



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

UIBM

DOMANDA NUMERO	101996900509667
Data Deposito	04/04/1996
Data Pubblicazione	04/10/1997

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

ACIDO IALURONICO QUALE COMPONENTE DEL LIQUIDO DI CONSERVAZIONE DELLA CORNEA



Descrizione di una invenzione industriale dal titolo: "Acido ialuronico quale componente del liquido di conservazione della cornea" di Fidia S.p.A. in Amministrazione Straordinaria, con sede in via Ponte della Fabbrica 3/A, Abano Terme, Italia, nella persona del suo Legale Rappresentante e Commissario Straordinario, Prof. Ing. Riccardo Gallo.

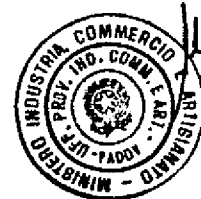
Inventore: Diego Ponzin

Depositatacon n°

PD 96 A 0 0 0 0 8 4

OGGETTO DELL'INVENZIONE

Scopo della presente invenzione è di migliorare e semplificare la conservazione delle cornee destinate alla cheratoplastica perforante, nell'intervallo che trascorre fra la loro rimozione dal donatore ed il trapianto, mediante l'impiego di formulazioni contenenti acido ialuronico quale componente del liquido di conservazione.



CAMPO DELL'INVENZIONE

La cheratoplastica perforante è un intervento ampiamente usato per restituire la vista nell'ambito di numerose malattie corneali. In gravi casi di distrofia corneale, processi infiammatori o degenerativi, la cheratoplastica perforante è l'unica terapia efficace per ottenere il recupero visivo. Una delle principali questioni riguardanti tale terapia è il metodo usato per conservare il tessuto corneale in condizioni vitali dopo la sua rimozione dal donatore.

Handwritten signature

Struttura della cornea

La cornea è un tessuto avascolare con una struttura ben definita (Gipson, I. K.; Edelhauser et al.). Ha uno spessore periferico di 1 mm ed uno spessore centrale di 0.5 mm. La parte esposta all'ambiente esterno è ricoperta da un epitelio stratificato, non cheratinizzato, formato da 3 a 4 strati esterni di cellule squamose piatte, da 1 a 3 strati intermedi di cellule epiteliali e da uno strato singolo di cellule colonnari basali attaccate alla lamina basale ed allo stroma sottostante mediante un complesso adesivo. Durante la conservazione corneale si rischia di perdere l'epitelio ma, se la lamina basale rimane intatta, la riepitelizzazione dopo il trapianto avviene di solito in maniera rapida. Lo stroma è organizzato in tre strati distinti di matrice extracellulare. Iniziando dall'epitelio, questi comprendono un sottile strato di Bowman, uno stroma lamellare intermedio ed una lamina basale (membrana di Descemet) che viene generata dalle cellule endoteliali che ricoprono il lato del tessuto dalla parte dell'umor acqueo. Le altre parti dello stroma vengono prodotte e mantenute dai fibroblasti stromali, cellule piatte comunemente chiamate cheratociti.

A causa della presenza di sali, collagene e proteoglicani, lo stroma è ipertonico rispetto sia alle lacrime che all'umor acqueo. L'acqua è meno concentrata dalla parte epiteliale, probabilmente a causa dell'evaporazione attraverso gli strati epiteliali. Allo stesso modo, il





glucosio è meno concentrato dalla parte epiteliale perchè tale metabolita fluisce dall'umor acqueo per essere in gran parte utilizzato dall'epitelio. Lo stroma contiene proteoglicani (dermatan e cheratan-solfato), il primo più concentrato sul lato epiteliale ed il secondo sul lato endoteliale. L'endotelio corneale è cubico, monostratificato e, visto dalla camera anteriore, forma un mosaico esagonale sulla membrana di Descemet. Le cellule esagonali sono legate da giunzioni strette che, tuttavia, non formano una saldatura completa tra di loro ma sono concentrate sulla porzione apicale della membrana della cellula. L'integrità della giunzione dipende dalla presenza di Ca^{2+} nel mezzo circostante. Tale struttura permette all'umor acqueo ed ai suoi soluti di accedere allo spazio intercellulare. In condizioni normali, l'afflusso di liquido non porta al rigonfiamento della cornea perchè un volume equivalente di liquido viene attivamente rimosso dal complesso sistema della pompa endoteliale. La $Na^{+}-K^{+}$ ATPasi rappresenta una parte essenziale di tale sistema di pompa che richiede, perciò, che l'ATP sia prodotto dall'attività metabolica delle cellule endoteliali.

Per valutare tutti gli aspetti della funzione delle cellule endoteliali è interessante osservare che tali cellule hanno, dalla parte dell'umor acqueo, un recettore, l'ICAM-1, ("intercellular adhesion molecule-1"-molecola di adesione intercellulare-1), membro della famiglia delle immunoglobuline, che serve da corecettore per l'integrina LFA-1 (α



Passo

- 4 -

L, β 2), localizzata sulla superficie del leucocita. ICAM-1 potrebbe anche funzionare come recettore per l'acido ialuronico (McCourt, P. A. G. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 30081-30084). Questo indica che le cellule endoteliali interagiscono con i leucociti quando questi raggiungono l'umor acqueo. Potrebbe indicare, inoltre, che in condizioni normali ed in assenza di leucociti, l'acido ialuronico si associa con tale recettore per mantenere l'integrità dello strato endoteliale.

Rigonfiamento della cornea

Quando l'endotelio perde la sua funzione di pompa, l'ipertonicità dello stroma causa il rigonfiamento del tessuto corneale. Tale rigonfiamento porta ad un aumento dello spessore corneale, ad una diminuzione della trasparenza del tessuto e ad un rilascio di proteoglicani dallo stroma verso il mezzo circostante. La perdita della funzione endoteliale è il risultato di eventi patologici (ad esempio, distrofie, degenerazione, glaucoma). La vecchiaia può favorire lo scompenso endoteliale, visto che il numero di cellule endoteliali diminuisce con l'età (circa il 50% dalla nascita alla vecchiaia). Poichè le cellule endoteliali hanno una capacità rigenerativa limitata, danni subiti dall'endotelio possono essere compensati soltanto con un ingrandimento delle cellule residue, che diventano più sottili. Il danno endoteliale rappresenta anche il rischio maggiore nella conservazione della cornea per trapianto.



10/11/77
F. M. M.

Tale evento porta al rigonfiamento corneale con perdita di trasparenza e morte progressiva delle cellule endoteliali. La preservazione di uno strato endoteliale intatto, quindi, è il presupposto essenziale che sta alla base dei metodi di conservazione delle cornee prima della cheratoplastica perforante.

Conservazione delle cornee

Bulbi oculari interi prelevati dai donatori possono essere conservati in una camera umida a 4°C, ma devono essere utilizzati entro 24 ore. La conservazione della cornea in stato di congelamento è stata sfruttata con successo (Kaufman, H. E. e Capella J. A. (1968) J. Cryosurg. 1, 125-129). Prima del congelamento, la cornea viene trattata con concentrazioni sempre maggiori di DMSO e saccarosio per prevenire la formazione di ghiaccio intracellulare. E' molto difficile maneggiare e trasportare cornee congelate assicurando una temperatura costantemente bassa e questa difficoltà non consente la diffusione di tale tecnica. Alternativamente, le cornee possono essere conservate a 37°C in un mezzo di coltura per organi (Doughman, D. J. et al., (1976) Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol. 81, 778-793). Dato che i mezzi di coltura sono addizionati di siero per ottimizzare la conservazione cellulare, tale metodo comporta lo svantaggio di esporre l'occhio ricevente ad una quantità residua di siero trasportato dalla cornea al momento del trapianto. Il siero animale può provocare una risposta immune,



Fiducia

mentre quello umano può trasmettere malattie virali. Attualmente, il metodo più conveniente per la conservazione corneale sembra essere quello a breve termine in un mezzo privo di siero a 4°C. A questa temperatura l'attività metabolica delle cellule endoteliali è minima, e la funzione di pompa viene persa. E' possibile prevenire il conseguente rigonfiamento corneale con l'aggiunta al mezzo di conservazione di composti che trattengono acqua. Fra questi, uno dei più usati è un composto deturgescente, il destrano, utilizzato da solo (McKarey, B. E. e Kaufman, H. E. (1974) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 13, 165) o in associazione con il glucosamminoglicano condroitin-solfato (Kaufman H. E. et al. (1991) Arch. Ophthalmol. 109, 864-868). Tuttavia, il condroitin-solfato è un composto eterogeneo a causa della distribuzione di tipo variato delle molecole di solfato che vi sono nel polimero (Scott, 1995). Ne risulta che le formulazioni contenenti il condroitin-solfato, da usare per la conservazione corneale, possono variare da un lotto all'altro. Inoltre, a causa delle molecole di solfato, il condroitin-solfato possiede una forte carica negativa. E' stato recentemente suggerito che una tale, forte carica negativa possa pregiudicare la conservazione corneale perchè le forti cariche negative diminuiscono le capacità adesive dell'endotelio corneale (Chen et al. 1996). Inoltre, è stato riportato che il condroitin-solfato è in grado di penetrare la cornea e di favorirne il rigonfiamento, particolarmente



Ram

quando il tessuto viene portato da 4°C a temperatura ambiente, prima del trapianto (Kaufman et al. 1991). Nel tentativo di ridurre il rigonfiamento corneale indotto dal condroitin-solfato, sono state formulate delle composizioni per la conservazione corneale contenenti agenti deturgescenti, come il destrano, in combinazione con il condroitin-solfato (EP 0517972). Tuttavia si è visto che il destrano può penetrare lo stroma durante il periodo di conservazione ed aumentare la pressione da rigonfiamento quando il tessuto viene riscaldato. Inoltre, è stato dimostrato che il destrano può essere tossico per la cornea, inducendone la senescenza e la degenerazione (Chen et al. 1996).

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Oggetto della presente invenzione è la preparazione e l'impiego di una formulazione adatta alla conservazione di cornee vitali a basse temperature, fra 2-8°C. Tale invenzione si basa sui seguenti presupposti, che si conformano con le considerazioni sulla struttura e sulla funzione corneale discusse precedentemente:



- (i) Durante la conservazione delle cornee a basse temperature, l'attività metabolica delle cellule endoteliali viene bloccata. In questo modo i fattori nutritivi e di crescita (siero o altri) non sono necessari e la funzione di pompa non viene svolta e non necessita di supporto;
- (ii) Una soluzione fisiologica equilibrata con un composto capace di

Handwritten signature

ritenere l'acqua dovrebbe essere sufficiente per mantenere l'integrità corneale. Se è sufficiente un unico composto a ritenzione d'acqua, altri composti, come il destrano, non sono più necessari;

(iii) Un film protettivo sopra le cellule endoteliali dovrebbe essere necessario per proteggerle dal danno durante la conservazione.

Un ligando naturale capace di interagire con il corecettore ICAM-1 sembra adatto allo scopo.

Come specificato qui di seguito, abbiamo identificato l'acido ialuronico come il composto adatto a soddisfare i requisiti necessari per la conservazione ottimale della cornea a basse temperature.

L'acido ialuronico appartiene al gruppo di glicosamminoglicani che comprende anche composti contenenti gruppi solfato (condroitine, cheratani ed eparani). Come conseguenza della distribuzione variabile dei residui solfati, questo gruppo di glicosamminoglicani è un insieme eterogeneo di diverse molecole. Al contrario, l'acido ialuronico contiene soltanto l'unità disaccaride N-acetilglucosammina e glucuronato. L'acido ialuronico è, pertanto, un composto omogeneo con una struttura primaria costituita da catene lineari contenenti centinaia di unità disaccaridiche e centinaia di anioni fissati a ciascuna catena (i gruppi carbossilici). Recentemente, è stata identificata una struttura secondaria ordinata nell'acido ialuronico (Scott, J. E. (1995) Eur. J. Rheumatol. Inflamm. 15, 3-8).



RECEIVED
Fuso

Questa struttura viene mantenuta da numerosi legami idrogeno fra le unità di zucchero ed è costituita da una elica a "due pieghe" provocata da una torsione di 180° fra le unità disaccaridiche. La struttura secondaria produce aree idrofobiche di circa 8 unità CH nelle catene di acido ialuronico (la lunghezza di un acido grasso a catena corta), che sono in grado di associarsi con i fosfolipidi di membrana o con altri lipidi. Infatti, l'effetto benefico dell'acido ialuronico in articolazioni infiammate potrebbe essere dovuto alla sua associazione con citochine infiammatorie simili ai lipidi, come il fattore di attivazione piastrinica. A concentrazioni diluite di acido ialuronico in mezzo acquoso ($1 \mu\text{g/ml}$ o oltre) si genera una struttura terziaria (Scott, J. E. et al. (1991) *Biochem. J.* 274, 699-705). Questa è un reticolo a forma di favo, formato dall'aggregazione delle catene di acido ialuronico che stabiliscono fra di loro un contatto dinamico. Il reticolo trattiene l'acqua ed i soluti, inibendo in questo modo la loro interazione con l'ambiente esterno. Le cellule che hanno recettori per l'acido ialuronico possono ancorare intorno a sé ampie quantità di reticolo. Questo potrebbe avere un effetto protettivo, visto che impedisce l'avvicinarsi di sostanze chimiche. E' interessante osservare che tale organizzazione diventa meno compatta e può perfino essere interrotta dall'azione di radicali liberi OH, che provocano la degradazione delle catene di acido ialuronico. In conseguenza di ciò, le proprietà dell'acido ialuronico, richiamate



Handwritten signature

nell'ambito della presente invenzione allo scopo di mantenere la vitalità della cornea, sono le seguenti:

1. la presenza di anioni fissi nelle catene di acido ialuronico, che funzionano da scambiatore cationico solubile e perciò limitano il movimento di cationi monovalenti e bivalenti verso il tessuto corneale;
2. la presenza di aree idrofobiche nella struttura secondaria delle catene di acido ialuronico, che permettono al composto di prendere contatto e di proteggere i siti idrofobici eventualmente esposti sulla membrana cellulare;
3. la formazione di un reticolo da parte delle catene di acido ialuronico, che racchiudono l'acqua ed i soluti e producono un effetto massimale di ritenzione d'acqua;
4. l'interazione con ICAM-1 localizzato sulla superficie delle cellule endoteliali, assicurando la formazione di un film protettivo di acido ialuronico intorno alle cellule stesse.

In linea di principio, tali proprietà sono sufficienti per ottenere la conservazione di cellule endoteliali a basse temperature e per evitare il rigonfiamento corneale. Visto che l'acido ialuronico ad alto peso molecolare (1,000,000 Da o oltre) forma soluzioni viscosi, si sono usate soluzioni a più basso peso molecolare (80,000-150,000 Da). A questa grandezza molecolare si forma sempre il reticolo di acido ialuronico, anche se l'organizzazione potrebbe essere meno



compatta.

Per le soluzioni medicali di cui alla presente invenzione, l'acido ialuronico può essere ottenuto da diverse fonti. Per esempio, può essere purificato da fonti convenzionali come le creste di gallo, usando i processi descritti in EP 0138572. In alternativa, l'acido ialuronico può essere ottenuto tramite un processo di fermentazione (WO 95/04132) o tramite la sintesi enzimatica, usando un fattore proteico purificato contenente la ialuronato-sintetasi (WO 95/24497).

ESEMPIO DI PREPARAZIONE

La soluzione medicale, priva di siero, di cui alla presente invenzione, contiene i seguenti componenti:

1. Una soluzione elettrolitica bilanciata e tamponata a pH 7.2 - 7.4 con fosfato, bicarbonato ed Hepes (idrossietilpiperazina acido etanosolfonico). Per il nostro scopo, è sufficiente un mezzo essenziale minimo (ad esempio TC 199). Tale mezzo è largamente usato nella coltura tissutale, e la sua formulazione comprende i sali inorganici essenziali, aminoacidi, vitamine e precursori dell'ATP.
2. Antibiotici quali gentamicina, streptomicina, penicillina G o combinazioni di questi, per prevenire le contaminazioni microbiche.
3. Acido ialuronico sale sodico con un peso molecolare di 80,000-



150,000 Da, ad una concentrazione compresa fra 1 e 20 mg/ml.

E' possibile variare la scelta di soluzione salina tamponata e di antibiotici. Questa semplice composizione dovrebbe essere sufficiente per soddisfare tutti i requisiti per la conservazione corneale ottimale a basse temperature per almeno una settimana.

ESPERIMENTI DI SUPPORTO

Materiali e Metodi

La composizione del mezzo privo di siero, contenente acido ialuronico sale sodico, oggetto della presente invenzione, viene descritta nella Tabella 1.

Come materiale di confronto sono stati usati dei mezzi per la conservazione corneale disponibili sul mercato e contenenti condroitin-solfato e destrano (Optisol-GS) o solo destrano (McKarey-Kaufman).

Coppie di bulbi umani sono stati prelevati da donatori entro 9-10 ore dalla morte. La cornea è stata isolata dal bulbo assieme ad un bordo sclerale di 2 mm, ed è stata poi testata per la vitalità delle cellule endoteliali, la densità delle cellule endoteliali, lo spessore e la trasparenza corneale. La vitalità delle cellule endoteliali è stata determinata colorando con tripan blu allo 0.3%. La morte delle cellule endoteliali, di solito, assume due diverse distribuzioni: arrangiamenti lineari di cellule colorate che corrispondono a pieghe causate dallo stress meccanico subito dalla cornea durante la



rimozione, oppure una mortalità diffusa su tutta la superficie endoteliale indicativa di una disfunzione metabolica delle cellule endoteliali. L'analisi è stata completata alla fine di ogni esperimento colorando con rosso di alizarina per valutare meglio la morfologia cellulare e le aree di membrana di Descemet non coperte dall'endotelio. La morte cellulare è stata espressa come densità percentuale di cellule colorate rispetto alla densità totale di cellule. La densità delle cellule endoteliali è stata valutata contando le cellule in 5 campi della parte centrale della cornea, usando un microscopio ottico fornito di reticolo da 10x10 mm quadrati. Nei casi in cui la morte cellulare era meno del 2% ed il numero di cellule endoteliali era $> 2,000 \text{ mm}^2$, la cornea era giudicata idonea al trapianto. Lo spessore corneale è stato misurato con un microscopio rovesciato, adattato con un micrometro digitale per valutare la distanza tra l'epitelio e l'endotelio. Sono state eseguite tre misurazioni centrali per ogni cornea. La trasparenza è stata valutata con un microscopio rovesciato e giudicata secondo la seguente scala: grado 3, eccellente; grado 2, buono con alcune irregolarità nella membrana di Descemet; grado 1, non idoneo a causa di edema stromale o pronunciate irregolarità nella membrana di Descemet. Dopo l'analisi, le cornee sono state immerse nel mezzo di conservazione a 4°C per ulteriori test sulla conservazione o per essere usate nella cheratoplastica perforante.



RECEIVED
Fam

Studi "in vitro"

Gli esperimenti sono stati eseguiti con cornee in buono stato, ma non idonee al trapianto a causa di controindicazioni come l'età o patologie del donatore. Le prove preliminari hanno valutato la trasparenza corneale e lo spessore, la densità e la vitalità delle cellule endoteliali. Un tasso di morte cellulare al di sopra del 10% ed una trasparenza di grado 1 sono stati considerati motivi di incompatibilità con l'esperimento. Le cornee sono state conservate in 10 ml del mezzo in esame (acido ialuronico sale sodico, Otisol-GS o McKarey-Kaufman) a 4°C per 7-14 giorni. Alla fine del periodo di conservazione, le cornee sono state colorate con tripan blu e rosso di alizarina per la determinazione finale delle condizioni delle cellule endoteliali.

Studi clinici

E' stato eseguito uno studio non-controllato, aperto, su cornee conservate nel mezzo contenente acido ialuronico sale sodico. Le cornee conservate in Optisol-GS fungevano da controllo. I donatori avevano da 46 a 86 anni. Le loro cornee, raccolte da 2 a 9 ore dopo la morte, erano in condizioni di conservazione eccellenti, in base ad una valutazione sulla trasparenza, sullo spessore e sulla vitalità e densità delle cellule endoteliali (2200-3000 cellule/mm²). Il periodo di conservazione a 4°C era di 25-96 ore (Tabella 2). Le cornee sono state riscaldate a temperatura ambiente al momento del trapianto.



Fuori

Un totale di 16 pazienti riceventi sono stati ammessi allo studio. Questi necessitavano di cheratoplastica perforante per cheratocono, cheratopatia bollosa, distrofia di Groenow, distrofia endoteliale acquisita e leucoma. Il trattamento chirurgico e le cure post-operatorie erano uguali in tutti i casi. Due settimane dopo il trapianto sono stati valutati la quantità di riepitelializzazione, la trasparenza corneale, lo spessore (misurato tramite pachimetria ad ultrasuoni) e la densità delle cellule endoteliali (valutata tramite microscopio speculare computerizzato). I pazienti sono stati nuovamente esaminati dopo due mesi.

Studi "in vitro"

Cinque paia di cornee sono state conservate in mezzo di conservazione McKarey-Kaufman, Optisol-GS o acido ialuronico sale sodico. La trasparenza, lo spessore e la mortalità delle cellule endoteliali sono stati valutati a 3, 7 o 14 giorni (Tabella 3). Si è osservato uno stato di conservazione eccellente nel mezzo Optisol-GS ed in quello di acido ialuronico sale sodico. Perfino dopo 14 giorni, la perdita di cellule endoteliali non superava il 7%. La colorazione con rosso di alizarina e tripan blu a 7 giorni ha confermato l'integrità dell'endotelio. Allo stesso modo, la trasparenza corneale e lo spessore erano ben conservati. Al contrario, il mezzo di McKarey-Kaufman era meno efficace. La trasparenza ha cominciato a diminuire al terzo giorno, mentre lo



spessore è aumentato fino a un massimo di 40% osservato al settimo giorno. La perdita delle cellule endoteliali ha raggiunto il 22-25% al quattordicesimo giorno. Questi risultati confermano che il destrano è poco adatto come conservante corneale, mentre indicano una maggiore efficacia sia del condroitin-solfato che dell'acido ialuronico sale sodico. L'acido ialuronico sale sodico, comunque, è stato in grado di raggiungere un livello soddisfacente di conservazione in assenza di destrano, che è invece richiesto dal mezzo Optisol-GS. Come richiamato in precedenza, il destrano tende a penetrare il tessuto corneale e ad aumentare la pressione da rigonfiamento quando il tessuto viene riscaldato.

Studi clinici

Un gruppo di 8 pazienti in attesa di cheratoplastica perforante ha ricevuto cornee conservate in soluzione di acido ialuronico sale sodico, mentre un gruppo parallelo di 8 pazienti ha ricevuto le cornee controlaterali conservate in Optisol-GS. La riepitelializzazione della cornea si è compiuta in tre giorni dopo l'intervento. Dopo due settimane la trasparenza e lo spessore delle cornee erano ben conservati. L'analisi della densità delle cellule endoteliali è stata eseguita su 10 pazienti ed hanno confermato l'efficacia dei due mezzi. Tutti i trapianti erano in buono stato dopo due mesi (Tabella 4).

Conclusioni



In conclusione, i risultati degli studi di cui alla presente invenzione dimostrano che l'acido ialuronico è un agente efficace per la conservazione corneale, anche in assenza di altre sostanze nel mezzo di conservazione. Questo semplifica la composizione della soluzione e ne riduce il costo, evitando miscele nutrienti complesse. Inoltre, l'assenza di componenti labili come peptidi o proteine (fattori di crescita) aumenta la stabilità della soluzione durante la conservazione delle cornee e previene la formazione di prodotti di degradazione. Un ulteriore vantaggio della soluzione contenente acido ialuronico è la possibilità di mantenere lo spessore del tessuto fino al momento dell'operazione chirurgica. Questo permette una valutazione accurata delle condizioni del tessuto ed una maggiore maneggevolezza durante il trapianto.

RIVENDICAZIONI

1. Una soluzione medica che comprende:
 - una soluzione elettrolitica bilanciata;
 - almeno un antibiotico; e
 - acido ialuronico sale sodico.
2. La soluzione secondo la rivendicazione 1, dove l'acido ialuronico sale sodico ha un peso molecolare compreso fra i 50,000 e 150,000 Da.
3. La soluzione secondo la rivendicazione 1, dove l'acido ialuronico sale sodico ha un peso molecolare compreso fra gli



Fazio

80,000 e 140,000 Da.

4. La soluzione secondo la rivendicazione 1, dove l'acido ialuronico sale sodico è presente ad una concentrazione fra 1 e 20 mg/ml.
5. La soluzione secondo la rivendicazione 1, dove l'acido ialuronico sale sodico è presente ad una concentrazione del 2%.
6. La soluzione secondo la rivendicazione 1, dove il pH della soluzione elettrolitica equilibrata è 7.2-7.4.
7. La soluzione secondo la rivendicazione 1, dove l'antibiotico viene scelto dal gruppo che comprende gentamicina, penicillina G, streptomicina, e/o combinazioni delle stesse.
8. Un metodo di conservazione del tessuto corneale che prevede la sua esposizione in una qualsiasi delle soluzioni medicali di cui alle rivendicazioni 1-7.
9. Un metodo di conservazione del tessuto corneale secondo la rivendicazione 8 che comprende inoltre il mantenimento di detta soluzione medica ad una temperatura di 2-8°C.
10. L'uso della soluzione medica secondo le rivendicazioni 1-7 per la conservazione del tessuto corneale.
11. L'uso della soluzione medica secondo le rivendicazioni 1-7 per la conservazione dei tessuti corneali ad una temperatura di 2-8°C.



FIDIA S.p.A.
In Amministrazione Delegata
(Prof. G. ...)
Fazio

COMPONENTE	MK	Optisol-GS®	Mezzo a base di acido ialuronico sale sodico
MEZZO	TC 199	TC 199	TC 199
TAMPONE		BSS di Eagle	
BICARBONATO DI SODIO	HEPES 25 mM 0,35 g/L	MEM	HEPES 25 mM
ANTIBIOTICO	Gentamicina 100 µg/ml	sconosciuto	0,35 g/L
		Gentamicina 100 µg/ml	Gentamicina µg/ml
ACIDO IALURONICO	--	Streptomycin 200 µg/ml	2 %
SALE SODICO		--	
pH	7,2 - 7,4	7,2 - 7,4	7,2 - 7,4
OSMOLARITA'	310-330 mOsm/Kg	320 mOsm/Kg	330 mOsm/Kg

TABELLA 1: Caratteristiche del mezzo a base di acido ialuronico sale sodico, in confronto a quelle di MK ed OPTISOL-GS®



ALBA S.p.A.
viale dell'Industria 10
franco

Donatore n°	Età (anni)	Sesso	Causa della morte	Tempo di espianto (ore/min)	Densità endoteliale (cellule/mm ²)
1	79	F	Malattia cardiovascolare	4.20	2700
2	52	F	Malattia cardiovascolare	9.10	2600
3	61	F	Tumore	3.10	2200
4	50	M	Malattia cardiovascolare	2.10	2800
5	86	M	Tumore	2.10	2600
6	46	F	Tumore	2.00	3000
7	85	F	Malattia cardiovascolare	5.10	2400
8	55	F	Malattia cardiovascolare	3.30	2500

TABELLA 2: Cheratoplastica perforante - caratteristiche dei donatori



STROMA										ENDOTELIO									
Cornea	Età donatore (anni)	Intervallo morte/espianto	Densità endoteliale (cellule/mm²)	Trasparenza				Spessore medio (µm)				Mortalità sulle pieghe media (%)				Mortalità diffusa media (%)			
				0	3	7	14	0	3	7	14	0	3	7	14	0	3	7	14
1-MK	45	5.00	2100	3	2	1	-	488	520	668	-	1	4	14	-	1	3	9	-
1-OPT				3	3	3	-	500	481	487	-	1	3	5	-	1	1	2	-
2-MK	89	5.00	1820	2	2	1	-	550	589	608	-	2	3	7	-	0	3	5	-
2-HA				2	2	2	-	507	494	494	-	2	2	2	-	0	0	2	-
3-MK	58	11.30	1600	2	-	-	1	485	-	-	695	5	-	-	22	0.5	-	-	25
3-HA				2	-	-	2	464	-	-	380	5	-	-	7	0.5	-	-	1
4-OPT	81	10.00	2400	3	-	2	-	475	-	475	-	7	-	8	-	0	-	1	-
4-HA				3	-	2	-	500	-	469	-	2	-	3	-	0	-	1	-
5-OPT	56	11.00	2500	3	-	-	2	510	-	-	440	3	-	-	6	0	-	-	3
5-HA				3	-	-	2	486	-	-	450	1	-	-	5	0	-	-	2

TABELLA 3: Esperimenti *in vitro*

Coppie di cornee umane, conservate con MK, Optisol-GS® (OPT) e mezzo a base di acido ialuronico sale sodico (HA).
Analisi ai giorni 0, 3, 7 e 14.



N°	Età (anni)	Sesso	Patologia Corneale	Durata della conservazione (ore)	Diametro lunetto (mm)	GG.dopo l'intervento	Ritipelliz- zazione	Trasparenza	Pachimetria (µm)	Densità endoteliale (cell./mm ²)
1-HA	51	M	Distrofia di Groenow	47	8.0 - 8.2	14	2	2	540	2000
1-OPT	28	F	Cheratocono	47	7.5 - 7.7	15	3	2	560	2000
2-HA	50	F	Leucoma post-erpetico	26	8.0 - 8.2	16	3	3	550	2100
2-OPT	36	M	Leucoma post-erpetico	25	8.0 - 8.2	16	2	3	560	2250
3-HA	70	M	Distrofia endoteliale acquisita	71	8.0 - 8.2	16	3	2	500	1220
3-OPT	87	M	Cheratoptasia bollosa	168	7.5 - 8.0	16	3	2	520	ND
4-HA	66	M	Leucoma post-traumatica	96	9.1 - 9.5	13	2	2	566	2100
4-OPT	43	M	Cheratocono	96	8.0 - 8.2	13	3	2	550	ND
5-HA	26	F	Cheratocono	72	7.5 - 7.7	12	3	3	545	ND
5-OPT	46	F	Cheratocono	72	8.0 - 8.2	13	3	3	520	ND
6-HA	48	F	Cheratocono	72	8.0 - 8.2	10	3	3	533	ND
6-OPT	25	M	Cheratocono	72	9.1 - 9.5	10	3	3	558	ND
7-HA	32	M	Cheratocono	40	7.5 - 7.7	10	3	3	528	1200
7-OPT	51	F	Cheratocono	40	7.5 - 7.7	10	3	3	555	1800
8-HA	57	M	Leucoma vascolarizzata	96	7.6 - 8.0	14	3	2	610	2400
8-OPT	69	M	Cheratoptasia bollosa	96	8.6 - 9.0	13	3	1	633	2200

Tabella 4: Cheratoplastica penetrante. Coppie di cornee umane conservate in OPTISOL-GS® o mezzo a base di acido ialuronico sale sodico
ND = non determinato



In conclusione, i risultati degli studi di cui alla presente invenzione dimostrano che l'acido ialuronico è un agente efficace per la conservazione corneale, anche in assenza di altre sostanze nel mezzo di conservazione. Questo semplifica la composizione della soluzione e ne riduce il costo, evitando miscele nutrienti complesse. Inoltre, l'assenza di componenti labili come peptidi o proteine (fattori di crescita) aumenta la stabilità della soluzione durante la conservazione delle cornee e previene la formazione di prodotti di degradazione. Un ulteriore vantaggio della soluzione contenente acido ialuronico è la possibilità di mantenere lo spessore del tessuto fino al momento dell'operazione chirurgica. Questo permette una valutazione accurata delle condizioni del tessuto ed una maggiore maneggevolezza durante il trapianto.

RIVENDICAZIONI

1. Una soluzione medica che comprende:
 - una soluzione elettrolitica bilanciata;
 - almeno un antibiotico; e
 - acido ialuronico sale sodico.
2. La soluzione secondo la rivendicazione 1, dove l'acido ialuronico sale sodico ha un peso molecolare compreso fra i 50,000 e 150,000 Da.
3. La soluzione secondo la rivendicazione 1, dove l'acido ialuronico sale sodico ha un peso molecolare compreso fra gli



Fasub

80,000 e 140,000 Da.

4. La soluzione secondo la rivendicazione 1, dove l'acido ialuronico sale sodico è presente ad una concentrazione fra 1 e 20 mg/ml.
5. La soluzione secondo la rivendicazione 1, dove l'acido ialuronico sale sodico è presente ad una concentrazione del 2%.
6. La soluzione secondo la rivendicazione 1, dove il pH della soluzione elettrolitica equilibrata è 7.2-7.4.
7. La soluzione secondo la rivendicazione 1, dove l'antibiotico viene scelto dal gruppo che comprende gentamicina, penicillina G, streptomicina, e/o combinazioni delle stesse.
8. Un metodo di conservazione del tessuto corneale che prevede la sua esposizione in una qualsiasi delle soluzioni medicali di cui alle rivendicazioni 1-7.
9. Un metodo di conservazione del tessuto corneale secondo la rivendicazione 8 che comprende inoltre il mantenimento di detta soluzione medica ad una temperatura di 2-8°C.
10. L'uso della soluzione medica secondo le rivendicazioni 1-7 per la conservazione del tessuto corneale.
11. L'uso della soluzione medica secondo le rivendicazioni 1-7 per la conservazione dei tessuti corneali ad una temperatura di 2-8°C.



FIDIA S.p.A.
In Amministrazione Delegata
(Prof. G. ...)
Fasub