



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

<b>DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO</b>	<b>102019000002193</b>
<b>Data Deposito</b>	<b>14/02/2019</b>
<b>Data Pubblicazione</b>	<b>14/08/2020</b>

Classifiche IPC

<b>Sezione</b>	<b>Classe</b>	<b>Sottoclasse</b>	<b>Gruppo</b>	<b>Sottogruppo</b>
C	12	N	5	071

<b>Sezione</b>	<b>Classe</b>	<b>Sottoclasse</b>	<b>Gruppo</b>	<b>Sottogruppo</b>
G	01	N	33	50

Titolo

Metodo di caratterizzazione di un costruito vascolare ingegnerizzato

**DESCRIZIONE dell'invenzione avente per titolo:  
"METODO DI CARATTERIZZAZIONE DI UN COSTRUTTO VASCOLARE  
INGEGNERIZZATO"**

**A nome:** 1Lab SA  
**Di nazionalità:** Svizzera  
**Con domicilio in:** Via Cantonale 2/A, 6928 Manno,  
Svizzera  
**Inventori designati:** Enrico PERFLER, Andrea BIFFI,  
Stefano FARINA

\*\*\*\*\*

La presente invenzione si riferisce a un metodo di caratterizzazione di un costrutto vascolare ingegnerizzato, comprendente uno scaffold avente almeno una parte del lume rivestito di almeno uno strato cellulare funzionale e preferibilmente continuo, utilizzabile per testare *in vitro* prodotti medicali per uso umano o animale. In particolare, detto metodo di caratterizzazione permette di verificare la vitalità, la morfologia, la funzionalità e/o la distribuzione delle cellule comprese nel costrutto vascolare ingegnerizzato. Inoltre, la presente invenzione si riferisce al costrutto vascolare ingegnerizzato caratterizzato mediante detto metodo e ad un metodo per testare *in vitro* prodotti medicali per uso umano o animale mediante l'uso di detto costrutto vascolare ingegnerizzato.

È noto che lo sviluppo di un prodotto medicale comporta un lungo percorso. Per prodotto medicale, nel contesto della presente invenzione, viene inteso qualunque prodotto per uso medico sia sull'uomo che sull'animale, quale ad esempio un farmaco o un dispositivo medico o una combinazione dei medesimi. In pratica, nel percorso di sviluppo di un prodotto medicale, prima dell'impiego del prodotto nell'uomo o nell'animale, è necessario determinare quali siano gli effetti sul/i tessuto/i con cui viene a contatto in modo da valutare la sicurezza biologica, la prestazione del prodotto medicale stesso ed anticipare potenziali problematiche relative al suo impiego.

Oggi la valutazione della sicurezza biologica e della prestazione di un prodotto medicale è basata su metodi di prova *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* su modelli animali che presentano delle differenze significative rispetto alle condizioni di utilizzo finali, in particolare nell'uomo. Tali differenze sono ulteriormente apprezzabili quando oggetto di valutazione sono prodotti medicali per uso umano o animale che prevedono il proprio utilizzo nel distretto cardiovascolare e vascolare periferico, quali, ad esempio, valvole cardiache, stent, graft, cateteri, bende, reti o filtri. Infatti, la valutazione dell'interazione di prodotti medicali per uso umano o animale con i tessuti vascolari e con il sangue per poterne determinare la sicurezza biologica e la prestazione è critica ed i modelli attualmente utilizzati presentano importanti limiti ed

inconvenienti sia anatomici-strutturali sia relativi alla composizione ematica.

Inoltre, gli esperimenti *in vivo* o *ex vivo* sugli animali sono al centro di un intenso e controverso dibattito sulle sperimentazioni biomediche.

È noto che nel campo dell'ingegnerizzazione dei tessuti vascolari ingegnerizzati (*vascular tissue engineering*), quale ad esempio quello dei costrutti vascolari ingegnerizzati (*tissue-engineered constructs*), è fondamentale poter produrre un endotelio funzionale e preferibilmente continuo (i.e. avente un mono-strato di cellule confluenti), costituito principalmente da cellule endoteliali (ECs).

La produzione di un endotelio funzionale e preferibilmente continuo è un fattore critico al fine di assicurare l'adeguata prestazione e la sicurezza dei tessuti o costrutti vascolari ingegnerizzati, quale ad esempio prevenire trombosi e stenosi una volta che detti tessuti o costrutti vengono impiantati.

La generazione *in vitro* di costrutto o tessuto vascolare ingegnerizzato avente uno strato cellulare, preferibilmente di cellule endoteliali, funzionale e preferibilmente continuo (ad esempio un endotelio vascolare) comprende, in breve, le seguenti fasi:

- semina delle cellule endoteliali nel lume dello scaffold e conseguente adesione delle stesse, seguita da
- crescita/proliferazione ed organizzazione delle cellule endoteliali in funzione degli stimoli meccanici

(come ad esempio il flusso di un fluido) a cui sono sottoposte, sino ad ottenere uno o più strati di cellule endoteliali funzionali e preferibilmente continui, e opzionalmente,

- caratterizzazione di detto uno o più strati di cellule in formazione o formatosi.

Nella fase di semina risulta cruciale utilizzare una tecnica che permetta di seminare in maniera uniforme le cellule, preferibilmente cellule endoteliali, nel lume dello scaffold, che permetta un'adesione omogenea delle cellule allo scaffold e di incrementare in generale l'efficacia della semina. Così come risulta cruciale il metodo utilizzato per stimolare e favorire la crescita delle cellule, preferibilmente cellule endoteliali, e la loro organizzazione dopo la semina al fine di ottenere uno o più strati di cellule, ad esempio endoteliali, funzionali e preferibilmente continui.

Conseguentemente, è sentita la necessità di sviluppare, per la produzione di tessuti o costrutti vascolari ingegnerizzati aventi uno strato cellulare (ad esempio un endotelio) funzionale e preferibilmente continuo, (i) un metodo di semina di cellule, principalmente cellule endoteliali, all'interno del lume di uno scaffold, che assicuri l'omogeneità e l'adesione uniforme delle cellule endoteliali, con l'eliminazione di bolle d'aria all'interno dello scaffold; e/o (ii) un metodo di stimolo (ad esempio un metodo di perfusione) della crescita/proliferazione ed organizzazione delle cellule,

principalmente cellule endoteliali, che garantisca la sterilità e il mantenimento dell'assenza di bolle d'aria nel sistema di produzione.

Varie sono le tecniche utilizzate nell'arte nota per la produzione di tessuti o costrutti cardiovascolari ingegnerizzati e, in particolare, per la semina e lo stimolo della crescita/proliferazione ed organizzazione delle cellule; tuttavia, i risultati sino ad ora raggiunti non sono del tutto soddisfacenti.

Infine, è sentita la necessità di poter determinare l'efficacia del metodo di semina e del metodo di stimolo della crescita e organizzazione cellulare selezionati mediante metodi di caratterizzazione opportuni che attestino la vitalità, morfologia, funzionalità e organizzazione delle cellule adese nel lume dello scaffold e la conseguente generazione di uno strato cellulare (ad esempio un endotelio) uniforme, omogeneo, funzionale e preferibilmente continuo.

Detti metodi di caratterizzazione devono avere come principio quello di non arrecare danni allo sviluppo delle cellule ed alla loro adesione sullo scaffold. In altre parole, detti metodi di caratterizzazione non devono arrecare alterazione cellulare che potrebbe portare alla possibile perdita dello strato cellulare in crescita o formatosi (ad esempio un endotelio).

Sia detti metodi di caratterizzazione, sia detto metodo di semina e adesione, sia detto metodo di stimolo della

crescita e organizzazione cellulare devono essere semplici, veloci, indipendentemente dall'operatore, altamente riproducibili, affidabili ed efficaci, al fine di produrre e caratterizzare detti costrutti o tessuti vascolari ingegnerizzati sia a livello di laboratorio sia a livello industriale, in particolare per laboratori o industrie di ingegneria dei tessuti o costrutti certificati GLP (*Good Laboratory Practice*).

Infine, è sentita la necessità di poter sviluppare e caratterizzare costrutti o tessuti vascolari ingegnerizzati *in vitro* comprendenti uno strato cellulare (ad esempio un endotelio) funzionale e preferibilmente continuo per eseguire test preclinici o clinici avanzati, in modo da evitare di utilizzare cavie animali da laboratorio.

La Richiedente, dopo una lunga ed intensa attività di ricerca e sviluppo, al fine di rispondere alle esigenze sopra descritte, ha messo a punto un metodo di caratterizzazione di un costrutto vascolare ingegnerizzato utilizzabile per testare *in vitro* prodotti medicali per uso umano o animale, avente le caratteristiche come rivendicato nelle unite rivendicazioni. In particolare, detto metodo di caratterizzazione permette di verificare la vitalità, la morfologia, la funzionalità, la distribuzione e/o altre proprietà delle cellule o strato cellulare adese al lume dello scaffold del costrutto vascolare ingegnerizzato.

I metodi della presente invenzione consentono di superare le limitazioni dei metodi attualmente disponibili e offre un'alternativa valida all'uso di modelli animali.

Forme preferite della presente invenzione appariranno chiare dalla descrizione dettagliata che segue.

Le Figure 1-32 sono descritte nel proseguo della presente descrizione.

Nel contesto della presente invenzione si definisce costruito vascolare ingegnerizzato uno scaffold avente il lume tappezzato da almeno uno strato di cellule, preferibilmente cellule endoteliali, funzionale e preferibilmente continuo, vale a dire un mono-strato di cellule confluenti (per esempio un endotelio funzionale e continuo).

Nel contesto della presente invenzione i termini tessuto vascolare ingegnerizzato e costruito vascolare ingegnerizzato sono utilizzati in modo interscambiabile.

Nel contesto della presente invenzione con il termine scaffold si intende un supporto polimerico poroso biocompatibile in grado di promuovere l'adesione e la crescita cellulare, in tal caso cellule endoteliali.

Nel contesto della presente invenzione per endotelio funzionale si intende un endotelio con comportamento simil-fisiologico, in cui le cellule endoteliali sono

adiacenti l'una all'altra, adese allo scaffold ed esprimenti i marcatori tipici delle cellule endoteliali, quali ad esempio Von Willebrand factor (VWF), cluster of differentiation 31 (CD31), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). Inoltre, per endotelio continuo si intende un endotelio avente un mono-strato di cellule confluenti (ad esempio almeno al 90%).

Nel contesto della presente invenzione si definiscono cellule endoteliali le cellule che costituiscono un endotelio, preferibilmente un endotelio di un tessuto vascolare.

Nel contesto della presente invenzione si definisce terreno di coltura il fluido di crescita e mantenimento cellulare, specifico per ogni tipologia di cellula. Ad esempio, per le cellule endoteliali HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Sigma Aldrich, codice 200-05n) il terreno di coltura utilizzabile può essere l'Endothelial Growth Medium (in breve, EGM, Sigma Aldrich, codice 211-500). L'EGM contiene fetal bovine serum (2%), adenina (0.2 µg/ml), metavanadato d'ammonio (0.0006 µg/ml), amfotericina B (0.3 µg/ml), calcio cloruro 2H<sub>2</sub>O (300 µg/ml), colina cloridrato (20 µg/ml), solfato di rame 5H<sub>2</sub>O (0.002 µg/ml), acido triottico DL-6,8 (0.003 µg/ml), acido folinico (calcio) (0.6 µg/ml), eparina (4 µg/ml), idrocortisone (2 µg/ml), acido L-aspartico (15 µg/ml), L-cisteina (30 µg/ml), L-tirosina (20 µg/ml), solfato manganoso monoidrato (0.0002 µg/ml), ammonio molibdato 4H<sub>2</sub>O (0.004 µg/ml), nicotinammide (8

µg/ml), cloruro di nichel  $6H_2O$  (0.0001 µg/ml), penicillina (60 µg/ml), rosso fenolo sale sodio (15 µg/ml), cloruro di potassio (300 µg/ml), putrescina diidrocloreuro (0.0002 µg/ml), piridossina idrocloreuro (3 µg/ml), metasilicato di sodio  $9H_2O$  (3 µg/ml), solfato di sodio  $7H_2O$  (200 µg/ml), selenito di sodio (0.01 µg/ml), streptomina solfato (100 µg/ml), tiamina idrocloreuro (4 µg/ml), e solfato di zinco  $7H_2O$  (0.0003 µg/ml). Un terreno di coltura fresco è un terreno sterile mai utilizzato, direttamente fornito dalla ditta produttrice. Per terreno di coltura caldo viene inteso un terreno di coltura precedentemente scaldato ad una temperatura compresa nell'intervallo tra 20°C e 45°C, preferibilmente a 37°C.

Forma oggetto della presente invenzione un metodo di caratterizzazione (in seguito, metodo di caratterizzazione della presente invenzione) di un costruito vascolare ingegnerizzato, comprendente uno scaffold avente almeno una parte del lume rivestito di almeno uno strato cellulare funzionale, utilizzabile per testare *in vitro* prodotti medicali per uso umano o animale, detto metodo comprendente:

- fase I di preparare uno scaffold (Fig.2, 21) all'interno di una camera di un bioreattore (Fig.3, 11), a dare un sistema bioreattore (11)-scaffold (21), seguito da
- fase II di applicare un metodo di semina per seminare almeno una parte del lume di detto scaffold (21) con una cultura di cellule e permettere l'adesione di dette

cellule allo scaffold (21) a dare un sistema bioreattore (11)-scaffold (21) seminato, seguita da

- fase III di stimolare la crescita e l'organizzazione di dette cellule sino a formare almeno uno strato di cellule funzionali, seguita da o concomitante a
- fase VI di caratterizzare dette cellule adese al lume dello scaffold (21) per verificare la loro vitalità, morfologia, funzionalità, distribuzione e/o altre proprietà note all'esperto del ramo.

Secondo una forma di realizzazione del metodo di caratterizzazione secondo l'invenzione comprendente le fasi I-IV (e opzionalmente le fasi I.1, II.1-II.2, II.1-II.4, II.1-II.9, III.1-III.3, 2.1-2.11 e/o 3.1-3.13), le cellule che rivestono almeno una parte del lume di detto scaffold sono cellule endoteliali scelte tra le cellule che costituiscono un endotelio di un tessuto vascolare; preferibilmente scelte tra HAOECs (*human aortic endothelial cells*), HCAECs (*human coronary artery endothelial cells*), HMEVECs (*human dermal microvascular endothelial cells*) e HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*).

Secondo una forma di realizzazione del metodo di caratterizzazione secondo l'invenzione comprendente le fasi I-IV (e opzionalmente le fasi I.1, II.1-II.2, II.1-II.4, II.1-II.9, III.1-III.3, 2.1-2.11 e/o 3.1-3.13), il lume di detto scaffold è rivestito almeno in parte di almeno uno strato cellulare funzionale e continuo, preferibilmente un monostrato di cellule endoteliali

funzionale e continuo avente le cellule confluenti (i.e. endotelio funzionale e continuo).

Secondo una forma di realizzazione del metodo di caratterizzazione secondo l'invenzione comprendente le fasi I-IV (e opzionalmente le fasi II.1-II.2, II.1-II.4, II.1-II.9, III.1-III.3, 2.1-2.11 e/o 3.1-3.13), detta fase I di preparare uno scaffold comprende la fase di:

I.1: montare lo scaffold (21) all'interno della camera del bioreattore (11), a dare il sistema bioreattore (11)-scaffold (21). Preferibilmente, montare lo scaffold (21) su afferraggi di un portascaffold (Fig. 1, 13, 13a, 13b) e alloggiare detto portascaffold (13, 13a, 13b) con lo scaffold (21) all'interno della camera del bioreattore (11). Ad entrambe le estremità del bioreattore (a monte e a valle) vengono applicati dei connettori rotanti (Fig. 4; CR1, CR2) e dei connettori a T (Fig. 4; T2, T3).

Nel contesto della presente invenzione con il termine sistema bioreattore-scaffold si intende l'insieme del bioreattore e dello scaffold (Fig. 3; 11, 21), preferibilmente uno scaffold di forma sostanzialmente tubolare, che viene alloggiato e fissato all'interno del bioreattore, ad esempio ad un portascaffold. Lo scaffold può essere afferrato agli afferraggi del portascaffold (il quale è cavo all'interno per permettere la perfusione dello scaffold) con fascette auto-stringenti, dopo aver protetto lo scaffold con un nastro di teflon sterilizzato. L'inserimento del portascaffold (13)

all'interno del bioreattore 11 avviene in modo tale che l'ingresso a monte della camera del bioreattore coincida (Fig. 4; CR1, 41) con una estremità dello scaffold (Fig. 4; 13a) e l'apertura a valle della camera del bioreattore (Fig. 4; CR2, 42) coincida con l'altra estremità dello scaffold (Fig. 4; 13b). In tal modo, lo scaffold (21) è perfettamente coassiale rispetto al percorso di perfusione generato dal portascaffold. Si definisce asse longitudinale del bioreattore l'asse maggiore secondo cui è orientato lo scaffold montato all'interno del bioreattore.

Lo scaffold (21) della presente invenzione è uno scaffold polimerico di origine sintetica o naturale e formato da un solo polimero o da co-polimeri (insieme di polimeri), come ad esempio fibroina della seta elettrofilata o copolimeri di PGA/PLA (acido poliglicolico/acido polilattico) o PGA/PCL (acido poliglicolico/policaprolactone).

Preferibilmente lo scaffold della presente invenzione è di fibroina della seta elettrofilata di forma sostanzialmente tubolare.

Secondo una forma di realizzazione del metodo di caratterizzazione secondo l'invenzione comprendente le fasi I-IV (e opzionalmente le fasi I.1, III.1-III.3, 2.1-2.11 e/o 3.1-3.13), detto metodo di semina compreso nella fase II, comprende le fasi di:

II.1: rilasciare detta cultura di cellule, preferibilmente endoteliali, sotto forma di una sospensione cellulare comprendente un terreno di coltura

fresco e cellule, preferibilmente endoteliali, all'interno di un contenitore (Fig. 10, 91) montato su un connettore a T (Fig. 10, T2) posto a monte del bioreattore (11) tramite un connettore rotante (Fig. 10, CR1); seguito da

II.2: rilasciare detta cultura di cellule, preferibilmente endoteliali, nel lume interno dello scaffold (21) presente all'interno del bioreattore (11) con un flusso continuo tale che la velocità di flusso permette a detta sospensione cellulare di scendere nel connettore a T (T2) senza generare bolle d'aria e spingere le bolle d'aria presenti all'interno del lume interno dello scaffold (21) verso un'apertura di un connettore a T (Fig. 10, T3) posto a valle del bioreattore (11) consentendo la loro uscita.

Detto contenitore (Fig. 10, 91) può essere la porzione cava di una siringa o un analogo.

Le fasi II.1 e II.2 di detto metodo di semina riducono il rischio che bolle d'aria entrino in contatto con le cellule seminate, preferibilmente cellule endoteliali, evitando così i danni alle cellule stesse e rendendo possibile ottenere un mono-strato di cellule funzionale e preferibilmente continuo (i.e. cellule confluenti) adese sul lume dello scaffold (ad esempio un endotelio funzionale e preferibilmente continuo).

Secondo una forma di realizzazione del metodo di caratterizzazione secondo l'invenzione comprendente le fasi I-IV (e opzionalmente le fasi I.1, III.1-III.3,

2.1-2.11 e/o 3.1-3.13), in cui detto metodo di semina compreso nella fase II comprende oltre alle fasi II.1 e II.2, successivamente alla fase II.2, le fasi di:

II.3: rotare in continuo lo scaffold (21) lungo il suo asse longitudinale per un intervallo di tempo compreso tra 2 e 48 ore, preferibilmente 24 ore, con una velocità di rotazione compresa tra 0,5 e 5 rpm, preferibilmente tra 1.5 e 2 rpm, più preferibilmente per 24 ore a 1.5- 2 rpm, per permettere l'adesione delle cellule sul lume interno dello scaffold (21) in modo uniforme; seguito da o concomitante a

II.4: incubare lo scaffold (21) alloggiato all'interno del bioreattore (11) per un intervallo di tempo compreso tra 2 e 48 ore, preferibilmente per 24 ore, a una temperatura tra 20 e 45°C, preferibilmente a 37°C, in presenza di CO<sub>2</sub> al 1-10%, preferibilmente al 5%; più preferibilmente per 24 ore a 37°C in presenza di 5% di CO<sub>2</sub>.

Preferibilmente, la fase II.4 di incubare avviene con lo scaffold (21) in rotazione secondo la fase II.3.

La fase II.3 di rotare migliora l'adesione cellulare sul lume dello scaffold e la rende uniforme, permette allo scaffold stesso di rimanere continuamente bagnato dal terreno di coltura presente all'interno della camera del bioreattore e permette il passaggio di nutrienti tra il terreno presente all'interno della camera (esterno allo scaffold) e quello della sospensione cellulare seminata all'interno del lume dello scaffold.

Secondo una forma di realizzazione del metodo di caratterizzazione secondo l'invenzione comprendente le fasi I-IV (e opzionalmente le fasi I.1, III.1-III.3, 2.1-2.11 e/o 3.1-3.13), detto metodo di semina secondo le fasi II.1-II.4 comprende in dettaglio le fasi II.1-II.9 di seguito illustrate, eseguite in sequenza e in condizioni di sterilità.

La fase I.1 è seguita dalla fase II.5: iniettare il terreno di coltura fresco all'interno del lume di detto scaffold (21) fissato su detto portascaffold (13) posto all'interno della camera del bioreattore (11) (i.e. preconditionamento dello scaffold).

La fase II.5 è seguita dalla fase II.6: aggiungere detto terreno di coltura fresco all'interno della camera del bioreattore (11) dove è presente detto portascaffold (13, 13a, 13b) con lo scaffold (21) iniettato con detto terreno di coltura.

La fase II.6 è seguita dalla fase II.7: lasciare per un intervallo di tempo compreso tra 1 ora e 18 ore a una temperatura compresa tra i 20°C e 30°C, preferibilmente 25°C, detto terreno di coltura all'interno del lume interno dello scaffold (21) e all'interno della camera del bioreattore (11) dove è presente detto portascaffold (13) con lo scaffold (21) iniettato con detto terreno di coltura.

In dettaglio, lo scaffold viene preconditionato utilizzando una siringa con attacco luer-lock che viene agganciata a una delle due estremità del bioreattore

tramite connettore a T (Fig. 9; T2). Successivamente le estremità aperte dei connettori posti a monte e a valle del bioreattore vengono chiuse con dei tappi per evitare lo svuotamento del lume dello scaffold. Inoltre nella camera del bioreattore viene inserito terreno di coltura fresco fino a che lo scaffold che si trova alloggiato al suo interno non viene ricoperto per intero. In questo modo lo scaffold alloggiato all'interno della camera del bioreattore viene preconditionato, preferibilmente per circa 1 ora a circa 25°C, con un terreno di coltura fresco sia internamente (nel lume) che esternamente.

La fase II.7 è seguita dalla fase II.8: liberare l'interno del lume dello scaffold (21) e della camera del bioreattore (11) dal terreno di coltura, preferibilmente con una pipetta sterile. I residui di terreno di coltura presenti nei connettori (rotanti e a T) posti a valle e a monte del bioreattore vengono eliminati con il vuoto attraverso una pipetta, senza fare collassare lo scaffold.

La fase II.8 è seguita dalla fase II.1, precedentemente descritta, di rilasciare detta coltura cellulare, preferibilmente endoteliale, all'interno di detto contenitore (91) secondo la fase II.1, preferibilmente detto contenitore (91) è una siringa.

La fase II.1 è seguita dalla fase II.2, precedentemente descritta, di rilasciare detta coltura di cellule, preferibilmente endoteliali, nel lume interno dello

scaffold (21) presente all'interno del bioreattore (11) con un flusso continuo.

In dettaglio, i connettori a T posti a monte (Fig. 9, T2) e a valle (Fig. 9; T3) delle estremità del bioreattore, con all'interno lo scaffold montato sugli afferraggi, vengono rivolti con l'apertura superiore verso l'alto (a 90° rispetto al piano in cui giace il sistema bioreattore-scaffold). Successivamente l'apertura laterale dei connettori a T posti a valle (T3) e a monte (T2) del bioreattore viene tappata. Sull'apertura rivolta verso l'alto del connettore a T (Fig. 9; T2) posto a monte del bioreattore viene montato un contenitore, preferibilmente una siringa (Fig. 9; 91) con attacco luer-lock di capacità ad esempio di 5ml privata del suo stantuffo. L'apertura del connettore a T (Fig. 9; T3) posto a valle del bioreattore invece rimane aperta (Figura 9).

Utilizzando una pipetta, preferibilmente una pipetta di plastica sterile di capacità ad esempio di 25ml (Fig. 10; 101), viene prelevata da un contenitore in cui è stata preparata una sospensione cellulare composta da terreno di coltura fresco e cellule endoteliali (e.g. HUVECs). Successivamente, la sospensione cellulare prelevata viene rilasciata all'interno del contenitore o della siringa (Fig 10; 91) montata sull'elemento connettore a T (Fig. 10; T2) a monte del bioreattore tramite l'elemento (Fig. 10; CR1). La sospensione cellulare deve essere rilasciata, tramite la pipetta (Fig. 10; 101), ad esempio da 25 ml, con un flusso continuo in modo che la velocità di flusso permetta alla

sospensione cellulare di scendere nel connettore a T (Fig. 10; T2) senza la generazione di bolle d'aria e di spingere eventuali bolle d'aria presenti all'interno dello scaffold verso l'apertura del connettore a T T3 posto a valle (Fig. 10; T3) del bioreattore 11 e, conseguentemente di uscire (Figura 10).

Quando la sospensione cellulare, caricata tramite la siringa, raggiunge l'estremità aperta del connettore a T T3 posto a valle del bioreattore priva di eventuali bolle d'aria, l'apertura del connettore a T T2 posto a monte del bioreattore viene chiusa con un tappo (Figura 11).

Successivamente la siringa (91) con il residuo della sospensione cellulare viene ruotata di circa 90° rispetto al piano in cui giace (Figura 12); in questa posizione lo stantuffo della siringa (102) viene reinserito all'estremità aperta della siringa (Figura 12) facendo entrare solo la parte nera isolante in modo tale da non creare pressioni interne allo scaffold. Successivamente la siringa (91) può essere svitata dal connettore a T T2 a monte del bioreattore senza che si formino bolle d'aria (Figura 13) e l'estremità del connettore viene chiusa con un tappo (Figura 14).

La fase II.2 è seguita dalla fase II.9: aggiungere terreno di coltura fresco caldo (come precedentemente definito) all'interno della camera del bioreattore (11) dove è presente detto portascaffold (13) con lo scaffold (21) seminato contenente detta sospensione cellulare nel

lume, fino a che lo scaffold è immerso per metà nel terreno di coltura.

La fase II.9 è seguita dalla fase II.3, precedentemente descritta, di rotare in continuo lo scaffold (21) secondo la fase II.3.

In dettaglio, viene poi applicata una rotazione continua lungo l'asse longitudinale dello scaffold, ad esempio con una velocità di rotazione compresa tra 1.5 e 2 rpm, per 24 ore. La rotazione permette l'adesione cellulare sul lume dello scaffold in modo uniforme, permette allo scaffold stesso di rimanere continuamente bagnato dal terreno di coltura presente all'interno della camera del bioreattore e permette il passaggio di nutrienti tra il terreno presente all'interno della camera (esterno allo scaffold) e quello della sospensione cellulare seminata all'interno del lume dello scaffold.

La fase II.3 è seguita dalla fase II.4, precedentemente descritta, di incubare lo scaffold (21) alloggiato all'interno della camera del bioreattore (sotto rotazione), preferibilmente per 24 ore a 37°C con 5% di CO<sub>2</sub>.

Vantaggiosamente, la presenza nel metodo di caratterizzazione secondo le fasi I-IV (e opzionalmente le fasi I.1, III.1-III.3, 2.1-2.11 e/o 3.1-3.13) del metodo di semina secondo le fasi II.1-II.2 o le fasi II.1-II.4 o le fasi II.1-II.9 consente di operare in condizioni di sterilità e di seminare le cellule

eliminando sia le bolle d'aria presenti nel sistema bioreattore-scaffold sia quelle che si vengono a formare durante la semina, evitando, in questo modo, di danneggiare le cellule. Questo consente la produzione di un tessuto o costrutto vascolare ingegnerizzato avente uno scaffold avente almeno una porzione del lume rivestito di uno stato di cellule funzionale e preferibilmente continuo (i.e. avente uno mono-strato di cellule confluenti), quale un endotelio continuo e funzionale.

In pratica, ogni step del presente metodo di semina è rapido, standardizzato e riproducibile e ottimizza il costo e il tempo di operatività.

Secondo una forma di realizzazione del metodo di caratterizzazione secondo l'invenzione comprendente le fasi I-IV (e opzionalmente le fasi I.1, II.1-II.2, II.1-II.4, II.1-II.9, 2.1-2.11 e/o 3.1-3.13), detta fase III di stimolare la crescita e l'organizzazione di dette cellule, preferibilmente endoteliali, comprende una fase di applicare un metodo di perfusione con un terreno di coltura fresco caldo avente una temperatura compresa nell'intervallo tra 20°C e 45°C, preferibilmente 37°C, delle cellule presenti nel lume di detto scaffold (21) seminato, in cui detto metodo di perfusione comprende le fasi III.1-III.3 di seguito descritte.

Fase III.1: connettere, in sequenza variabile, un elemento per la rimozione delle bolle d'aria (Fig. 8, 71-72 o Fig. 22, BT) e detto sistema bioreattore (11)-scaffold (21) seminato ad un circuito di perfusione

(Fig. 5, 51-56)), in cui detto elemento per la rimozione delle bolle d'aria è inserito a monte del sistema bioreattore (11)-scaffold (21) seminato; il circuito di perfusione (Fig. 5, 51-56) comprende un reservoir (Fig. 5, 56) contenente un terreno di coltura.

La fase III.1 è seguita o preceduta dalla fase III.2: riempire con detto terreno di coltura fresco caldo almeno una parte di un elemento per la rimozione delle bolle d'aria (Fig. 8, 71-72 o Fig. 22, BT), in cui detto elemento per la rimozione delle bolle d'aria (Fig. 8, 71-72 o Fig. 22, BT) comprende una camera, un tappo che chiude detta camera, un accesso con funzione di ingresso (211) e un accesso con funzione di uscita (212), in cui detta camera ha un volume ed in cui una prima parte di detto volume è riempita con detto terreno di coltura fresco e in cui una seconda parte di detto volume è riempita con aria, detta seconda parte di detto volume avente la funzione di intrappolare le bolle d'aria presenti in detto terreno di coltura fresco che fluisce attraverso detto accesso con funzione di ingresso (211) e detto accesso con funzione di uscita (212).

Preferibilmente detto elemento per la rimozione delle bolle d'aria (Fig. 8, 71-72 o Fig. 22, BT) è una *bubble-trap* o un analogo.

Le fasi III.1 e III.2 sono seguite dalla fase III.3: permettere la perfusione dello scaffold (21) seminato con detto terreno di coltura fresco caldo, preferibilmente mediante una pompa peristaltica.

Le fasi III.1-III.3, comprese nella fase III di stimolare la crescita e l'organizzazione delle cellule sino a formare almeno uno strato di cellule funzionali, comprese nel metodo di caratterizzazione secondo l'invenzione comprendente le fasi I-IV (e opzionalmente le fasi I.1, II.1-II.2, II.1-II.4, II.1-II.9), possono essere eseguite secondo una prima forma di realizzazione comprendente le fasi 2.1-2.11 (illustrate nelle Figure 5-8, 18-21) o, alternativamente, secondo una seconda forma di realizzazione comprendente le fasi 3.1-3.13 (illustrate nelle Figure 22-27), di seguito descritte.

Le fasi sia di detta prima forma di realizzazione (fasi 2.1-2.11) sia di detta seconda forma di realizzazione (fasi 3.1-3.13) sono eseguite in sequenza e in condizioni di sterilità.

Dette fasi 2.1-2.11 o 3.1-3.13 sono successive alla fase II realizzate secondo le fasi II.1-II.2 o II.1-II.4 o II.1-II.9.

Detta prima forma di realizzazione (fasi 2.1-2.11), in breve, prevede prima la connessione del circuito di perfusione al sistema bioreattore-scaffold seminato, poi il riempimento dell'elemento per la rimozione delle bolle d'aria con un terreno di coltura e successivamente l'inserimento dell'elemento per la rimozione delle bolle d'aria nel circuito di perfusione precedentemente collegato al sistema bioreattore-scaffold seminato.

2.1 Collocare il tubo o sottopompa (Fig. 5; 52) del circuito di perfusione chiuso sotto la testa della pompa

peristaltica (Fig. 5; 55), la quale una volta attivata genera una forza peristaltica in grado di aspirare fluidi, in questo caso terreno di coltura fresco caldo. Il riempimento del circuito di perfusione chiuso avviene grazie all'aspirazione, da parte del tubo (Fig. 5; 51) del circuito di perfusione collegato al reservoir (Fig. 5; 56), del terreno di coltura fresco caldo che viene precedentemente riversato nel reservoir a sua volta chiuso. Riempire tutti i tubi del circuito di perfusione con il terreno di coltura fresco caldo fino a che il terreno di coltura fresco non ritorna al reservoir tramite il tubo 54 (Fig. 5; 54) del circuito di perfusione chiuso. Posizionare il sistema bioreattore-scaffold nelle stesse condizioni di sterilità in cui si trova il circuito di perfusione.

2.2 Aprire le estremità superiore e laterale del connettore a T T2 posto a monte del bioreattore.

2.3 Alla rimozione dei tappi dalle estremità superiore e laterale del connettore a T T2 posto a monte del bioreattore l'eventuale formazione di bolle d'aria viene compensata con l'aggiunta manuale (preferibilmente con una pasteur) di un pari volume di terreno di coltura fresco caldo (Fig. 16).

2.4 Occludere il tubo 54 del circuito di perfusione chiuso, preferibilmente con una clamp (Fig. 17; 171) in posizione prossimale al connettore tra il tubo 54 e il tubo 53 del circuito di perfusione stesso (Fig. 17). Fare

attenzione a mantenere chiusa la testa della pompa per prevenire lo svuotamento del tubo 53 del circuito di perfusione chiuso.

2.5 Tenere il tubo 53 del circuito di perfusione chiuso in posizione verticale, svitare il connettore (Fig. 5, C) posto tra il tubo 53 e il tubo 54 del circuito di perfusione e tappare preferibilmente il tubo 54 del circuito di perfusione con un tappo.

2.6 Avvitare il tubo 53 del circuito di perfusione all'estremità laterale aperta del connettore a T T2 a monte del bioreattore in corrispondenza del suo accesso laterale. Il connettore a monte del bioreattore va tenuto sempre in posizione verticale (Fig. 18).

2.7 Aprire il connettore T T3 a valle del bioreattore svitando il tappo dell'apertura laterale.

2.8 Togliere il tappo dal connettore del tubo 54 del circuito di perfusione (Fig. 19A) e avvitarlo sull'apertura laterale del connettore a T a valle del bioreattore (Fig. 19B).

2.9 Togliere la clamp 171 che occlude il tubo 54 del circuito di perfusione (Fig. 20).

2.10 Riempire l'elemento per la rimozione delle bolle d'aria (Fig. 21, 71-72), nel contesto della presente invenzione definito con il termine tecnico *bubble trap*

(BT). Il *bubble trap* consiste di un elemento rappresentato da una camera chiusa con un tappo e avente due accessi con funzione di ingresso e di uscita. La camera del *bubble trap* contiene un volume di liquido (in questo caso specifico di terreno di coltura fresco caldo) e di un volume d'aria che intrappola eventuali bolle d'aria presenti nel liquido in perfusione che fluisce attraverso i due accessi della camera del *bubble trap*.

Riempire il *bubble trap* con terreno di coltura fresco caldo in modo da lasciare un certo volume d'aria e chiudere la camera e i suoi due accessi con i rispettivi tappi.

2.11 Collegare il *bubble trap* al circuito di perfusione precedentemente collegato al sistema bioreattore-scaffold come segue (Fig. 7):

- a. chiudere il tubo 53 del circuito di perfusione con una clamp posta prossimalmente al connettore che collega il tubo 53 all'estremità laterale del connettore a T T1 (posto tra il tubo 53 e il tubo 52 del circuito di perfusione) e svitarlo (Fig. 7; 52).
- b. preferibilmente, chiudere il tubo 53 del circuito di perfusione con un tappo. Tale operazione previene lo svuotamento del tubo 53 del circuito di perfusione.
- c. tappare l'estremità laterale del connettore a T T1 (posto tra il tubo 53 e il tubo 52 del circuito di perfusione) e aprire la sua estremità superiore.

d. aprire l'accesso d'ingresso della camera del *bubble trap* e connetterlo all'accesso dell'estremità superiore e posta in verticale del connettore a T T1.

e. aprire l'accesso d'uscita del *bubble trap* e connetterlo al tubo 53 del circuito di perfusione, prestando attenzione a evitare qualsiasi torsione del tubo.

f. mantenere il *bubble trap* in posizione verticale.

g. togliere la clamp 71 dal tubo 53 del circuito di perfusione appena connesso alla camera del *bubble trap*.

Accendere la pompa e aprire il tappo dell'estremità superiore del connettore a T T2 a monte del bioreattore per eliminare eventuali bolle d'aria formatesi nel tubo 53 durante il processo evitando che raggiungano lo scaffold. La forza peristaltica applicata dalla pompa al sistema assemblato, costituito dal circuito di perfusione e dal sistema bioreattore-scaffold permetterà la perfusione dello scaffold.

h. dopo tale verifica, chiudere il connettore a T T2 a monte del bioreattore con il suo tappo.

Detta seconda forma di realizzazione (fasi 3.1-3.13), in breve, prevede prima la connessione dell'elemento per la rimozione delle bolle al circuito di perfusione, successivamente il riempimento dell'elemento per la rimozione delle bolle d'aria con un terreno di coltura e, infine, l'inserimento del sistema bioreattore-scaffold seminato nel circuito di perfusione precedentemente collegato all'elemento per la rimozione delle bolle d'aria.

3.1 Collegare in condizioni di sterilità i tubi del circuito di perfusione (Fig. 22; 51; 52; 53; 54; 55), l'elemento per la rimozione delle bolle d'aria (Fig. 22; BT), definito nel contesto della presente invenzione con il termine tecnico *bubble trap*, e il reservoir (Fig. 22; 56). L'elemento per la rimozione delle bolle d'aria o *bubble trap* (BT) consiste di un elemento rappresentato da una camera chiusa, preferibilmente in vetro, con un tappo e avente due accessi asimmetrici: l'accesso con rubinetto e portagomma ha funzione di ingresso (Fig. 27, 211) mentre l'accesso con solo portagomma ha funzione di uscita (Fig. 27, 221). La camera del *bubble trap* contiene un volume di liquido (in questo caso specifico di terreno di coltura fresco caldo) e un volume d'aria che intrappola eventuali bolle d'aria presenti nel liquido in perfusione che fluisce attraverso i due accessi della camera del *bubble trap*.

3.2 Collocare il sottopompa (Fig. 22; 52) del circuito di perfusione chiuso sotto la testa della pompa peristaltica (Fig. 22; 57), la quale una volta attivata genera una forza peristaltica in grado di aspirare fluidi, in questo caso terreno di coltura fresco caldo. Il riempimento del circuito di perfusione chiuso avviene grazie all'aspirazione, da parte del tubo (Fig. 22; 51) del circuito di perfusione collegato al reservoir (Fig. 22; 56), del terreno di coltura fresco caldo che viene precedentemente riversato nel reservoir (Fig. 22; 56) a sua volta chiuso. Riempire tutti i tubi del circuito di

perfusione, il *bubble trap* (Fig. 22, BT) e il reservoir (Fig. 22; 56) con un liquido di perfusione, quale un terreno di coltura fresco caldo (come sopra definito), fino a che il terreno di coltura fresco caldo non ritorna al reservoir tramite il tubo 55 (Fig. 22; 55) del circuito di perfusione chiuso. Il BT e il reservoir vanno riempiti in modo da lasciare un certo volume d'aria. In particolare, il *bubble trap* (Fig. 22, BT) viene riempito in modo tale che detta camera del *bubble trap* abbia una prima parte del suo volume riempita con detto terreno di coltura fresco e una seconda parte del suo volume riempita di aria, detta seconda parte di detto volume avente la funzione di intrappolare le bolle d'aria presenti nel liquido di perfusione (terreno di coltura fresco caldo) che fluisce attraverso detto accesso con funzione di ingresso (211) e detto accesso con funzione di uscita (212) del *bubble trap* (BT) (Fig. 22).

3.3 Occludere il tubo 54 (Fig 23), preferibilmente con una clamp (Fig. 23; 172) in posizione prossimale al BT e mettere in posizione di chiusura il rubinetto del BT (in posizione perpendicolare rispetto ai tubi del circuito di perfusione).

3.4 Posizionare il sistema bioreattore-scaffold nelle stesse condizioni di sterilità in cui si trova il circuito di perfusione.

3.5 Occludere il tubo 55 (Fig. 23), preferibilmente con una clamp (Fig. 23; 171; Fig. 17; 171) in posizione prossimale alla connessione C con il tubo 54 (Fig. 23; C). Aprire le estremità superiore e laterale del connettore a T T2 posto a monte del bioreattore (Fig. 4; T2).

3.6 Alla rimozione dei tappi dalle estremità superiore e laterale del connettore a T T2 (Fig. 4) posto a monte del bioreattore l'eventuale formazione di bolle d'aria viene compensata con l'aggiunta manuale (preferibilmente con una pasteur) di un pari volume di terreno di coltura fresco caldo (Fig. 16).

3.7 Tenere il tubo 54 (Fig. 23) del circuito di perfusione chiuso in posizione verticale, svitare il connettore posto tra il tubo 54 (Fig. 23) e il tubo 55 (Fig. 23) del circuito di perfusione e tappare preferibilmente il tubo 55 del circuito di perfusione con un tappo (Fig. 24).

3.8 Avvitare il tubo 54 (Fig. 27) del circuito di perfusione all'estremità laterale aperta del connettore a T T2 (Fig. 27) a monte del bioreattore in corrispondenza del suo accesso laterale. Il connettore a monte del bioreattore va tenuto sempre in posizione verticale (Fig. 18 o 27).

3.9 Aprire il connettore T T3 (Fig. 4) a valle del bioreattore svitando il tappo dell'apertura laterale.

3.10 Svitare il connettore rotante T3 insieme al connettore a T CR2 (Fig. 4), tenendo bloccata la ruota dentata R (Fig. 4) e avvitare il connettore del tubo 55 (Fig. 25) sull'apertura laterale del portasccaffold 14a (Fig. 1) (Fig. 25).

3.11 Togliere la clamp 171 che occlude il tubo 55 del circuito di perfusione (Fig. 26).

3.12 Posizionare il sistema bioreattore-scaffold seminato connesso al circuito di perfusione a circa 37°C e al circa 5% di CO<sub>2</sub>, porre in posizione libera il sottopompa 52 (Fig. 27), aprire il rubinetto del bubble trap BT (Fig. 27) posizionandolo parallelamente ai tubi del circuito di perfusione, togliere la clamp 172 (Fig. 27).

3.13 Accendere la pompa (Fig. 27, 57). La forza peristaltica applicata dalla pompa al sistema assemblato, costituito dal circuito di perfusione, dall'elemento per la rimozione delle bolle d'aria e dal sistema bioreattore-scaffold seminato permetterà la perfusione dello scaffold (fase III.3).

Nel contesto della presente invenzione, è definito circuito di perfusione (Fig. 5 e Fig. 22) nel contesto della presente invenzione un insieme di: tubi (Fig. 5; 51- 54 o Fig. 22; 51-55), un reservoir (Fig. 5 o Fig. 22; 56) e una pompa peristaltica (Fig. 5; 55 o Fig. 22; 57). Detti tubi sono di materiale biocompatibile e

connessi tra loro in modo tale da permettere la perfusione dello scaffold (Fig. 21 e Fig. 27), preferibilmente di forma sostanzialmente tubolare, alloggiato all'interno del bioreattore 11, tramite la pompa peristaltica (Fig. 5; 55, Fig. 22; 57) (in tal caso, Masterflex®, L/S Digital Dispensing Pump Drives 07551-20, Cole-Parmer) con la testa Easy-Load II 77200-62 (Masterflex, Cole-Parmer).

Con riferimento alla seconda forma di realizzazione del metodo di perfusione (fasi 3.1-3.13) sopra descritto e rappresentato in figura 27, il circuito di perfusione è principalmente costituito da quattro tubi con diametro interno di 3/16''': primo tubo 51 di aspirazione dal reservoir, secondo tubo 52 sottopompa, terzo tubo 53 che connette il circuito al bubble trap BT, quarto tubo 54 che connette BT al connettore a T T2 a monte del sistema bioreattore-scaffold, quinto tubo 55 di ritorno al reservoir 56 collegato al connettore a T T3 a valle del sistema di bioreattore-scaffold.

Con riferimento alla prima forma di realizzazione del metodo di perfusione sopra descritto (fasi 2.1-2.11) e rappresentato in figura 5, il tubo 51 è connesso al tubo sottopompa 52, il tubo sottopompa 52 al BT, il BT al tubo 53, il 53 al connettore a T T2 a monte del sistema bioreattore-scaffold, il 54 al connettore a T T3 a valle del sistema bioreattore-scaffold e al reservoir 56.

Il reservoir (Fig. 5 o Fig. 22, 56) è l'elemento contenente il terreno di coltura (ad esempio Endothelial Growth Medium EGM, Sigma Aldrich) fresco caldo dal quale il tubo 51 (Fig. 5 o Fig. 22) aspira e a cui il tubo 54

(Fig. 5) o 55 (Fig. 22) ritorna, mantenendo tutto il circuito e il sistema bioreattore-scaffold seminato in un sistema chiuso. Il reservoir (Fig. 5 o Fig. 22, 56) si trova a pressione atmosferica, grazie a un filtro da 0.22  $\mu\text{m}$  presente sul tappo del reservoir, che garantisce la sterilità dell'aria.

Vantaggiosamente, il metodo di perfusione qui descritto (fasi III.1-III.3), sia nella prima forma di realizzazione (fasi 2.1-2.11) sia nella seconda forma di realizzazione (fasi 3.1-3.13), consente di connettere un circuito di perfusione e un elemento per la rimozione delle bolle d'aria al sistema bioreattore-scaffold seminato evitando la formazione di bolle d'aria e impedendo che le stesse bolle, in caso si dovessero formare, raggiungano lo scaffold seminato con cellule, preferibilmente endoteliali, del sistema bioreattore-scaffold. Inoltre, le bolle d'aria eventualmente già presenti nel circuito di perfusione non raggiungono lo scaffold grazie alla presenza dell'elemento per la rimozione delle bolle d'aria (Fig. 21, 71-72 o Fig. 27, BT) nel circuito stesso.

Quindi, la presenza nel metodo di caratterizzazione comprendente le fasi I-IV (e, opzionalmente, le fasi I.1, II.1-II.2, II.1-II.4 o II.1-II.9) delle fasi III.1-III.3, sia nella prima forma di realizzazione (fasi 2.1-2.11) sia nella seconda forma di realizzazione (fasi 3.1-3.13), assicura con maggiore sicurezza, rispetto alla sola applicazione delle fasi II.1-II.2, II.1-II.4 o II.1-II.9, la completa assenza di bolle d'aria nel lume

dello scaffold e la produzione di un tessuto o costrutto vascolare ingegnerizzato avente uno scaffold avente almeno una porzione del lume rivestito di uno stato di cellule funzionale e preferibilmente continuo (i.e. avente un mono-strato di cellule confluenti), quale un endotelio continuo e funzionale.

Inoltre, durante la fase di connettere il sistema bioreattore-scaffold seminato e il circuito di perfusione del presente metodo di perfusione (fase III.1) non si verificano modifiche dello stato di adesione cellulare, fattore fondamentale per permettere la crescita dello strato cellulare vascolare.

La fase VI di caratterizzare dette cellule adese al lume dello scaffold compreso nel costrutto vascolare ingegnerizzato ottenuto mediante le fasi I-III (e, opzionalmente, le fasi I.1, II.1-II.2, II.1-II.4, II.1-II.9, II.1-III.3, 2.1-2.11 e/o 3.1-3.13), ha lo scopo di verificare ed attestare l'efficacia di dette fasi I-III (e, opzionalmente, delle fasi I.1, II.1-II.2, II.1-II.4, II.1-II.9, II.1-III.3, 2.1-2.11 e/o 3.1-3.13) e, in particolare, del metodo di semina e del metodo di perfusione utilizzati e, conseguentemente, di verificare ed attestare la formazione di uno scaffold avente almeno una parte del lume rivestito da almeno uno strato cellulare funzionale, preferibilmente uno strato di cellule endoteliali funzionale (endotelio funzionale); più preferibilmente uno strato di cellule endoteliali funzionale e continuo avente le cellule confluenti (endotelio funzionale e continuo).

Detta fase VI di caratterizzare comprende analizzare la vitalità, morfologia, funzionalità, distribuzione e/o altre caratteristiche opportune di dette cellule adese allo scaffold mediante opportune analisi di seguito descritte o note all'esperto del ramo.

Dette analisi non devono arrecare dei danni allo sviluppo delle cellule ed alla loro adesione sullo scaffold. Infatti, le cellule adese nel lume dello scaffold devono conservare la loro morfologia, vitalità e funzionalità per poter dare luogo a un endotelio vascolare funzionale, omogeneo e preferibilmente continuo (con cellule confluenti). Di conseguenza, è importante evitare qualsiasi alterazione cellulare durante la fase IV di caratterizzazione che potrebbe portare alla possibile perdita dello strato vascolare in crescita o formatosi.

Le analisi che si possono eseguire sono distinguibili in analisi non distruttive e analisi distruttive.

Vantaggiosamente, la fase VI di caratterizzare dette cellule, preferibilmente endoteliali, adese allo scaffold comprende almeno un metodo non distruttivo da applicare sulle cellule durante la fase di formazione di almeno uno strato di cellule funzionali e/o, alternativamente, almeno un metodo non distruttivo o distruttivo da applicare al completamento della fase di formare almeno uno strato di cellule funzionale e preferibilmente continuo.

Preferibilmente, detto metodo non distruttivo è un saggio di reazione metabolica delle cellule ad un reagente; mentre detto metodo distruttivo è scelto tra un saggio di quantificazione del DNA o un saggio colorimetrico con DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindolo, nome IUPAC 2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-carbossiammidina, CASS 47165-04-8) o rodamina-falloidina (*Rhodamine-Phalloidin*, falloidina CASS Nr 17466-45-4) o ematossilina (*hematoxilin*, nome IUPAC 7,11b-diidroindeno[2,1-c]cromene-3,4,6a,9,10(6H)-pentolo, CASS Nr, 517-28-2) o eosina (*etosin Y*, nome IUPAC 2-(2,4,5,7-tetrabromo-6-ossido-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate in forma depronata, CASS Nr. 17372-87-1). I saggi con metodo distruttivo sono effettuati su campioni di detto strato cellulare funzionale o su campioni di detto scaffold avente il lume rivestito di almeno uno strato cellulare funzionale, quale uno scaffold endotelizzato.

La vitalità delle cellule adese allo scaffold secondo le fasi I-III del metodo di caratterizzazione oggetto della presente invenzione è valutata, ad esempio, tramite un saggio di reazione metabolica delle cellule e/o tramite la quantificazione del DNA presente nel campione.

Detto saggio di reazione metabolica per la valutazione della vitalità delle cellule impiega come reagente, ad esempio, la resazurina (nome commerciale Alamar Blue, nome IUPAC 7-idrossi-10-ossidofenossazina-10-ium-3-one, CAS 550-82-3) o altri indicatori noti all'esperto del ramo. Tale saggio consiste in una reazione metabolica

che permette di quantificare la vitalità cellulare grazie all'ossidazione-riduzione dell'indicatore; ad esempio la resazurina si riduce a resofluorina, composto fluorescente dal colore rosa, in presenza dell'ambiente riduttivo di una cellula vitale. Detto saggio di reazione metabolica è un metodo non distruttivo applicabile sulle cellule durante la fase di formazione dello strato di cellule funzionali sullo scaffold senza compromettere la crescita cellulare. Tale saggio di reazione metabolica fornisce un valore di unità di fluoresceina arbitraria (in breve, A.U., *arbitrary unit of fluorescence*) che è indice della vitalità cellulare ma non della quantità cellulare.

La vitalità delle cellule può essere analizzata anche mediante il saggio di quantificazione di DNA genomico presente nelle cellule adese sullo scaffold, effettuato su gli stessi campioni utilizzati per il saggio di reazione metabolica.

Il saggio di quantificazione del DNA fornisce un valore di cellule vive e funzionali presenti nel campione e permette di rendere il valore relativo di A.U., ottenuto con il saggio di reazione metabolica, un valore assoluto.

Tale saggio si basa sul legame del Picogreen® (composto fluorescente) al doppio filamento del DNA e quindi all'emissione di fluorescenza del DNA nel campione visibile ad opportuna lunghezza d'onda dello spettrofotometro. In particolare, il DNA genomico viene estratto dalle cellule adese allo scaffold tramite lisi

e viene successivamente quantificato usando il Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay (P7589, Invitrogen, Molecular Probes) dove un colorante fluorescente degli acidi nucleici (PicoGreen®) permette di valutare la concentrazione del DNA genomico in soluzione attraverso una curva standard di riferimento.

Tale saggio è un metodo distruttivo, quindi può essere utilizzato solo al completamento della fase di formazione dello strato di cellule funzionale e preferibilmente continuo (e.g. endotelio funzionale e continuo) adese allo scaffold, per la verifica del risultato.

La morfologia delle cellule adese allo scaffold secondo le fasi I-III del metodo di caratterizzazione oggetto della presente invenzione è verificabile, ad esempio, tramite il saggio colorimetrico DAPI o il saggio colorimetrico con rodamina/falloidina o il saggio colorimetrico con ematossilina o il saggio colorimetrico con eosina o qualunque altro saggio noto all'esperto del ramo. I saggi per la caratterizzazione della morfologia sono saggi distruttivi.

I due saggi con DAPI e ematossilina permettono di valutare la morfologia cellulare tramite la colorazione del nucleo ed osservazione al microscopio ottico a fluoresceina o un microscopio confocale; mentre i due saggi con rodamina/falloidina e con eosina permettono di valutare la morfologia cellulare tramite la colorazione del citoplasma.

La colorazione con DAPI si basa sul principio del legame specifico a regioni A-T del DNA e di conseguenza all'emissione di fluoresceina nel blu in corrispondenza del nucleo. La colorazione con rodamina/falloidina si basa sul principio del legame specifico della falloidina ai filamenti di actina e di conseguenza all'emissione nel rosso in corrispondenza del citoplasma. La colorazione con ematosilina si basa sul principio del legame specifico dell'ematosilina ai componenti cellulari carichi negativamente (acidi nucleici, proteine della membrana, etc.) e di conseguenza all'emissione nel blu viola. La colorazione con eosina si basa sul principio del legame specifico dell'eosina con i granuli eosinofili del citoplasma e di conseguenza all'emissione nel rosa (Figura 30, colorazione DAPI/rodamina-falloidina).

Inoltre, la morfologia cellulare può essere testata tramite analisi istologica di alcune porzioni del costruito vascolare ingegnerizzato (e.g. scaffold endotelizzato) e inclusione in paraffina e successivo sezionamento tramite microtomo.

La funzionalità delle cellule adese allo scaffold secondo le fasi I-III del metodo di caratterizzazione oggetto della presente invenzione è verificabile, ad esempio, tramite la valutazione dell'espressione genica di alcuni marcatori tipici delle cellule. Per le cellule endoteliali i marcatori tipici sono, ad esempio, Von

Willebrand factor (VWF), cluster of differentiation 31 (CD31), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1).

Il fattore Von Willebrand factor (VWF) è tipico delle cellule endoteliali, mentre il fattore cluster of differentiation 31 (CD31) è un fattore tipico delle adesioni cellula-cellula tra cellule endoteliali.

Le tecniche in uso per caratterizzare la funzionalità delle cellule sono distinguibili in immunofluorescenza e immunoistochimica.

I saggi di immunofluorescenza si basano sulla coniugazione tra un anticorpo e gli antigeni della proteina VWF (che si trova nel citoplasma) o CD31 (che si trova nella membrana cellulare) ed un sistema di rilevazione con fluoresceina tramite microscopio ottico.

I saggi di immunoistochimica si basano sulla coniugazione tra un anticorpo e gli antigeni della proteina VWF (che si trova nel citoplasma) o CD31 (che si trova nella membrana cellulare) ed un sistema di rilevazione enzimatica tramite microscopio ottico.

La funzionalità cellulare è anche testata tramite un saggio di real-time PCR per i fattori Von Willebrand factor (VWF) e cluster of differentiation 31 (CD31).

Il saggio si basa sulla valutazione dell'espressione genica e prevede l'estrazione dell'RNA totale da cellule e dopo retrotrascrizione a cDNA viene quantificato grazie a specifici Taqman Gene Expression Assay (ThermoFisher Scientific) utilizzando la tecnica di *real-time PCR*.

Livelli funzionali d'espressione genica dei marcatori precedentemente elencati sono indice di una buona

funzionalità e vitalità delle cellule adese sul lume dello scaffold.

Come risulta evidente dai risultati riportati nella parte sperimentale, la fase IV di caratterizzazione del metodo di caratterizzazione della presente invenzione evidenzia che le fasi I-III (e, opzionalmente, le fasi I.1, II.1-II.2, II.1-II.4, II.1-II.9, II.1-III.3, 2.1-2.11 e/o 3.1-3.13) di detto metodo, in particolare il metodo di semina e di perfusione, sono efficaci e garantiscono una semina, una adesione e una crescita omogenea, uniforme e riproducibile di cellule, preferibilmente endoteliali, vitali lungo le varie sezioni di lume analizzate.

In altre parole, il metodo di caratterizzazione della presente invenzione comprendente le fasi I-IV (e, opzionalmente, le fasi I.1, II.1-II.2, II.1-II.4, II.1-II.9, II.1-III.3, 2.1-2.11 e/o 3.1-3.13) permette di produrre, in modo facile e riproducibile sia in scala di laboratorio sia industriale, e caratterizzare un costrutto vascolare ingegnerizzato comprendente uno scaffold avente almeno una parte del lume rivestito di almeno uno strato cellulare funzionale e preferibilmente continuo, quale ad esempio uno strato endoteliale funzionale e preferibilmente continuo avente le cellule confluenti.

Forma oggetto della presente invenzione il costrutto vascolare ingegnerizzato comprendente uno scaffold (21)

avente almeno una parte del lume rivestito di almeno uno strato cellulare funzionale ottenibile mediante il metodo di caratterizzazione (fase I-IV) oggetto della presente invenzione.

Preferibilmente, detto almeno uno strato cellulare funzionale è uno strato di cellule endoteliali funzionali; più preferibilmente è un mono-strato di cellule endoteliali funzionali e continuo avente le cellule confluenti.

Vantaggiosamente, detto scaffold può essere rivestito sulla superficie esterna con cellule, preferibilmente cellule muscolari.

Forma oggetto della presente invenzione, inoltre, un metodo per testare *in vitro* l'efficacia, tossicità e/o la sicurezza di un prodotto medicale per uso umano o animale, preferibilmente per uso nel distretto cardiovascolare e vascolare periferico, detto metodo comprendente le seguenti fasi:

- preparare un modello *in-vitro* di una struttura vascolare comprendente il costrutto vascolare ingegnerizzato ottenibile in accordo al metodo di caratterizzazione secondo la presente invenzione (fase I-IV), in cui detto costrutto vascolare ingegnerizzato ha caratteristiche anatomiche e fisiologiche funzionali o, alternativamente, ha caratteristiche anatomiche e fisiologiche disfunzionali atte a simulare un danneggiamento o una deformazione o una degenerazione dovuta a un aneurisma, stenosi, placche sclerotiche, forme tumorali o cardiomiopatie; preferibilmente detta

struttura vascolare è scelta tra vasi sanguigni, condotti sanguigni e valvole del sistema circolatorio centrale o periferico; più preferibilmente detta struttura vascolare è scelta tra arterie, vene, capillari, valvola aortica e mitralica; seguito da

- introdurre all'interno di detto modello *in-vitro* di una struttura vascolare il prodotto medicale da testare; preferibilmente il prodotto medicale è scelto tra valvole, valvole cardiache, stent, graft, cateteri, bende, reti o filtri; seguito da

- consentire la circolazione all'interno di detto modello *in-vitro* di una struttura vascolare comprendente detto prodotto medicale di un campione di sangue intero umano, sangue artificiale o loro derivati al fine di valutare il comportamento e l'interazione di detto prodotto medicale con detto campione di sangue intero umano, sangue artificiale o loro derivati.

#### PARTE SPERIMENTALE

#### VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE: SAGGIO DI REAZIONE METABOLICA CON RESAZURINA DI CELLULE ADESE SU SCAFFOLD

##### Metodologia 1:

Lo scaffold seminato dopo circa 24 ore di adesione viene smontato dagli afferraggi. Successivamente, lo scaffold viene sezionato (tagliandolo) in tre zone lunghe circa 2cm ciascuna in base alla distanza dal sito di iniezione della sospensione cellulare: prossimale, mediale e distale. Successivamente, ogni sezione viene suddivisa

in 4 parti dalla dimensione di circa  $1\text{cm}^2$ . Per il saggio con resazurina vengono selezionati 3 campioni ciascuno rappresentativi di ogni regione (prossimale, mediale distale) dello scaffold con cellule endoteliali adese. Ogni campione viene posizionato in un pozzetto di una piastra da 24 pozzetti e incubato con 1ml di una soluzione 0.02 mg/ml resazurina sale di sodio con terreno di coltura fresco preferibilmente per 3 ore a  $37^\circ\text{C}$  con 5% di  $\text{CO}_2$ . La reazione che si sviluppa tra la soluzione all'0.02 mg/ml resazurina sale di sodio con terreno fresco di coltura e il campione di scaffold (con le cellule endoteliali adese) viene analizzata tramite rilevazione dell'unità di fluoresceina arbitraria (A.U) a 590 nm tramite l'utilizzo di uno spettrofluorimetro.

#### Metodologia 2:

Preparare la soluzione di resazurina 0,02 mg/ml in EGM (endothelial growth medium) sotto cappa a flusso laminare a partire dalla soluzione di resazurina 0,2 mg/ml in PBS (phosphate-buffered saline) 1X ed terreno EGM precedentemente filtrato con filtro  $0.1\mu\text{m}$ . Preriscaldare a  $37^\circ\text{C}$  prima dell'uso in bagno d'acqua termostato.

Trasferire la camera del bioreattore con inserito al suo interno lo scaffold precedentemente seminato con cellule HUVECs sotto cappa sterile a flusso laminare. Scollegare eventuale circuito collegato alla camera del bioreattore, servendosi di clamp e tappi per i connettori. Svuotare l'EGM presente nel lume dello scaffold per gravità tramite inclinazione della camera.

Iniettare nel lume dello scaffold una soluzione di resazurina 0.02mg/ml in EGM, utilizzando la procedura di semina cellulare dello scaffold (MMM-05-00).

Preparare il bianco per l'analisi aggiungendo 3ml della stessa soluzione di resazurina in un tubo sterile da 15ml che verrà posto nello stesso incubatore. Incubare in incubatore a 37°C + 5% CO<sub>2</sub> per 30min.

Dopo 30min riportare la camera del bioreattore sotto cappa a flusso laminare e svuotare il lume dello scaffold per gravità inclinando la camera e raccogliere la soluzione in un tubo da 15ml.

Spostarsi con i campioni sul bancone per il caricamento della piastra per la lettura allo spettrofluorimetro.

Trasferire 1ml di ciascun campione con micropipetta p1000 in una provetta da 1,5ml precedentemente etichettata. Dopo l'analisi allo spettrofluorimetro conservare i campioni nell'apposita scatola presente nel frigorifero a -20°C.

Analisi allo spettrofluorimetro:

Una volta collezionata la soluzione di resazurina e il bianco in un tubo da 15ml caricare in piastra nera da 96 pozzetti 100µl in triplicato con micropipetta p200 di ciascun campione.

Leggere la piastra allo spettrofluorimetro impostando come parametri per il rilevamento della fluorescenza 510nm d'eccitazione e 590nm di emissione per leggere i valori di A.U. (*arbitrary unit of fluorescence*).

VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE: QUANTIFICAZIONE DI  
DNA GENOMICO TRAMITE PICOGREEN DI CELLULE ADESE SU  
SCAFFOLD

Metodologia:

Il metodo di analisi di quantificazione di DNA genomico può essere applicato a campioni di 1 cm<sup>2</sup> di cellule HUVECs adese su sezione di scaffold.

Utilizzare il kit Quant-iT PicoGreen dsDNA Reagents and Kits (P7589, Invitrogen) ed i reattivi qui di seguito elencati.

Porre le sezioni di scaffold con cellule HUVECs adese in provette da 1,5 ml ed aggiungere 180µl di soluzione AUT e 20 µl di proteinasi K, miscelare con vortex con modalità pulsante per 15sec. Incubare a 56°C in termoblocco o/n. Aggiungere 200µl di soluzione AUL e miscelare con vortex con modalità pulsante per 15sec. Incubare a 70°C in termoblocco per 10min. Spinnare in centrifuga. Aggiungere 200µl di Etanolo (assicurarsi che il solvente non sia alla temperatura di oltre 25°) e miscelare con vortex con modalità pulsante per 15sec.

Centrifugare a 6000xg (8000rpm) per 1min. Trasferire il lisato sulla colonna QIAamp UCP MinElute inserita in un tubo da 2ml.

Centrifugare a 6000xg (8000rpm) per 1min. Trasferire la colonna in un nuovo tubo da 2ml e aggiungere 500 µl di Buffer AUW1.

Centrifugare a 6000xg (8000rpm) per 1min. Trasferire la colonna in un nuovo tubo da 2ml e aggiungere 500 µl di Buffer AUW2.

Centrifugare a 6000xg (8000rpm) per 1min. Trasferire la colonna in un nuovo tubo da 2ml e centrifugare a 20000xg (12000rpm) per 3min. Trasferire la colonna in una provetta da 1,5ml precedentemente etichettata e aggiungere 20µl di H<sub>2</sub>O di tipo I direttamente sulla membrana ed incubare a RT per 5min.

Centrifugare a 20000xg (12000rpm) per 1min. Eliminare la colonna ed archiviare in campioni a -20°C.

Il seguente metodo di analisi può essere applicato a campioni di DNA genomico risospeso in H<sub>2</sub>O.

Preparazione curva di calibrazione:

Diluire TE 20X (componente B) a TE 1X con H<sub>2</sub>O di tipo I in una provetta o tubo.

Preparare il reagente PicoGreen diluendo 1:200 Quant-iT PicoGreen dsDNA reagent (componente A) con TE 1X, preparare al momento dell'uso in una provetta.

Preparare una soluzione di DNA diluita a partire dalla soluzione madre standard di dsDNA lambda (100µg/ml, componente C) e preparare la curva di calibrazione utilizzando la soluzione di DNA diluita come segue, scegliendo quella in relazione al contenuto di dsDNA stimato nei campioni.

Curva standard ad alto-range:

Preparare una soluzione 2µg/ml di dsDNA a partire dalla soluzione madre di standard di dsDNA lambda (100µg/ml), diluizione 1:50 con TE 1X in provetta da 1,5ml.

Diluire serialmente la soluzione 2µg/ml di dsDNA come mostrato nella Figura 28 in provette da 1,5ml.

Curva standard a basso-range:

Preparare una soluzione 50ng/ml di dsDNA a partire dalla soluzione di dsDNA 2µg/ml, diluizione 1:40 con TE 1X in provetta da 1,5ml.

Diluire serialmente la soluzione 50ng/ml di dsDNA come mostrato nella Figura 29 in provette da 1,5ml.

Analisi Campione:

Caricare 25µl in doppio di ciascun punto della curva selezionata nei pozzetti di una piastra nera da 96 pozzetti.

Caricare 25µl in doppio della soluzione TE 1X (bianco) in pozzetti della stessa piastra nera da 96.

Caricare 25µl in triplicato ciascun campione da quantificare in pozzetti della stessa piastra nera da 96, se necessario diluire opportunamente i campioni con TE 1X.

Aggiungere a ciascun pozzetto caricato (punti della curva, bianco e campioni) pari volume, 25µl, di PicoGreen miscelando bene.

Incubare la piastra nera da 96 pozzetti a RT al buio per 2-5min.

Misurare la fluorescenza allo spettrofluorimetro impostando lunghezza d'onda d'eccitazione a 480nm e d'emissione a 520nm.

Sottrarre il valore di fluorescenza (U.A) del campione bianco da quello di ciascuno dei campioni da quantificare e da ciascun campione della curva.

Utilizzare i valori ottenuti per generare una curva standard di fluorescenza rispetto alla concentrazione di DNA, utilizzando un file Excel.

Calcolare il quantitativo di dsDNA (ng/ml e ng totali) di ciascun campione tramite la curva standard di fluorescenza.

#### RISULTATI DEI SAGGI DI REAZIONE METABOLICA CON RESAZURINA E DI QUANTIFICAZIONE DI DNA GENOMICO TRAMITE PICOGREEN SU CELLULE ADESE SU SCAFFOLD

Nelle Figure 15A e 15B sono rappresentati in grafico i valori ottenuti con il saggio di reazione metabolica con resazurina secondo la metodologia 1 sui campioni rappresentativi di ogni regione (prossimale, mediale distale) di uno scaffold seminato con cellule endoteliali e incubato per 24 ore in tre esperienze diversi (denominati DYN1, DYN2 e DYN3). I grafici nelle Figure 15A e 15B evidenziano una buona adesione e vitalità delle cellule endoteliali.

Questi dati sono confermati dalla quantificazione del DNA genomico (Figure 15C e 15D) calcolata considerando che il contenuto di DNA genomico di una cellula endoteliale è di circa 7 pg.

Tra le diverse sezioni prossimali, mediali e distali dello scaffold seminato con cellule endoteliali non si rileva una differenza significativa nella vitalità cellulare. In particolare, la vitalità delle cellule e il numero delle stesse sono comparabili lungo la

lunghezza (asse principale dello scaffold) nelle sue porzioni prossimale, mediale e distale.

Per supportare questa evidenza è stata effettuata una doppia colorazione (*costaining*) utilizzando DAPI (D1306, ThermoFisher scientific) e Rhodamine-Phalloidin (R415, ThermoFisher scientific) su campioni rappresentativi di ogni regione (prossimale, mediale, distale) di uno scaffold seminato con cellule endoteliali e incubato per circa 24 ore. Questi risultati dopo circa 24 ore di coltura dimostrano che le cellule endoteliali sono vitali e distribuite sul lume dello scaffold in maniera uniforme. In particolare, questi risultati dimostrano una confluenza cellulare almeno del 90%.

In conclusione, la fase IV di caratterizzazione del metodo di caratterizzazione della presente invenzione evidenzia che le fasi I-III di detto metodo, in particolare il metodo di semina e di perfusione, sono efficaci e garantiscono una semina, una adesione e una crescita omogenea, uniforme e riproducibile di cellule endoteliali vitali lungo le varie sezioni di lume analizzate.

#### VALUTAZIONE DELLA MORFOLOGIA CELLULARE TRAMITE COLORAZIONE (STAINING) DEL NUCLEO E DEI FILAMENTI DI F-ACTINA

Il seguente metodo di analisi è applicato per colorare il nucleo e i filamenti di F-actina di cellule HUVECs adese su sezione di scaffold. È un metodo distruttivo.

Questo metodo utilizza DAPI per colorare il nucleo e Rodamina falloidina per la colorazione citoplasmatica.

Metodologia:

Porre le sezioni di scaffold da 1 cm<sup>2</sup> con cellule HUVECs adese in pozzetti di una piastra da 24. Utilizzare come controllo positivo di analisi una sezione della stessa tipologia di scaffold di 1 cm<sup>2</sup> seminato con circa 2,5\*10<sup>5</sup> cellule 24h prima. Per ciascun campione procedere come di seguito.

Effettuare 3 lavaggi rapidi consecutivi con PBS 1X, coprendo bene il campione, con una pasteur di plastica. Rimuovere ogni traccia di PBS 1X e sotto cappa chimica aggiungere formalina tamponata neutra al 10% coprendo bene ciascun campione con una pasteur di plastica. Incubare a temperatura ambiente per 10min. Effettuare 3 lavaggi con PBS 1X per 5min, meglio se in agitazione su piastra agitante.

Aggiungere la soluzione di Sudan Black in EtOH 70% coprendo bene il campione ed incubare al buio a temperatura ambiente per 30min. Da questo momento in poi manipolare i campioni al buio.

Spostare il campione in un pozzetto con PBS 1X ed effettuare dei lavaggi ripetuti con PBS 1X finché non vi siano più tracce di sudan black. Aggiungere la soluzione di Triton 0,1% in PBS 1X coprendo bene il campione ed incubare a temperatura ambiente per 5min. Effettuare 2 lavaggi con PBS 1X per 5min, meglio se in agitazione su piastra agitante.

Aggiungere la soluzione di BSA 1% in PBS 1X coprendo bene il campione ed incubare a temperatura ambiente per 20min. Effettuare 2 lavaggi con PBS 1X per 5min, meglio se in agitazione su piastra agitante.

Aggiungere la soluzione di Rodamina-falloidina 1:100 in BSA 1% in PBS 1X, preparata al momento con micropipette, coprendo bene il campione ed incubare a temperatura ambiente per 20min. Effettuare 3 lavaggi con PBS 1X per 5min, meglio se in agitazione su piastra agitante.

Aggiungere la soluzione di DAPI 1:200 in PBS 1X, preparata al momento con micropipette, coprendo bene il campione ed incubare a 37°C per 3min. Effettuare 2 lavaggi con PBS 1X per 5min, meglio se in agitazione su piastra agitante.

Osservare i campioni al microscopio a fluorescenza servendosi di un vetrino e vetrino coprioggetto senza montante. Osservare la colorazione nucleare tramite il canale del blu ed osservare la colorazione dei filamenti di actina tramite il canale del rosso. Archiviare in campioni in PBS 1X a 4°C.

#### VALUTAZIONE DELLA MORFOLOGIA CELLULARE TRAMITE ANALISI ISTOLOGICA.

La preparazione di campioni per inclusione in paraffina e valutazione istologica è effettuata come di seguito descritto.

Sciacquare la sezione tubolare in PBS 1X non sterile. Immergere la sezione in formalina 10% in un tubo ed

incubare a +4°C per 4h. Sciacquare la sezione in etanolo 70%. Immergere la sezione in etanolo 70% in un tubo e conservare a +4°C.

Da ogni campione, sono ottenute due sezioni: una trasversale di 2-3 mm di altezza e l'altra longitudinale (restante parte). La preparazione prosegue come riportato qui di seguito:

- Chiarificazione: dal momento che l'etanolo, ora contenuto nel preparato dopo la disidratazione, non è miscibile con la sostanza che dovrà infiltrarlo per la fase di inclusione (paraffina), occorre sostituirlo con un solvente intermedio, che sia miscibile sia con l'etanolo che con la paraffina. L'agente chiarificante utilizzato è lo xilolo.

- Inclusione: i passaggi di infiltrazione, da effettuare alla temperatura di 56-58 °C, sono i seguenti:

- xilolo /paraffina (50%-50%)
- paraffina pura (con 2-3 cambi)

- Sezionamento: mediante utilizzo del microtomo si ottengono fettine aventi spessore di 5 µm.

- Sparaffinatura: le sezioni in paraffina sono invece idrofobe e, per poterle colorare, necessitano l'allontanamento della paraffina stessa; quindi è necessario trattare i vetrini con:

- xilolo

- xilolo/etanolo (50%-50%)
- etanolo 100%
- etanolo 95%
- etanolo 70%
- etanolo 50%
- acqua distillata
  
- Colorazione: ematossilina eosina
  
- Disidratazione: si devono disidratare le sezioni ancora una volta e riportarle allo xilolo:
  - acqua distillata
  - etanolo 70%
  - etanolo 90%
  - etanolo 95%
  - etanolo 100% (2 cambi)
  - xilolo
  
- Montaggio: il vetrino copri-oggetto deve essere saldato saldamente al vetrino porta-oggetto. Per far ciò, si utilizzano delle resine naturali o sintetiche che garantiscono la perfetta adesione dei due vetrini fra loro e che, seccando, rendono il preparato stabile ed inalterabile. (Balsamo del Canada)
  
- Osservazione: mediante microscopio ottico con i seguenti ingrandimenti: 25X; 50X; 100X; 200X; 400X e 1000X

La valutazione della morfologia e della distribuzione cellulare sulla superficie interna di uno scaffold e la condizione cellulare è effettuata attraverso la colorazione con ematossilina ed eosina.

Il campione è stato sezionato ed incluso in paraffina, successivamente sono state tagliate delle fettine di 5µm e colorate con Ematossilina ed Eosina (Figure 31 e 32).

Tutti i campioni sono poi stati esaminati al microscopio con diversi ingrandimenti.

**RIVENDICAZIONI**

1. Un metodo di caratterizzazione di un costrutto vascolare ingegnerizzato, comprendente uno scaffold avente almeno una parte del lume rivestito di almeno uno strato cellulare funzionale, utilizzabile per testare *in vitro* prodotti medicali per uso umano o animale, detto metodo comprendente le fasi di:

- I. preparare uno scaffold (21) all'interno di una camera di un bioreattore (11), a dare un sistema bioreattore (11)-scaffold (21), seguito da

- II. applicare un metodo di semina per seminare almeno una parte del lume di detto scaffold (21) con una cultura di cellule e permettere l'adesione di dette cellule allo scaffold (21) a dare un sistema bioreattore (11)-scaffold (21) seminato, seguita da

- III. stimolare la crescita e l'organizzazione di dette cellule seminate nel lume dello scaffold (21) sino a formare almeno uno strato di cellule funzionali adeso ad almeno una parte del lume dello scaffold (21), seguita da o concomitante a

- VI. caratterizzare dette cellule che rivestono almeno una parte del lume dello scaffold (21) per verificare la loro vitalità, morfologia, funzionalità e/o distribuzione.

2. Il metodo di caratterizzazione secondo la rivendicazione 1, in cui dette cellule che rivestono almeno una parte del lume dello scaffold (21) sono

cellule endoteliali scelte tra le cellule che costituiscono un endotelio di un tessuto vascolare; preferibilmente scelte tra HAOECs (*human aortic endothelial cells*), HCAECs (*human coronary artery endothelial cells*), HMEVECs (*human dermal microvascular endothelial cells*) e HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*).

3. Il metodo di caratterizzazione secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui il lume di detto scaffold è rivestito almeno in parte di almeno uno strato cellulare funzionale e continuo, preferibilmente un monostrato di cellule endoteliali funzionale e continuo.

4. Il metodo di caratterizzazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detto metodo di semina comprende le fasi di:

- rilasciare detta cultura di cellule, preferibilmente endoteliali, sotto forma di una sospensione cellulare comprendente un terreno di coltura fresco e cellule, preferibilmente endoteliali, all'interno di un contenitore (91) montato su un connettore a T (T2) posto a monte del bioreattore (11) tramite un connettore rotante (CR1); seguito da

- rilasciare detta cultura di cellule, preferibilmente endoteliali, nel lume dello scaffold (21) presente all'interno del bioreattore (11) con un flusso continuo tale che la velocità di flusso permette a detta sospensione cellulare di scendere nel connettore a T (T2) senza generare bolle d'aria e di spingere le bolle

d'aria presenti all'interno del lume dello scaffold (21) verso un'apertura di un connettore a T (T3) posto a valle del bioreattore (11) consentendo la loro uscita.

5. Il metodo di caratterizzazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detto metodo di semina comprende inoltre, successivamente alla fase di rilasciare la cultura di cellule, preferibilmente endoteliali, nel lume dello scaffold (21), le fasi di:

- rotare in continuo lo scaffold (21) lungo il suo asse longitudinale per un intervallo di tempo compreso tra 2 e 48 ore, preferibilmente 24 ore, con una velocità di rotazione compresa tra 0,5 e 5 rpm, preferibilmente tra 1.5 e 2 rpm, per permettere l'adesione delle cellule sul lume interno dello scaffold (21) in modo uniforme; seguito da

- incubare lo scaffold (21) alloggiato all'interno del bioreattore (11) per un intervallo di tempo compreso tra 2 e 48 ore, preferibilmente per 24 ore, a una temperatura tra 20 e 45°C, preferibilmente a 37°C, in presenza di CO<sub>2</sub> al 1-10%, preferibilmente al 5%.

6. Il metodo di caratterizzazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la fase III di stimolare la crescita e l'organizzazione di dette cellule, preferibilmente endoteliali, comprende una fase di applicare un metodo di perfusione con un terreno di coltura fresco caldo avente una temperatura compresa nell'intervallo tra 20°C e 45°C, preferibilmente 37°C, delle cellule presenti nel lume di detto scaffold (21)

seminato; in cui detto metodo di perfusione comprende le fasi di:

- connettere un elemento per la rimozione delle bolle d'aria (71-72 o BT) e detto sistema bioreattore (11)-scaffold (21) seminato ad un circuito di perfusione (51-56), in cui detto elemento per la rimozione delle bolle d'aria è inserito a monte del sistema bioreattore (11)-scaffold (21) seminato; seguito da o preceduto da
- riempire con detto terreno di coltura fresco caldo almeno una parte di detto elemento per la rimozione delle bolle d'aria (71-72 o BT), in cui detto elemento per la rimozione delle bolle d'aria (71-72 o BT) comprende una camera, un tappo che chiude detta camera, un accesso con funzione di ingresso (211) e un accesso con funzione di uscita (212), in cui detta camera ha un volume ed in cui una prima parte di detto volume è riempito con detto terreno di coltura fresco caldo e in cui una seconda parte di detto volume è riempito con aria, detta seconda parte di detto volume avente la funzione di intrappolare le bolle d'aria presenti in detto terreno di coltura fresco che fluisce attraverso detto accesso con funzione di ingresso (211) e detto accesso con funzione di uscita (212); preferibilmente detto elemento per la rimozione delle bolle d'aria (71-72 o BT) è una *bubble-trap* o un analogo; seguito da
- permettere la perfusione dello scaffold (21) seminato con detto terreno di coltura fresco caldo, preferibilmente mediante una pompa peristaltica.

7. Il metodo di caratterizzazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la fase IV di caratterizzare dette cellule, preferibilmente endoteliali, che rivestono almeno una parte del lume dello scaffold (21) comprende

- almeno un metodo non distruttivo da applicare sulle cellule durante la fase III di formare almeno uno strato di cellule funzionali; preferibilmente detto metodo non distruttivo è un saggio di reazione metabolica delle cellule ad un reagente; e/o

- almeno un metodo non distruttivo o distruttivo da applicare al completamento della fase III di formare almeno uno strato di cellule funzionali; preferibilmente detto metodo distruttivo è scelto tra un saggio di quantificazione del DNA o un saggio colorimetrico con 2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-carbossiammidina (DAPI) o rodamina/falloidina o ematosilina o eosina.

8. Il metodo di caratterizzazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti,

in cui detta fase I di preparare uno scaffold comprende:

- montare lo scaffold (21) all'interno della camera del bioreattore (11) mediante un portascaffold (13), a dare il sistema bioreattore (11)-scaffold (21), in cui detto scaffold (21) è uno scaffold polimerico di forma sostanzialmente tubolare, preferibilmente di fibroina della seta elettrofilata; e

in cui detto metodo di semina comprende:

- iniettare il terreno di coltura fresco all'interno del lume di detto scaffold (21) fissato su detto

portascaffold (13) posto all'interno della camera del bioreattore (11); seguito da

- aggiungere detto terreno di coltura fresco all'interno della camera del bioreattore (11) dove è presente detto portascaffold (13, 13a, 13b) con lo scaffold (21) iniettato con detto terreno di coltura; seguito da

- lasciare per un intervallo di tempo compreso tra 1 ora e 18 ore a una temperatura compresa tra i 20°C e 30°C, preferibilmente 25°C, detto terreno di coltura all'interno del lume interno dello scaffold (21) e all'interno della camera del bioreattore (11) dove è presente detto portascaffold (13) con lo scaffold (21) iniettato con detto terreno di coltura; seguito da

- liberare l'interno del lume dello scaffold (21) e della camera del bioreattore (11) dal terreno di coltura; seguito da

- rilasciare detta coltura cellulare, preferibilmente endoteliale, all'interno di detto contenitore (91) secondo la rivendicazione 1; preferibilmente detto contenitore (91) è sostanzialmente una siringa o un analogo; seguito da

- rilasciare detta sospensione cellulare nel lume dello scaffold (21) secondo la rivendicazione 1; seguito da

- aggiungere detto terreno di coltura fresco all'interno della camera del bioreattore (11) dove è presente detto portascaffold (13) con lo scaffold (21) seminato contenente detta sospensione cellulare nel lume; seguito da

- rotare in continuo lo scaffold (21) secondo la rivendicazione 5; seguito da
- incubare lo scaffold (21) secondo la rivendicazione 5.

9. Un costrutto vascolare ingegnerizzato comprendente uno scaffold (21) avente almeno una parte del lume rivestito di almeno uno strato cellulare funzionale ottenibile mediante il metodo di caratterizzazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-8; preferibilmente detto almeno uno strato cellulare funzionale è uno strato di cellule endoteliali funzionali; più preferibilmente è un mono-strato di cellule endoteliali funzionali e continuo.

10. Un metodo per testare *in vitro* l'efficacia e/o tossicità di un prodotto medicale per uso umano o animale, preferibilmente per uso nel distretto cardiovascolare e vascolare periferico, detto metodo comprendente le fasi di:

- preparare un modello *in-vitro* di una struttura vascolare comprendente il costrutto vascolare ingegnerizzato secondo la rivendicazione 9, in cui detto costrutto vascolare ingegnerizzato ha caratteristiche anatomiche e fisiologiche funzionali o, alternativamente, ha caratteristiche anatomiche e fisiologiche disfunzionali atte a simulare un danneggiamento o una deformazione o una degenerazione dovuta a un aneurisma, stenosi, placche sclerotiche, forme tumorali o cardiomiopatie; preferibilmente detta struttura vascolare è scelta tra vasi sanguigni,

condotti sanguigni e valvole del sistema circolatorio centrale o periferico; più preferibilmente detta struttura vascolare è scelta tra arterie, vene, capillari, valvola aortica e mitralica; seguito da

- introdurre all'interno di detto modello *in-vitro* di una struttura vascolare il prodotto medicale da testare; preferibilmente il prodotto medicale è scelto tra valvole, valvole cardiache, stent, graft, cateteri, bende, reti o filtri; seguito da

- consentire la circolazione all'interno di detto modello *in-vitro* di una struttura vascolare comprendente detto prodotto medicale di un campione di sangue intero umano, sangue artificiale o loro derivati al fine di valutare il comportamento e l'interazione di detto prodotto medicale con detto campione di sangue intero umano, sangue artificiale o loro derivati.

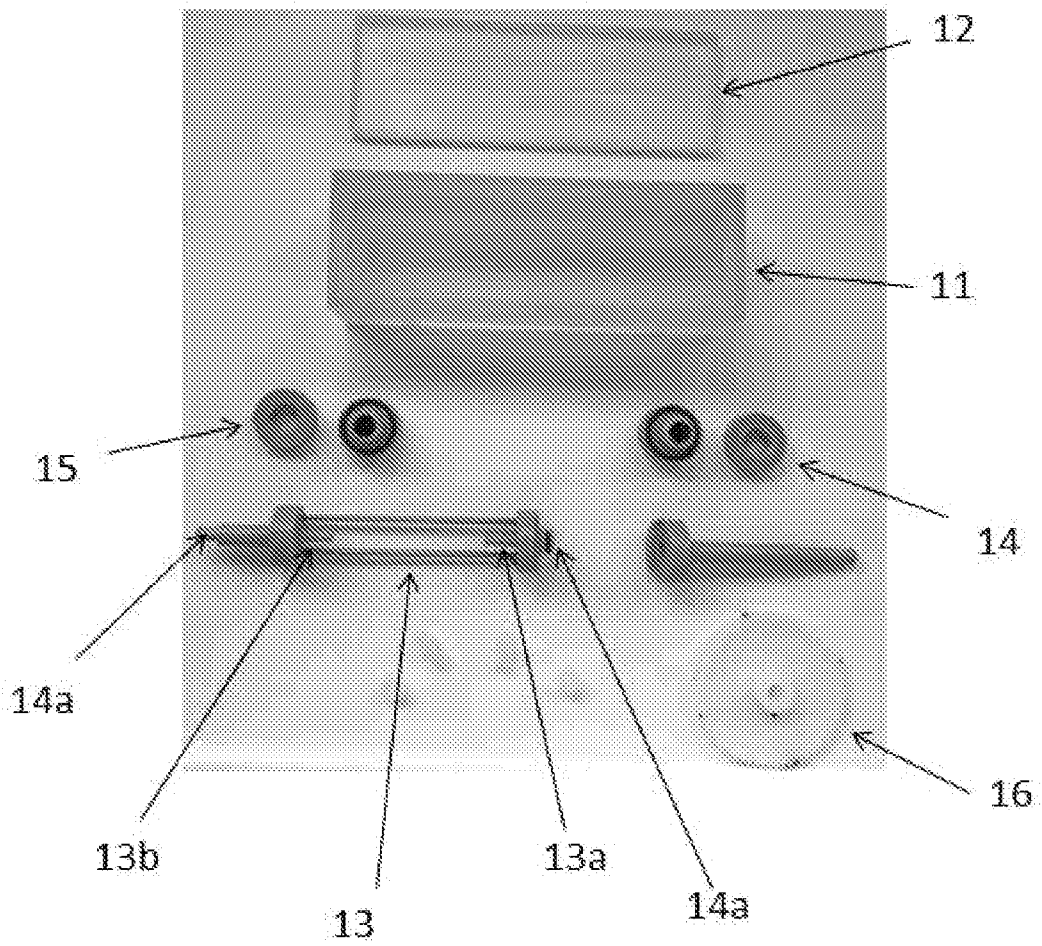
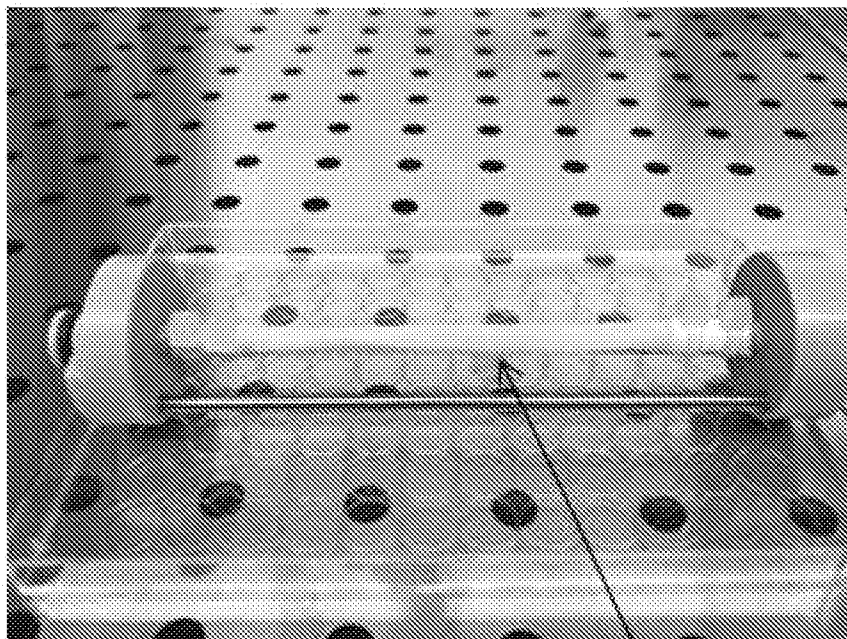


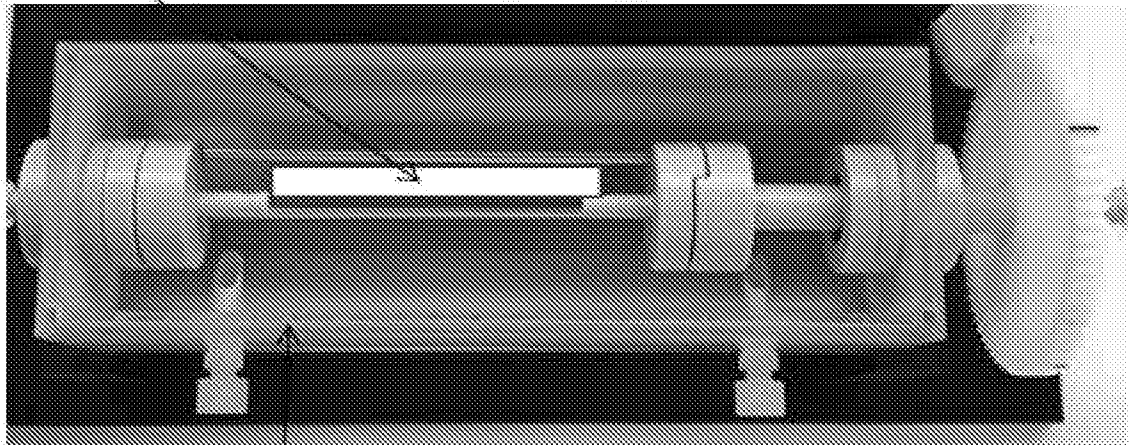
Fig. 1



21

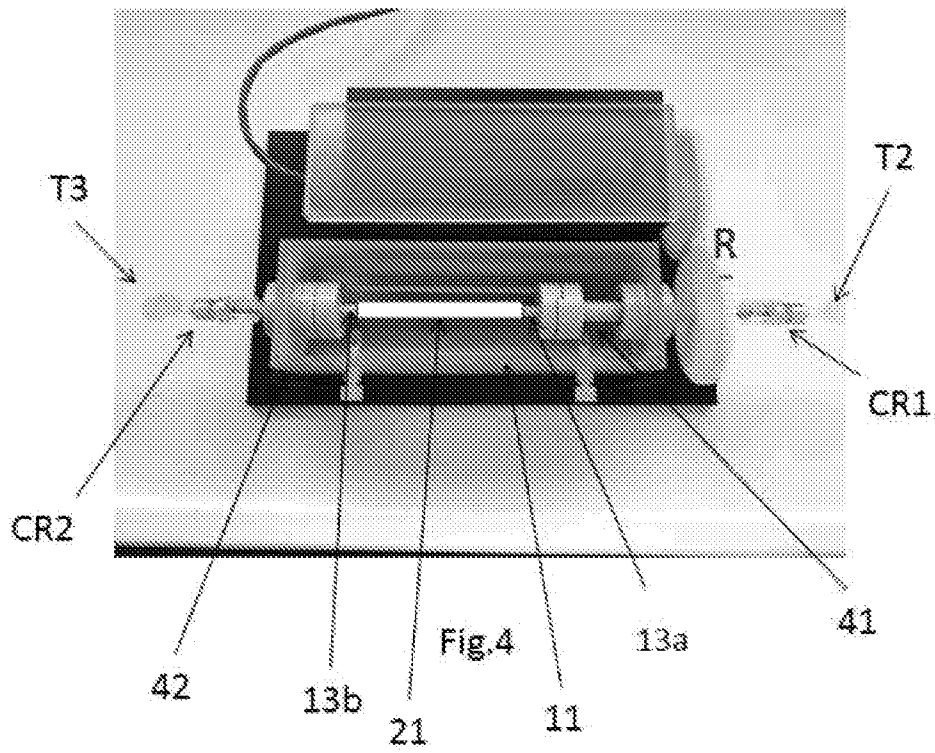
Fig. 2

21

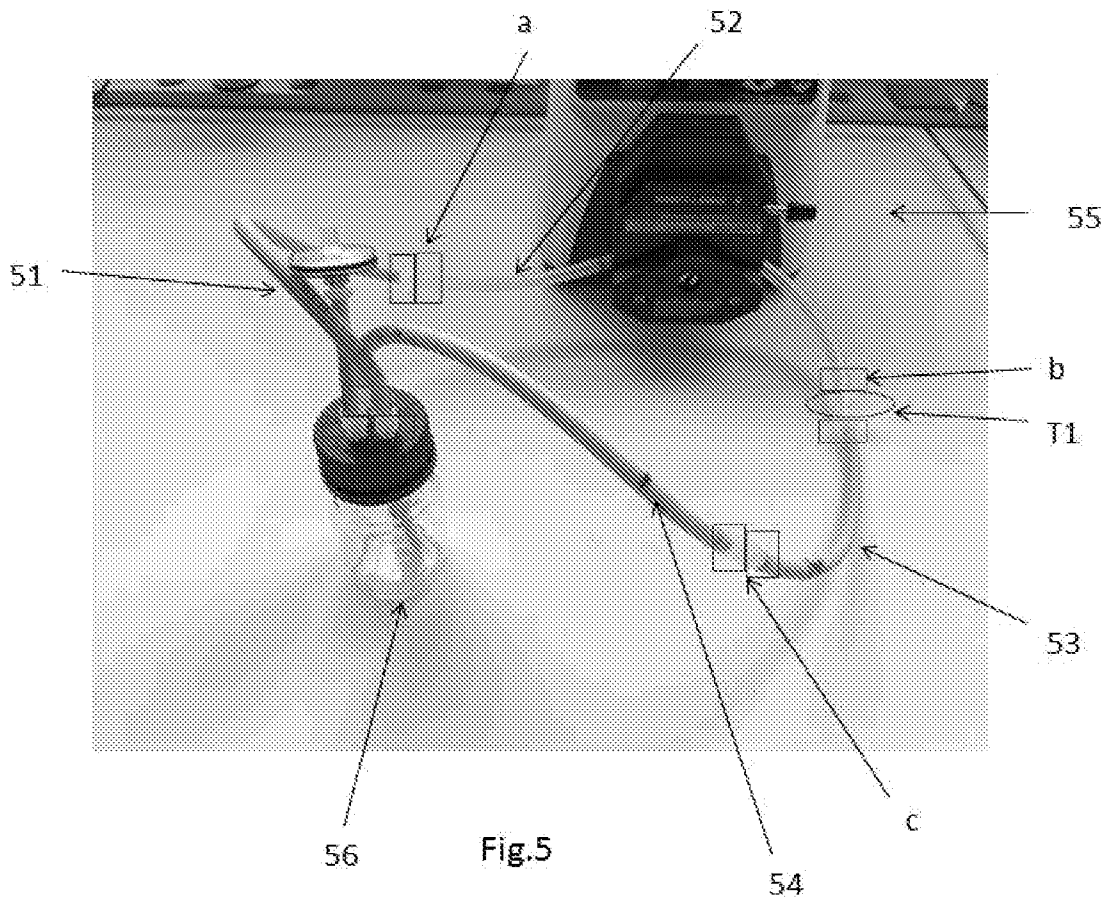


11

Fig. 3



5/32



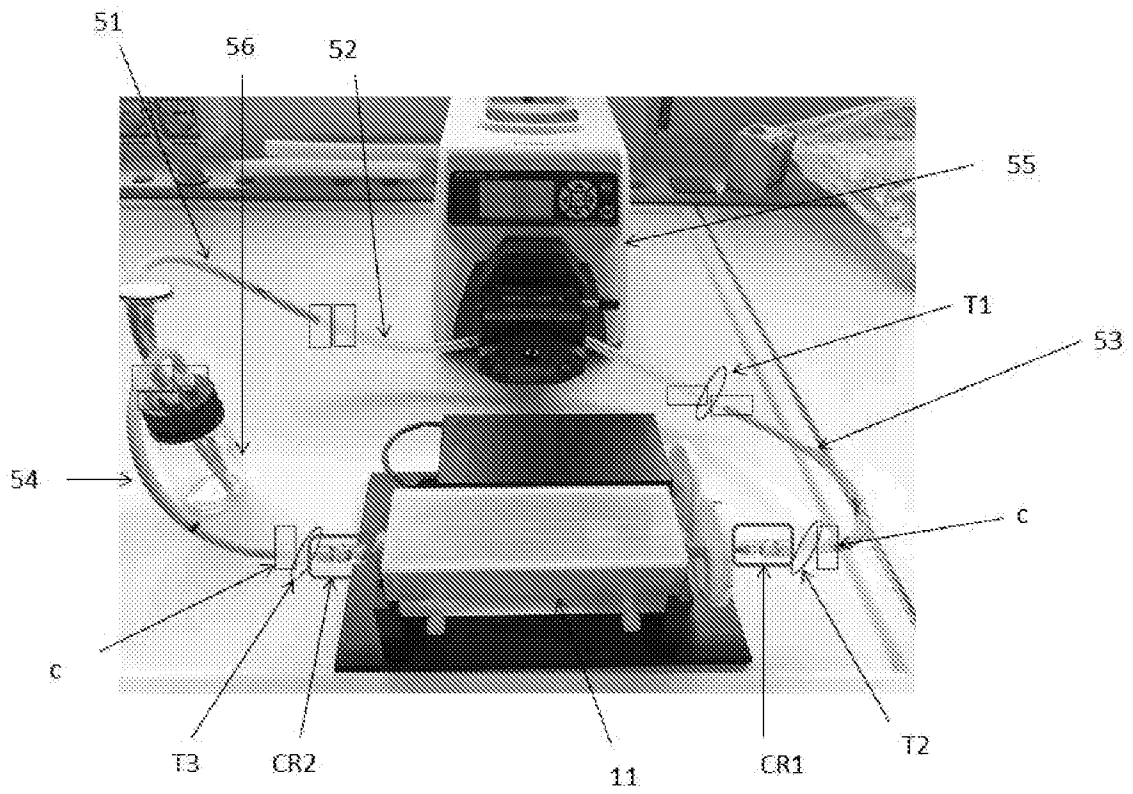


Fig.6

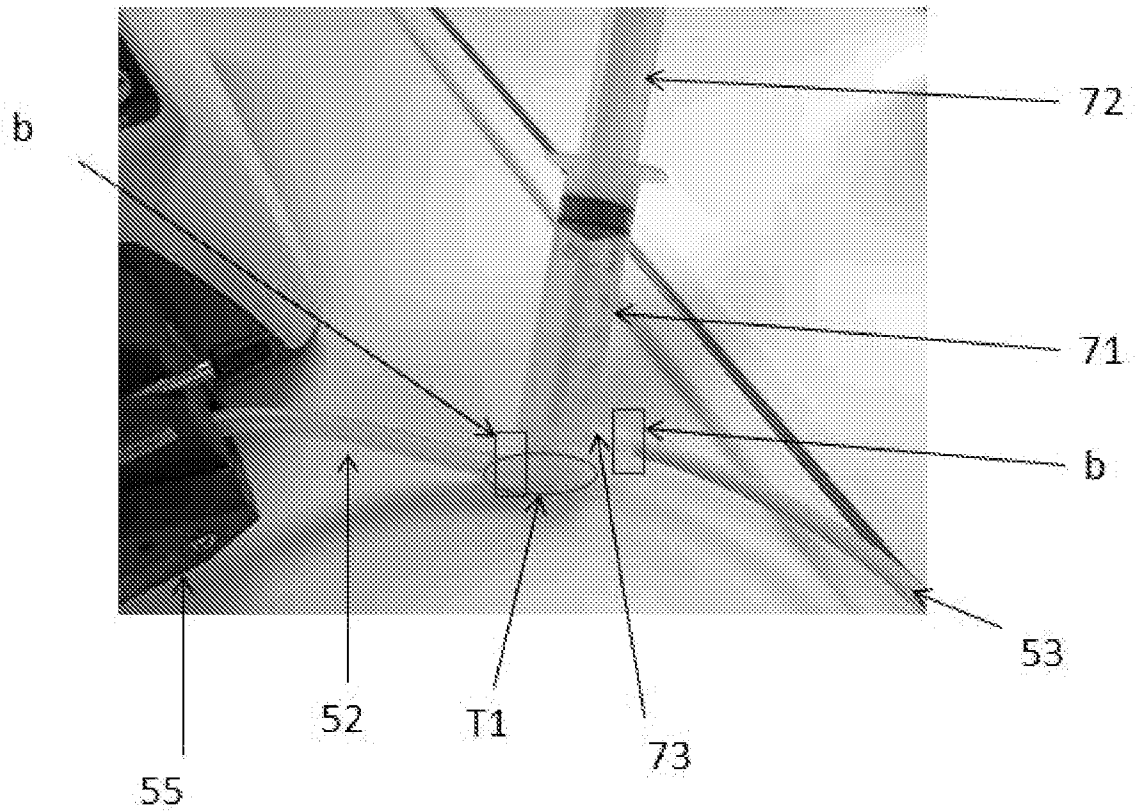


Fig. 7

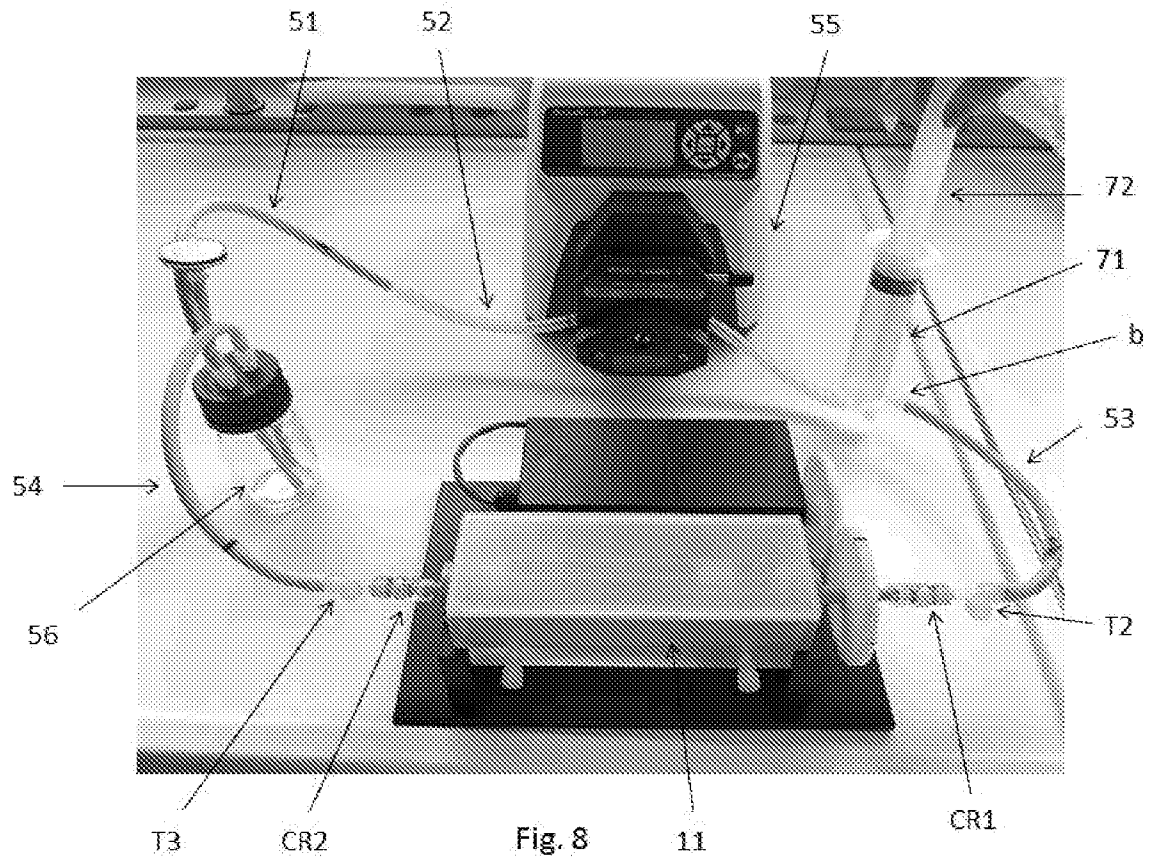


Fig. 8

9/32

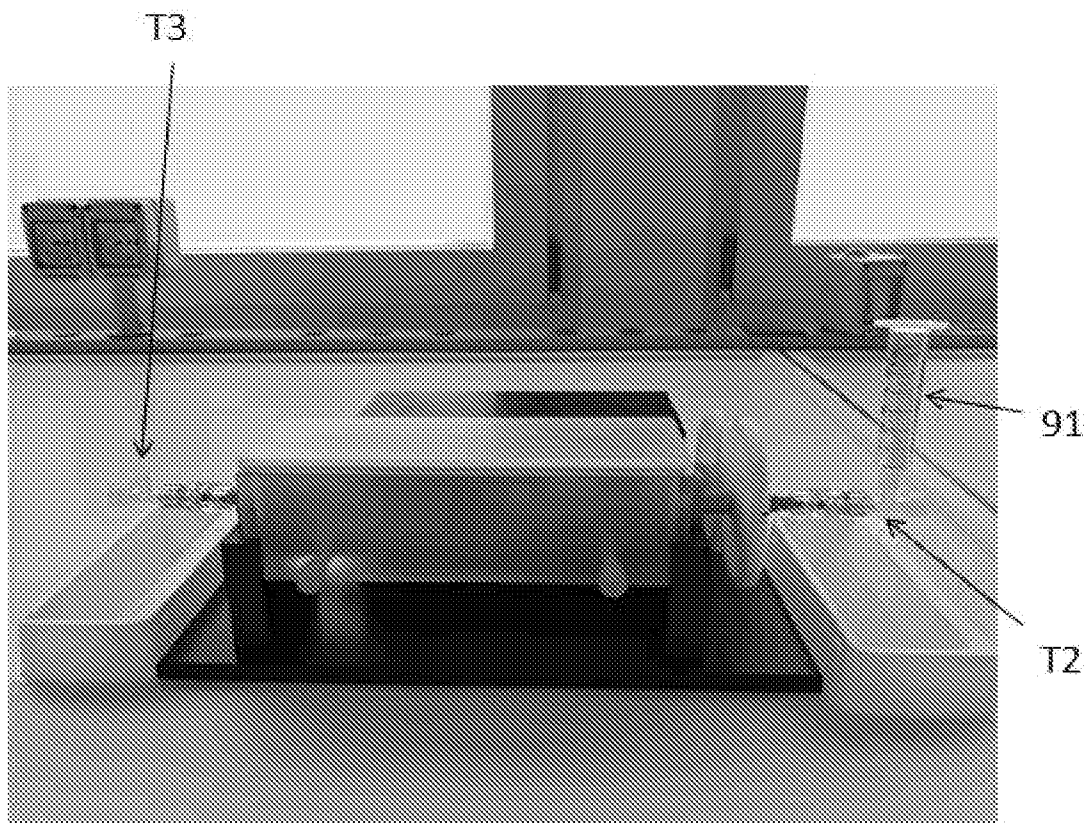


Fig. 9

10/32

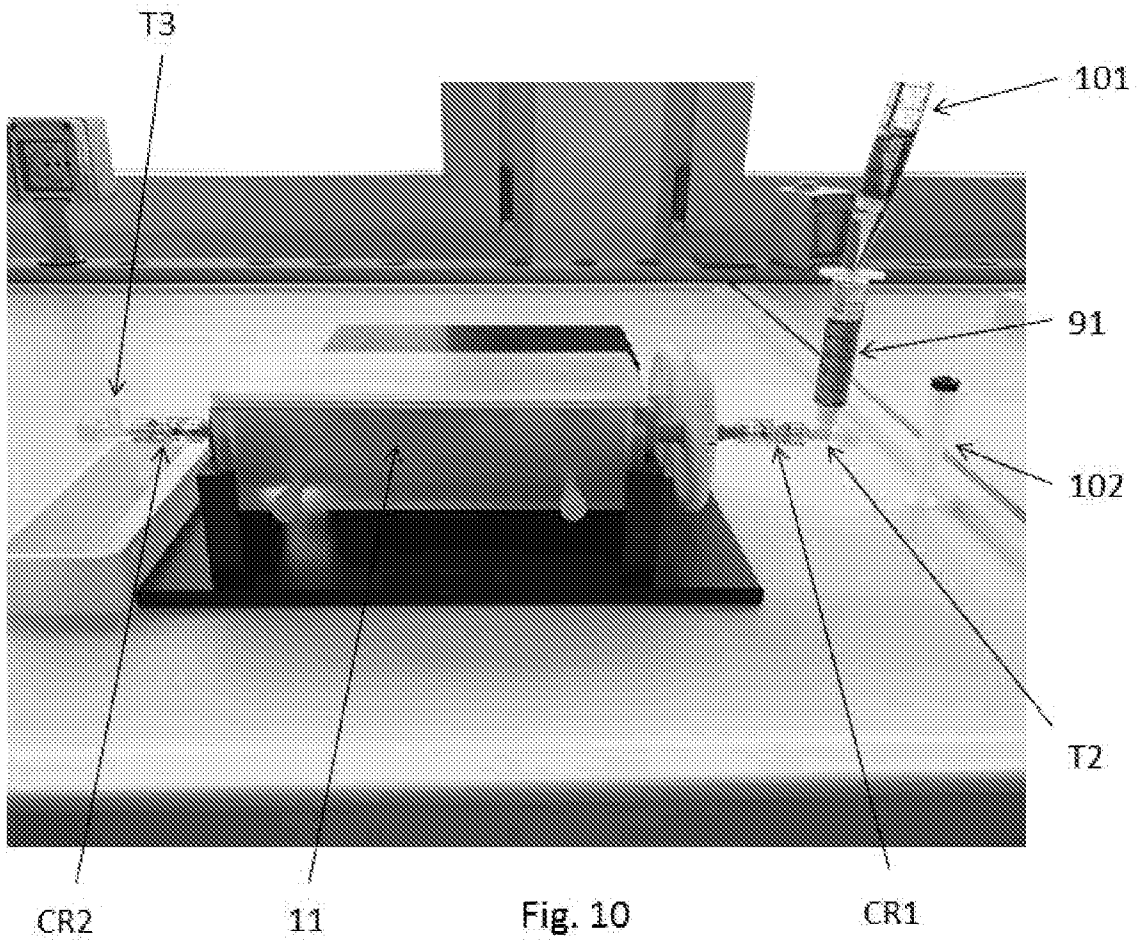


Fig. 10

11/32

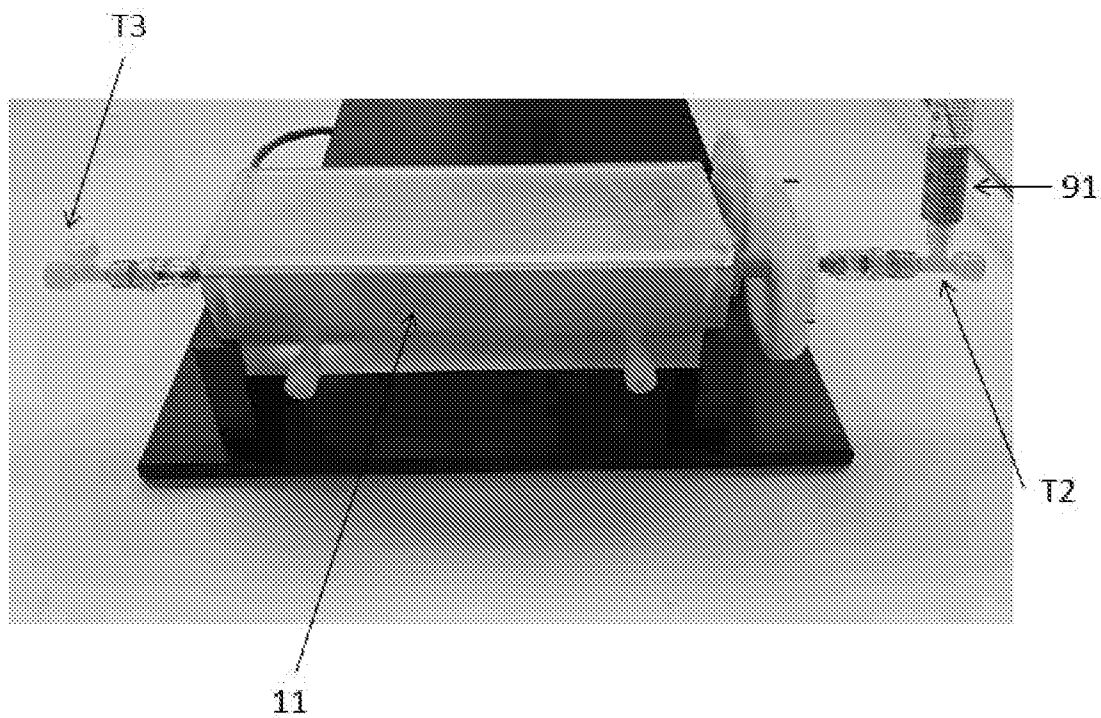


Fig. 11

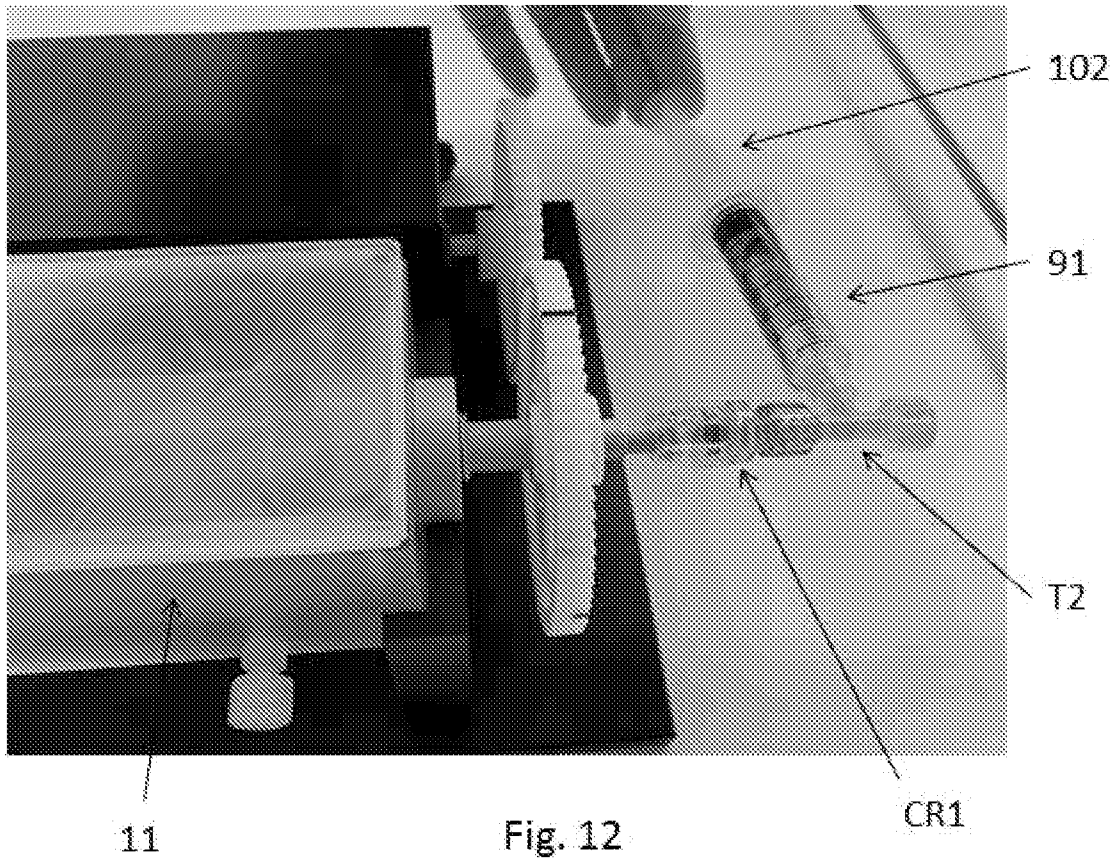


Fig. 12

13/32

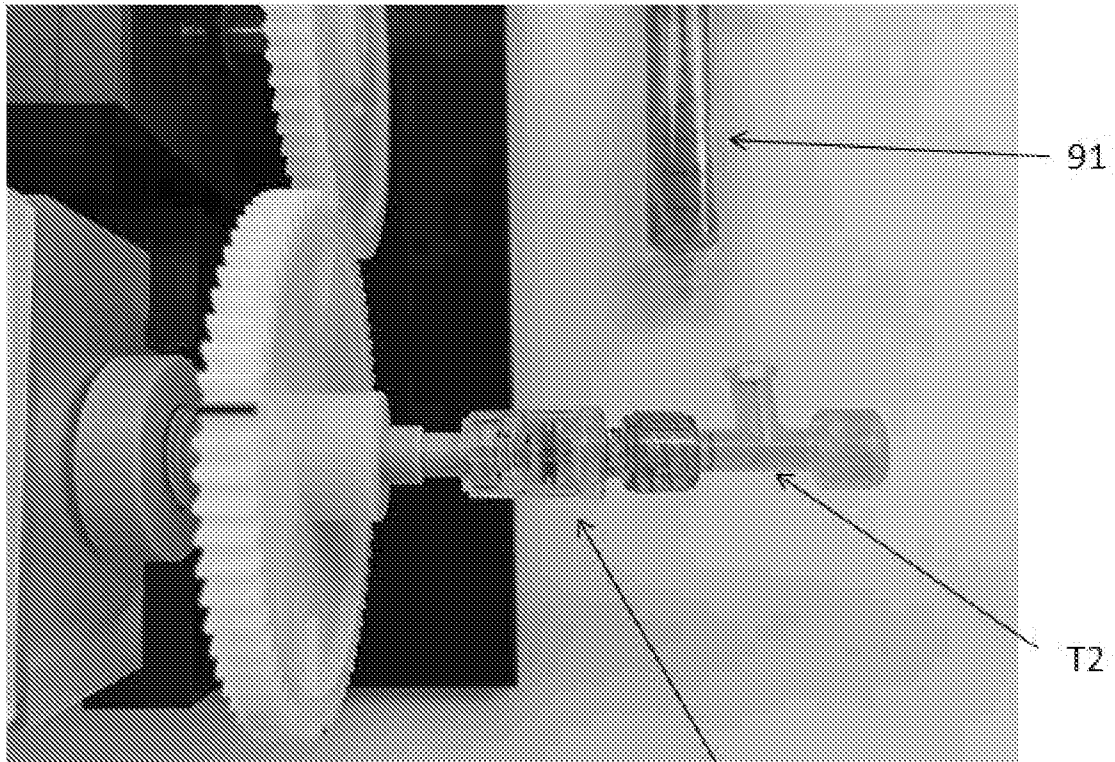


Fig. 13

CR1

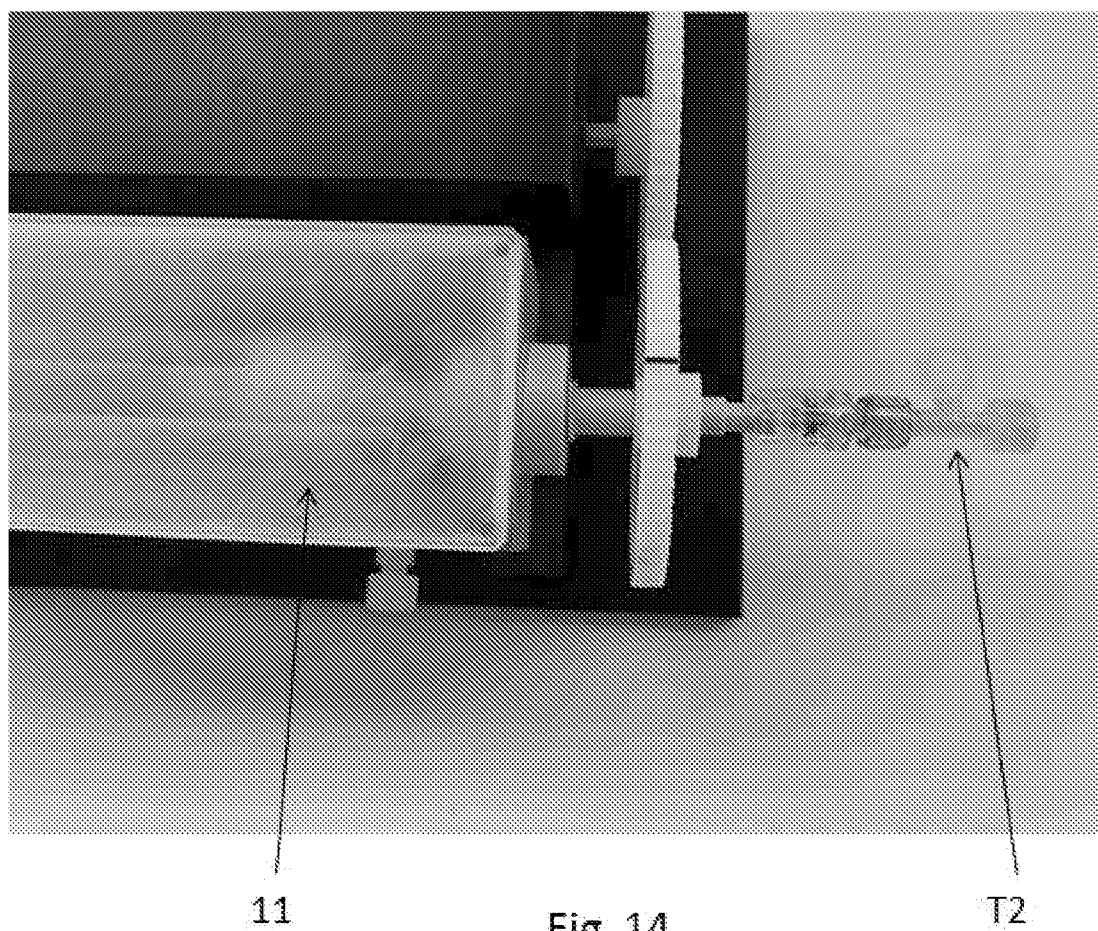


Fig. 14

15/32

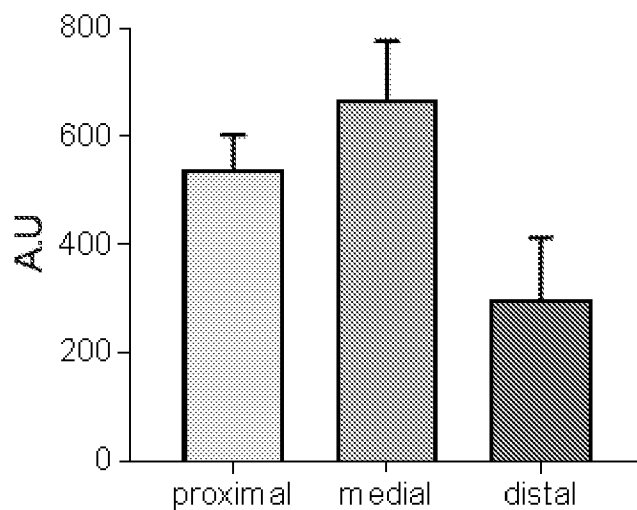


Fig. 15a

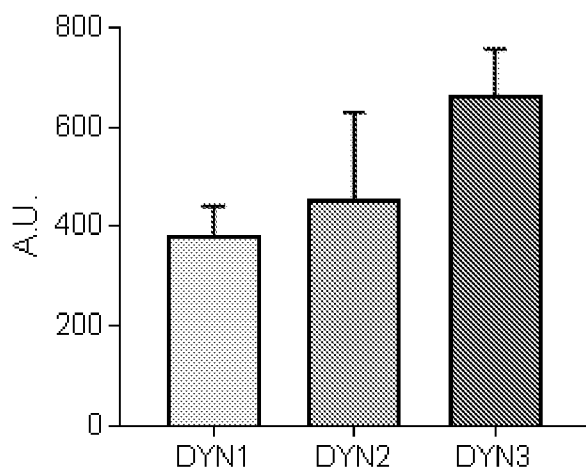


Fig. 15b

16/32

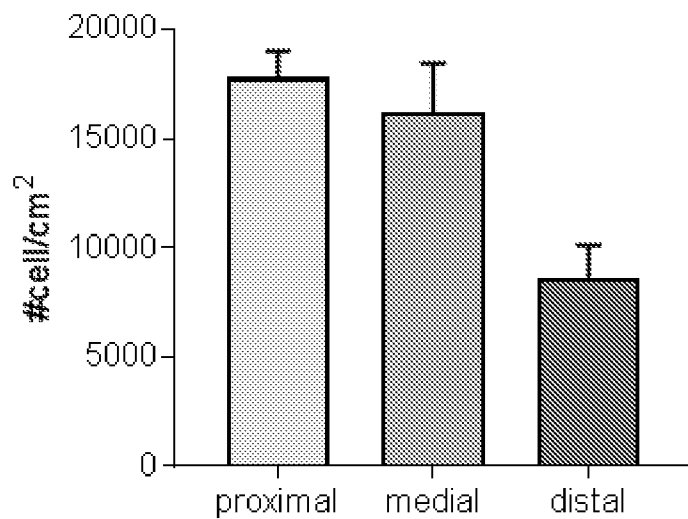


Fig. 15c

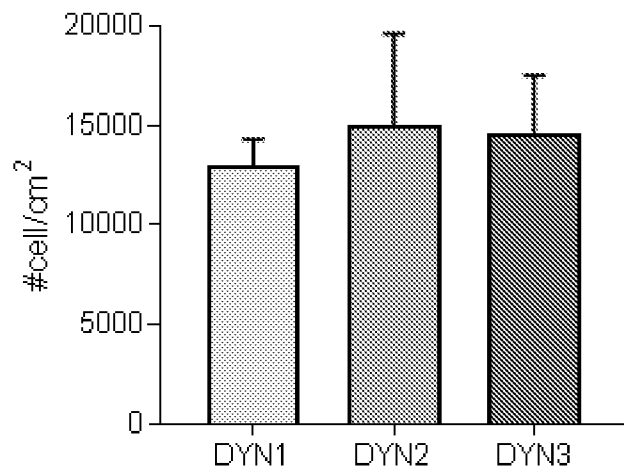


Fig. 15d

17/32

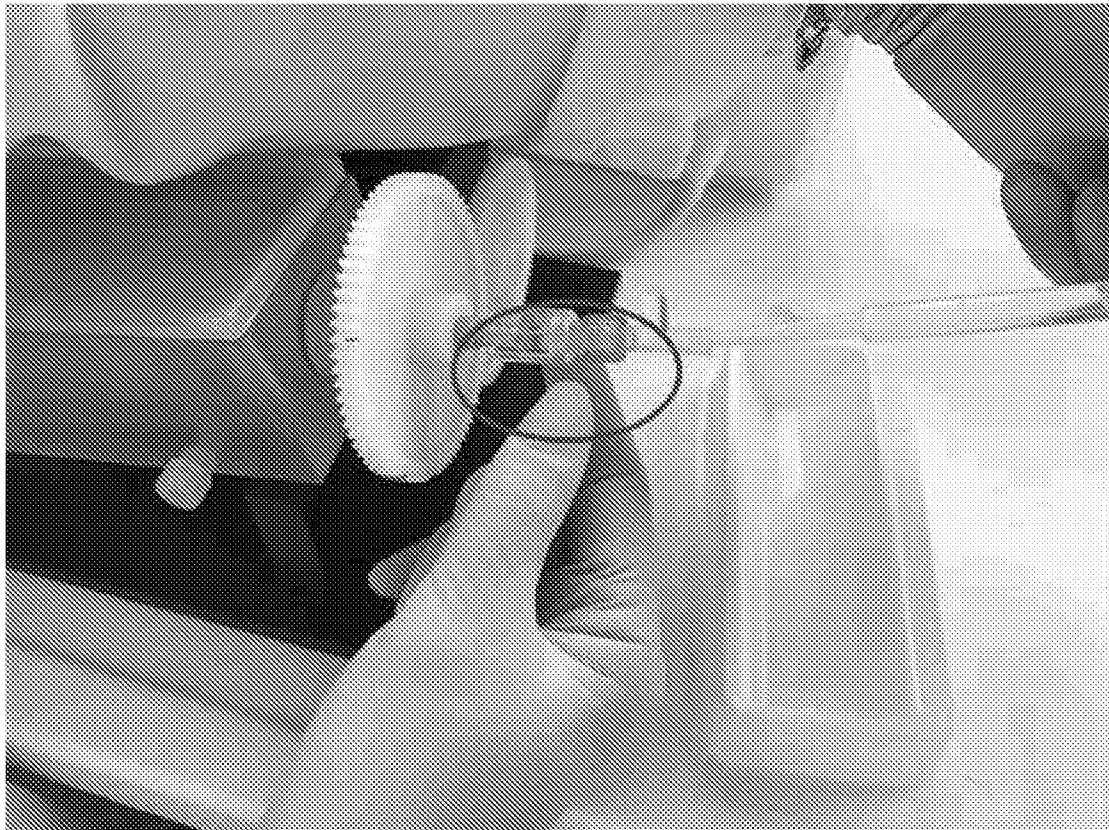


Fig. 16

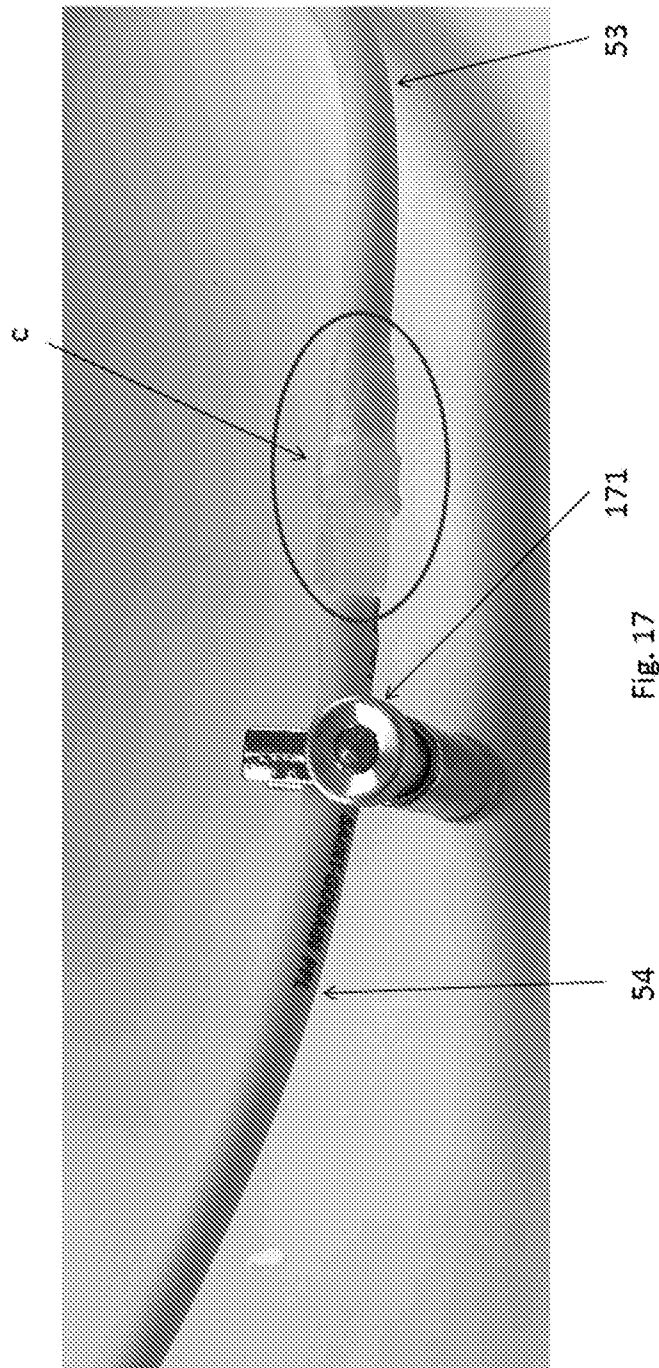
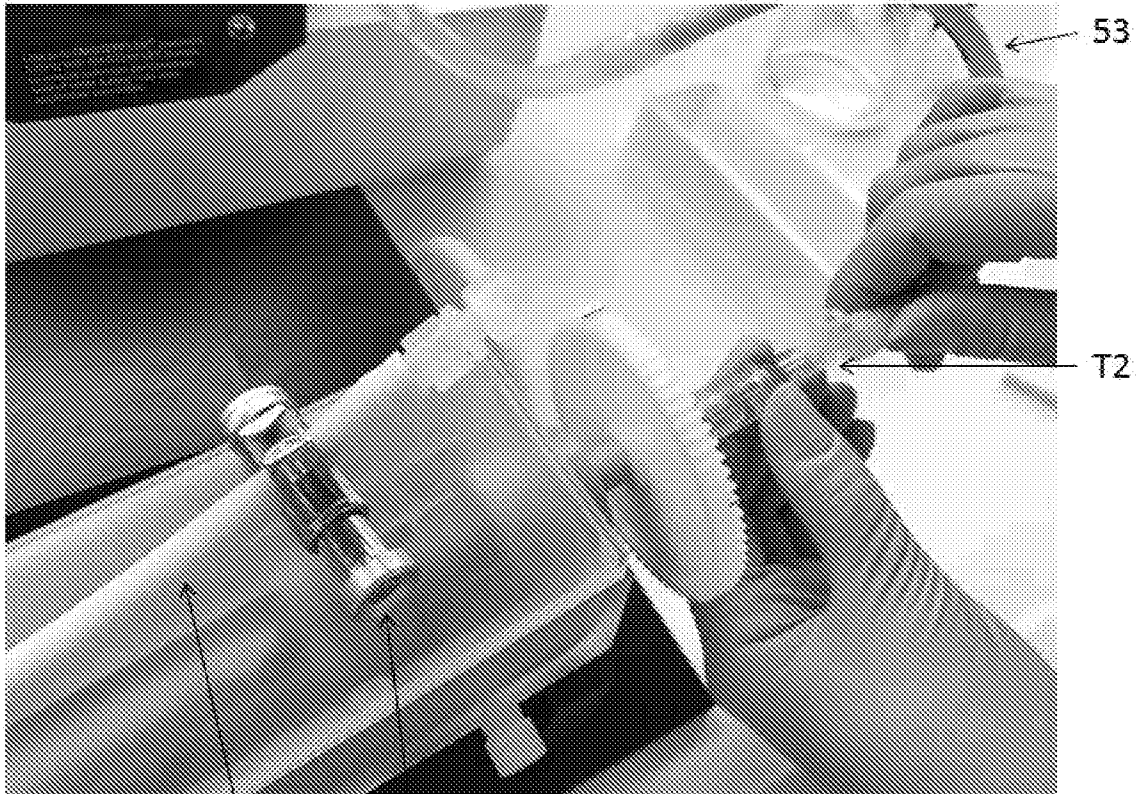


FIG. 17

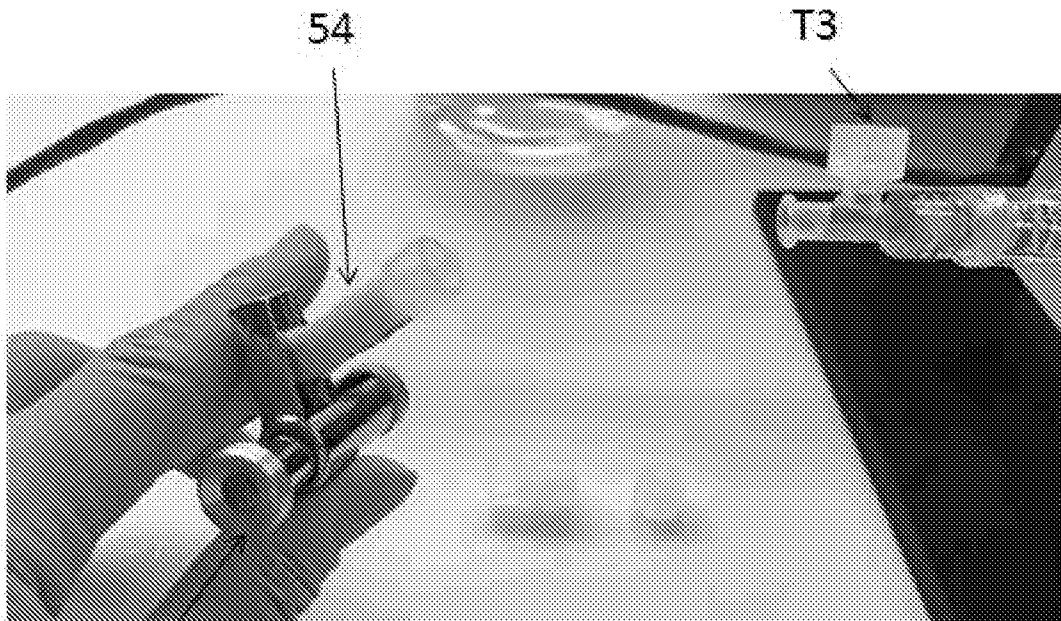
19/32



54

171

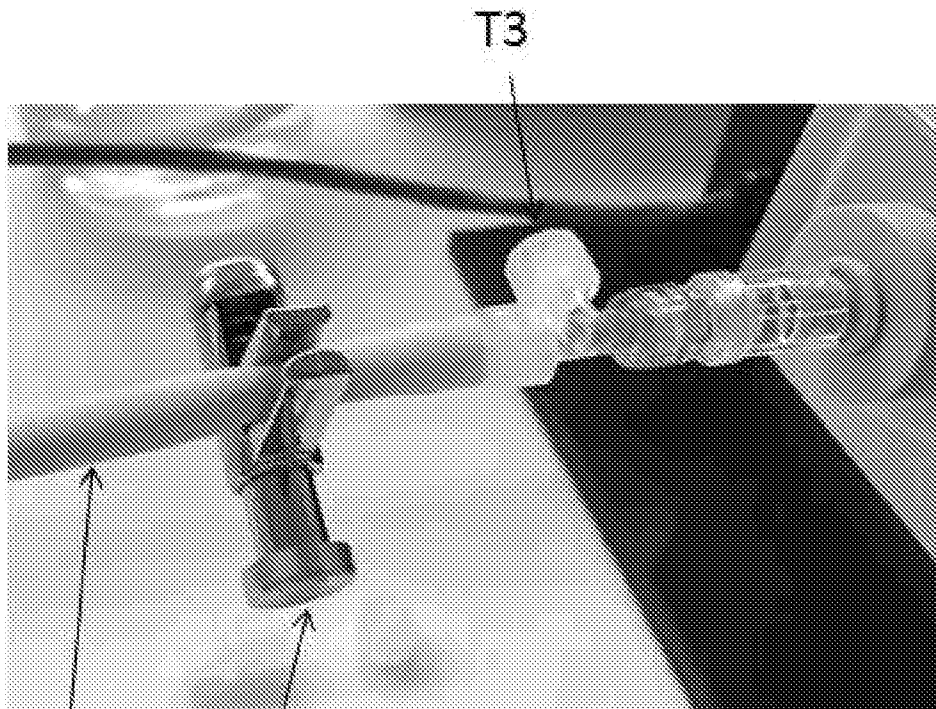
Fig. 18



171

Fig. 19a

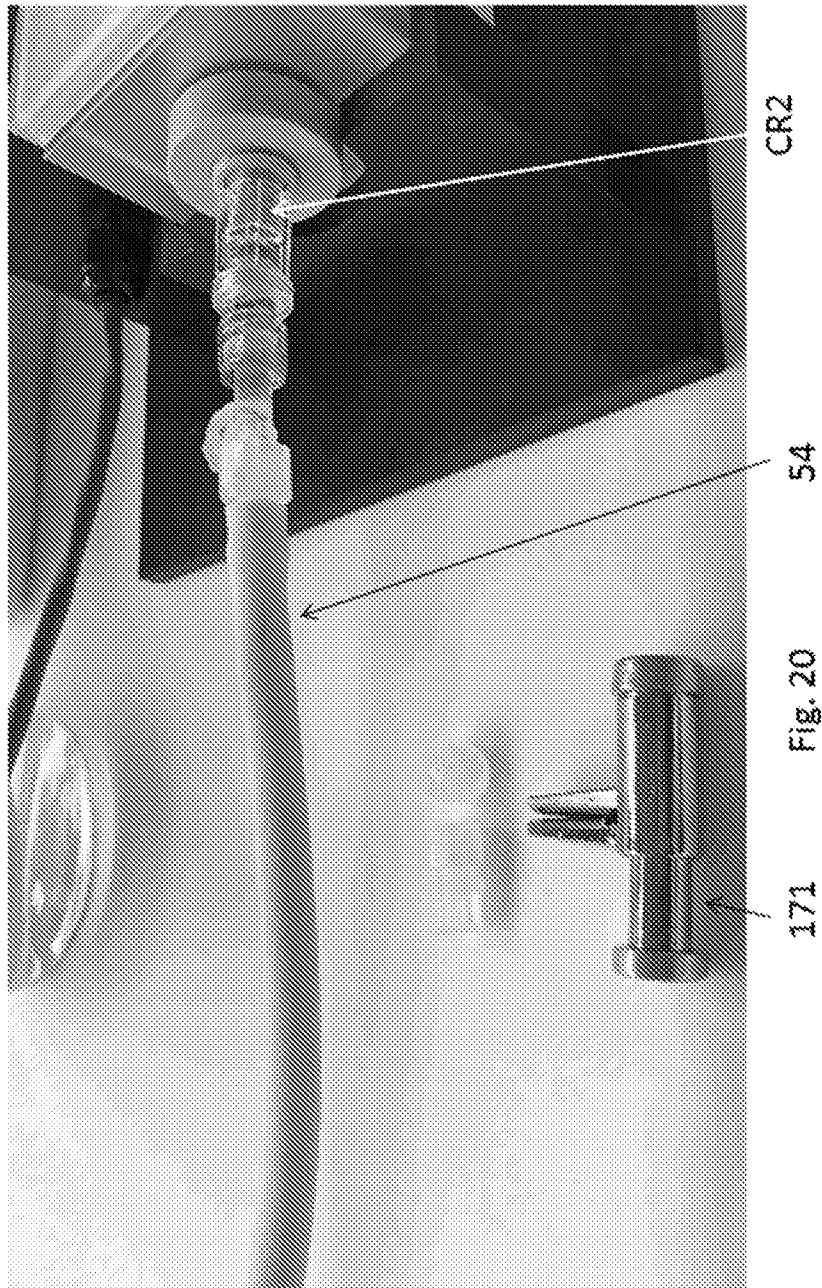
21/32



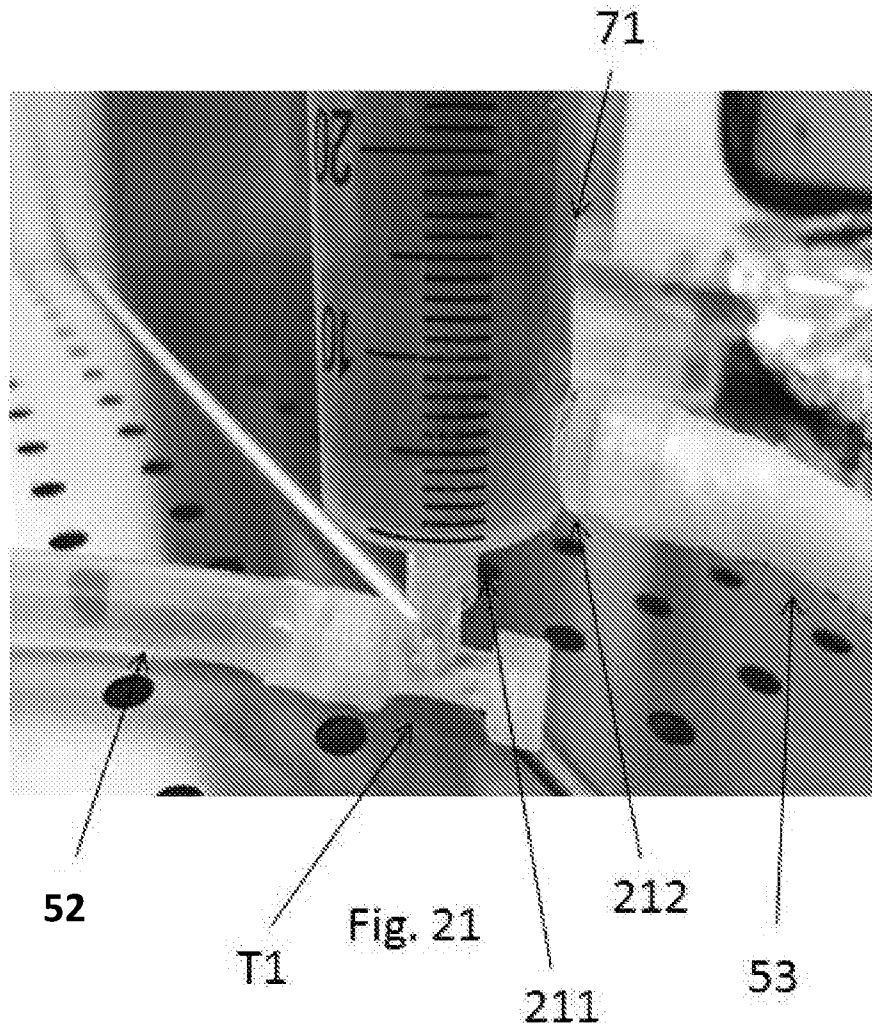
54

171

Fig. 19b



23/32



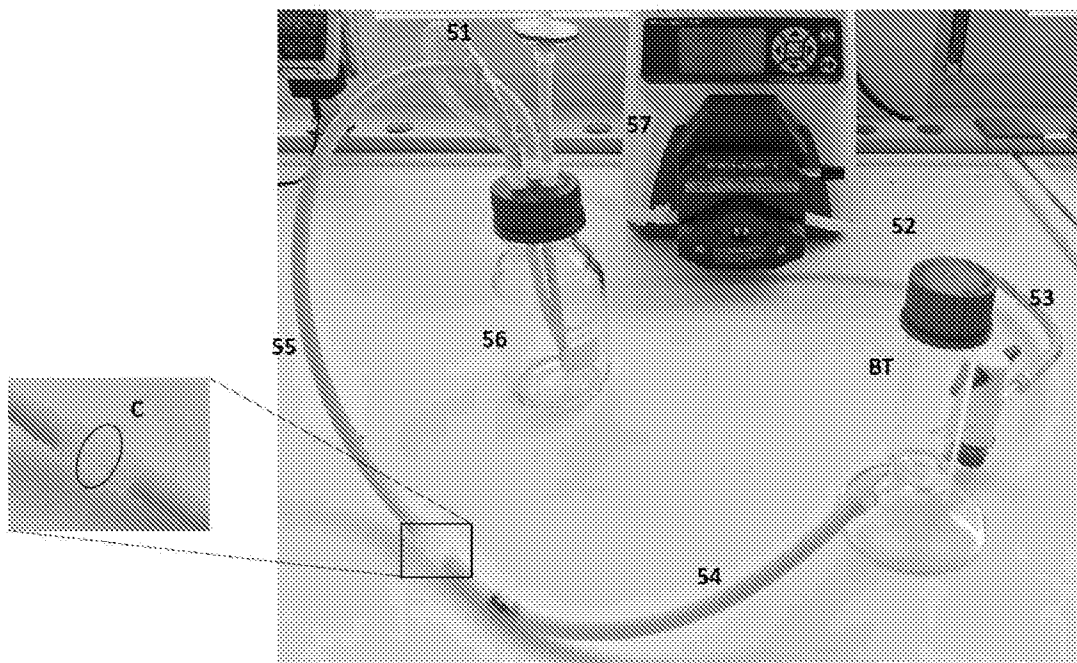


Fig. 22

25/32

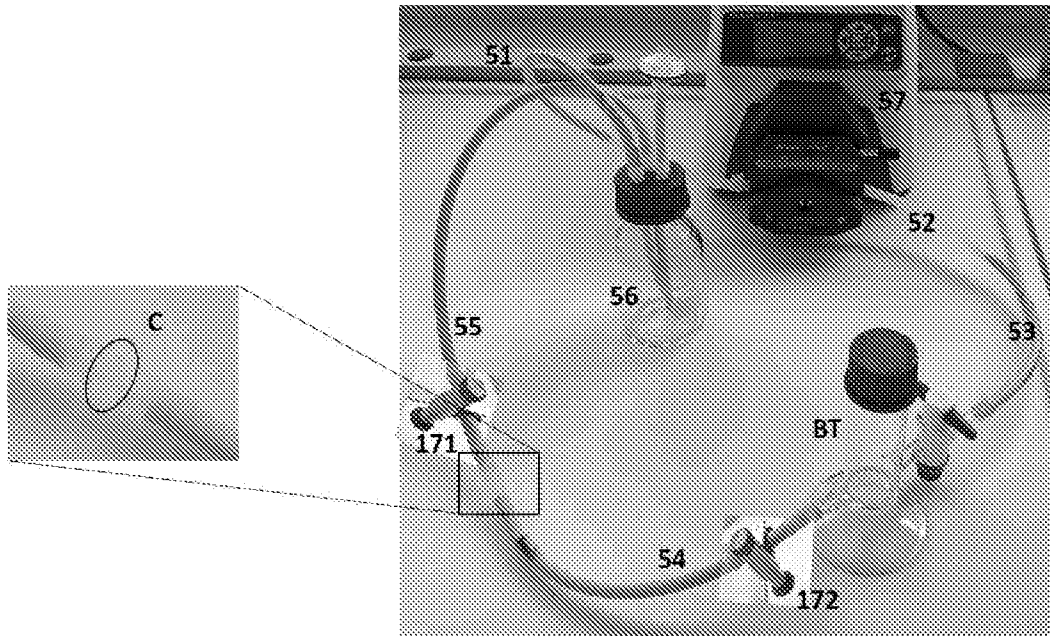


Fig. 23

26/32

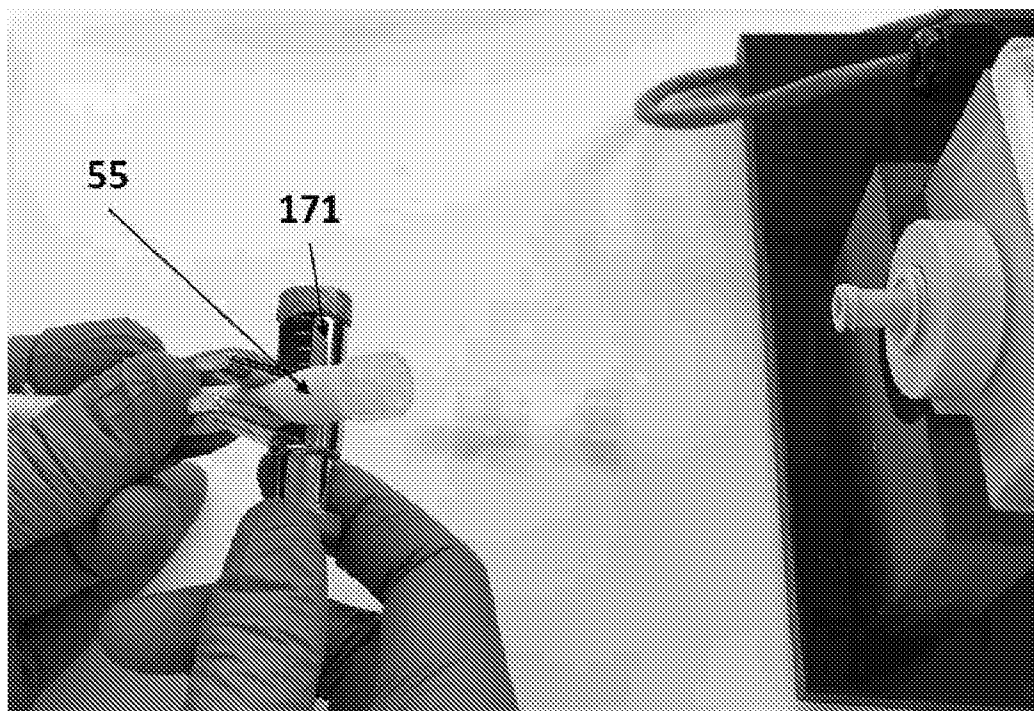


Fig. 24

27/32

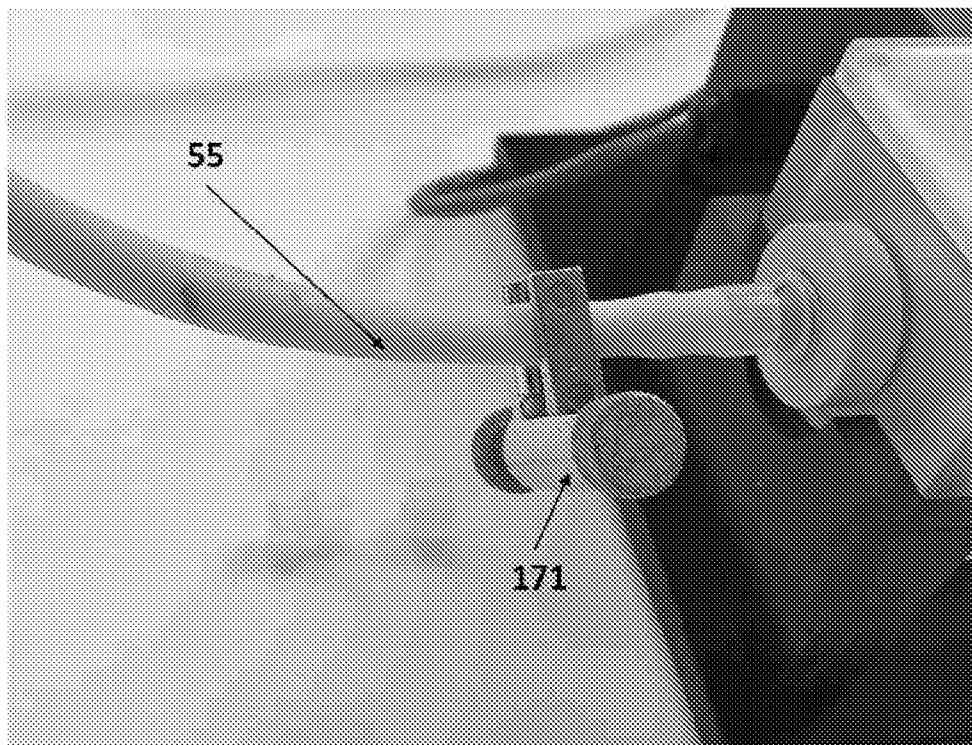


Fig. 25

28/32

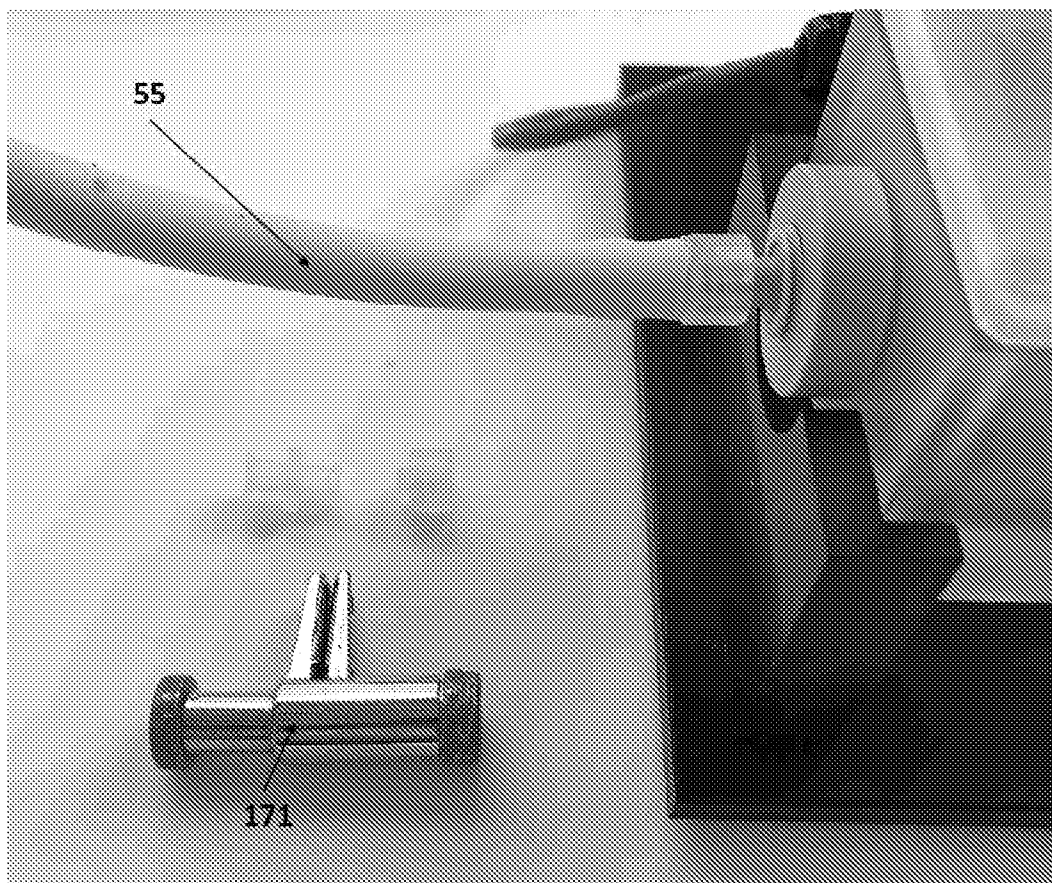


Fig. 26

29/32

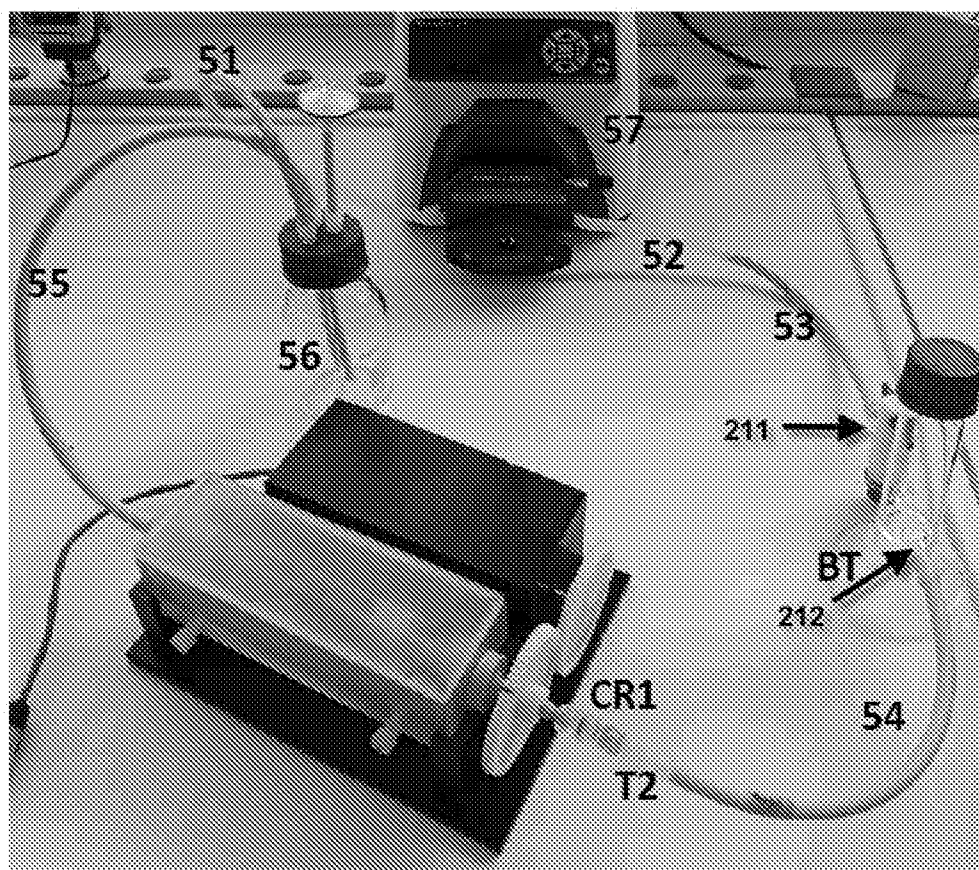


Fig. 27

30/32

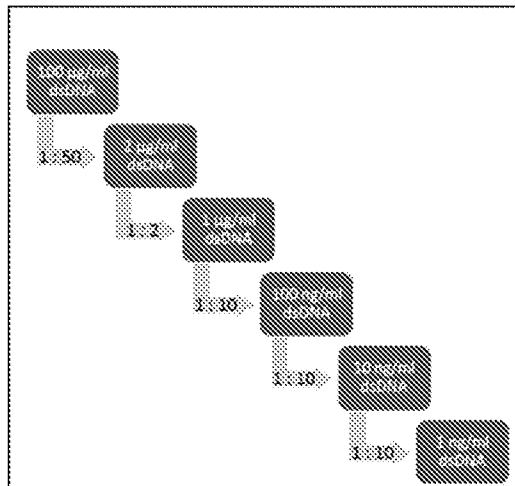


Fig. 28

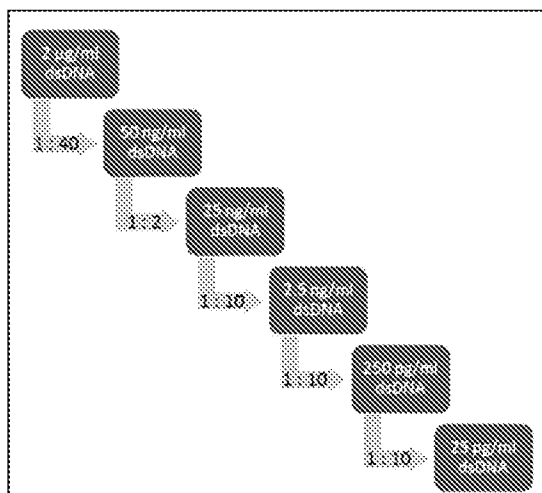


Fig. 29

31/32



Fig. 30

32/32

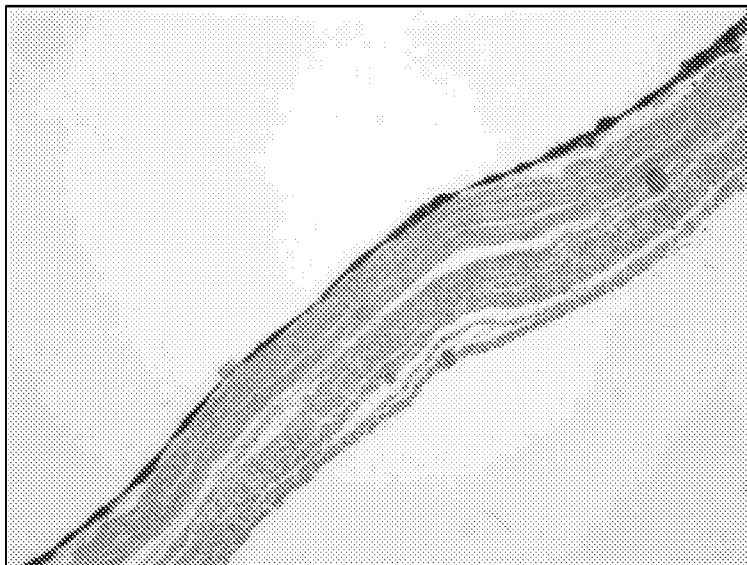


Fig. 31

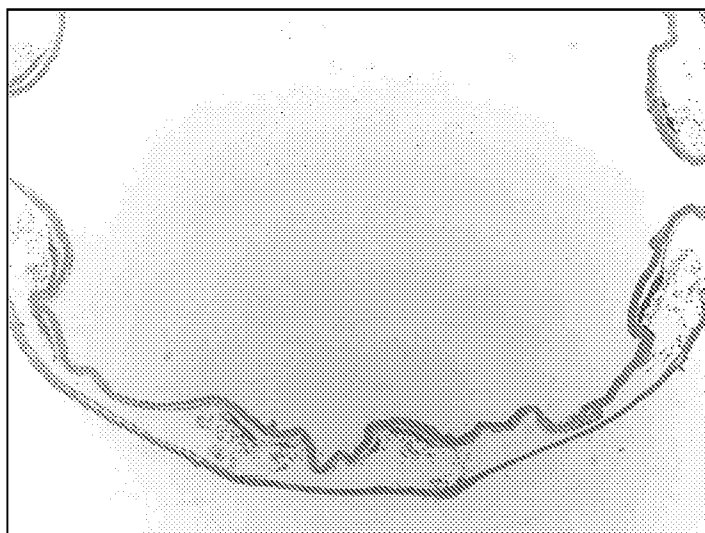


Fig. 32