavaggi con soluzione isotonica della durata di 15 minuti ciascuno e un terzo lavaggio in tampone dedicato (TP) della durata di 15 minuti.

La valutazione della presenza di epitopi

eventualmente ancora attivi sulla superficie dei campioni trattati, si basa su una modifica del metodo illustrato dagli inventori e descritto nel Brevetto Italiano n° PD2012A000029 e nel Brevetto Europeo n° EP2626701.

Brevemente i campioni di tessuto trattati e lavati, vengono posti in provette a cui viene aggiunto tampone TP fino ad un volume finale compreso tra 1000uL e 1500uL.

Viene quindi aggiunto un anticorpo monoclonale di tipo diretto contro l'epitopo alpha-Gal, nel presente esempio si tratta di un clone IgM chiamato M86, alla concentrazione preferibile di [1:50] v/v e incubato il tutto per minuti 120 ± 10 a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ sotto costante ma moderata agitazione.

Al termine i campioni vengono sottoposti a centrifugazione a $14.750 \times g$ per minuti 30 ± 5 a temperatura ambiente.

Durante l'incubazione con l'anticorpo M86 si allestisce una piastra a 96 pozzetti su cui si effettua un rivestimento del fondo dei pozzetti con 100uL per pozzetto di alpha-Gal/albumina serica a 5ug/ml in tampone fosfato. La piastra così allestita viene incubata per minuti 60 ± 10 ad

una temperatura compresa tra 30°C e 40°C, anche se è preferibile stabilizzare il tutto a 37°C. Vengono quindi effettuati 3 lavaggi con 300uL per pozzetto di tampone fosfato a temperatura ambiente.

Il primo lavaggio è lasciato agire per 5 minuti, i due successivi per 3 minuti.

Il blocking viene effettuato con 300uL per pozzetto di albumina sierica, seguito da incubazione per minuti 60 ± 10 a temperatura ambiente, al buio. Successivamente si eseguono 3 lavaggi come sopra.

Per ogni singolo pozzetto sono aggiunti 100uL di surnatante prelevato dopo centrifugazione da ogni campione trattato.

Il carico in piastra viene eseguito occupando i pozzetti di un'intera colonna per ogni tipo di campione. Segue incubazione della piastra per minuti 120 ± 10 ad una temperatura compresa tra 30°C - 40°C, anche se è preferibile stabilizzare il tutto a 37°C.

Vengono quindi effettuati 3 lavaggi come sopra ed aggiunti 100uL per pozzetto di una soluzione di anticorpo secondario (policlonale da coniglio

anti-topo) coniugato all'enzima perossidasi (le soluzioni di tale anticorpo ideali sono risultate essere [1:1000], [1:500] e [1:100], preferibilmente è stata adottata quella intermedia [1:500]).

La piastra viene quindi incubata nuovamente per minuti 60 ± 10 ad una temperatura compresa tra 30°C - 40°C , anche se è preferibile stabilizzare il tutto a 37°C .

Vengono quindi effettuati 3 lavaggi come sopra. Si aggiungono 100uL per pozzetto di una soluzione di sviluppo per l'enzima perossidasi, a cui segue l'incubazione della piastra per minuti 5 ± 1 al buio.

Successivamente vengono aggiunti 50uL per pozzetto di una soluzione di stop costituita da H_2SO_4 2M e si procede alla lettura della piastra in un lettore di piastre a 450 nm.

La percentuale di inattivazione dell'epitopo in oggetto è determinabile attraverso il confronto tra il numero di epitopi ottenuto: in un tessuto di controllo costituito da tessuto vascolare di animali knockout per l'antigene alpha-Gal, in tessuti bioprotesici non trattati e nei tessuti

sottoposti ai vari trattamenti come sopra descritto.

In Figura 1 è evidente come il metodo nella sua variante applicativa denominata T1 esibisca una spiccata variabilità d'effetto in base ai diversi tessuti bioprotesici trattati.

Il metodo T1 ha dimostrato una efficacia nettamente inferiore agli altri protocolli studiati, riportando come miglior risultato una inattivazione limitata a circa il 43% degli epitopi.

In Figura 2 è possibile riconoscere come il metodo nella sua variante applicativa T2 con i soli derivati dell'Acido Cinnamico evidenzi un'ottima azione inattivante nei confronti dell'antigene, con percentuali di inattivazione comprese tra il 90 e il 98%, similmente al risultato dimostrato dal metodo nelle varianti T3 (Figura 3, percentuali di inattivazione comprese tra l'80 e il 100%) e T4 (Figura 4, percentuali di inattivazione comprese tra l'89 e il 95%).

E' da intendersi oggetto del trovato anche un tessuto connettivale ottenuto con un metodo come sopra descritto.

Tale tessuto connettivale si caratterizza per il fatto di presentare almeno parte della componente antigenica in forma inattiva.

E' da intendersi oggetto del trovato anche un uso di tessuto connettivale come sopra descritto, per la manifattura di sostituiti bioprotesici e/o facenti parte di sostituti bioprotesici già allestiti, per uso in campo clinico umano o veterinario.

E' da intendersi oggetto del trovato anche un kit per l'esecuzione di un metodo per l'inattivazione di xenoantigeni in tessuti biologici come sopra descritto.

Tale kit comprende almeno:

- uno o più contenitori contenenti il tampone in cui sciogliere la dose di composti fenolici, polifenolici o loro derivati più adatta;
- uno o più contenitori contenenti la dose di composti fenolici, polifenolici o loro derivati in polvere da unire al tampone;
- uno o più contenitori contenenti i tamponi di lavaggio;
- libretto di istruzioni riportante la descrizione delle tempistiche e delle modalità di applicazione

della procedura.

L'uso previsto del kit è volto al trattamento autonomo di sostituti bioprotesici già allestiti, con un metodo secondo il trovato come sopra descritto, utile per strutture sanitarie come cliniche e ospedali.

Si è in pratica constatato come il trovato raggiunga il compito e gli scopi preposti.

In particolare, con il trovato si è messo a punto un metodo per l'inattivazione di xenoantigeni in tessuti biologici, ed in particolare dell'epitopo alpha-Gal in tessuti destinati alla produzione di sostituti bioprotesici utilizzabili in ambito clinico e/o veterinario.

Inoltre, con il trovato si è messo a punto un metodo per inattivare i suddetti antigeni garantendo un efficace trattamento applicabile ai diversi tipi di bioprotesi tissutali attualmente in commercio.

Quindi, con il trovato si è messo a punto un metodo potenzialmente in grado di non determinare, dopo un impianto di un tessuto trattato con tale metodo, un aumento degli anticorpi anti alpha-Gal circolanti.

In più, con il trovato si è messo a punto un metodo in grado di limitare la deposizione di sali di calcio, non favorendo quindi la formazione di episodi di distrofia calcifica della valvola.

Non ultimo, con il trovato si è messo a punto un metodo realizzabile con attrezzature e macchine di tipo noto.

Il trovato, così concepito, è suscettibile di numerose modifiche e varianti, tutte rientranti nell'ambito del concetto inventivo; inoltre, tutti i dettagli potranno essere sostituiti da altri elementi tecnicamente equivalenti.

In pratica, i componenti ed i materiali impiegati, purché compatibili con l'uso specifico, nonché le dimensioni e le forme contingenti, potranno essere qualsiasi a seconda delle esigenze e dello stato della tecnica.

Ove le caratteristiche e le tecniche menzionate in qualsiasi rivendicazione siano seguite da segni di riferimento, tali segni sono stati apposti al solo scopo di aumentare l'intelligibilità delle rivendicazioni e di conseguenza tali segni di riferimento non hanno alcun effetto limitante sull'interpretazione di ciascun elemento

identificato a titolo di esempio da tali segni di riferimento.

REFERENZE

- Nkomo VT et al. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. Lancet 2006;368:1005-1011.
- Zeng LY et al. A prompt method to quantitative assay of alpha-Gal on pig cell surface without injury. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2005;36(3):419-421.
- Galili U et al. A sensitive assay for measuring alpha Gal epitope expression on cells by a monoclonal anti-Gal antibody. Transplantation 1998;65:1129-1132.
- Chen RH et al. alpha-Gal and beta-Gal are preferentially expressed on porcine cardiac microvascular endothelium. Transplant Proc 2000;32:877-878.
- Feng W et al. Distribution of the Alpha-Gal epitope on adult porcine bone tissue. Transplant. Proceed. 2006;38:2247-2251.
- Galili U. The alpha Gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy. Immun Cell Biol 2005;83:674-686.

- Konakci KZ et al. Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery. Eur J Clin Invest 2005;35(1):17-23.
- Park CS et al. Anti alpha-gal immune response following porcine bioprosthesis implantation in children. J Heart Valve Dis 2010;19(1):124-30.
- Lila N et al. Gal knockout pig pericardium: new source of material for heart valve bioprostheses. J Heart Lung Transplant 2010;29(5):538-43.
- Naso F et al. First quantitative assay of alpha-Gal in soft tissues: presence and distribution of the epitope before and after cell removal from xenogeneic heart valves. Acta Biomater 2011;7(4):1728-1734.
- Naso F et al. First quantification of alpha-Gal epitope in current glutaraldehyde-fixed heart valve bioprostheses. Xenotransplantation 2013;20(4):252-261.

RIVENDICAZIONI

1) Metodo per l'inattivazione di xenoantigeni in tessuti biologici, in particolare in tessuti impiegabili per la manifattura di sostituiti bioprotesici e/o in sostituti bioprotesici già allestiti e destinati ad uso clinico umano o veterinario, caratterizzato dal fatto di prevedere le seguenti fasi:

- realizzare una soluzione a base di composti fenolici, polifenolici o loro derivati, per la inattivazione di almeno parte degli epitopi xenogenici da detti tessuti;
- incubare i campioni da trattare nelle diverse soluzioni a base di fenoli/polifenoli in condizioni controllate;
- sottoporre i tessuti trattati ad una serie di lavaggi.

2) Metodo secondo la rivendicazione 1, che si caratterizza per il fatto che detti tessuti biologici sono costituiti da tessuti connettivali nativi, o nativi e fissati, o fissati.

3) Metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, che si caratterizza per il fatto che detti tessuti biologici sono eterologhi od

omologhi.

4) Metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, che si caratterizza per il fatto che detto epitopo antigenico è l'antigene alpha-Gal.

5) Metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, che si caratterizza per il fatto che dette condizioni controllate comprendono almeno il trattamento alla temperatura di $40 \pm 2^\circ\text{C}$;

6) Metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, che si caratterizza per il fatto che detti composti fenolici, polifenolici o loro derivati, per la inattivazione di almeno parte di detti epitopi xenogenici da detti tessuti, sono costituiti da derivati dell'acido cinnamico, dal tannino e dalla oleuropeina.

7) Metodo secondo la rivendicazione precedente, che si caratterizza per il fatto che detti derivati dell'acido cinnamico, sono costituiti da acido caffeico.

8) Metodo secondo la rivendicazione 6, che si caratterizza per il fatto che detti derivati del tannino, sono costituiti da acido tannico.

9) Metodo secondo la rivendicazione 6, che si caratterizza per il fatto che detti derivati

dell'oleuropeina, sono costituiti da idrossitirosolo.

10) Metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, che si caratterizza per il fatto che almeno un derivato fenilico dell'acido cinnamico è costituito da acido caffeico.

11) Metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, che si caratterizza per il fatto che almeno un derivato fenilico del tannino è costituito da acido tannico.

12) Metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, che si caratterizza per il fatto che almeno un derivato fenilico dell'oleuropeina è costituito da idrossitirosolo.

13) Tessuto connettivale ottenuto con un metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto di presentare almeno parte della componente antigenica in forma inattiva.

14) Uso di tessuto connettivale come ad una o più delle rivendicazioni precedenti, per la manifattura di sostituiti bioprotesici e/o facenti parte di sostituti bioprotesici già allestiti, per uso in campo clinico umano o veterinario.

15) Kit per l'esecuzione di un metodo per l'inattivazione di xenoantigeni in tessuti biologici secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, che si caratterizza per il fatto di comprendere almeno:

- uno o più contenitori contenenti il tampone in cui sciogliere la dose di composti fenolici, polifenolici o loro derivati più adatta;
- uno o più contenitori contenenti la dose di composti fenolici, polifenolici o loro derivati in polvere da unire al tampone;
- uno o più contenitori contenenti i tamponi di lavaggio;
- libretto di istruzioni riportante la descrizione delle tempistiche e delle modalità di applicazione della procedura.

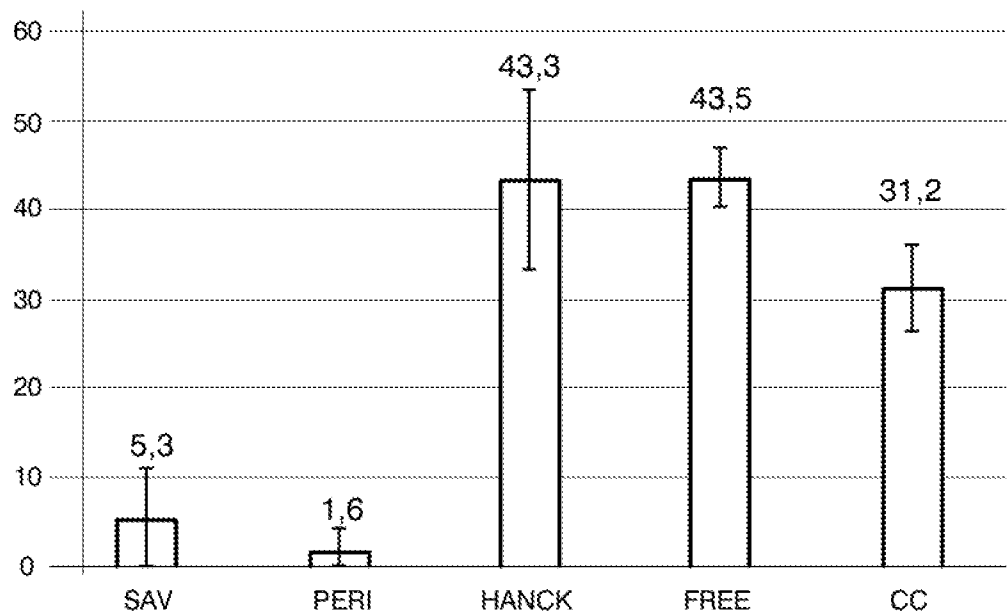


Fig.1

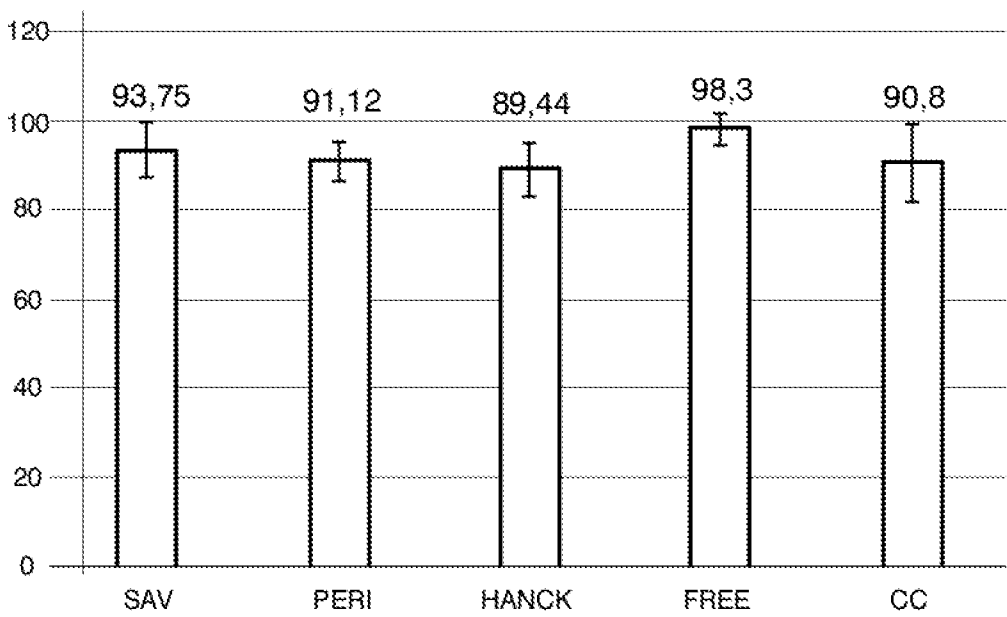


Fig.2

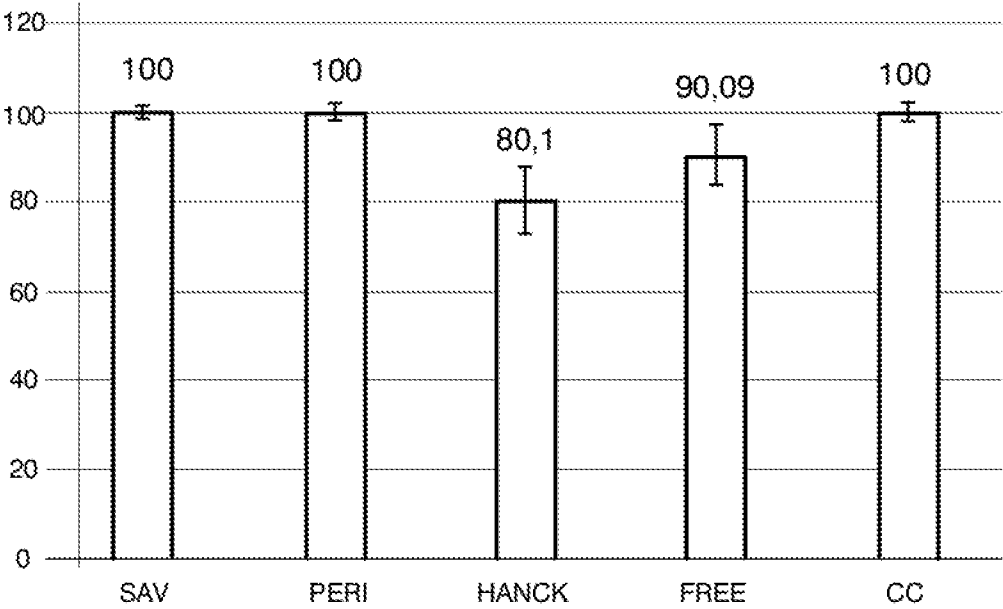


Fig.3

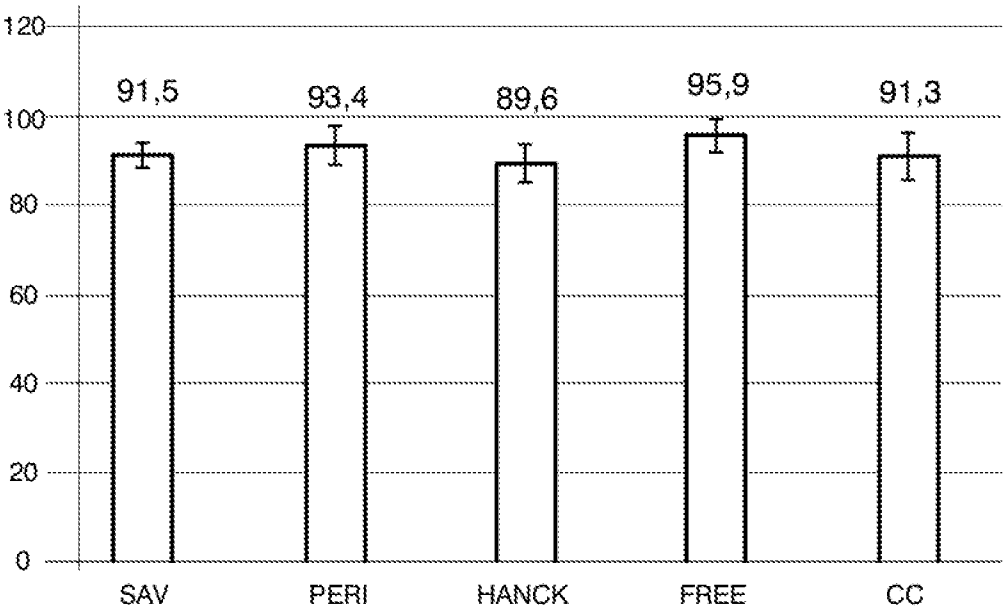


Fig.4