



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101997900603151
Data Deposito	11/06/1997
Data Pubblicazione	11/12/1998

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	08	B		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N		

Titolo

MATERIALE BIOLOGICO COMPRENDENTE UNA EFFICIENTE COLTURA DI CELLULE E UNA MATRICE TRIDIMENSIONALE BIOCOMPATIBILE E BIODEGRADABILE COSTITUITA DA UN DERIVATO DELL'ACIDO IALURONICO.

Descrizione di una domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo
"Materiale biologico comprendente una efficiente coltura di cellule e una
matrice tridimensionale biocompatibile e biodegradabile costituita da un
derivato dell'acido ialuronico", della Fidia Advanced Biopolymers S.r.l. con
sede in Via De' Carpentieri 3, 72100 - Brindisi, Italia, nella persona del suo
Presidente e Legale Rappresentante, Dr. Lanfranco Callegaro.

Inventori: Giovanni ABATANGELO

Lanfranco CALLEGARO

PD 97 A 0 0 0 1 2 2

Depositata il con N.

**** *

OGGETTO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce ad un materiale biologico costituito da una
matrice di estere dell'acido ialuronico sulla quale vengono coltivate cellule
endoteliali, cellule ghiandolari quali, ad esempio, isole di Langerhans ed
epatociti, annessi cutanei e cellule germinative dei bulbi piliferi, in presenza di
un mezzo condizionato da fibroblasti o in una co-cultura con fibroblasti.

CAMPO DELL'INVENZIONE

A tutt'oggi l'Angiogenesi, cioè la formazione di nuovi capillari sanguigni, può
essere sperimentalmente riprodotta *in vitro* con vari sistemi ed utilizzando
diversi fattori di stimolo, quali i fattori di crescita VEGF (Vascular Endothelial
Growth Factor) o bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) (R. Montesano et al.,
PNAS USA, 1986, 83; 7297-7301, "Basic Fibroblast Growth Factor induces
angiogenesis *in vitro*"; J. Folkman et al., PNAS USA, 1979, 76; 5217-5221, "Long
term culture of capillary endothelial cells"; A. Montesano et al., Lab. Invest.,
1996, 75; 249-262, "Synergistic effect of hyaluronan oligosaccharides and



vascular endothelial growth factor on angiogenesis *in vitro*").

La riorganizzazione delle cellule endoteliali in strutture tubulari è stata osservata, ad esempio, in presenza di collagene in fase di gelificazione, oppure all'interno di un doppio strato collagenico.

Risultati ancora più incoraggianti sono stati di recente ottenuti utilizzando come supporto per la semina degli estratti di membrane basali (Matrigel), sulle quali il meccanismo angiogenetico sembra essere più rapido e facilmente riproducibile. Si è così potuto dimostrare che la presenza di un'impalcatura contenente anche fibre collagene facilita il differenziamento cellulare il quale, nel caso delle cellule endoteliali, si traduce nell'organizzazione di una sottile trama di strutture tubulari analoga a quella che si ritrova nella matrice extracellulare dei connettivi (J. Folkman et al., Nature, 1980, 288, 551-556, "Angiogenesis *in vitro*"; J.A. Madri et al., J. of Cell Biol, 1983, 97, 153-165, "Capillary endothelial cell culture: phenotypic modulation by matrix components").

E' noto che le matrici di estere parziale o totale dell'acido ialuronico con alcool benzilico nella forma di tessuto non-tessuto sono adatte per la crescita e lo sviluppo *in vitro* di diversi tipi cellulari, quali fibroblasti e condrociti (WO 96/33750).

Cellule quali, ad esempio, le endoteliali, le ghiandolari, le isole di Langerhans, gli epatociti, gli annessi cutanei coltivati *in vitro*, trovandosi in assenza di una impalcatura connettivale, non sono in grado di mantenere il loro stato di differenziamento e presentano ridotta capacità proliferativa e tempi di



sopravvivenza bassi.

Infatti, *in vitro*, gli epatociti possono sopravvivere circa 7 settimane con una percentuale di cellule vive minore del 50% (J. C. Gerlach et al., Hepatology August 1995, Vol. 22 No. 2, pagg. 546-552), gli annessi cutanei circa due settimane (A. Limat et al., The Journal of Investigative Dermatology, Vol. 87, No. 4 October 1986, pagg. 485-488), le isole di Langerhans soltanto pochi giorni (S.G. Matta, Pancreas, Vol. 9, No. 4, 1994, pagg. 439-449).

Nonostante, quindi, siano note le proprietà delle matrici di HYAFF® di favorire la crescita e lo sviluppo *in vitro* di elementi cellulari quali, ad esempio, fibroblasti, cheratinociti e condrociti, non è prevedibile per un esperto del ramo ottenere tassi di proliferazione e tempi di sopravvivenza soddisfacenti coltivando tipi cellulari quali cellule endoteliali, cellule ghiandolari e annessi cutanei su un supporto di HYAFF®, eventualmente contenente collagene e/o fibrina, e in particolari condizioni di coltura.

Infatti, secondo la presente invenzione cellule endoteliali umane, estratte dalla vena di funicoli ombelicali (HUVEC) mediante digestione enzimatica con collagenasi (E. A. Jaffe, J. Clin. Invest., 1973, 52, 2745-2756, "Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins") o da tessuto dermico omologo o autologo, sono state fatte attecchire e proliferare su matrici di HYAFF® nella forma di non tessuto (US 5,520,910) ed è stato sorprendentemente trovato che in presenza di un mezzo condizionato da fibroblasti o in una co-cultura con fibroblasti seminati sul biomateriale diversi giorni prima o contemporaneamente alle cellule endoteliali si ottiene un tasso di



proliferazione significativamente più elevato rispetto a quello riscontrato per altri supporti nelle stesse condizioni.

Inoltre, la matrice di HYAFF® facilita la crescita delle cellule nelle tre dimensioni dello spazio, potendo queste ultime organizzarsi in strutture tubulari.

Il materiale biologico così costituito può essere vantaggiosamente utilizzato nei trapianti dermici in cui le cellule endoteliali favoriscono la neo-vascularizzazione del tessuto trapiantato che altrimenti si otterrebbe molto lentamente dopo la migrazione di elementi endoteliali dalle zone circostanti il trapianto, mettendo a rischio la sopravvivenza del nuovo tessuto.

Un ulteriore vantaggio di una veloce vascularizzazione del sostituto dermico trapiantato su una lesione cutanea è rappresentato dalla possibilità di poter applicare a tempi brevi o in contemporanea anche lamine di cheratinociti preparati in precedenza senza rischiare la necrosi di tali cellule per mancanza di nutrimento.

Il materiale biologico contenente le cellule endoteliali può essere usato, oltre che nel trapianto dermico, in seguito ad ustioni o a traumi, anche in oncologia e in altri settori della chirurgia quali, ad esempio, la chirurgia cardiovascolare ed estetica, per favorire il processo biologico di vascularizzazione dei tessuti.

E' stato verificato, inoltre, che elementi ghiandolari quali epatociti, isole di Langerhans e annessi cutanei hanno *in vitro* un tempo di sopravvivenza molto lungo su matrici di estere benzilico dell'acido ialuronico, eventualmente in presenza di fibrina e/o collagene, supplementato da medium condizionato da



fibroblasti o in co-coltura con fibroblasti, ed inoltre si é visto che cellule germinative di bulbi piliferi, nelle stesse condizioni di coltura, danno origine a nuovi elementi piliferi.

Pertanto, il materiale biologico in cui gli elementi ghiandolari sono gli epatociti può essere usato vantaggiosamente come tessuto epatico vitale trapiantabile nei casi di grave insufficienza epatica.

Il materiale biologico in cui gli elementi ghiandolari sono rappresentati dalle isole di Langerhans può essere vantaggiosamente inserito nell'organismo umano, per esempio a livello sottocutaneo o nel parenchima pancreatico, nei casi in cui è deficitaria la funzione di produzione dell'insulina.

Il materiale biologico costituito da una matrice tridimensionale biodegradabile e biocompatibile di estere dell'acido ialuronico e da una coltura di annessi cutanei quali bulbi piliferi, ghiandole sebacee, ghiandole sudoripare e cellule germinative di bulbi piliferi in mezzo condizionato da fibroblasti o in co-coltura con fibroblasti, può essere vantaggiosamente utilizzato nei trapianti del cuoio capelluto o nel trapianto dermico insieme alle cellule endoteliali ed eventualmente ai cheratinociti ottenendo un tessuto molto simile alla pelle umana.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce ad un materiale biologico costituito da una matrice di estere dell'acido ialuronico, ed eventualmente di collagene e/o fibrina, sulla quale vengono coltivate cellule endoteliali, cellule ghiandolari quali, per esempio, isole di Langerhans, epatociti, annessi cutanei e cellule



germinative dei bulbi piliferi in presenza di un mezzo condizionato da fibroblasti o in una co-coltura con fibroblasti ottenendo un tasso di proliferazione e di sopravvivenza cellulare sorprendentemente alto rispetto a quello di colture cellulari su altri tipi di supporto nelle stesse condizioni.

Il derivato dell'acido ialuronico di cui è costituita la matrice tridimensionale del materiale biologico in accordo alla presente invenzione è un estere dell'acido ialuronico, preferibilmente con un grado di esterificazione che varia dal 25 al 100%, secondo quanto descritto nel Brevetto U.S. 4,851,521.

La matrice tridimensionale biocompatibile può essere utilizzata in forma di tessuto non tessuto, spugne, granuli, microsfere, tubicini e garze.

La preparazione del suddetto tessuto non tessuto costituito dal derivato dell'acido ialuronico e in particolare dall'estere dell'acido ialuronico viene descritto nel brevetto della Richiedente US 5,520,916.

Esempio 1

Estrazione delle cellule endoteliali dalla vena di funicoli ombelicali

Le cellule endoteliali (HUVEC) sono state ottenute dalla vena di cordoni ombelicali incannulando delicatamente la vena del funicolo con un grosso ago sterile, facendo attenzione a non rompere le pareti. Il vaso viene, quindi, sciacquato con una soluzione salina (tampone fosfato senza Ca^{++} e Mg^{++} , PBS^-) in modo da eliminare eventuali residui di sangue. Le cellule vengono staccate dalle pareti del vaso mediante perfusione con una soluzione di collagenasi (1 mg/ml, 300-400 U/mg), immergendo per 5' in soluzione fisiologica a 37°C.



La reazione viene bloccata con del medium completo (M199 1x + 20% siero fetale bovino + L-Glutamina 2mM + Pennicillina/Streptomicina (100U/ml)/(100µg/ml) + Fungizone 2,5 µg/ml).

Quindi, dopo centrifugazione, il sedimento di cellule viene risospeso in terreno completo e seminato in una fiaschetta per colture cellulari preventivamente collagenata per una notte a 37°C con una soluzione di collagene I (10 µg/ml) in PBS⁻.

Le HUVEC così ottenute, una volta raggiunta la confluenza, vengono staccate dalla piastra di coltura con tripsina 0,05%-EDTA 0,02% ed amplificate con il loro medium addizionato di hECGF (0,1ng/ml) ed Eparina (100µg/ml) e bFGF (10ng/ml).

Esempio 2

Confronto tra la crescita delle cellule endoteliali in diverse condizioni di coltura

Dopo un'iniziale amplificazione su piastre gelatinate, le cellule HUVEC (Human Umbelical Vein Endothelial Cells) sono state seminate sulle membrane di non-tessuto in piastre da 24 pozzetti e alla densità di 30.000/cm² in diverse condizioni di coltura:

- 1) con il terreno arricchito di fattori di crescita (M199 completo al 20% di FCS (siero fetale bovino), bFGF alla concentrazione di 10 ng/ml, eparina alla concentrazione di 100 ng/ml ed ECGF alla concentrazione di 0,1 ng/ml) (t+GF);
- 2) in presenza di un medium condizionato da fibroblasti umani a tre giorni dalla semina (tFU);



- 3) in una co-coltura con fibroblasti umani dermici seminati sul biomateriale 7 giorni prima o contemporaneamente alle cellule endoteliali (*Fu*).

La proliferazione cellulare è stata valutata in modo indiretto e a tempi diversi (24, 72 e 96 ore) mediante saggio MTT (F. Denizot, J. Immunol. Met., 1986, 89, 271-277, "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival") e, nel caso della co-coltura, protratta per un massimo di tre settimane. Ogni campione è stato allestito in triplicato.

Risultati

In figura 1 sono riportati i valori di assorbanza a 534 nm, dopo saggio MTT, a 24, 72 e 96 ore dalla semina delle HUVEC su dischetti di non-tessuto di HYAFF® nelle tre diverse condizioni sopra indicate. Nel caso delle co-culture di endoteli e fibroblasti (Esempio 2; condizione 3; *Fu*), gli istogrammi riportati nel grafico si riferiscono soltanto alla componente endoteliale, in quanto già sottratti dei valori corrispondenti ottenuti da piastre di controllo contenenti solo fibroblasti. Si può osservare come, sorprendentemente, la crescita delle HUVEC in presenza di fibroblasti (Esempio 2; condizione 3; *Fu*) o di un medium da questi condizionato (Esempio 2; condizione 2; *tFu*) è significativamente superiore a quella ottenuta con terreno arricchito di fattori di crescita (Esempio 2; condizione 1; *t+GF*).

La figura 2 mostra i valori ottenuti dalle colture di cellule endoteliali su pozzetti gelatinati con terreno completo di fattori di crescita e con medium condizionato da fibroblasti. In questo caso il tasso di proliferazione, come



risulta dal test MTT, pur essendo abbastanza simile nei due tipi di pozzetti, è notevolmente inferiore ai valori di crescita riscontrati per i campioni di non-tessuto di HYAFF® in presenza di fibroblasti o di un medium da questi condizionato (vd. figura 1).

Discussione

Dai dati sopra riportati appare evidente come la proliferazione delle cellule endoteliali sul biomateriale sia notevolmente favorita dalla presenza dei fibroblasti, o da medium ottenuto da questi (figura 1). La presenza di una struttura tridimensionale come quella del non-tessuto di HYAFF® facilita la crescita, potendo le cellule colonizzare la trama di fibre a loro disposizione nelle tre dimensioni dello spazio. In queste condizioni è quindi possibile protrarre la coltura per tempi superiori alle 96 ore e fino ad un massimo di tre settimane, quando le fibre del biomateriale raggiungono un grado elevato di idratazione.

L'importanza di una maglia di supporto per la proliferazione cellulare è poi confermata dai dati ottenuti su pozzetti gelatinati (figura 2), dove la crescita delle HUVEC avviene solo in senso bidimensionale.

Viene così dimostrato che i biomateriali costituiti da esteri dell'acido ialuronico nella forma di non-tessuto, rappresentano un substrato adatto alla crescita e al differenziamento anche delle cellule endoteliali umane HUVEC. Su queste impalcature, tali cellule sono in grado di proliferare molto meglio in presenza di fibroblasti o eventualmente di un medium da questi "condizionato", rispetto a quanto ottenibile con il terreno normalmente



utilizzato per la loro amplificazione su piastra. Di notevole rilievo è, inoltre, il diverso tasso di proliferazione delle cellule coltivate nei pozzetti gelatinati rispetto a quelle coltivate sul biomateriale in questione, risultando senza dubbio più significativo sul non-tessuto di HYAFF® quando vengono coltivati insieme fibroblasti e cellule endoteliali.

Esempio 3

Isolamento e coltura di epatociti

Gli epatociti sono stati isolati dalla vena portale e dall'arteria epatica di fegato di maiale attraverso la tecnica di perfusione con collagenasi secondo Gerlach J. et al., Hepatology, August 1995, pagg. 546-552.

Dopo un'iniziale amplificazione su piastre gelatinate, gli epatociti sono stati seminati sulle membrane di non-tessuto in piastre da 24 pozzetti e alla densità di 30.000/cm² in diverse condizioni di coltura:

- 1) in presenza di un medium condizionato da fibroblasti umani a tre giorni dalla semina (A);
- 2) in una co-coltura con fibroblasti umani dermici seminati sul biomateriale (B).
- 3) in una co-coltura con fibroblasti umani dermici seminati sul biomateriale 7 giorni prima degli epatociti (C).

La percentuale di cellule in vita è stata valutata mediante due distinti metodi:

- a) valutazione delle caratteristiche morfologiche;
- b) test di esclusione del Tripan-Bleu.

Sono state considerate cellule non vitali quelle che assumevano il colorante e



quelle che presentavano vacuolizzazione citoplasmatica, accumulo di goccioline lipidiche e frammentazione citoplasmatica.

Ogni campione è stato allestito in triplicato.

% cell. vive	1 giorno	2 settim.	4 settim.	6 settim.	8 settim.
A	80	25	5	/	/
B	80	40	20	5	/
C	90	85	75	60	50

Esempio 4

Isolamento e coltura delle isole di Langerhans

Le isole di Langerhans sono state isolate dal pancreas di ratti per digestione con collagenasi secondo Matta S. G. et al.; Pancreas, Vol. 9, No. 4, 1994.

Dopo un'iniziale amplificazione su piastre gelatinate, le isole di Langerhans sono state seminate sulle membrane di non-tessuto in piastre da 24 pozzetti e alla densità di $30.000/\text{cm}^2$ in diverse condizioni di coltura:

- 1) in presenza di un medium condizionato da fibroblasti umani a tre giorni dalla semina (A);
- 2) in una co-coltura con fibroblasti umani dermici seminati sul biomateriale (B);
- 3) in una co-coltura con fibroblasti umani dermici seminati sul biomateriale 7 giorni prima delle isole di Langerhans (C).

La percentuale di cellule in vita è stata valutata mediante due distinti metodi:

- a) valutazione delle caratteristiche morfologiche;



b) test di esclusione del Tripan-Bleu.

Sono state considerate cellule non vitali quelle che assumevano il colorante e quelle che presentavano vacuolizzazione citoplasmatica, accumulo di goccioline lipidiche e frammentazione citoplasmatica.

Ogni campione è stato allestito in triplicato.

% cell. vive	1 giorno	10 giorni	20 giorni	30 giorni	40 giorni
A	90	20	/	/	/
B	90	40	10	/	/
C	90	80	70	55	40

Esempio 5

Isolamento e coltura di annessi cutanei

I bulbi piliferi sono stati isolati mediante uso di piccole pinze e forbici, da frammenti di cuoio capelluto sotto microscopio da dissezione.

Le ghiandole sebacee e sudoripare sono state isolate da frammenti di pelle ottenuta durante interventi chirurgici. Sotto microscopio di dissezione è stato possibile rimuovere (la capsula) dopo aver indotto una compressione del derma che facilita la protensione di dette strutture.

Dopo un'iniziale amplificazione su piastre gelatinate, gli annessi cutanei sono stati seminati sulle membrane di non-tessuto in piastre da 24 pozzetti e alla densità di 30.000/cm² in diverse condizioni di coltura:

- 1) in presenza di un medium condizionato da fibroblasti umani a tre giorni dalla semina (A);



- 2) in una co-coltura con fibroblasti umani dermici seminati sul biomateriale 3 settimane prima degli annessi cutanei(B);
- 3) in una co-coltura con fibroblasti umani dermici seminati sul biomateriale 5 settimane prima degli annessi cutanei(C).

Ogni campione è stato allestito in triplicato.

Gli annessi cutanei nelle condizioni di coltura A hanno dimostrato una sopravvivenza di circa 2-3 giorni, come valutato dalle indagini istologiche.

Dopo tale periodo le ghiandole vanno incontro a disgregazione frammentandosi in gruppi cellulari non vitali.

Nelle condizioni B e C gli annessi cutanei sono rimasti integri in coltura fino ad un periodo di 35 giorni. Successivamente si è verificato un graduale processo di disgregazione fino a scomparsa delle ghiandole.

RIVENDICAZIONI:

- 1) Materiale biologico costituito da due componenti:
 - a) una coltura di cellule endoteliali autologhe o omologhe eventualmente in associazione con cellule ghiandolari o annessi cutanei, cellule germinative dei bulbi piliferi e/o cheratinociti in mezzo condizionato da fibroblasti o in co-coltura con fibroblasti oppure;
una coltura di cellule ghiandolari o di annessi cutanei, di cellule germinative in mezzo condizionato da fibroblasti o in co-coltura con fibroblasti;
 - b) una matrice tridimensionale biocompatibile e biodegradabile di un



- 2) in una co-coltura con fibroblasti umani dermici seminati sul biomateriale 3 settimane prima degli annessi cutanei(B);
- 3) in una co-coltura con fibroblasti umani dermici seminati sul biomateriale 5 settimane prima degli annessi cutanei(C).

Ogni campione è stato allestito in triplicato.

Gli annessi cutanei nelle condizioni di coltura A hanno dimostrato una sopravvivenza di circa 2-3 giorni, come valutato dalle indagini istologiche.

Dopo tale periodo le ghiandole vanno incontro a disgregazione frammentandosi in gruppi cellulari non vitali.

Nelle condizioni B e C gli annessi cutanei sono rimasti integri in coltura fino ad un periodo di 35 giorni. Successivamente si è verificato un graduale processo di disgregazione fino a scomparsa delle ghiandole.

RIVENDICAZIONI:

- 1) Materiale biologico costituito da due componenti:
 - a) una coltura di cellule endoteliali autologhe o omologhe eventualmente in associazione con cellule ghiandolari o annessi cutanei, cellule germinative dei bulbi piliferi e/o cheratinociti in mezzo condizionato da fibroblasti o in co-coltura con fibroblasti oppure;
una coltura di cellule ghiandolari o di annessi cutanei, di cellule germinative in mezzo condizionato da fibroblasti o in co-coltura con fibroblasti;
 - b) una matrice tridimensionale biocompatibile e biodegradabile di un



derivato dell'acido ialuronico ed eventualmente collagene e/o
fibrina.

- 2) Materiale biologico secondo la rivendicazione 1, in cui le cellule endoteliali sono prelevate dalla vena di funicoli ombelicali o da derma autologo o omologo.
- 3) Materiale biologico secondo la rivendicazione 1, in cui le cellule ghiandolari autologhe o omologhe sono epatociti o cellule delle isole di Langerhans.
- 4) Materiale biologico secondo la rivendicazione 1, in cui gli annessi cutanei sono ghiandole sebacee, ghiandole sudoripare, bulbi piliferi e le cellule germinative sono prelevate da bulbi piliferi autologhi o omologhi.
- 5) Materiale biologico costituito da due componenti:
 - a) una coltura di cellule endoteliali autologhe o omologhe in mezzo condizionato da fibroblasti o in co-cultura con fibroblasti.
 - b) una matrice tridimensionale biocompatibile e biodegradabile di un derivato dell'acido ialuronico ed eventualmente collagene e/o fibrina.
- 6) Materiale biologico costituito da due componenti:
 - a) una coltura di cellule endoteliali autologhe o omologhe in associazione con annessi cutanei e/o cellule germinative autologhe o omologhe dei bulbi piliferi e/o cheratinociti autologhi o omologhi in mezzo condizionato da fibroblasti o in co-cultura



con fibroblasti.

- b) una matrice tridimensionale biocompatibile e biodegradabile di un derivato dell'acido ialuronico ed eventualmente collagene e/o fibrina.
- 7) Materiale biologico secondo la rivendicazione 6, in cui gli annessi cutanei sono ghiandole sebacee, ghiandole sudoripare, bulbi piliferi.
- 8) Materiale biologico costituito da due componenti:
- a) una coltura di cellule endoteliali autologhe o omologhe in associazione con cellule delle isole di Langerhans autologhe o omologhe in mezzo condizionato da fibroblasti o in co-cultura con fibroblasti.
 - b) una matrice tridimensionale biocompatibile e biodegradabile di un derivato dell'acido ialuronico ed eventualmente collagene e/o fibrina.
- 9) Materiale biologico costituito da due componenti:
- a) una coltura di cellule endoteliali autologhe o omologhe in associazione con epatociti autologhi o omologhi in mezzo condizionato da fibroblasti o in co-cultura con fibroblasti.
 - b) una matrice tridimensionale biocompatibile e biodegradabile di un derivato dell'acido ialuronico ed eventualmente collagene e/o fibrina.
- 10) Materiale biologico costituito da due componenti:
- a) una coltura di annessi cutanei o di cellule germinative autologhe o



omologhe dei bulbi piliferi in mezzo condizionato da fibroblasti o in co-cultura con fibroblasti.

- b) una matrice tridimensionale biocompatibile e biodegradabile di un derivato dell'acido ialuronico ed eventualmente collagene e/o fibrina.

11) Materiale biologico costituito da due componenti:

- a) una coltura di cellule delle isole di Langerhans autologhe o omologhe in mezzo condizionato da fibroblasti o in co-cultura con fibroblasti.
- b) una matrice tridimensionale biocompatibile e biodegradabile di un derivato dell'acido ialuronico ed eventualmente collagene e/o fibrina.

12) Materiale biologico costituito da due componenti:

- a) una coltura di epatociti autologhi o omologhi in mezzo condizionato da fibroblasti o in co-cultura con fibroblasti.
- b) una matrice tridimensionale biocompatibile e biodegradabile di un derivato dell'acido ialuronico ed eventualmente collagene e/o fibrina.

13) Materiale biologico secondo le rivendicazioni 1, in cui il derivato dell'acido ialuronico è un estere dell'acido ialuronico avente grado di esterificazione compreso tra il 25 e il 100%.

14) Materiale biologico secondo la rivendicazione 13, in cui l'estere dell'acido ialuronico è un estere benzilico avente grado di esterificazione



di 75% o 100%.

- 15) Materiale biologico secondo le rivendicazioni 1, 13 e 14, in cui il componente b) viene usato nella forma di tessuto non tessuto.
- 16) Materiale biologico secondo le rivendicazioni 1, 13-15, in cui il componente b) viene usato nella forma di tessuto non tessuto, spugne, granuli, microsfere, tubi e garze.
- 17) Processo per preparare il materiale biologico di cui alla rivendicazione 1, che comprende le seguenti fasi:
 - i) isolamento delle cellule endoteliali da vena di funicoli ombelicali umani mediante digestione enzimatica da collagenasi;
 - ii) amplificazione su piastre collagenate;
 - iii) semina delle cellule su matrice tridimensionale biodegradabile e biocompatibile di derivato dell'acido ialuronico in presenza di un medium condizionato da fibroblasti umani in coltura primaria o in una co-coltura con fibroblasti umani dermici.
- 18) Uso del materiale biologico secondo le rivendicazioni 1, 5, 6 in cui il componente a) contiene cellule endoteliali da sole o in associazione con annessi cutanei, cellule germinative e cheratinociti, nel trapianto dermico.
- 19) Uso del materiale biologico secondo le rivendicazioni 9, nel trapianto dermico e del cuoio capelluto.
- 20) Uso del materiale biologico secondo le rivendicazioni 1, 5, 6, nel trapianto dermico in cui il componente a) contenente cellule endoteliali



facilita il meccanismo di neo-vascularizzazione del derma trapiantato.

- 21) Uso del materiale biologico secondo le rivendicazioni 1, 6, e 9 in cui il componente a) contiene cellule germinative dei bulbi piliferi, nel trapianto del cuoio capelluto.
- 22) Uso del materiale biologico secondo le rivendicazioni 1, 8, 11, in cui il componente a) contiene epatociti, nel trapianto di tessuto epatico.
- 23) Uso del materiale biologico secondo le rivendicazioni 1, 7, 10, in cui il componente a) contiene isole di Langerhans, nei casi di insufficiente produzione di insulina.
- 24) Uso del materiale biologico secondo le rivendicazioni 1, 5-9, in cui il componente a) contiene le cellule endoteliali, in chirurgia.
- 25) Uso del materiale biologico secondo la rivendicazione 24, in chirurgia cardiovascolare, estetica, oncologica.
- 26) Uso del materiale biologico secondo le rivendicazioni 24-25, in chirurgia per favorire il processo biologico di vascularizzazione dei tessuti.

Fidia Advanced Biopolymers s.r.l.
Dott. Lanfranco Callegaro
Presidente



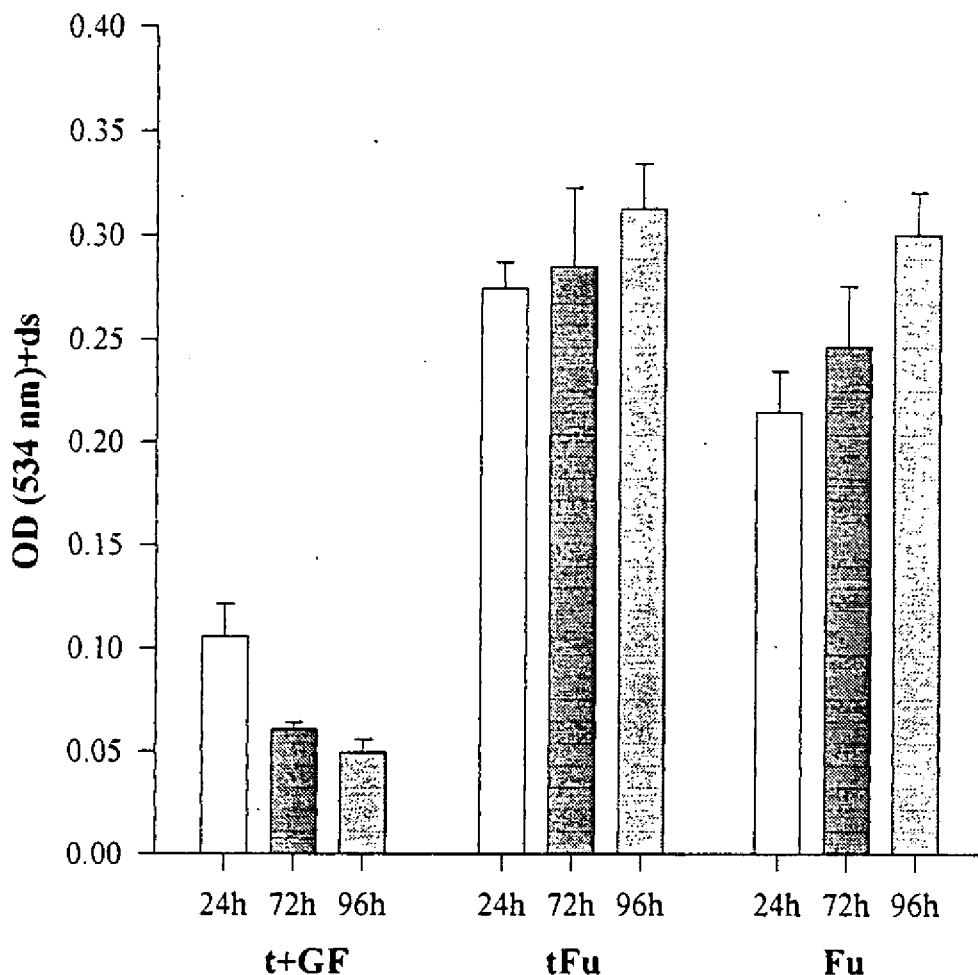


Figura 1: le HUVEC sono state seminate in triplicato su dischetti di non tessuto di HYAFF® in piastre da 24 pozzetti e alla densità di 30.000/cm² in terreno addizionato di fattori di crescita (t+GF), in medium condizionato da fibroblasti umani a 3 giorni dalla semina (tFu) oppure dopo semina di fibroblasti umani eterologhi (Fu). La crescita è stata bloccata a tempi diversi e la proliferazione cellulare valutata con saggio MTT.

I valori di OD riportati per Fu si riferiscono a quelli ottenuti in seguito a sottrazione dei corrispondenti valori letti per campioni analoghi in cui sono stati seminati in parallelo soltanto i fibroblasti.



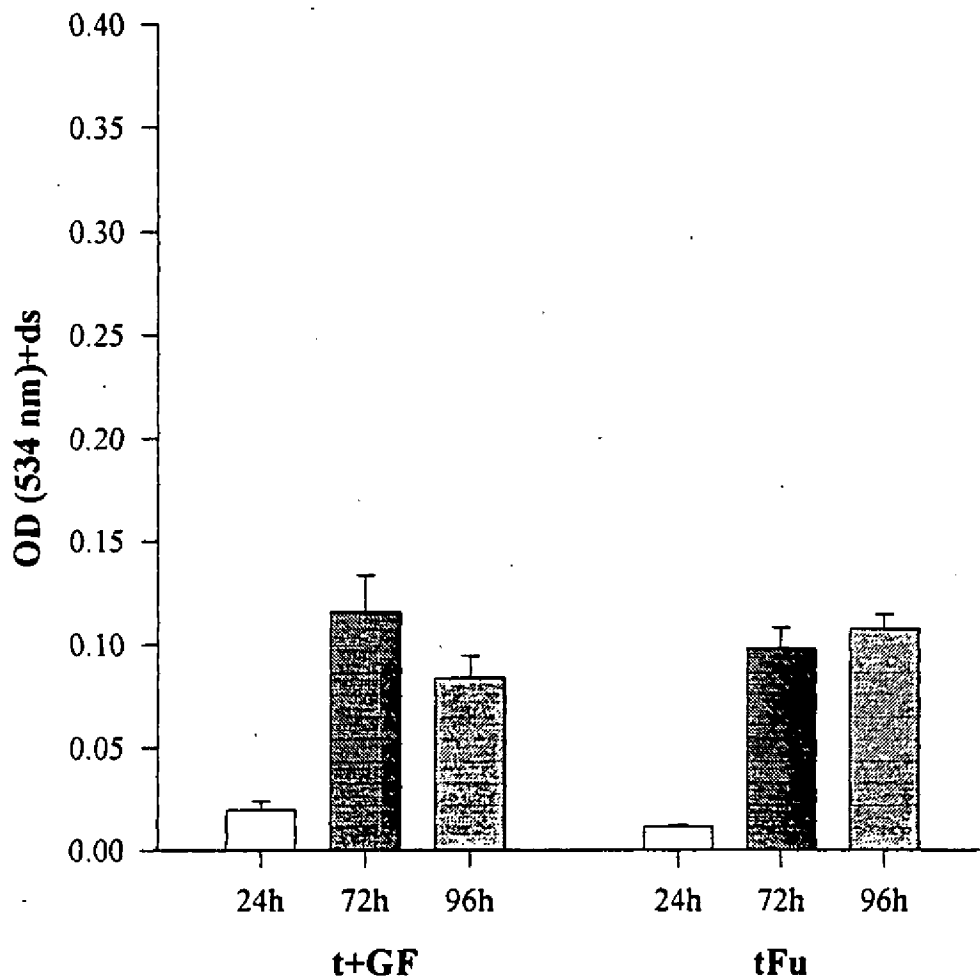


Figura 2: le HUVEC sono state contate e seminate in triplicato su pozzetti gelatinati in piastre da 24 pozzetti e alla densità di 30.000/cm² in terreno addizionato di fattori di crescita (t+GF) e in medium condizionato da fibroblasti umani a 3 giorni dalla semina (tFu). La crescita è stata bloccata in tempi diversi e valutata con saggio MTT.

