



Ministero della Proprietà e del Mercato delle Proprietà Industriali e del Commercio Internazionale
DIREZIONE GENERALE DELLA TABELLA UFFICIALE DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO DI PROPRIETÀ INDUSTRIALE

UIBM

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102023000007497
Data Deposito	18/04/2023
Data Pubblicazione	18/10/2024

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	M	1	36

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	01	N	15	14

Titolo

ISOLATORE PER COLTURE CELLULARI DERIVATE DA UN TESSUTO PERINATALE E
METODO DI ISOLAMENTO DI ALMENO UNA TIPOLOGIA DI CELLULE DA UN TESSUTO
PERINATALE

DESCRIZIONE

del brevetto per invenzione industriale dal titolo:

“ISOLATORE PER COLTURE CELLULARI DERIVATE DA UN TESSUTO PERINATALE E METODO DI ISOLAMENTO DI ALMENO UNA TIPOLOGIA DI CELLULE DA UN TESSUTO PERINATALE”

di COMECER S.P.A.

di nazionalità italiana

con sede: VIA MAESTRI DEL LAVORO 90

48014 CASTEL BOLOGNESE (RA)

Inventore: PANDOLFI Assunta, SANTALUCIA Manuela, DI TOMO Pamela, MANDATORI Domitilla, PIPINO Caterina, DI PIETRO Natalia, DI PIETRANTONIO Nadia, VOLTA Riccardo, BRUNETTI Alessandro, GALASSI Filippo

SETTORE TECNICO

La presente invenzione è relativa a un isolatore per colture cellulari derivate da un tessuto perinatale e a un metodo di isolamento di almeno una tipologia di cellule selezionata dal gruppo costituito da cellule endoteliali (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC o Human Umbilical Artery Endothelial Cells: HUAEC), cellule muscolari lisce (human Umbilical Cord - Vascular Smooth Muscle Cells: hUC-VSMC), e cellule mesenchimali staminali (human Umbilical Cord - Wharton Jelly - Mesenchymal Stem Cells: hUC-WJ-MSC) da un tessuto perinatale, preferibilmente cordone ombelicale.

STATO DELL'ARTE NOTA

Il campo dei tessuti perinatali, ed in particolare del cordone ombelicale, risulta estremamente interessante per le possibili applicazioni in medicina rigenerativa poiché le cellule derivate dagli stessi presentano ottime potenzialità differenziative, bassa immunogenicità e teratogenicità. In aggiunta, il loro uso non solleva problematiche di natura etica poiché sono materiali di scarto post partum. Tali caratteristiche rendono pertanto i tessuti perinatali interessanti risorse per l'ottenimento di cellule e tessuti per uso autologo e/o allogenico in ambito della medicina rigenerativa.

In base alle indicazioni della food and drug administration (FDA), il processo di lavorazione dei prodotti a base cellulare/tissutale è costituito da una fase di raccolta dei tessuti, seguita da una successiva di lavorazione tissutale (manipolazione), eventuale espansione cellulare e preparazione per la crioconservazione.

In particolare, la attuale letteratura scientifica riporta varie procedure di manipolazione del cordone ombelicale che hanno l'obiettivo di ottenere molteplici tipologie cellulari potenzialmente utilizzabili per le successive applicazioni terapeutiche e quindi nel rispetto delle norme correnti di Good Manufacturing Practice (GMP). Ad oggi, le principali tipologie cellulari che possono essere

ottenute dal cordone ombelicale mediante protocolli di ricerca e sviluppo sono: cellule endoteliali, cellule muscolari lisce e cellule mesenchimali staminali.

Basandosi su tali protocolli sperimentali, i recenti progressi ottenuti nell'ambito della produzione industriale di tali cellule e tessuti riguardano prevalentemente le procedure di isolamento e conservazione delle cellule mesenchimali staminali derivate dalla gelatina di Wharton del cordone ombelicale (human Umbilical Cord - Wharton Jelly - Mesenchymal Stem Cells, hUC-WJ-MSC) e delle cellule endoteliali isolate dai vasi ombelicali, in particolare da vena (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) e da arteria (Human Umbilical Artery Endothelial Cells HUAEC). Sebbene la manipolazione delle HUVEC e HUAEC sia stata sviluppata a norma GMP, ad oggi le procedure note non consentono di ottenere una resa cellulare idonea all'applicazione industriale. Ad oggi nessuna biobanca cellulare rende disponibili cellule vascolari umane per tale scopo.

Inoltre, ad oggi per la manipolazione delle cellule muscolari lisce derivate dalla parete del vaso arterioso (human Umbilical Cord - Vascular Smooth Muscle Cells, hUC-VSMC) mancano protocolli a norma GMP.

Più nello specifico, le problematiche legate ai singoli tipi cellulari sono le seguenti.

hUC-WJ-MSC:

- la procedura di isolamento cellulare non è standardizzata, soprattutto in relazione alle aree di tessuto da utilizzare;
- mezzi di coltura e supplementi utilizzati risultano disomogenei e non specifici per la coltura e l'espansione di cellule staminali mesenchimali in accordo alle linee guida GMP.

HUVEC:

- la procedura di isolamento cellulare non è standardizzata, soprattutto rispetto a soluzioni enzimatiche e tempi da utilizzare per il corretto isolamento;
- mezzi di coltura e supplementi utilizzati risultano disomogenei e non specifici per l'ottenimento e l'espansione di colture pure di cellule endoteliali in accordo alle linee guida GMP.

HUAEC:

- la procedura di isolamento delle cellule endoteliali dalle arterie ombelicali, diversamente dalla vena, comporta una difficoltà di incannulamento dovuta al minore diametro del vaso e alla presenza della parete arteriosa la cui tunica media conferisce resistenza. Inoltre, i metodi non sono standardizzati;
- mezzi di coltura e supplementi utilizzati risultano disomogenei e non specifici per l'ottenimento e l'espansione

di colture pure di cellule endoteliali in accordo alle linee guida GMP.

hUC-VSMC:

- la procedura di isolamento cellulare non è standardizzata e non tiene conto delle norme GMP, soprattutto rispetto a metodi e soluzioni da utilizzare per l'espianto, al fine di migliorare la resa cellulare. Mezzi di coltura e supplementi utilizzati risultano disomogenei e non specifici per l'ottenimento e l'espansione di colture pure di cellule muscolari lisce vascolari in accordo alle linee guida GMP.

In merito alle procedure di espansione cellulare, tutte le cellule primarie ricavate dal cordone ombelicale, saranno sottoposte a successive fasi di crescita cellulare prima di essere opportunamente congelate. Tali fasi richiederanno l'ausilio di un microscopio integrato dal quale verificare il corretto distacco delle cellule a seguito della tripsinizzazione, e offrire una prima valutazione della morfologia cellulare e dell'eventuale presenza di contaminanti.

Per quanto riguarda la fase di preparazione alla crioconservazione, le problematiche riguardano soprattutto la mancata standardizzazione dei mezzi utilizzati per il congelamento ai fini del bancaggio utile per future applicazioni terapeutiche. In particolare, l'uso del dimetilsolfossido (DMSO) in produzione GMP è piuttosto

discusso ed è associato ad azioni potenzialmente tossiche riscontrate in alcuni studi clinici. Per tale motivo risulta necessario trovare un'alternativa più sicura ed anche più efficiente rispetto a tale approccio convenzionale.

Un punto importante per la realizzazione di procedure di manipolazione tissutale che siano in accordo alle linee guida GMP è l'uso delle cosiddette camere bianche. Per i costi elevati sia di costruzione che di utilizzo, queste ultime non rappresentano delle realtà efficacemente diffuse sul territorio. Tale problematica rende complesso il processo di raccolta, lavorazione e crioconservazione di tessuti nel rispetto delle norme GMP e allontana la realtà sanitaria/accademica dall'opportunità di entrare attivamente in studi clinici e quindi anche di supportare il processo di scale up industriale e, in pratica, di cura del paziente.

Per questo motivo negli ultimi anni si è diffuso l'utilizzo di isolatori per colture cellulari, in quanto in grado di generare un ambiente asettico di grado A (ISO 5) all'interno del quale è possibile lavorare prodotti a base cellulare e/o tissutale nel rispetto delle norme GMP. Essi nascono infatti con l'obiettivo di sostituire l'uso delle camere bianche ed ottimizzare quindi gli spazi, la gestione ed i costi di produzione. Al momento gli isolatori per colture cellulari vengono progettati e realizzati per la manipolazione esclusiva di una sola tipologia tissutale con

l'intento di isolare un'unica tipologia cellulare (ad esempio lavorazione del sangue cordonale, estrazione di cellule staminali da tessuto adiposo o da midollo osseo, ecc) e pertanto non sono in grado di rispondere ad esigenze trasversali di processo.

Pertanto, alle criticità relative alle tecniche di manipolazione delle varie tipologie cellulari, si associa il fatto che gli isolatori per colture cellulari attualmente presenti sul mercato non sono progettati per lo svolgimento di diverse procedure di lavorazione. Tali caratteristiche non facilitano l'implementazione dell'uso dell'isolatore in maniera analoga e sostitutiva alle camere bianche dove, solo a seguito di procedure di sterilizzazione lunghe e costose, è possibile lavorare tessuti di varia origine e natura. In particolare, rispetto all'uso degli annessi perinatali come fonte di tessuti e cellule destinati alla medicina rigenerativa, il limite degli isolatori per colture cellulari in commercio e delle procedure di lavorazione dei tessuti è rappresentato dal non essere progettati ad hoc ed accessoriati di piccole strumentazioni che permettano la manipolazione di tessuti e cellule di natura molto diversa in tempi e costi adeguati alle realtà accademiche/ospedalieri.

È pertanto oggetto della presente invenzione fornire un isolatore per colture cellulari derivate da tessuti perinatali,

che consenta in modo efficiente ed economico di manipolare, coltivare e preparare per la crioconservazione diversi tipi di cellule derivati da tessuti perinatali.

Questo oggetto è ottenuto mediante la presente invenzione in quanto relativa a un isolatore per colture cellulari derivate da tessuti perinatali come definito nella rivendicazione 1.

È un ulteriore oggetto della presente invenzione fornire un metodo di isolamento di cellule endoteliali (HUVEC o HUAEC), cellule muscolari lisce (hUC-VSMC) o cellule mesenchimali staminali (hUC-WJ-MSC) che sia standardizzato e permetta un'ottimizzazione della resa, delle tempistiche e dei costi.

Questo oggetto è ottenuto mediante la presente invenzione in quanto relativa a un metodo come definito nella rivendicazione 7.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

Per una migliore comprensione della presente invenzione viene descritta nel seguito una forma preferita di realizzazione, a titolo di esempio non limitativo e con riferimento ai disegni allegati, in cui:

- la Figura 1 è una vista frontale di un isolatore per colture cellulari derivate da un tessuto perinatale secondo una forma di realizzazione della presente invenzione;
- la Figura 2 è una vista prospettica di un piano di lavoro compreso nell'isolatore della Figura 1;

- la Figura 3 è una vista prospettica di una prima porzione del piano di lavoro della Figura 2;
- la Figura 4 è una vista prospettica di una seconda porzione del piano di lavoro della Figura 2;
- la Figura 5 è una vista prospettica di una terza porzione del piano di lavoro della Figura 2.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Con riferimento alla Figura 1, secondo la presente invenzione, è fornito un isolatore 1 per colture cellulari derivate da un tessuto perinatale. Il tessuto perinatale è preferibilmente cordone ombelicale.

L'isolatore comprende un'unità 2, che a sua volta comprende una pluralità di pareti collegate tra loro per definire uno spazio, detto spazio essendo selettivamente accessibile dall'esterno per permettere una pluralità di operazioni manuali eseguibili all'interno di detto spazio. Preferibilmente, l'accesso dall'esterno è costituito da oblò ricavati in una parete trasparente in cui l'operatore può infilare le mani guantate e operare nello spazio.

Preferibilmente, almeno una di dette pareti definisce un'apertura configurata per alloggiare un modulo operativo selettivamente in comunicazione con detto spazio. Il modulo operativo comprende preferibilmente almeno uno tra un forno, un frigorifero e un incubatore per colture cellulari.

Con riferimento alla Figura 2, l'unità 2 comprende un piano

di lavoro 3 alloggiato in detto spazio, il quale comprende:

- una prima porzione 4 atta a ricevere il tessuto perinatale prelevato da un paziente e a isolare almeno una tipologia di cellule selezionata dal gruppo costituito da cellule endoteliali (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC o Human Umbilical Artery Endothelial Cells: HUAEC), cellule muscolari lisce (human Umbilical Cord - Vascular Smooth Muscle Cells: hUC-VSMC) e cellule mesenchimali staminali (human Umbilical Cord - Wharton Jelly - Mesenchymal Stem Cells: hUC-WJ-MSC);
- una seconda porzione 5 atta a trasportare elementi contenitori 7 contenenti l' almeno una tipologia di cellule;
- una terza porzione 6 atta a operare sull' almeno una tipologia di cellule.

Con riferimento alla Figura 3, la prima porzione 4 comprende una parete di supporto 8 definente almeno un piano di appoggio ed un dispositivo di supporto 9 portato da detta parete di supporto 8 in modo regolabile lungo almeno due direzioni rispetto al piano di appoggio. Il dispositivo di supporto 9 comprende preferibilmente un' asta principale 11 collegata a detta parete di supporto 8 per mezzo di un accoppiamento scorrevole e almeno una porzione di presa 14 scorrevole lungo detta asta principale 11 e selettivamente fissabile ad essa. Preferibilmente, il dispositivo di supporto 9 comprende due porzioni di presa 14 costituite da ganci. Nel caso in cui il tessuto perinatale sia un cordone ombelicale, a seguito dell' incannulamento ad entrambe

le estremità delle arterie e della vena del tessuto cordonale, il cordone può essere ancorato ai ganci facilitando l'infusione di soluzioni enzimatiche. Essendo i ganci scorrevoli lungo l'asta principale 11, è possibile operare su cordoni di diversa lunghezza. Inoltre l'accoppiamento scorrevole dell'asta principale 11 consente di regolare convenientemente la posizione del cordone.

Il parete di supporto 8 definisce preferibilmente un primo piano 15 ed un secondo piano 16 posti a differenti altezze tra loro. Preferibilmente, il primo piano 15 è ad un'altezza inferiore rispetto al secondo piano 16 ed è utilizzato per la preparazione del tessuto, mentre il secondo piano 16 è utilizzato per l'isolamento chirurgico di diverse tipologie cellulari. Preferibilmente il parete di supporto 8 comprende anche una scala metrica graduata che permette di misurare il tessuto da espiantare. Ciò consente di ottenere una stima più accurata della resa di espianto cellulare/cm tessuto.

Con riferimento alla Figura 4, la seconda porzione 5 comprende una parete di supporto 12, che definisce una pluralità di binari 10 atti ad alloggiare elementi contenitori 7 in modo da trattenerli lungo una direzione trasversale rispetto all'estensione di detti binari 10. Gli elementi contenitori possono essere piastre Petri, provette da 50 ml, 15 ml o 1,5 ml a seconda della tipologia cellulare e possono essere a loro volta disposti in apposite rastrelliere.

Con riferimento alla Figura 5, la terza porzione 6 comprende un piano di supporto 13 definente una superficie operativa. Sul piano di supporto 13 si possono eseguire operazioni di espansione cellulare. Preferibilmente, in prossimità della terza porzione 6 si trova almeno un incubatore per colture cellulari e/o una centrifuga, cosicché il numero di passaggi tra una manipolazione e l'altra sia limitato e si evitino così contaminazioni.

L'unità 2 si estende lungo un asse longitudinale, detta prima porzione 4, detta seconda porzione 5 e detta terza porzione 6 essendo adiacenti tra loro lungo detto asse longitudinale.

Il metodo di isolamento di almeno una tipologia di cellule selezionata dal gruppo costituito da cellule endoteliali (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC o Human Umbilical Artery Endothelial Cells: HUAEC), cellule muscolari lisce (human Umbilical Cord - Vascular Smooth Muscle Cells: hUC-VSMC), e cellule mesenchimali staminali (human Umbilical Cord - Wharton Jelly - Mesenchymal Stem Cells: hUC-WJ-MSC) da cordone ombelicale secondo la presente invenzione comprende le seguenti fasi.

Inizialmente, viene fornito un cordone ombelicale da 35 a 65 cm, preferibilmente da 40 a 50 cm.

Più in particolare, il taglio del cordone ombelicale avviene preferibilmente trasversalmente a distanza di 3-4 cm dal contenuto placentare. La stima della lunghezza del tessuto, che deve essere inizialmente almeno di 50-60 cm, permetterà un calcolo accurato della resa cellulare finale. Inoltre, al fine

di ricreare un ambiente simile a quello fisiologico, il cordone ombelicale è immerso in soluzione fisiologica e il trasporto è effettuato preferibilmente alla temperatura da 1 a 10°C, preferibilmente 4°C, utilizzando un triplo imballaggio, necessario per preservare condizioni di sterilità compatibili con le procedure GMP. Inoltre, l'intervallo di tempo tra prelievo e manipolazione è preferibilmente inferiore alle 12 ore, condizione necessaria al fine di ridurre il danno al quale il tessuto sarebbe sottoposto, compromettendone la resa finale soprattutto per alcune tipologie cellulari.

Nel dettaglio, la strategia di introduzione del cordone ombelicale in isolatore può essere effettuata come segue. Viene eseguito un preventivo ciclo di decontaminazione dell'isolatore, precedentemente caricato dei materiali necessari per l'esecuzione del processo, sfruttando la tecnologia Sterilization in Place (SIP) con vapori di perossido di idrogeno (VPHP). La decontaminazione può avvenire simultaneamente su precamera e camera principale. In seguito, il tessuto cordonale raggiunge l'area di classe C/D immediatamente adiacente all'isolatore e all'interno del quale vengono decontaminati esternamente e poi rimossi, il terzo e secondo imballaggio. Il primo imballaggio, contenente il tessuto cordonale in soluzione fisiologica, viene decontaminato esternamente con Alcool Isopropilico (IPA) all'interno della cappa a flusso laminare e successivamente trasferito nel carrello della precamera di

isolatore attraverso una porta di comunicazione tra le due aree. In successione, il tessuto presente nel carrello incorporato nella precamera di isolatore viene trasferito nella camera principale attraverso una seconda porta di connessione.

In seguito, viene isolata almeno una tipologia cellulare selezionata da gruppo costituito da cellule mesenchimali staminali derivate dalla gelatina di Wharton del cordone ombelicale (human Umbilical Cord - Wharton Jelly - Mesenchymal Stem Cells, hUC-WJ-MSC), cellule endoteliali isolate da vena (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC), cellule endoteliali isolate da arteria (Human Umbilical Artery Endothelial Cells HUAEC) e cellule muscolari lisce derivate dalla parete del vaso arterioso (human Umbilical Cord - Vascular Smooth Muscle Cells, hUC-VSMC).

Successivamente, viene espansa una coltura cellulare della tipologia cellulare in un mezzo di coltura specifico per la tipologia cellulare.

Infine, la coltura cellulare viene sospesa in un mezzo per la crioconservazione.

Ciascuna tipologia cellulare implica un trattamento specifico, che verrà descritto più in particolare nel seguito.

Per le hUC-WJ-MSC, la fase di isolare comprende espiantare cellule facendo migrare dette cellule da frammenti di gelatina di Wharton prelevati dalla regione perivascolare del cordone ombelicale e trattare

enzimaticamente frammenti derivati da regioni intervascolari e subamniotiche. Il mezzo di coltura è Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12) supplementato con lisato piastrinico ottenuto da sangue cordonale (CBPL) e amminoacidi non essenziali (NEAA). Il mezzo di coltura comprende preferibilmente anche almeno uno tra β -FGF, L-Glutamina e Gentamicina Solfato.

La resa cellulare viene determinata come somma del numero di cellule ottenute dai frammenti perivascolari e di cellule ottenute da trattamento enzimatico, preferibilmente con Collagenasi NB6 a 37°C per 15 minuti. Il mezzo di coltura specifico, DMEM-F12, ha una formulazione completa di amminoacidi e vitamine, oltre che di supplementi specifici per l'espansione di tale tipologia cellulare. Il lisato piastrinico ottenuto da sangue cordonale (CBPL), oltre a contenere numerosi fattori di crescita importanti per l'espansione cellulare, rappresenta una valida alternativa al comune Siero Fetale Bovino (FBS) il quale, benché largamente utilizzato in ricerca e sviluppo, è di origine animale, e quindi non traslavile all'applicazione clinica. Gli Amminoacidi Non Essenziali (NEAA) contribuiscono ad aggiungere fattori come il triptofano e l'uso del fattore di crescita dei fibroblasti (β -FGF), entrambi importanti per la crescita cellulare.

Il mezzo per la crioconservazione è preferibilmente il

CryoStor CS10 (caratterizzato da bassa concentrazione di DMSO).

Per le HUVEC, la fase di isolare comprende un trattamento enzimatico. Il mezzo di coltura è Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + Medium 199 supplementato con lisato piastrinico ottenuto da sangue cordonale (CBPL).

Per il processo di lavorazione delle HUVEC è stata ottimizzata una procedura di isolamento cellulare enzimatico agevolata dal piano di lavoro dell'isolatore secondo la presente invenzione, che è accessoriato ad hoc. Operativamente, la vena ombelicale viene incannulata alle estremità ed in seguito agganciata al dispositivo di supporto dell'isolatore. Tale strumentazione offre una soluzione logistica di aggancio del tessuto cordonale ad entrambe le estremità e ne facilita l'infusione della soluzione enzimatica. Inoltre, mezzi di coltura, fattori di crescita, supplementi ed enzimi sono specifici per l'espansione di tale tipologia cellulare e in accordo alle linee guida GMP. Oltre al CBPL, possono essere utilizzati gelatina, β -FGF, eparina (Ph. Grade), L-glutamina, e/o gentamicina solfato.

Il mezzo per la crioconservazione è preferibilmente PrimeXV (PXV). Si tratta di un mezzo di congelamento privo di DMSO che permette di ovviare alle problematiche potenzialmente dannose del tradizionale mezzo di crioconservazione.

Per le HUAEC, la fase di isolare comprende un trattamento con nitroprussiato di sodio e un trattamento enzimatico. Il mezzo di coltura è Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplementato con lisato piastrinico ottenuto da sangue cordonale (CBPL).

Il processo di lavorazione per l'ottenimento a norma GMP di HUAEC dalle arterie ombelicali è stato ottimizzato modificando la procedura di incannulamento. In particolare, l'uso innovativo del Nitroprussiato di Sodio come vasodilatatore, l'incannulamento dell'arteria e la successiva fase di infusione enzimatica, limitano i rischi di contaminazione del campione durante il processo di isolamento. Inoltre, è diminuito il tempo di esposizione al trattamento enzimatico, con una ottimizzazione dei tempi procedurali per le fasi successive. Il mezzo per la crioconservazione è preferibilmente PrimeXV (PXV).

Per le hUC-VSMC, la fase di isolare comprende un trattamento dei frammenti di tunica media derivati dalle arterie cordonali e deposizione dei frammenti di arterie su piastra di petri. Tale procedura mista consente di massimizzare la resa cellulare rispetto ad un espianto puro.

La fase di isolamento è preceduta da una fase preliminare di rimozione della tunica avventizia su piastra siliconata, seguita da successiva frammentazione delle arterie su vetrino smerigliato.

Il mezzo di coltura è Minimum Essential Medium (α -MEM) supplementato con lisato piastrinico ottenuto da sangue cordonale (CBPL) e amminoacidi non essenziali (NEAA).

Il mezzo per la crioconservazione è preferibilmente PrimeXV (PXV).

Nella seguente tabella, si evidenziano i vantaggi raggiungibili rispetto alle procedure tradizionali. In dettaglio, si riporta una descrizione delle caratteristiche del tessuto processato e delle tipologie cellulari che sono ottenibili partendo da un unico cordone ombelicale, con particolare riferimento alla resa cellulare, al tempo richiesto per l'isolamento e al numero dei lavoratori coinvolti nel processo (2 unità richieste nel processo di lavorazione e una unità dedicata al supporto documentale GMP che revisiona e verifica tutto il processo eseguito dagli altri operatori).

Lunghezza cordone (cm)		Tipologia cellulare ottenuta / cordone		Resa cellulare ottenuta / cordone		Tempi (min)		Personale	
Procedura stato dell'arte	Procedura invenzione	Procedura stato dell'arte	Procedura invenzione	Procedura stato dell'arte	Procedura invenzione	Procedura stato dell'arte	Procedura invenzione	Procedura stato dell'arte	Procedura invenzione
10-30	40-50	Una sola tipologia cellulare per processo	WJ-MSC	1 T25	1 T75	00:90	00:45	6	3
			HUVEC	1 T25	1 T75	00:45	00:30		
			HUAEC	1 T75	2 T75	00:60	00:30		
			VSMC	1 T25	1 T75	00:60	00:30		

VANTAGGI

Da quanto precede, risultano evidenti i vantaggi dell'isolatore e del metodo di isolamento secondo l'invenzione.

L'isolatore secondo l'invenzione consente di ottimizzare raccolta, manipolazione e conservazione di tutti i tessuti perinatali di interesse clinico a norma GMP. La combinazione di accessori del piano di lavoro dell'isolatore consente di lavorare con diverse tipologie di tessuto in modo comodo, rapido e che minimizza il rischio di contaminazione. Nonostante i processi di isolamento delle diverse tipologie cellulari siano differenti, essi possono essere svolti in tutte le fasi nelle aree specifiche in cui l'isolatore è stato diviso da sinistra verso destra.

Inoltre il metodo secondo l'invenzione permette di ottenere una procedura innovativa e standardizzata che consente l'ottenimento di una maggiore resa cellulare, ottimizzando tempistiche e costi procedurali, e assicurando l'adeguatezza del materiale all'applicabilità clinica.

In sintesi, il metodo e l'isolatore secondo la presente invenzione offrono per la prima volta, nel rispetto delle norme GMP, la possibilità di ottenere numerose tipologie cellulari partendo dal tessuto di uno stesso donatore, di aumentare la resa di ogni tipologia cellulare e di manipolare tessuti derivanti da donatori diversi in tempi e con costi

ridotti rispetto all'impiego delle tradizionali camere bianche.

RIVENDICAZIONI

1.- Isolatore (1) per colture cellulari derivate da un tessuto perinatale comprendente:

- un'unità (2) comprendente una pluralità di pareti collegate tra loro per definire uno spazio, detto spazio essendo selettivamente accessibile dall'esterno per permettere una pluralità di operazioni manuali eseguibili all'interno di detto spazio;

detta unità (2) comprendendo un piano di lavoro (3) alloggiato in detto spazio e comprendente:

- una prima porzione (4) atta a ricevere il tessuto perinatale prelevato da un paziente e a isolare almeno una tipologia di cellule selezionata dal gruppo costituito da cellule mesenchimali staminali (human Umbilical Cord - Wharton Jelly - Mesenchymal Stem Cells: hUC-WJ-MSC), cellule endoteliali (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC o Human Umbilical Artery Endothelial Cells: HUAEC), e cellule muscolari lisce (human Umbilical Cord - Vascular Smooth Muscle Cells: hUC-VSMC);

- una seconda porzione (5) atta a trasportare elementi contenitori (7) contenenti l'almeno una tipologia di cellule;

- una terza porzione (6) atta a operare sull'almeno una tipologia di cellule;

in cui detta prima porzione (4) comprende una parete di supporto (8) definente almeno un piano di appoggio ed un dispositivo di supporto (9) portato da detta parete di supporto

in modo regolabile lungo almeno due direzioni rispetto al piano di appoggio;

in cui detta seconda porzione (5) comprende una parete di supporto (12), detta parete di supporto (12) definendo una pluralità di binari (10) atti ad alloggiare elementi contenitori (7) in modo da trattenerli lungo una direzione trasversale rispetto all'estensione di detti binari (10); e

in cui detta terza porzione (6) comprende un piano di supporto (13) definente una superficie operativa,

detta unità (2) estendentesi lungo un asse longitudinale, detta prima porzione (4), detta seconda porzione (5) e detta terza porzione (6) essendo adiacenti tra loro lungo detto asse longitudinale.

2.- Isolatore secondo la rivendicazione 1, in cui il tessuto perinatale è cordone ombelicale.

3.- Isolatore secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui almeno una di dette pareti definisce un'apertura configurata per alloggiare un modulo operativo selettivamente in comunicazione con detto spazio.

4.- Isolatore secondo la rivendicazione 3, in cui detto modulo operativo comprende almeno uno tra un forno, un frigorifero e un incubatore per colture cellulari.

5.- Isolatore secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui il dispositivo di supporto (9) comprende un'asta principale (11) collegata a detta parete di supporto (8) per

mezzo di un accoppiamento scorrevole e almeno una porzione di presa (14) scorrevole lungo detta asta principale e selettivamente fissabile ad essa.

6.- Isolatore secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui detto piano di appoggio definisce un primo piano (15) ed un secondo piano (16) posti a differenti altezze tra loro.

7.- Metodo di isolamento di almeno una tipologia di cellule selezionata dal gruppo costituito da cellule mesenchimali staminali (human Umbilical Cord - Wharton Jelly - Mesenchymal Stem Cells: hUC-WJ-MSC), cellule endoteliali (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC o Human Umbilical Artery Endothelial Cells: HUAEC), e cellule muscolari lisce (human Umbilical Cord - Vascular Smooth Muscle Cells: hUC-VSMC), da un tessuto perinatale, preferibilmente cordone ombelicale, comprendente:

- fornire un cordone ombelicale da 35 a 65 cm immerso in soluzione fisiologica a una temperatura da 1 a 10 °C;
- isolare almeno una tipologia cellulare selezionata da gruppo costituito da cellule mesenchimali staminali derivate dalla gelatina di Wharton del cordone ombelicale (human Umbilical Cord - Wharton Jelly - Mesenchymal Stem Cells, hUC-WJ-MSC), cellule endoteliali isolate da vena (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC), cellule endoteliali isolate da arteria (Human Umbilical Artery Endothelial Cells, HUAEC) e cellule muscolari lisce derivate dalla parete del vaso arterioso

(human Umbilical Cord - Vascular Smooth Muscle Cells, hUC-VSMC) ;

- espandere una coltura cellulare della tipologia cellulare in un mezzo di coltura specifico per la tipologia cellulare;
- sospendere la coltura cellulare in un mezzo per la crioconservazione.

8. Metodo secondo la rivendicazione 7, in cui:

- la tipologia cellulare è cellule mesenchimali staminali derivate dalla gelatina di Wharton del cordone ombelicale (hUC-WJ-MSC) ;
- la fase di isolare comprende espiantare cellule facendo migrare dette cellule da frammenti di gelatina di Wharton prelevati dalla regione perivascolare del cordone ombelicale e trattare enzimaticamente frammenti derivati da regioni intervascolari e subamniotiche;
- la fase di isolare è preceduta da una fase di rimozione della tunica avventizia su piastra siliconata, seguita da successiva frammentazione delle arterie su vetrino smerigliato;
- il mezzo di coltura è Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12) supplementato con lisato piastrinico ottenuto da sangue cordonale (CBPL) e amminoacidi non essenziali (NEAA) .

9. Metodo secondo la rivendicazione 7, in cui:

- la tipologia cellulare è cellule endoteliali isolate da vena (HUVEC) ;

- la fase di isolare comprende un trattamento enzimatico;
- il mezzo di coltura è Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + Medium 199 supplementato con lisato piastrinico ottenuto da sangue cordonale (CBPL).

10. Metodo secondo la rivendicazione 7, in cui:

- la tipologia cellulare è cellule endoteliali isolate da arteria (HUAEC);
- la fase di isolare comprende un trattamento con nitroprussiato di sodio e un trattamento enzimatico;
- il mezzo di coltura è Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplementato con lisato piastrinico ottenuto da sangue cordonale (CBPL).

11. Metodo secondo la rivendicazione 7, in cui:

- la tipologia cellulare è cellule muscolari lisce derivate dalla parete del vaso arterioso (hUC-VSMC);
- la fase di isolare comprende un trattamento enzimatico dei frammenti di tunica media derivati dalle arterie cordonali e deposizione dei frammenti di arterie su piastra di petri;
- il mezzo di coltura è Minimum Essential Medium (α -MEM) supplementato con lisato piastrinico ottenuto da sangue cordonale (CBPL) e amminoacidi non essenziali (NEAA).

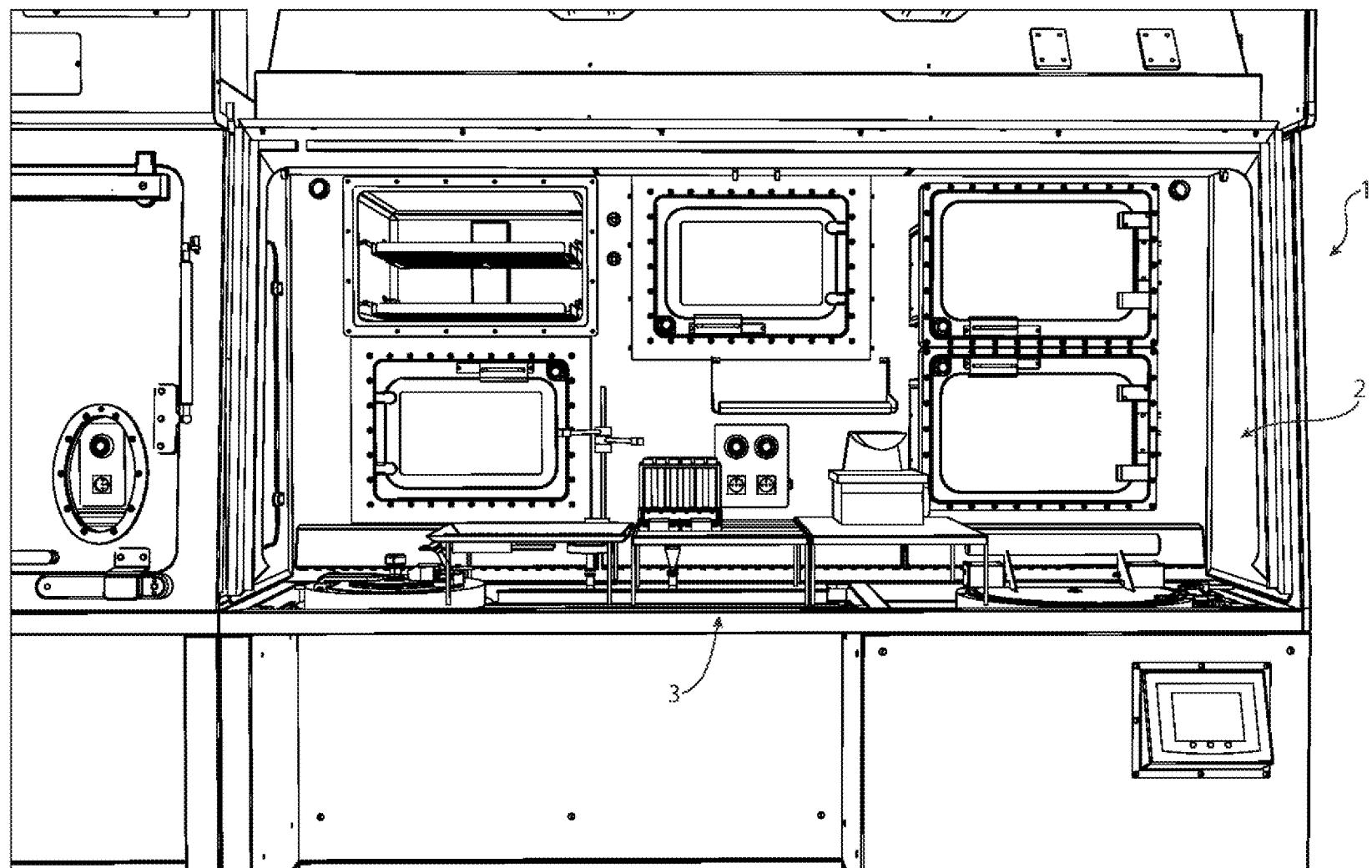


FIG. 1

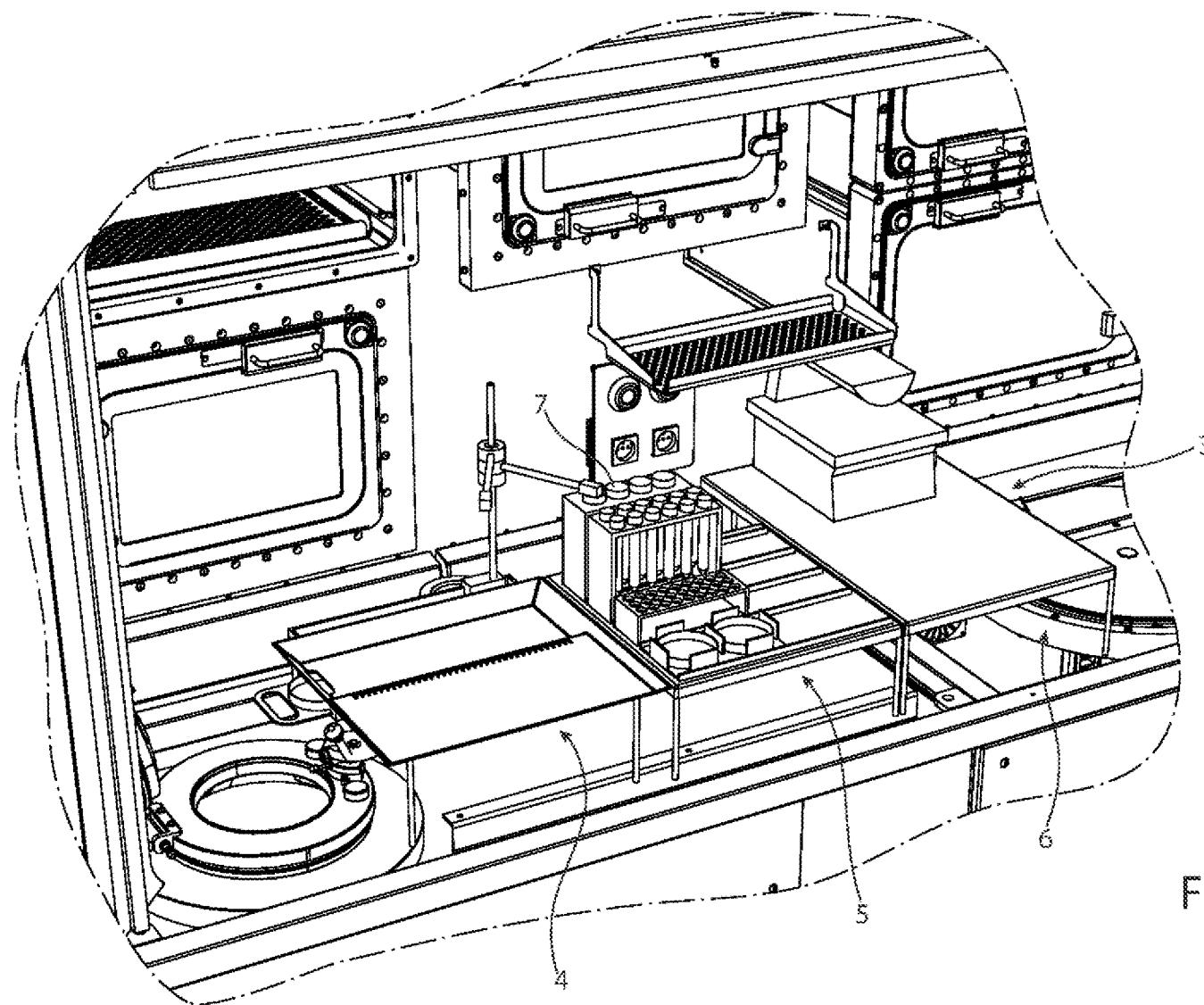


FIG. 2

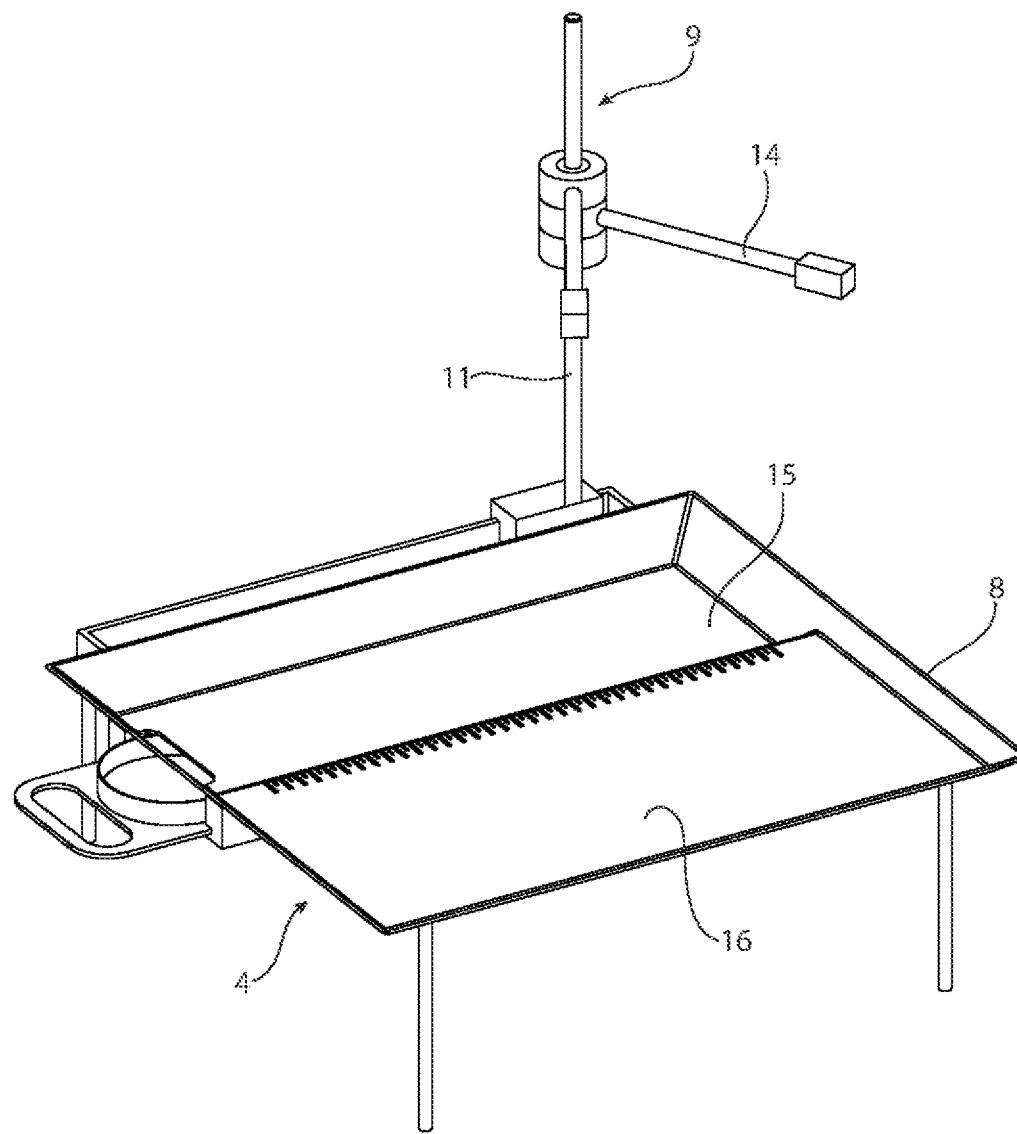


FIG. 3

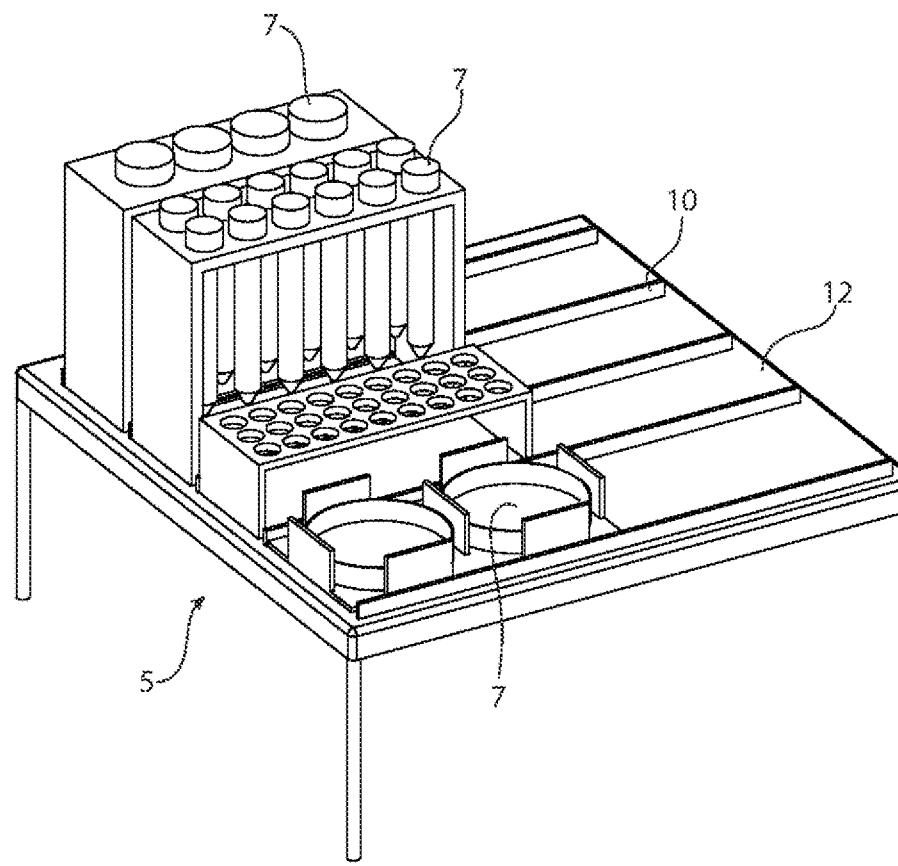


FIG. 4

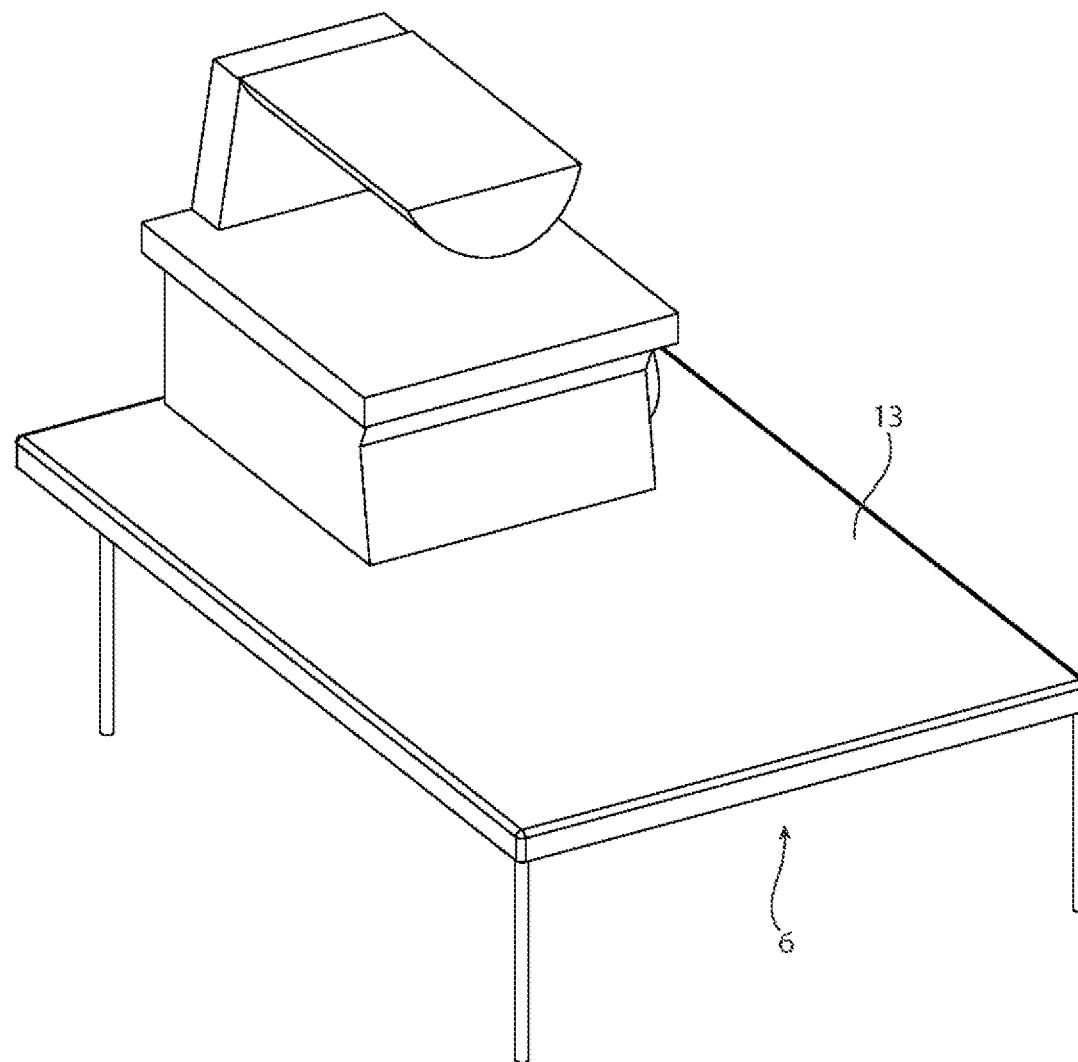


FIG. 5