

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902095584A1

Publication Date

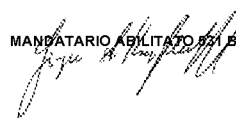
20140425

Applicant

LIPOGEMS INTERNATIONAL S.R.L.

Title

PROCEDIMENTO DI PRECONDIZIONAMENTO CHIMICO DI MATERIALE
CELLULARE PER OTTENERE LA RIPROGRAMMAZIONE EPIGENETICA
CHIMICA E L'ESPRESSIONE DI PLURIPOTENZIALITA



DESCRIZIONE dell'Invenzione Industriale dal titolo:

5 "Procedimento di precondizionamento chimico di materiale cellulare per ottenere la riprogrammazione epigenetica chimica e l'espressione di pluripotenzialità"

appartenente a LIPOGEMS INTERNATIONAL SRL di nazionalità italiana, con sede in via Santa Maria alla porta 9, Milano.

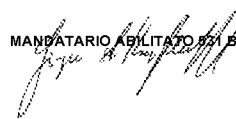
10

TESTO DELLA DESCRIZIONE

La presente invenzione ha per oggetto un procedimento di precondizionamento chimico di materiale cellulare per ottenere la riprogrammazione epigenetica chimica e l'espressione di pluripotenzialità di elementi staminali e multipotenti di origine non embrionale, quali periciti e/o cellule staminali mesenchimali, e/o cellule somatiche adulte.

15 Prove sperimentali indicano che il destino delle cellule, e quindi anche il destino delle cellule staminali, è controllato a più livelli interconnessi tra loro, che coinvolgono una complessa interazione tra segnalazione cellulare e modulazione epigenetica che viene modellata a livello di assemblaggio nucleosomale, creazione architettónica di motivi di fattori di trascrizione sfaccettati, e organizzazione temporale e spaziale della cromatina in anse e domini.

20 Un contributo in rapida crescita per la dissezione molecolare della regolazione trascrizionale e delle modificazioni epigenetiche nasce dall'isolamento e dalla caratterizzazione di molecole chiave coinvolte nella acetilazione degli



istoni, nella metilazione del DNA e nel rimodellamento della cromatina.

Fino a poco tempo fa, gli ambiti di ricerca sulle cellule staminali e la ricerca epigenetica sono stati sviluppati in modo indipendente.

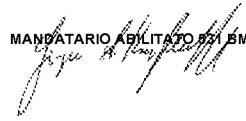
Tuttavia, è ormai chiaro che questi ambiti non possono essere più considerati in modo indipendente, e che lo stato epigenetico delle cellule staminali toti/pluripotenti può essere in larga misura responsabile per la "plasticità" di queste cellule.

Similmente a tale consapevolezza, i risultati recenti indicano che anche le cellule somatiche umane adulte non staminali possono essere riprogrammate a uno stato simile a quello embrionale mediante trasduzione virale con pochi, da tre a quattro, fattori di trascrizione, venendo trasformate in lineage in cui queste cellule altrimenti non sarebbero mai state presenti.

Il trasferimento genico mediato da vettori virali può quindi essere sfruttato per fornire una prova di principio che la trasformazione di cellule somatiche in "cellule staminali pluripotenti indotte (iPS)" può essere ottenuta mediante lo sblocco dei domini della cromatina che ospitano cruciali informazioni genetiche e architetturali (epigenetiche) che possono connettere le cellule specializzate mature ai loro elementi base della pluripotenzialità.

Tuttavia, il trasferimento genico di vettori virali è un approccio ingombrante, costoso e potenzialmente rischioso che non è facilmente immaginabile negli esseri umani.

E' noto che la molecola costituita dall'acido



ialuronico esterificato con acido butirrico e retinoico (HBR), è in grado di:

(i) massimizzare la cardiogenesi in cellule staminali embrionali di topo,

5 (ii) migliorare la differenziazione miocardica e vascolare in cellule staminali mesenchimali umane (hMSC) isolate dal midollo osseo, dalla polpa dentale e da membrane fetali di placenta umana a termine,

(iii) produrre il preconditionamento delle
10 cellule staminali mesenchimali umane (hMSC) per migliorare notevolmente la riparazione cardiovascolare mediata da hMSC in modelli animali sia di piccola taglia (ratto) che grande taglia (maiale) di infarto acuto del miocardico,

15 (iiii) offrire una significativa riparazione e sopravvivenza del miocardio nei cuori sottoposti a infarto (ratti), senza trapianto di cellule staminali.

L'acido ialuronico esterificato con acido
20 butirrico e retinoico (HBR) iniettato direttamente nel miocardio infartuato è in grado di aumentare l'acetilazione degli istoni sia nelle zone lontane che di margine del tessuto danneggiato.

Questo effetto è attribuibile all'azione
25 inibitoria delle deacetilasi istoniche esercitata dalla frazione butirrica dell'HBR.

Esperimenti in vitro hanno confermato un
significativo aumento nell'acetilazione dell'istone
H4 ottenuta dopo il trattamento di HBR sia di
30 cardiomiociti ventricolari cardiaci di ratti adulti e di cellule staminali mesenchimali di ratti positive a Stro-1, rispetto alle cellule non trattate.

In tutti questi studi, l'HBR ha dimostrato



essere efficace nell'agire per via trascrizionale sull'espressione di un certo numero di geni cruciali coinvolti in:

- (i) cardiogenesi,
- 5 (ii) vasculogenesi,
- (iii) sopravvivenza cellulare,
- (iiii) sintesi di mediatori trofici rilasciabili da cellule staminali, come il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) e il fattore di crescita degli epatociti (HGF), agenti in modo paracrino come
- 10 molecole antiapoptotiche, antifibrotiche e angiogeniche.

Questi effetti si sono verificati a livello sia delle cellule staminali mesenchimali umane (hMSC) e

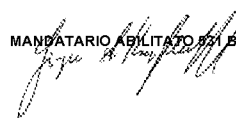
15 delle cellule staminali di ratti positive a Stro-1 e delle cellule adulte (ad esempio cardiomiociti).

Diverse osservazioni sono state fatte sull'acido ialuronico (HA), sull'acido butirrico (BU) e sull'acido retinoico (RA).

20 Il recettore dell'acido ialuronico CD44 è altamente espresso da cellule cardiogeniche, e viene messa fine alla normale morfogenesi cardiaca dal silenziamento genico della sintasi-2 dell'acido ialuronico.

25 Frammenti di acido ialuronico promuovono la differenziazione delle cellule endoteliali in modo CD44-dipendente, e CD44 svolge un ruolo importante nella funzione delle cellule endoteliali e nella formazione di nuovi vasi sanguigni.

30 L'acido ialuronico può essere internalizzato mediante endocitosi mediata da recettori, venendo in seguito rilevato in stretta associazione con eterocromatina nucleare.



Le ialaderine (proteine di legame dell'acido ialuronico) possono trasferirsi verso il nucleo all'atto della stimolazione mitogenica, servendo come substrati o attivatori per le MAP chinasi, o agendo
5 come omologhi nei vertebrati di proteine coinvolte nella crescita e nella differenziazione cellulare.

Per quanto riguarda il butirrato, la sua azione inibitoria delle deacetilasi di istoni altera la struttura della cromatina grazie alla
10 iperacetilazione degli istoni nucleosomali, aumentando l'accessibilità dei fattori di trascrizione ai siti regolatori cis-agenti bersaglio.

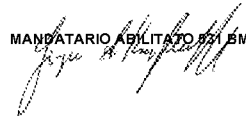
Un'inferenza della segnalazione di acido retinoico con differenziazione cardiaca è supportata
15 dalla constatazione che uno sviluppo cardiaco anormale si verifica dopo l'inattivazione del gene RXR α e combinando razze di topi con sottotipi mutanti RAR e RXR.

Inoltre, gli acidi all-*trans* e 9-*cis*-retinoici
20 hanno aumentato l'efficienza della cardiogenesi in cellule staminali embrionali di topo ES.

L'acido retinoico gioca un ruolo cruciale nello sviluppo vascolare nei mammiferi, essendo richiesto nella proliferazione di cellule endoteliali e nel
25 rimodellamento vascolare durante la vasculogenesi *in vivo*.

In nuclei isolati, è stato dimostrato che la trascrizione dei geni modulati da HBR non è stata influenzata dalla molecola intatta, ma piuttosto è
30 stata regolata mediante esposizione ad acido butirrico e retinoico, essendo migliorata mediante una miscela dei due.

Questi risultati indicano che HBR può aver agito



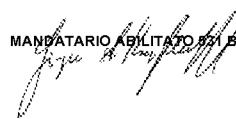
dopo l'idrolisi intracellulare (mediata da esterasi ubiquitarie) delle sue proprie componenti esterificate.

Nonostante questi risultati, e il fatto che il
5 tessuto adiposo è una fonte facilmente accessibile di
elementi multipotenti con profili di espressione
genica e fenotipica simili a cellule staminali
mesenchimali (hMSC) e a periciti, la possibilità di
un'applicazione clinica del potenziale multilineage
10 di queste cellule viene ritardata dalla
scarsa/trascurabile sopravvivenza cellulare nei
lipoaspirati crioconservati, dalla difficoltà di
espansione *ex vivo* e dalla complessità degli attuali
requisiti delle Norme di Buona Fabbricazione (cGMP)
15 per le cellule espanse.

Le cellule isolate ed espanse sono infatti
sottoposte a una cosiddetta "major manipulation" e
sono quindi considerate ATMPs (Advanced Therapies
Medicinal Products) e sottoposte alla normativa delle
20 cGMPs (current Good Manufacturing Practice).

Da queste osservazioni risulta quindi evidente
l'importanza, in particolare per il campo della
medicina rigenerativa, di sviluppare molecole
sintetiche e/o di identificare molecole presenti in
25 natura che possano sostituire le procedure di
trasferimento genico mediato da vettori virali per
ottenere la riprogrammazione epigenetica e
l'espressione di pluripotenzialità in elementi
cellulari multipotenti.

30 Dette molecole devono infatti essere in grado di
guidare le cellule staminali e multipotenti e/o le
cellule somatiche non staminali verso uno stato
pluripotente, massimizzando le loro proprietà di



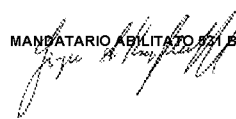
differenziazione, e la loro capacità di secernere una serie di fattori che agiscono in modo paracrino in un tessuto danneggiato per provocare il potenziale di guarigione del ricevente.

5 Risulta altresì evidente l'importanza di avere una fonte di elementi staminali e multipotenti di origine non embrionale di facile reperimento e pronti all'uso.

 E' noto che le domande di brevetto GE2010A000057
10 e WO2011/145075 descrivono un dispositivo ed un metodo per la preparazione di tessuto, in particolare tessuto adiposo, per trapianto ottenuto da materiale adiposo lobulare estratto tramite liposuzione.

 Secondo la presente invenzione è pertanto
15 possibile impiegare uno o più sostanze chimiche di origine naturale o sintetica per riportare le cellule staminali e multipotenti adulte o cellule somatiche adulte non staminali ad uno stato con caratteristiche simili a quello embrionale ovvero per ottimizzare la
20 potenza delle stesse ossia per ottenere una riprogrammazione epigenetica e l'espressione di pluripotenzialità al fine di poter utilizzare delle cellule a scopi terapeutici ed in medicina rigenerativa nell'ambito di vari contesti clinici,
25 tra cui malattie cardiovascolari, malattie neurodegenerative e malattie endocrine/metaboliche.

 A tal fine l'invenzione prevede il
precondizionamento chimico di materiale cellulare per
ottenere la riprogrammazione epigenetica chimica e
30 l'espressione di pluripotenzialità di elementi staminali e multipotenti di origine non embrionale, quali periciti e/o cellule staminali mesenchimali, e/o cellule somatiche adulte, sottoponendo un



derivato tissutale non espanso comprendente detti
elementi staminali e multipotenti, e/o sottoponendo
cellule staminali non embrionali e/o cellule
somatiche non embrionali, ottenute da un campione di
5 tessuto o da detto derivato, a miscelazione con una o
più sostanze chimiche di origine naturale o
sintetica.

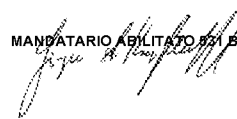
Detta o dette sostanze sono in grado di svolgere
una o più delle seguenti funzioni:

10 - aumento della acetilazione istonica, con
conseguente rimodellamento della cromatina e una
maggiore accessibilità del fattore di trascrizione ai
domini di cromatina bersaglio;

- aumento della trascrizione dei geni associati
15 alla pluripotenzialità delle cellule staminali, quali
Oct3/4, Nanog, Sox2 e altri membri di questa
famiglia, Klf4;

- aumento della trascrizione di diversi geni
tessuto-specifici, insieme con i geni legati a
20 pluripotenza, quali Mef2C, Tbx5, e geni coinvolti in
cardiogenesi, come prodinorfina, Gata4, Nkx2.5, geni
coinvolti in vasculogenesi, come VEGF, HGF, KDR, geni
coinvolti in neurogenesi, come neurogenina1, geni che
innescano l'orientamento verso isole beta-
25 pancreatiche, come ad esempio neurogenina3, geni
responsabili di un contesto di pro-sopravvivenza
all'interno di un derivato tissutale, compresi Pim1 e
Akt.

Secondo una forma esecutiva preferita della
30 presente invenzione il procedimento prevede la
miscelazione del materiale cellulare con un composto
comprendente acido ialuronico esterificato con acido
butirrico e retinoico (HBR) e/o con un composto



comprendente una o più delle sue frazioni quali acido ialuronico (HA), acido butirrico (BU) e acido retinoico (RA), essendo dette sostanze previste nel detto composto da sole od in combinazione con altre
5 sostanze solide o liquide.

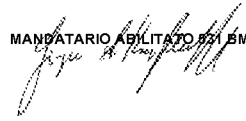
Secondo la presente invenzione quindi il materiale cellulare può essere miscelato con:

- acido ialuronico esterificato con acido butirrico e retinoico (HBR),
- 10 - una miscela di una o più delle sue frazioni,
- una miscela di acido ialuronico esterificato con acido butirrico e retinoico (HBR) e una o più delle sue frazioni.

Secondo la presente invenzione l'uso di HBR o di una miscela di acido ialuronico (HA) e/o butirrico (BU) e/o retinoico (RA) consente di ottenere il rimodellamento della cromatina e modificazioni epigenetiche all'interno degli elementi cellulari trattati anche senza la necessità di avere
15 l'espansione cellulare.

È stato infatti dimostrato che una miscela di acido ialuronico (HA), butirrico (BU) e retinoico (RA) è stata in grado di aumentare la secrezione di VEGF e la trascrizione di VEGF, di KDR (codificante il maggior recettore VEGF), e HGF in cellule
25 staminali mesenchimali umane (hMSC) dissociate dal tessuto adiposo (hASC).

E' stato dimostrato che il preconditionamento chimico ex vivo di hASC con la suddetta miscela di
30 molecole presenti in natura ha portato alla rivascularizzazione del tessuto trapiantato dopo il co-trapianto intraepatico di isole pancreatiche/hASC in ratti diabetici singenici.



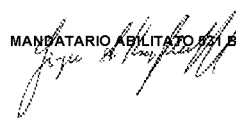
I ratti trapiantati con isole in co-coltura con hASC preconditionate hanno mostrato un controllo glicemico migliore rispetto ai ratti trapiantati con un volume uguale di isole e hASC di controllo.

5 Il co-trapianto con hASC preconditionate è anche associato ad una migliore rivascularizzazione delle isole in vivo, come evidenziato dall'analisi morfologica del trapianto.

L'aumento osservato nella funzione e
10 rivascularizzazione dimostra quindi che il metodo di preconditionamento di cellule staminali rappresenta una nuova strategia per migliorare notevolmente l'efficacia del co-trapianto di hASC/hMSC.

Il prodotto cellulare, non espanso e pronto
15 all'uso, ottenuto con il dispositivo oggetto del brevetto con numero di pubblicazione WO 2011/145075, qui definito per semplicità prodotto "Lipogems", che utilizza lievi forze meccaniche in un sistema completamente chiuso, evitando l'uso di enzimi, di
20 additivi e altre manipolazioni, risulta essere particolarmente vantaggioso nel procedimento di riprogrammazione epigenetica e di ottimizzazione della pluripotenzialità di cellule tramite l'uso di HBR o delle sue frazioni sopra citate ossia acido
25 ialuronico, retinoico e acido butirrico.

A differenza del lipoaspirato non trattato con il detto dispositivo, il prodotto ottenuto da lipoaspirato con il dispositivo ed il procedimento brevettato, cosiddetto prodotto "Lipogems", comprende
30 uno stroma vascolare straordinariamente conservato, con capillari a fessura incuneati tra adipociti e steli stromali contenenti canali vascolari con evidenti lumi. L'immunoistochimica ha rivelato che la



frazione stromale vascolare (SVF) del detto prodotto "Lipogems" include un elevato numero di cellule con identità di pericita e/o cellule staminali mesenchimali (hMSC) che mostrano il classico orientamento verso lineage osteogenico, condrogenico e adipogenico.

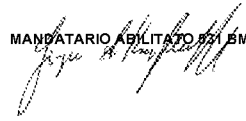
Il dispositivo del brevetto WO2011/145075 e di seguito descritto permette di preservare la nicchia vasculo stromale e consente che l'HBR (o le sue frazioni) possano agire sulle cellule contenute all'interno di detta nicchia.

L'analisi di citometria a flusso del prodotto "Lipogems" non-espanso trattato con collagenasi ha dimostrato che è composto con una percentuale notevolmente più elevata rispetto ai normali lipoaspirati ottenuti con tecniche tradizionali, di periciti maturi e di cellule staminali mesenchimali (hMSC), e una quantità inferiore di elementi ematopoietici, rispetto ai lipoaspirati enzimaticamente-digeriti.

Inoltre a differenza del lipoaspirato tradizionale, ossia non trattato con il dispositivo ed il metodo oggetto di brevetto WO2011/145075, i tratti distintivi del prodotto "Lipogems" fresco isolato da tessuto adiposo non differiscono dai tratti distintivi del prodotto "Lipogems" sottoposto a crioconservazione ossia la crioconservazione non altera le caratteristiche biochimiche del prodotto "Lipogems".

E' altresì da notare che le caratteristiche sopra citate sono presenti anche nel prodotto "Lipogems" ottenuto da tessuto adiposo di cadaveri.

Secondo una forma esecutiva preferita della



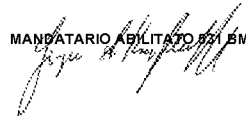
presente invenzione è prevista la miscelazione di HBR o di una o più delle sue frazioni (o di una miscela costituita da o comprendente HBR e una o più delle sue frazioni) con il prodotto cellulare del dispositivo e del procedimento descritto in WO2011/145075 (cosiddetto prodotto "Lipogems") per ottenere un precondizionamento chimico del detto prodotto prima del suo trapianto nello stesso donatore (procedura autologa) o in un soggetto diverso dal donatore (procedura allogenica).

Il precondizionamento chimico ha lo scopo di permettere il rimodellamento della cromatina ed una riprogrammazione epigenetica degli elementi multipotenti presenti nella frazione stromale vascolare (SVF) del detto prodotto.

Questi elementi sono i periciti e le cellule staminali mesenchimali hMSC che rispondono a HBR o alle sue frazioni con l'acquisizione di uno stato pluripotente, che a sua volta porterà all'aumento dell'orientamento verso lineage complessi, tra cui lineage del miocardio, vascolare (endoteliali e muscolari lisce) e neuronale.

La riprogrammazione epigenetica inoltre migliora la sintesi e la secrezione di molteplici fattori di crescita che agiranno in modo paracrino dopo il trapianto del prodotto "Lipogems" precondizionato per impartire "messaggi istruttivi" capaci di aumentare il potenziale di guarigione endogeno del tessuto danneggiato del ricevente.

L'oggetto del presente brevetto rappresenta quindi un procedimento innovativo in ambito biomedico e clinico in quanto consente, come meglio specificato di seguito, di ottenere la riprogrammazione



epigenetica e l'espressione di pluripotenzialità sia di elementi multipotenti, quali periciti e/o cellule staminali mesenchimali, di origine non embrionali sia di cellule somatiche adulte, in particolare di
5 elementi staminali e multipotenti contenuti nella frazione vasculo-stromale di un derivato tissutale non espanso.

Queste ed altre caratteristiche e vantaggi della presente invenzione risulteranno più chiaramente
10 dalla seguente descrizione e dalle figure allegate in cui:

- la fig.1 illustra schematicamente il dispositivo oggetto del brevetto WO2011/145075 ed i passi di trattamento del lipoaspiato tramite detto
15 dispositivo;

- la fig.2 mostra la struttura chimica di HBR.

La sintesi e la caratterizzazione del composto HBR può essere ottenuta secondo procedure note come quelle descritte nei seguenti documenti:

20 - Ventura C, Maioli M, Asara Y, Santoni D, Scarlata I, Cantoni S, Perbellini A. Butyric and retinoic mixed ester of hyaluronan. A novel differentiating glycoconjugate affording a high throughput of cardiogenesis in embryonic stem cells. J Biol Chem. 2004 May 28;279(22):23574-9.

25 - Lionetti V, Cantoni S, Cavallini C, Bianchi F, Valente S, Frascari I, Olivi E, Aquaro GD, Bonavita F, Scarlata I, Maioli M, Vaccari V, Tassinari R, Bartoli A, Recchia FA, Pasquinelli G,
30 Ventura C. Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic acid affording myocardial survival and repair without stem cell transplantation. J Biol Chem. 2010 Mar 26;285(13):9949-61.



Con riferimento alla figura 2, con la sigla HA si intende l'acido ialuronico; con la sigla BU si intende l'acido butirrico, con la sigla RA si intende l'acido retinoico.

5 La formula generica di esteri HA rappresenta un copolimero random (ran) di tre distinte unità ripetitive dimeriche, tra cui x sono non sostituite, y sono sottoposte a butirilazione (gruppo C_3H_7CO) e z sono sottoposte a retinoilazione (gruppo $C_{19}H_{27}CO$).

10 Assumiamo n come la somma di x , y e z vale a dire il numero totale di unità di disaccaride nel polisaccaride.

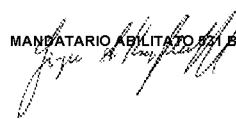
DS_{BU} e DS_{RA} corrispondono rispettivamente al rapporto tra y e n e tra z e n .

15 Ovviamente per il monoestere ialuronico (H) - retinoico (R), abbreviato come HR, il DS_{BU} è 0 ($y = 0$), mentre per il monoestere ialuronico (H) - Butirrico (B), abbreviato come HB il DS_{RA} è 0 ($z = 0$).

20 Secondo un metodo noto di preparazione, il gruppo idrossilico primario in posizione 6 dei residui di N-acetil-D-glucosamina nello scheletro del polisaccaride è il più reattivo verso l'esterificazione.

25 E' stato preparato un doppio sale di tetrabuttilammonio con due gruppi funzionali dell'acido ialuronico, in particolare il suo carbossilico e 6-idrossilico, al fine di ottenere una buona solubilità in solventi polari aprotici organici e per aumentare la nucleofilicità dell'atomo di ossigeno in
30 C-6.

La retinoilazione con retinoil cloruro, che è il fattore limitante la velocità di reazione, è stata effettuata prima della butirilazione mediante



anidride butirrica e 4 - (dimetilammino) piridina come catalizzatore di acilazione ipernucleofilica.

Il grado di sostituzione (DS) è stato considerato come il numero dei gruppi esterificati OH per ciascuna unità di ripetizione di acido ialuronico (GlcNAc-GlcUA dimero).

Il peso molecolare medio ponderale di HBR, denominato come media ponderale di sodio ialuronato, è stato determinato mediante cromatografia ad esclusione dimensionale ad alta prestazione.

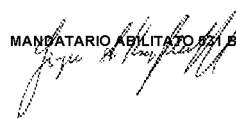
Tutti gli HBR sintetizzati possono presentare un DS con BU (DSBU) compreso tra 0,05 e 1,5, o qualsiasi altro DSBU che può risultare compatibile con la stabilità e l'efficienza/efficacia biologica di HBR.

Il DS con RA (DSRA) può essere compreso tra 0,002 e 0,1, o qualsiasi altro DSRA che può risultare compatibile con la stabilità e l'efficienza/efficacia biologica di HBR.

Il rapporto tra DSBU/ DSRA può essere di 6, o qualsiasi altro valore che può risultare compatibile con la stabilità e l'efficienza/efficacia biologica di HBR.

Il peso molecolare medio ponderale può essere compreso tra 10.000 e 30.000 dalton, o altri valori che possono risultare compatibili con la stabilità chimica e l'efficienza /efficacia biologica di HBR.

Il dispositivo 1 descritto nel brevetto WO 2011/145075 consente di prelevare tessuto da paziente vivo o da cadavere, umano o animale, di processarlo senza l'utilizzo di enzimi, eventualmente di crioconservarlo, e di reiniettarlo nel paziente, essendo possibile prevedere che detto paziente sia



uguale o diverso dal paziente donatore (trapianto autologo o allogenico).

Il dispositivo 1 consente di preparare un derivato tissutale non espanso a partire da una
5 "manipolazione minima", non-enzimatica, del tessuto di origine.

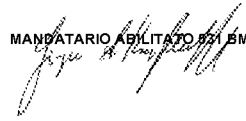
Preferibilmente il tessuto trattato è tessuto adiposo.

10 Secondo una forma attuativa particolarmente vantaggiosa, il tessuto comprende tessuto adiposo ottenuto da materiale adiposo lobulare estratto, ad esempio, tramite liposuzione, essendo il detto materiale adiposo costituito da una componente fluida
15 comprendente una componente oleosa, una componente ematica e/o soluzioni sterili e da una componente solida comprendente strutture vasculo-stromali, frammenti cellulari e/o uno o più macroagglomerati cellulari di dimensioni eterogenee tra loro e comprendenti cellule staminali.

20 Nel presente testo con derivato tissutale si intende un aggregato o cluster cellulare, comprendente una frazione vasculo-stromale arricchita di elementi staminali e multipotenti, quali periciti e/o cellule staminali mesenchimali.

25 Preferibilmente nella presente invenzione il derivato tissutale non espanso è ottenuto da tessuto adiposo trattato con il metodo ed il dispositivo 1 descritto di seguito e nel documento WO 2011/145075.

Il procedimento di preparazione del derivato
30 tissutale da materiale adiposo prevede la fase di suddivisione del detto materiale adiposo in agglomerati cellulari di dimensioni minori rispetto alle dimensioni dei detti macroagglomerati, in modo



tale che detti agglomerati cellulari e/o vasculo-
stromali abbiano dimensioni pari o minori rispetto ad
un determinato valore, e in modo tale che dette
dimensioni siano mediamente uguali tra loro.

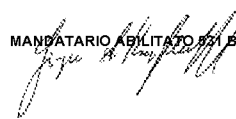
5 In alternativa o in combinazione alla fase di
suddivisione, il procedimento può prevedere almeno
una fase di lavaggio degli aggregati cellulari
eseguito contestualmente ad una fase di separazione
della componente fluida dalla componente solida.

10 Secondo la presente invenzione la fase di
sottoporre dette cellule/agglomerati a miscelazione
con una o più sostanze chimiche di origine naturale o
sintetica avviene per tutta la durata del
procedimento o per solo una parte di esso o alla fine
15 del procedimento.

Ovviamente è possibile prevedere di ottenere un
derivato tissutale anche tramite altri metodi e
dispositivi noti.

Il dispositivo 1, grazie alla presenza di almeno
20 una rete di riduzione 101 delle dimensioni del
lipoaspirato e di elementi agitatori meccanici 103,
che consentono di ottenere una emulsione delle
componenti liquide del lipoaspirato, riduce
progressivamente le dimensioni dei clusters o
25 agglomerati cellulari del tessuto adiposo
lipoaspirato, eliminando contemporaneamente i residui
liquidi costituiti principalmente da olio e sangue.

Il metodo di trattamento del lipoaspirato
prevede il lavaggio e la riduzione delle dimensioni
30 dei clusters cellulari in completa immersione in un
liquido, quale una soluzione fisiologica sterile di
lavaggio, per minimizzare l'azione traumatica del
dispositivo 1 sulle cellule.



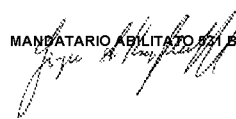
I passi di riduzione, lavaggio ed emulsione eseguiti meccanicamente tramite il dispositivo 1 sono quindi eseguiti in condizioni di assenza di aria all'interno di detto dispositivo 1.

5 Il dispositivo 1 consente di ottenere agglomerati cellulari di dimensioni ridotte che migliorano integrazione cellulare post-trapianto.

La prima riduzione degli agglomerati cellulari è ottenuta spingendo il lipoaspirato contenuto nella
10 siringa di aspirazione nel dispositivo 1 attraverso la prima rete 101 di riduzione delle dimensioni, mentre una corrispondente quantità di soluzione salina esce dal dispositivo 1 e viene accumulata in una sacca di raccolta (figura 1A).

15 Quando la quantità desiderata di lipoaspirato è stata inserita nel dispositivo 1, mantenuto verticale, con la prima rete 101 di riduzione delle dimensioni in alto, lo strato galleggiante di tessuto adiposo, preferibilmente, non deve occupare più della
20 metà superiore del dispositivo 1.

Gli elementi agitatori 103 presenti nel dispositivo 1, ad esempio sfere in metallo o simili, consentono, durante l'agitazione del dispositivo 1 (figura 1B), di formare una emulsione, tra l'olio,
25 sangue e soluzione di lavaggio che è rimossa contro densità, dall'interno del dispositivo 1, seguendo il flusso della soluzione salina mossa dalla gravità, mentre gli agglomerati di dimensioni ridotte della frazione vasculo stromale (contenente adipociti,
30 vasi, periciti e cellule mesenchimali) si muovono verso la parte superiore del dispositivo 1 considerato in posizione verticale (figura 1B).



Quando la parte liquida all'interno del dispositivo 1 appare chiara ed il lipoaspirato giallo, il flusso di soluzione salina viene interrotto, ed il dispositivo 1 viene ruotato di 180° (figura 1C).

La seconda riduzione delle dimensioni dei clusters cellulari è ottenuta facendo passare gli agglomerati della frazione vasculo stromale (contenente adipociti, vasi, periciti e cellule mesenchimali) attraverso una seconda rete 102 di riduzione delle dimensioni spingendo all'interno del dispositivo 1 ulteriore liquido attraverso l'apertura inferiore del dispositivo (considerato in posizione verticale come in figura 1C), utilizzando ad esempio una siringa.

Il derivato tissutale ottenuto attraverso il trattamento del lipoaspirato con il dispositivo 1 sopra descritto è raccolto in siringhe collegate all'apertura superiore del dispositivo (considerato in posizione verticale come in figura 1C) ed è pronto ad essere utilizzato o conservato.

Il prodotto ottenuto tramite il dispositivo sopra descritto costituisce quindi un derivato tissutale non espanso comprendente una frazione vasculo-stromale arricchita di elementi staminali e multipotenti, quali periciti e/o cellule staminali mesenchimali in particolare costituisce una "nicchia vascolare stromale naturale" costituita da una rete di adipociti a guisa di impalcatura legati a vasi altamente conservati, contenente una notevole quantità di cellule staminali mesenchimali e periciti.



Secondo la presente invenzione il materiale cellulare sul quale il preconditionamento chimico può essere eseguito comprende, in alternativa od in combinazione tra loro:

5 - elementi staminali e multipotenti, quali periciti e/o cellule staminali mesenchimali, contenuti nella frazione vasculo-stromale di un derivato tissutale, espanso o non espanso,

 - elementi staminali e multipotenti, quali
10 periciti e/o cellule staminali mesenchimali ottenuti da detto derivato o da un campione di tessuto, espansi o non espansi,

 - cellule somatiche adulte non staminali (es. fibroblasti cutanei) contenute od ottenute da detto
15 derivato o da un campione di tessuto, espanse o non espanse.

Il metodo può quindi essere applicato anche a cellule diverse dalle cellule staminali e multipotenti, come cellule somatiche adulte, umane o
20 animali, o cellule embrionali non umane per ottenere una sorta di programmazione delle stesse.

Il metodo può essere applicato sia su materiale cellulare ottenuto da donatori vivi o donatori cadavere.

25 Inoltre può essere anche applicato, oltre che su materiale fresco, su materiale scongelato dopo crioconservazione a -80°C o in azoto liquido.

Si ricorda che per derivato tissutale non espanso si intende un aggregato di cellule del
30 tessuto estratto da paziente, che non viene messo in coltura e pertanto gli elementi cellulari (staminali e non) in esso contenuti non vengono posti a coltura in vitro in un mezzo di coltura, ossia non vengono



sottoposti a proliferazione (definita anche espansione) in vitro.

Nel complesso, il procedimento può comprendere le fasi di:

5 a) preparare un derivato tissutale non espanso a partire da una "manipolazione minima", non-enzimatica, del tessuto di origine, quale lipoaspirato, essendo detto derivato inteso come costituito da aggregati di cellule del tessuto di

10 origine, quali adipociti nel caso di lipoaspirato, circondati da una componente vasculo-stromale contenente cellule staminali e/o elementi multipotenti quali periciti e cellule staminali mesenchimali;

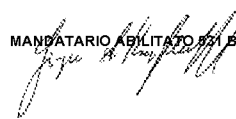
15 b) in alternativa od in combinazione alla fase a), preparare una sospensione cellulare a partire da un campione di tessuto o dal derivato di cui alla fase a), recuperare le cellule staminali (non embrionali) e/o le cellule somatiche adulte da detta

20 sospensione cellulare;

c) sottoporre dette cellule staminali (non embrionali) e/o le cellule somatiche adulte del derivato tissutale od ottenute da un campione di tessuto o dal derivato di cui alla fase a), a

25 miscelazione con una o più sostanze chimiche di origine naturale o sintetica, in particolare con un composto comprendente acido ialuronico esterificato con acido butirrico e retinoico (HBR) e/o con un composto comprendente una o più delle sue frazioni

30 quali acido ialuronico (HA), acido butirrico (BU) e acido retinoico (RA), essendo dette sostanze previste nel detto composto da sole od in combinazione con altre sostanze solide o liquide.



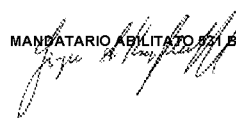
Con la definizione di "manipolazione minima" delle cellule si intende che le cellule (staminali e non) non vengono espanse (coltivate e fatte proliferare in vitro in coltura) e non vengono sottoposte ad una serie di "lavorazioni" quali estrazione e dissociazioni enzimatiche, centrifugazioni e separazioni di popolazioni cellulari, arricchimento di alcune popolazioni cellulari a scapito di altre (ad esempio separazione con citofluorometria a flusso) ed altre lavorazioni simili.

Il fatto che le cellule possono essere sottoposte a manipolazione minima consente che il procedimento ed il prodotto ottenuto tramite detto procedimento non ricada nella normativa "Farmaco-Major manipulation".

Ovviamente è anche possibile prevedere che gli elementi cellulari di origine non embrionale (elementi staminali e multipotenti e cellule somatiche) siano sottoposti ad espansione in vitro.

Il campione di tessuto può vantaggiosamente comprendere materiale adiposo estratto, ad esempio, tramite liposuzione/lipoaspirazione, e la fase b) del procedimento prevedere di trattare enzimaticamente il materiale adiposo per il rilascio di elementi staminali e multipotenti e/o cellule somatiche dopo eventuale riduzione del tessuto adiposo in parti più piccole.

Il procedimento può quindi essere applicato sia ad aggregati cellulari non espansi (ad esempio cellule ottenute con il procedimento descritto nel brevetto WO2011/145075), che a cellule da esso derivate (e quindi espanse) o ad altre tipologie di



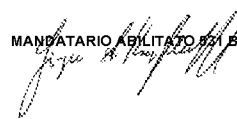
prodotto "lipogems" ottenuto con il metodo e dispositivo del brevetto WO2011/145075 è possibile ottenere non solo materiale adiposo da usare come filler biologico, ma anche materiale ricco di
5 elementi quali periciti e cellule staminali mesenchimali con potenza arricchita o comunque modificata, che può essere impiegato per rigenerare tessuti anche diversi da quelli da cui detto materiale è stato estratto.

10 Il preconditionamento chimico per ottenere la riprogrammazione epigenetica e la modulazione trascrizionale, secondo le modalità della presente invenzione, può essere eseguito non solo, preferibilmente, su un derivato tissutale non espanso
15 come quello ottenuto con il metodo ed il dispositivo del brevetto WO2011/145075, ma anche su specifici tipi di cellule.

Questi tipi di cellule possono essere:

- tutti i tipi di cellule derivate dal
20 cosiddetto prodotto "Lipogems", in qualsivoglia modo isolate ed espanse in coltura per un qualsivoglia periodo di tempo; questi tipi di cellule possono essere periciti, così come cellule staminali adipose derivate contenute all'interno della frazione vasculo
25 stromale (SVF) del prodotto "Lipogems", o qualsiasi altro tipo di cellula presente all'interno del prodotto "Lipogems" e/o la sua frazione vasculo stromale SVF;

- cellule somatiche adulte non staminali,
30 compresi i fibroblasti umani isolati dalla pelle e da altre fonti (ad esempio i tessuti cicatriziali); nei fibroblasti dermici umani, l'HBR, e, in misura inferiore la miscela di acido ialuronico HA, e/o



acido butirrico BU, e/o acido retinico RA, sono in grado di ottenere l'espressione trascrizionale dei geni correlati a staminalità, quali Oct3/4, Nanog, Sox2 e altri membri di questa famiglia, Klf4.

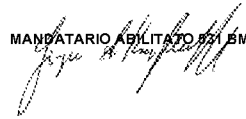
5 Secondo la presente invenzione quindi il
precondizionamento chimico, con una o più molecole di
origine naturale o sintetica, implica, anche per le
cellule somatiche, l'acquisizione di uno stato
pluripotente con la possibilità di guidare il
10 differenziamento cellulare verso qualsivoglia tipo di
lineage cellulare derivato dai tre strati germinali.

In particolare la riprogrammazione chimica dei
fibroblasti (ossia di cellule somatiche) in cellule
staminali pluripotenti indotte (iPS) rappresenta una
15 strategia senza precedenti per la guarigione dei
tessuti.

Secondo la presente invenzione il
precondizionamento chimico per ottenere una
sostanziale riprogrammazione epigenetica ed una
20 modulazione trascrizionale in cellule staminali e
pluripotenti di origine non embrionale o in cellule
somatiche adulte, avviene miscelando il materiale
cellulare con un composto comprendente acido
ialuronico esterificato con acido butirrico e
25 retinoico (HBR) e/o con un composto comprendente una
o più delle sue frazioni quali acido ialuronico (HA),
acido butirrico (BU) e acido retinoico (RA), essendo
dette sostanze previste nel detto composto da sole od
in combinazione con altre sostanze solide o liquide.

30 La miscelazione può avvenire con acido
ialuronico esterificato con acido butirrico e
retinoico (HBR).

L'HBR è miscelato in un ampio range di dosi,



preferibilmente ma non soltanto comprese tra 0,5 e 2,5 mg/l.

Preferibilmente quindi le dosi possono variare, da 0,5 a 2,5 mg/ml.

5 La miscelazione con il materiale cellulare deve avvenire gentilmente.

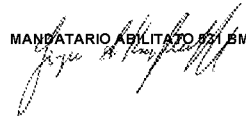
Il tempo di incubazione del materiale cellulare precondizionato può essere molto breve, compreso tra 1 e 2 ore, o meno, dato che l'effetto del farmaco continuerà anche dopo il trapianto del materiale cellulare sul paziente.

La miscelazione tra materiale cellulare con una o più sostanze chimiche di origine naturale o sintetica ha una durata preferibilmente compresa tra 15 1 o 2 ore, comunque modulabile in base alla ottimizzazione del differenziamento verso determinati lineage specifici.

Sebbene l'utilizzo di HBR rappresenti una soluzione ottimale per ottenere il precondizionamento chimico, un significativo miglioramento della pluripotenzialità e dell'orientamento delle cellule staminali non embrionali e/o delle cellule somatiche può anche essere ottenuto esponendo il materiale cellulare ad una miscela di acido ialuronico e/o di acido butirrico e/o di acido retinico.

L'esposizione del materiale cellulare a questa miscela, seppur meno efficiente in termini di riprogrammazione e modulazione della trascrizione genica rispetto al trattamento con HBR, garantisce comunque un significativo miglioramento di pluripotenzialità e regolazione trascrizionale, rispetto a materiale cellulare non trattato.

Inoltre, questi sono tutti composti presenti in

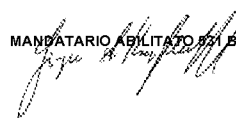


natura, e le loro concentrazioni sono tutte mantenute sotto la dose farmacologica comunemente usata (cioè acido ialuronico, 1,5 mg/ml. MW 10,000-30,000 dalton, acido butirrico 2,5 mM, e acido retinoico, 5 10^{-8} M).

I tempi di internalizzazione cellulare di ciascuna frazione sono ovviamente non sincroni a causa della loro differente lipofilicità (acido retinoico > acido butirrico > acido ialuronico), ma 10 ciascun componente ha dimostrato di agire efficacemente sul meccanismo di trascrizione anche quando cellule intatte sono state incubate con una miscela di acido retinoico, acido butirrico e acido ialuronico.

15 La molecola costituita dall'acido ialuronico esterificato con acido butirrico e retinoico (HBR) da sola o miscelata con una o più delle sue frazioni, acido ialuronico e/o di acido butirrico e/o di acido retinico, o la miscela di una o più delle sue 20 frazioni, ossia una miscela di acido ialuronico e/o di acido butirrico e/o di acido retinico può essere/possono essere utilizzate disciolte in soluzione fisiologica o in soluzioni tampone, o possono essere sottoposte a incapsulamento in 25 "contenitori nanocolloidali/nanoparticelle intelligenti", ovvero nanocapsule o nanofilm multistrato biodegradabili auto-assemblati, prodotti tramite la cosiddetta tecnica strato su strato (LbL), o in qualsiasi altra entità nano-strutturata che può 30 essere adatta a tale scopo, per ottenere il rilascio efficace sia a livello intracellulare che a livello tissutale.

Preferibilmente il materiale cellulare miscelato



con le molecole di origine sintetica (come HBR) o naturale come (come l'acido ialuronico, l'acido butirrico e l'acido retinico) è costituito dal derivato tissutale non espanso ottenuto con il
5 dispositivo ed il metodo sopra descritto ed oggetto del brevetto con numero di pubblicazione WO2011/145075, definito nella presente domanda di brevetto come prodotto "Lipogems".

L'effetto della riprogrammazione comporta:

10 - aumento della acetilazione istonica, con conseguente rimodellamento della cromatina e una maggiore accessibilità del fattore di trascrizione ai domini di cromatina bersaglio;

15 - aumento della trascrizione dei geni associati alla pluripotenzialità delle cellule staminali (quali Oct3/4, Nanog, Sox2 e altri membri di questa famiglia, Klf4);

20 - aumento della trascrizione di diversi geni tessuto-specifici, insieme con i geni associati alla pluripotenza, tra cui, Mef2C, Tbx5, e:

- geni coinvolti in cardiogenesi, come prodinorfina, Gata4, Nkx2.5,

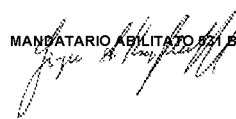
- geni coinvolti in vasculogenesi, come VEGF, HGF, KDR,

25 - geni coinvolti in neurogenesi, come neurogenina 1,

- geni che innescano l'orientamento verso isole beta-pancreatiche, come ad esempio neurogenina 3,

30 - geni responsabili di un contesto di pro-sopravvivenza all'interno del prodotto "Lipogems", compresi Pim1 e Akt.

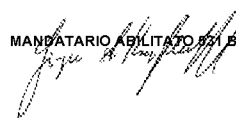
Le azioni vasculogeniche e pro-sopravvivenza



indotte da HBR, insieme con gli effetti antifibrotici
forniti da alcuni dei fattori di crescita indotti da
HBR (cioè VEGF e HGF), si traducono in un esito
favorevole di guarigione in qualsiasi tessuto
5 danneggiato che soffre di condizioni ischemiche e
formazione di cicatrici, in qualsiasi modo derivanti
dai contesti più vari, tra cui malattie
aterosclerotiche o complicazioni del diabete.

E' importante notare che il derivato tissutale
10 preconditionato, in particolare il prodotto
"Lipogems", si insedia all'interno del sito di
iniezione, e che il suo letto vascolare che forma la
frazione vasculo stromale (SVF) stabilisce anastomosi
e connessioni con la vascolarizzazione del ricevente,
15 con conseguente progressivo innesto. Ciò a sua volta
porta ad un progressivo cross-talk tra gli elementi
staminali della frazione vasculo stromale (vale a
dire periciti e cellule staminali mesenchimali) e
l'ambiente ospite. In particolare, tale cross-talk
20 comporterà il rilascio dalla frazione vasculo
stromale di segnali di lunga vita per la
sopravvivenza cellulare, riperfusione, angiogenesi, e
pluripotenza cellulare che "cancelleranno" l'ambiente
ostile del tessuto danneggiato del ricevente.

25 Il ruolo di HBR in questo contesto è cruciale.
Infatti, la sua persistenza dopo l'incubazione
iniziale all'interno del derivato tissutale
trapiantato e la sua successiva internalizzazione
negli elementi cellulari del detto derivato, tramite
30 il recettore ialuronico CD44 (altamente espresso in
periciti e cellule staminali mesenchimali della
frazione vasculo stromale), conduce al rilascio
intracellulare di frazioni esterificate con acido



ialuronico, seguito da innesco ialuronico-mediato dell'interazione del fattore di trascrizione/proteine chinasi (essenziale per la traslocazione e traffico nucleare), l'inibizione acido butirrico-mediata delle
5 deacetilasi istoniche e il rimodellamento della cromatina, e modulazione trascrizionale acido retinoico-mediata (ossia influenzando tutta la suddetta profilazione di espressione genica).

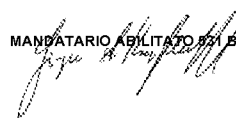
L'espressione guidata da HBR di
10 pluripotenzialità ed orientamento di lineage all'interno della frazione vasculo stromale del derivato tissutale, quale quella del derivato tissutale definito "Lipogems" ha un impatto favorevole sulle dinamiche del tessuto del ricevente
15 in quanto:

- un numero maggiore di elementi della frazione vasculo stromale sono orientati al lineage vascolare, o del miocardio, o neurale, o forniscono un aumento del rilascio di mediatori trofici con proprietà
20 angiogeniche, antiapoptotiche e antifibrotiche;

- l'innesto progressivo del derivato tissutale, in particolare del prodotto "Lipogems" si traduce in un intreccio di segnali di salvataggio dal prodotto stesso e dal ricevente, promuovendo una profilazione
25 cellulare per la sopravvivenza reciproca;

- la creazione di circuiti di sopravvivenza reciproca è la premessa per la sopravvivenza degli elementi orientati a lineage cellulari destinati alla sostituzione o la riparazione del tipo o dei tipi
30 cellulari perduti all'interno del tessuto danneggiato del ricevente.

L'uso di HBR o di una miscela di acido ialuronico, retinoico e butirrico su materiale



cellulare, in particolare sul prodotto "Lipogems" consente di ottenere un recupero ottimale di qualsivoglia tipo di tessuto danneggiato.

5 Il materiale cellulare preconizionato può essere utilizzato non solo per trapianti autologhi ma anche per trapianti in ambienti allogenici.

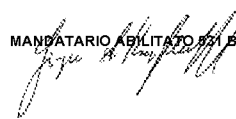
In particolare per il prodotto "Lipogems" umano non espanso è stato sottoposto a trapianto xenogenico in ratti sottoposti ad ischemia cronica degli arti
10 posteriori.

Il trapianto è stato privo di effetti collaterali, è stato ben tollerato dai ratti riceventi.

Dopo 14 giorni, non si sono osservati segni di
15 rigetto immunitario, né infiltrati infiammatori all'esame fisico e istologico.

Il trapianto xenogenico del prodotto "Lipogems" umano offre una rivascularizzazione efficiente e un recupero funzionale nei ratti sottoposti ad ischemia
20 cronica degli arti posteriori, anche con utilizzo del prodotto Lipogems crioconservato. Oltre alla rivascularizzazione si assiste al mantenimento di un trofismo muscolare ottimale, risultato dipendente, all'esame istologico, da una neoformazione di fibre
25 muscolari, verosimilmente a partenza da cellule satelliti del muscolo scheletrico.

I risultati sperimentali dimostrano che il derivato tissutale non espanso definito nella presente invenzione "Lipogems", fresco o
30 crioconservato, sottoposto a riprogrammazione epigenetica e modulazione trascrizionale per via chimica con le modalità oggetto della presente invenzione anche in trapianti allogenici, non ha



portato al rigetto immunitario, né ha portato a
risultati infiammatori locali o sistemici, e ha
indotto una chiara rivascularizzazione e riparazione
del tessuto insieme con la normalizzazione della sua
5 funzione.

Grazie a questi effetti il prodotto cellulare
"Lipogems" costituisce un prodotto nuovo ed
innovativo nel campo della terapia cellulare e della
medicina rigenerativa.

10 Oggetto della presente invenzione è quindi
anche materiale cellulare in particolare cellule
staminali e/o multipotenti non embrionali ottenibili
mediante un procedimento come sopra descritto e l'uso
di dette cellule per la preparazione di un
15 medicamento per la rigenerazione e/o la riparazione
di un tessuto, umano o animale, da utilizzare a scopi
terapeutici ed in medicina rigenerativa per trapianti
autologhe o allogenici.

Oggetto della presente invenzione è altresì
20 l'uso di composto comprendente acido ialuronico
esterificato con acido butirrico e retinoico (HBR)
e/o con un composto comprendente una o più delle sue
frazioni quali acido ialuronico (HA), acido butirrico
(BU) e acido retinoico (RA), essendo dette sostanze
25 previste nel detto composto da sole od in
combinazione con altre sostanze solide o liquide, per
la preparazione di un medicamento comprendente
elementi staminali e multipotenti non embrionali e/o
cellule somatiche non embrionali per la rigenerazione
30 e/o la riparazione di un tessuto, umano o animale, da
utilizzare a scopi terapeutici ed in medicina
rigenerativa per trapianti autologhe o allogenici.



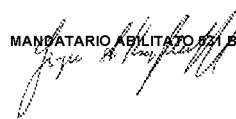
Naturalmente l'invenzione non è limitata alle forme esecutive testé descritte ma può essere ampiamente variata.

Ad esempio è possibile prevedere di
5 precondizionare chimicamente le cellule non solo all'interno di un contenitore ma anche *in vivo* ovvero direttamente sul paziente da trattare in modo da variare la potenza delle stesse già all'interno del tessuto in cui si trovano.

10 In questo caso la o le molecole od il composto contenente detta o dette molecole ossia acido ialuronico esterificato con acido butirrico e retinoico (HBR), acido ialuronico (HA), acido butirrico (BU) e acido retinoico (RA), saranno
15 applicate direttamente sulla o nella zona da trattare.

Il trattamento di un tessuto, in particolare di un tessuto danneggiato direttamente sul paziente prevede una o più delle seguenti fasi:

20 a) rimozione dell'ambiente tissutale ostile fibrotico ischemico e apoptotico associato alla inerente condizione di malattia mediante somministrazione, ad esempio iniezione nel tessuto di una o più sostanze chimiche di origine naturale o
25 sintetica per ottenere la riprogrammazione epigenetica chimica e l'espressione di pluripotenzialità di elementi staminali e multipotenti di origine non embrionale, quali periciti e/o cellule staminali mesenchimali, e/o
30 cellule somatiche adulte, in particolare mediante somministrazione nel tessuto di un composto comprendente acido ialuronico esterificato con acido butirrico e retinoico (HBR) e/o con un composto



comprendente una o più delle sue frazioni quali acido ialuronico (HA), acido butirrico (BU) e acido retinoico (RA), essendo dette sostanze previste nel detto composto da sole od in combinazione con altre
5 sostanze solide o liquide; ad esempio viene iniettato HBR, e/o una miscela di acido ialuronico e/o acido butirrico e/o retinico;

b) trapianto, in condizioni autologhe o allogeniche, con materiale cellulare preconizionato
10 secondo la presente invenzione.

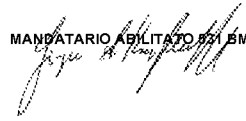
Preferibilmente il trapianto è eseguito con il derivato tissutale non espanso definito "Lipogems" preconizionato ex vivo (1-2 ore, o meno) con HBR, o una miscela di HA, BU, e RA.

15 Il materiale cellulare preconizionato ed utilizzato per il trapianto, in particolare il prodotto "Lipogems" preconizionato, può essere preparato fresco o crioconservato inizialmente.

20 Il materiale cellulare preconizionato ed utilizzato per il trapianto, in particolare il prodotto "Lipogems" preconizionato, può essere ottenuto da donatori vivi o da cadaveri, umani o animali.

25 Il materiale cellulare preconizionato ed utilizzato per il trapianto, in particolare il prodotto "Lipogems" preconizionato, può essere utilizzato per uso autologo o allogenico.

c) somministrazione nel materiale cellulare trapiantato secondo la fase b) e/o nel tessuto
30 circostante di una o più sostanze chimiche di origine naturale o sintetica per ottenere la riprogrammazione epigenetica chimica e l'espressione di pluripotenzialità di elementi staminali e

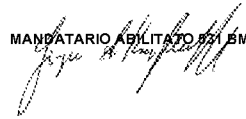


5 multipotenti di origine non embrionale, quali periciti e/o cellule staminali mesenchimali, e/o cellule somatiche adulte, in particolare mediante somministrazione nel tessuto di un composto
10 comprendente acido ialuronico esterificato con acido butirrico e retinoico (HBR) e/o con un composto comprendente una o più delle sue frazioni quali acido ialuronico (HA), acido butirrico (BU) e acido retinoico (RA), essendo dette sostanze previste nel detto composto da sole od in combinazione con altre sostanze solide o liquide.

15 La fase c) costituisce una ottimizzazione post-trapianto *in vivo* della risposta tissutale e/o il potenziale salvataggio degli elementi multipotenti contenuti nella frazione vasculo stromale SFV del prodotto trapiantato "Lipogems" tramite iniezione nel tessuto di HBR, e/o una miscela di acido ialuronico, acido butirrico e/o retinico.

20 Nel complesso, l'iniezione pre-e post-trapianto di HBR, e/o la miscela di acido ialuronico e/o acido butirrico e/o retinico, aumenterà il potenziale di rigenerazione del materiale utilizzato per il trapianto, in particolare secondo una forma esecutiva della presente invenzione, aumenterà il potenziale di
25 rigenerazione associato al prodotto "Lipogems" precondizionato, rafforzando il cross-talk di segnalazione tra il prodotto trapiantato e il tessuto ricevente, massimizzando l'azione di HBR o dell'acido ialuronico, acido butirrico e/o retinico,
30 eventualmente rilasciati dallo stesso prodotto "Lipogems" precondizionato.

E' stato dimostrato che il recupero del tessuto è correlato alla capacità di HBR di migliorare la



densità capillare e la perfusione miocardica, di promuovere l'assunzione di cellule staminali mesenchimali endogene al sito del danno, di diminuire il numero di cardiomiociti apoptotici, di diminuire
5 notevolmente il grado di tessuti danneggiati. Tali effetti positivi sono stati mediati a livello trascrizionale.

Secondo la presente invenzione è quindi possibile ottenere chimicamente non solo il
10 preconditionamento, ossia una riprogrammazione epigenetica ed una modulazione trascrizionale, di cellule, derivati tissutali e/o tessuti da utilizzare per trapianti autologhi o allogenicici ma anche il
preconditionamento del tessuto ricevente con evidenti
15 effetti benefici sul processo di guarigione.

Riferimenti

1. Cherry AB, Daley GQ. Reprogramming cellular
20 identity for regenerative medicine. Cell. 2012 Mar 16;148(6):1110-22.

2. Ang YS, Gaspar-Maia A, Lemischka IR, Bernstein E. Stem cells and reprogramming: breaking the epigenetic barrier? Trends Pharmacol Sci. 2011
25 Jul;32(7):394-401.

3. Barrero MJ, Izpisua Belmonte JC. Regenerating the epigenome. EMBO Rep. 2011 Mar;12(3):208-15.

4. Shafa M, Krawetz R, Rancourt DE. Returning
30 to the stem state: epigenetics of recapitulating pre-differentiation chromatin structure. Bioessays. 2010 Sep;32(9):791-9.

5. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 2007 Nov 30;131(5):861-72.

5 6. Ventura C, Maioli M, Asara Y, Santoni D, Scarlata I, Cantoni S, Perbellini A. Butyric and retinoic mixed ester of hyaluronan. A novel differentiating glycoconjugate affording a high throughput of cardiogenesis in embryonic stem cells. J Biol Chem. 2004 May 28;279(22):23574-9.

10 7. Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, Lionetti V, Cavallini C, Scarlata I, Foroni L, Maioli M, Bonsi L, Alviano F, Fossati V, Bagnara GP, Pasquinelli G, Recchia FA, Perbellini A. Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic Acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. J Biol Chem. 2007 May 11;282(19):14243-52.

20 8. Simioniuc A, Campan M, Lionetti V, Marinelli M, Aquaro GD, Cavallini C, Valente S, Di Silvestre D, Cantoni S, Bernini F, Simi C, Pardini S, Mauri P, Neglia D, Ventura C, Pasquinelli G, Recchia FA. Placental stem cells pre-treated with a hyaluronan mixed ester of butyric and retinoic acid to cure infarcted pig hearts: a multimodal study. Cardiovasc Res. 2011 Jun 1;90(3):546-56.

30 9. Lionetti V, Cantoni S, Cavallini C, Bianchi F, Valente S, Frascari I, Olivi E, Aquaro GD, Bonavita F, Scarlata I, Maioli M, Vaccari V, Tassinari R, Bartoli A, Recchia FA, Pasquinelli G, Ventura C. Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic acid affording myocardial survival and

repair without stem cell transplantation. J Biol Chem. 2010 Mar 26;285(13):9949-61.

10. Wheatley SC, Isacke CM, Crossley PH. Restricted expression of the hyaluronan receptor, CD44, during postimplantation mouse embryogenesis suggests key roles in tissue formation and patterning. Development. 1993 Oct;119(2):295-306.

11. Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T, Biesterfeldt J, Augustine ML, Calabro A Jr, Kubalak S, Klewer SE, McDonald JA. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. J Clin Invest. 2000 Aug;106(3):349-60.

12. Takahashi Y, Li L, Kamiryo M, Asteriou T, Moustakas A, Yamashita H, Heldin P. Hyaluronan fragments induce endothelial cell differentiation in a CD44- and CXCL1/GRO1-dependent manner. J Biol Chem. 2005 Jun 24;280(25):24195-204.

13. Savani RC, Cao G, Pooler PM, Zaman A, Zhou Z, DeLisser HM. Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. J Biol Chem. 2001 Sep 28;276(39):36770-8.

14. Tammi R, Rilla K, Pienimaki JP, MacCallum DK, Hogg M, Luukkonen M, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan enters keratinocytes by a novel endocytic route for catabolism. J Biol Chem. 2001 Sep 14;276(37):35111-22.

15. Majumdar M, Meenakshi J, Goswami SK, Datta K. Hyaluronan binding protein 1 (HABP1)/C1QBP/p32 is an endogenous substrate for MAP kinase and is translocated to the nucleus upon mitogenic

stimulation. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Mar 8;291(4):829-37.

16. Grammatikakis N, Grammatikakis A, Yoneda M, Yu Q, Banerjee SD, Toole BP. A novel glycosaminoglycan-binding protein is the vertebrate homologue of the cell cycle control protein, Cdc37. J Biol Chem. 1995 Jul 7;270(27):16198-205.

17. Wolffe AP, Pruss D. Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. Cell. 1996 Mar 22;84(6):817-9.

18. Illi B, Scopece A, Nanni S, Farsetti A, Morgante L, Biglioli P, Capogrossi MC, Gaetano C. Epigenetic histone modification and cardiovascular lineage programming in mouse embryonic stem cells exposed to laminar shear stress. Circ Res. 2005 Mar 18;96(5):501-8.

19. Kastner P, Grondona JM, Mark M, Gansmuller A, LeMeur M, Decimo D, Vonesch JL, Dollé P, Chambon P. Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. Cell. 1994 Sep 23;78(6):987-1003.

20. Sucov HM, Dyson E, Gumeringer CL, Price J, Chien KR, Evans RM. RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. Genes Dev. 1994 May 1;8(9):1007-18.

21. Wobus AM, Kaomei G, Shan J, Wellner MC, Rohwedel J, Ji Guanju, Fleischmann B, Katus HA, Hescheler J, Franz WM. Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol. 1997 Jun;29(6):1525-39.

22. Lai L, Bohnsack BL, Niederreither K, Hirschi KK. Retinoic acid regulates endothelial cell proliferation during vasculogenesis. *Development*. 2003 Dec;130(26):6465-74.
- 5 23. Dilworth FJ, Fromental-Ramain C, Yamamoto K, Chambon P. ATP-driven chromatin remodeling activity and histone acetyltransferases act sequentially during transactivation by RAR/RXR *In vitro*. *Mol Cell*. 2000 Nov;6(5):1049-58.
- 10 24. Cavallari G, Olivi E, Bianchi F, Neri F, Foroni L, Valente S, Manna GL, Nardo B, Stefoni S, Ventura C. MESENCHYMAL STEM CELLS AND ISLET CO-TRANSPLANTATION IN DIABETIC RATS: IMPROVED ISLET GRAFT REVASCULARIZATION AND FUNCTION BY HUMAN ADIPOSE
- 15 TISSUE-DERIVED STEM CELLS PRECONDITIONED WITH NATURAL MOLECULES. *Cell Transplant*. 2012 Apr 2. [Epub ahead of print].



RIVENDICAZIONI

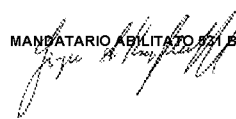
1. Procedimento di precondizionamento chimico di materiale cellulare per ottenere la riprogrammazione epigenetica chimica e l'espressione di pluripotenzialità di elementi staminali e multipotenti di origine non embrionale, quali periciti e/o cellule staminali mesenchimali, e/o cellule somatiche adulte caratterizzato dal fatto di comprendere la fase di sottoporre un derivato tissutale non espanso comprendente detti elementi staminali e multipotenti, e/o di sottoporre cellule staminali non embrionali e/o cellule somatiche non embrionali, ottenute da un campione di tessuto o da detto derivato, a miscelazione con una o più sostanze chimiche di origine naturale o sintetica.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che detta o dette sostanze svolgono una o più delle seguenti funzioni:

- aumento della acetilazione istonica, con conseguente rimodellamento della cromatina e una maggiore accessibilità del fattore di trascrizione ai domini di cromatina bersaglio;

- aumento della trascrizione dei geni associati alla pluripotenzialità delle cellule staminali, quali Oct3/4, Nanog, Sox2 e altri membri di questa famiglia, Klf4;

- aumento della trascrizione di diversi geni tessuto-specifici, insieme con i geni legati a pluripotenza, quali Mef2C, Tbx5, e geni coinvolti in cardiogenesi, come prodinorfina, Gata4, Nkx2.5, geni coinvolti in vasculogenesi, come VEGF, HGF, KDR, geni coinvolti in neurogenesi, come neurogeninal1, geni che innescano l'orientamento verso isole beta-



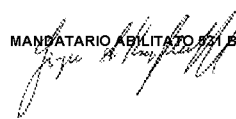
pancreatiche, come neurogenina3, geni responsabili di un contesto di pro-sopravvivenza all'interno di un derivato tissutale, compresi Pim1 e Akt.

3. Procedimento secondo la rivendicazione 1 o 2
5 caratterizzato dal fatto di comprendere la fase di miscelazione con un composto comprendente acido ialuronico esterificato con acido butirrico e retinoico (HBR) e/o con un composto comprendente una o più delle sue frazioni quali acido ialuronico (HA),
10 acido butirrico (BU) e acido retinoico (RA), essendo dette sostanze previste nel detto composto da sole od in combinazione con altre sostanze solide o liquide.

4. Procedimento secondo una o più delle precedenti rivendicazioni caratterizzato dal fatto
15 che l'acido ialuronico esterificato con acido butirrico e retinoico (HBR) è miscelato in un ampio range di dosi, preferibilmente, comprese tra 0,5 e 2,5 mg/l.

5. Procedimento secondo una o più delle precedenti rivendicazioni caratterizzato dal fatto
20 che detta miscelazione in vitro tra materiale cellulare con una o più sostanze chimiche di origine naturale o sintetica ha una durata preferibilmente compresa tra 1 o 2 ore, comunque modulabile in base
25 alla ottimizzazione del differenziamento verso determinati lineage specifici.

6. Procedimento secondo una o più delle precedenti rivendicazioni caratterizzato dal fatto
che detta o dette sostanze di origine naturale o
30 sintetica, quali acido ialuronico esterificato con acido butirrico e retinoico (HBR) e/o le sue frazioni quali acido ialuronico (HA), acido butirrico (BU) e acido retinoico (RA), sono disciolte in soluzione



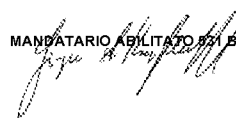
fisiologica e/o in soluzioni tampone, e/o sono sottoposte a incapsulamento in contenitori biologici quali nanocapsule o nanofilm multistrato biodegradabili, contenitori nanocolloidali e/o
5 costituiti da nanoparticelle o in qualsiasi altra entità nano-strutturata adatta ad ottenere il rilascio efficace di dette sostanze sia a livello intracellulare che a livello tissutale.

7. Procedimento secondo una o più delle
10 precedenti rivendicazioni, caratterizzato dal fatto di comprendere le fasi di:

a) preparare un derivato tissutale non espanso a partire da una "manipolazione minima", non-enzimatica, del tessuto di origine, quale
15 lipoaspirato, essendo detto derivato inteso come costituito da aggregati di cellule del tessuto di origine, quali adipociti nel caso di lipoaspirato, circondati da una componente vasculo-stromale contenente cellule staminali e/o elementi
20 multipotenti quali periciti e cellule staminali mesenchimali;

b) in alternativa od in combinazione alla fase a), preparare una sospensione cellulare a partire da un campione di tessuto o dal derivato di cui alla
25 fase a), recuperare le cellule staminali e/o le cellule somatiche adulte da detta sospensione cellulare;

c) sottoporre dette cellule staminali e/o le cellule somatiche adulte del derivato tissutale od
30 ottenute da un campione di tessuto o dal derivato di cui alla fase a), a miscelazione con una o più sostanze chimiche di origine naturale o sintetica, in particolare con un composto comprendente acido



ialuronico esterificato con acido butirrico e retinoico (HBR) e/o con un composto comprendente una o più delle sue frazioni quali acido ialuronico (HA), acido butirrico (BU) e acido retinoico (RA), essendo
5 dette sostanze previste nel detto composto da sole od in combinazione con altre sostanze solide o liquide.

8. Procedimento secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto che il tessuto comprende materiale adiposo estratto, ad esempio, tramite
10 liposuzione/lipoaspirazione, la fase b) del procedimento prevedendo di trattare enzimaticamente il materiale adiposo per il rilascio delle cellule staminali e/o delle cellule somatiche dopo eventuale riduzione del tessuto adiposo in parti più piccole.

9. Procedimento secondo una o più delle precedenti rivendicazioni, caratterizzato dal fatto che il tessuto comprende tessuto adiposo per trapianto ottenuto da materiale adiposo lobulare estratto, ad esempio, tramite
20 liposuzione/lipoaspirazione, essendo il detto materiale adiposo costituito da una componente fluida comprendente una componente oleosa, una componente ematica e/o soluzioni sterili e da una componente solida comprendente strutture vasculo-stromali,
25 frammenti cellulari e/o uno o più macroagglomerati cellulari di dimensioni eterogenee tra loro e comprendenti cellule staminali, il procedimento prevedendo la fase di suddivisione del detto materiale adiposo in agglomerati cellulari di
30 dimensioni minori rispetto alle dimensioni dei detti macroagglomerati, in modo tale che detti agglomerati cellulari e/o vasculo-stromali abbiano dimensioni pari o minori rispetto ad un determinato valore, e in



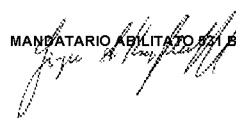
modo tale che dette dimensioni siano mediamente uguali tra loro, la fase di sottoporre dette cellule/agglomerati a miscelazione con una o più sostanze chimiche di origine naturale o sintetica avvenendo per tutta la durata del procedimento o per solo una parte di esso o alla fine del procedimento.

10. Procedimento secondo la rivendicazione 9, caratterizzato dal fatto che, in alternativa o in combinazione alla fase di suddivisione, prevede almeno una fase di lavaggio degli aggregati cellulari eseguito contestualmente ad una fase di separazione della componente fluida dalla componente solida, la fase di sottoporre dette cellule/agglomerati a miscelazione con una o più sostanze chimiche di origine naturale o sintetica avvenendo per tutta la durata del procedimento o per solo una parte di esso o alla fine del procedimento.

11. Cellule staminali e/o multipotenti non embrionali ottenibili mediante un procedimento secondo una o più delle precedenti rivendicazioni.

12. Uso di cellule secondo la rivendicazione precedente per la preparazione di un medicamento per la rigenerazione e/o la riparazione di un tessuto, umano o animale da utilizzare a scopi terapeutici ed in medicina rigenerativa per trapianti autologhe o allogenici.

13. Uso di composto comprendente acido ialuronico esterificato con acido butirrico e retinoico (HBR) e/o con un composto comprendente una o più delle sue frazioni quali acido ialuronico (HA), acido butirrico (BU) e acido retinoico (RA), essendo dette sostanze previste nel detto composto da sole od in combinazione con altre sostanze solide o liquide,



per la preparazione di un medicamento comprendente
elementi staminali e multipotenti non embrionali e/o
cellule somatiche non embrionali per la rigenerazione
e/o la riparazione di un tessuto, umano o animale, da
5 utilizzare a scopi terapeutici ed in medicina
rigenerativa per trapianti autologhe o allogenici

14. Procedimento per il trattamento di un
tessuto a scopo costruttivo o rigenerativo su
paziente caratterizzato dal fatto di comprendere una
10 o più delle seguenti fasi:

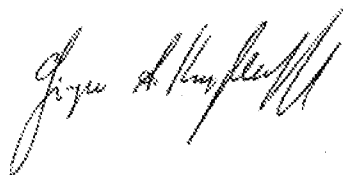
a) rimozione dell'ambiente tissutale ostile,
quale tessuto fibrotico, ischemico e apoptotico,
associato alla condizione di malattia mediante
somministrazione nel tessuto di una o più sostanze
15 chimiche di origine naturale o sintetica per ottenere
la riprogrammazione epigenetica chimica e
l'espressione di pluripotenzialità di elementi
staminali e multipotenti di origine non embrionale,
quali periciti e/o cellule staminali mesenchimali,
20 e/o cellule somatiche adulte, in particolare mediante
somministrazione nel tessuto di un composto
comprendente acido ialuronico esterificato con acido
butirrico e retinoico (HBR) e/o con un composto
comprendente una o più delle sue frazioni quali acido
25 ialuronico (HA), acido butirrico (BU) e acido
retinoico (RA), essendo dette sostanze previste nel
detto composto da sole od in combinazione con altre
sostanze solide o liquide;

b) trapianto, in condizioni autologhe o
30 allogeniche, di materiale cellulare preconditionato
secondo una o più delle precedenti rivendicazioni da
1 a 9;

c) somministrazione nel materiale cellulare trapiantato secondo la fase b) e/o nel tessuto circostante di una o più sostanze chimiche di origine naturale o sintetica per ottenere la
5 riprogrammazione epigenetica chimica e l'espressione di pluripotenzialità di elementi staminali e multipotenti di origine non embrionale, quali periciti e/o cellule staminali mesenchimali, e/o cellule somatiche adulte, in particolare mediante
10 somministrazione nel tessuto di un composto comprendente acido ialuronico esterificato con acido butirrico e retinoico (HBR) e/o con un composto comprendente una o più delle sue frazioni quali acido ialuronico (HA), acido butirrico (BU) e acido
15 retinoico (RA), essendo dette sostanze previste nel detto composto da sole od in combinazione con altre sostanze solide o liquide.

P.I. LIPOGEMS INTERNATIONAL SRL

20 Giorgio A. Karaghiosoff
Mandatario Abilitato
Iscritto al N. 531 BM



25

Numero domanda (Application N.) GE2012A000102 del
(filed on) 25.10.2012

CLAIMS

5

1. Chemical preconditioning process for cell material to obtain chemical epigenetic reprogramming and pluripotency expression of stem and multipotent elements of non-embryonic origin, such as pericytes and/or mesenchymal stem cells, and/or adult somatic cells characterized in that it comprises the step of subjecting a non-expanded tissue derivative comprising said stem and multipotent elements, and/or of subjecting non-embryonic stem cells and/or non-embryonic somatic cells, obtained from a tissue sample or from said derivative, to a mixing with one or more chemical substances of natural or synthetic origin.

10

15

2. Process according to claim 1, characterized in that said substance or substances perform one or more of the following functions:

20

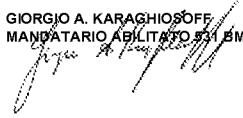
- increase of histone acetylation, with consequent remodeling of chromatin and a higher accessibility of the transcription factor to chromatin target domains;

25

- increase of the transcription of genes associated to pluripotency of stem cells, such as Oct3/4, Nanog, Sox2 and other members of such family, Klf4;

30

- increase of the transcription of different tissue-specific genes, together with genes related to pluripotency, such as Mef2C, Tbx5, and genes involved in cardiogenesis, such as prodynorphin, Gata4, Nkx2.5, genes involved in vasculogenesis, such as



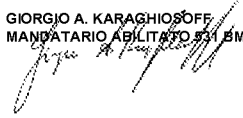
VEGF, HGF, KDR, genes involved in neurogenesis, such as neurogenin1, genes that trigger the orientation to beta-pancreatic islets, such as neurogenin3, genes responsible for a pro-survival context in a tissue derivative, including Pim1 and Akt.

3. Process according to claim 1 or 2 characterized in that it comprises the step of mixing with a compound comprising hyaluronic acid esterified with butyric and retinoic acid (HBR) and/or with a compound comprising one or more of its fractions such as hyaluronic acid (HA), butyric acid (BU) and retinoic acid (RA), said substances being provided in said compound alone or in combination with other solid or liquid substances.

4. Process according to one or more of the preceding claims, characterized in that the hyaluronic acid esterified with butyric and retinoic acid (HBR) is mixed within a wide range of doses, preferably, from 0.5 to 2.5 mg/l.

5. Process according to one or more of the preceding claims, characterized in that said mixing in-vitro between the cell material and one or more chemical substances of natural or synthetic origin has a length preferably ranging from 1 to 2 hours, anyway it being modulatable on the basis of the optimization of the differentiation to particular specific lineages.

6. Process according to one or more of the preceding claims, characterized in that said substance or substances of natural or synthetic origin, such as hyaluronic acid esterified with butyric and retinoic acid (HBR) and/or its fractions such as hyaluronic acid (HA), butyric acid (BU) and



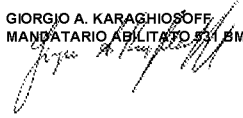
retinoic acid (RA), are dissolved in physiological solution and/or buffer solutions, and/or are subjected to encapsulation into biological containers such as biodegradable multilayer nanofilms or nanocapsules, nanocolloidal containers and/or composed of nanoparticles or into any other nano-structured entity suitable for achieving the effective release of said substances both at intracellular level and at tissue level.

7. Process according to one or more of the preceding claims, characterized in that it comprises the steps of:

a) preparing a non-expanded tissue derivative from non-enzymatical "minimal manipulation", of the original tissue, as lipoaspirate, said derivative being intended as composed of aggregates of cells of the original tissue, such as adipocytes in case of lipoaspirate, encompassed by a vascular-stromal component containing stem cells and/or multipotent elements such as pericytes and mesenchymal stem cells;

b) as an alternative or in combination to step a), preparing a cell suspension from a tissue sample or from the derivative as of step a), collecting the stem cells and/or adult somatic cells from said cell suspension;

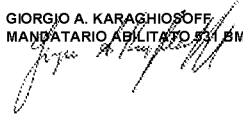
c) subjecting said stem cells and/or adult somatic cells of the tissue derivative or obtained from a tissue sample or from the derivative as of step a), to a mixing with one or more chemical substances of natural or synthetic origin, particularly with a compound comprising hyaluronic acid esterified with butyric and retinoic acid (HBR)



and/or with a compound comprising one or more of its fractions such as hyaluronic acid (HA), butyric acid (BU) and retinoic acid (RA), said substances being provided in said compound alone or in combination
5 with other solid or liquid substances.

8. Process according to claim 7, characterized in that the tissue comprises fat material extracted, for example, by liposuction/lipoaspiration, step b) of the process providing the fat material to be
10 enzymatically treated for releasing stem cells and/or somatic cells after possibly reducing the fat tissue into smaller portions.

9. Process according to one or more of the preceding claims, characterized in that the tissue
15 comprises transplantation fat tissue obtained from lobular fat material extracted, for example, by liposuction/lipoaspiration, said fat material being composed of a fluid component comprising a oil component, a hematic component and/or sterile
20 solutions and of a solid component comprising vascular-stromal structures, cell fragments and/or one or more cell macroagglomerates of heterogeneous size and comprising stem cells, the process providing the step of dividing said fat material into cell
25 agglomerates with a smaller size than the size of said macroagglomerates, such that said cell and/or vascular-stromal agglomerates have a size equal to or smaller than a predetermined value, and such that said sizes are on average equal to one another, the
30 step subjecting said cells/agglomerates to a mixing with one or more chemical substances of natural or synthetic origin being carried out for all the length of the process or only for a part thereof or at the



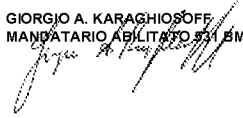
end of the process.

10. Process according to claim 9, characterized
in that as an alternative or in combination with the
division step, it provides at least one step washing
5 the cell aggregates which is carried out
contemporaneously with a step separating the fluid
component from the solid component, the step
subjecting said cells/agglomerates to a mixing with
one or more chemical substances of natural or
10 synthetic origin being carried out for all the length
of the process or only for a part thereof or at the
end of the process.

11. Non-embryonic stem and/or multipotent cells
obtainable by a process according to one or more of
15 the preceding claims.

12. Use of cells according to the preceding
claim for preparing a drug for regenerating and/or
reparing an animal or human tissue to be used for
therapeutic purposes and in regenerative medicine for
20 allogeneic or autologous transplants.

13. Use of a compound comprising hyaluronic acid
esterified with butyric and retinoic acid (HBR)
and/or a compound comprising one or more of its
fractions such as hyaluronic acid (HA), butyric acid
25 (BU) and retinoic acid (RA), said substances being
provided in said compound alone or in combination
with other solid or liquid substances, for preparing
a drug comprising non-embryonic multipotent and stem
cells and/or non-embryonic somatic cells for
30 regenerating and/or repairing an animal or human
tissue to be used for therapeutic purposes and in
regenerative medicine for allogeneic or autologous
transplants.

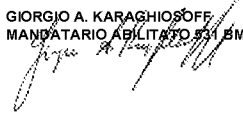


14. Process for treating a tissue for construction or regenerative purpose on a patient characterized in that it comprises one or more of the following steps:

5 a) removing the hostile tissue environment, such as fibrotic, ischemic and apoptotic tissue, associated to the disease condition by administering in the tissue one or more chemical substances of natural or synthetic origin to obtain the chemical
10 epigenetic reprogramming and pluripotency expression of stem and multipotent elements of non-embryonic origin, such as pericytes and/or mesenchymal stem cells, and/or adult somatic cells, particularly by administering in the tissue a compound comprising
15 hyaluronic acid esterified with butyric and retinoic acid (HBR) and/or with a compound comprising one or more of its fractions such as hyaluronic acid (HA), butyric acid (BU) and retinoic acid (RA), said substances being provided in said compound alone or
20 in combination with other solid or liquid substances;

b) transplanting, under allogeneic or autologous conditions, cell material preconditioned according to one or more of the preceding claims from 1 to 9;

25 c) administering in the cell material transplanted according to step b) and/or in the surrounding tissue one or more chemical substances of natural or synthetic origin to obtain chemical
30 epigenetic reprogramming and pluripotency expression of stem and multipotent elements of non-embryonic origin, such as pericytes and/or mesenchymal stem cells, and/or adult somatic cells, particularly by administering in the tissue a compound comprising

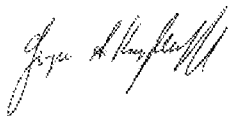


hyaluronic acid esterified with butyric and retinoic acid (HBR) and/or with a compound comprising one or more of its fractions such as hyaluronic acid (HA), butyric acid (BU) and retinoic acid (RA), said
5 substances being provided in said compound alone or in combination with other solid or liquid substances.

E' traduzione esattamente conforme all'originale

PI LIPOGEMS INTERNATIONAL SRL

Giorgio A. Karaghiosoff
Mandatario Abilitato
Iscritto al N. 531 BM



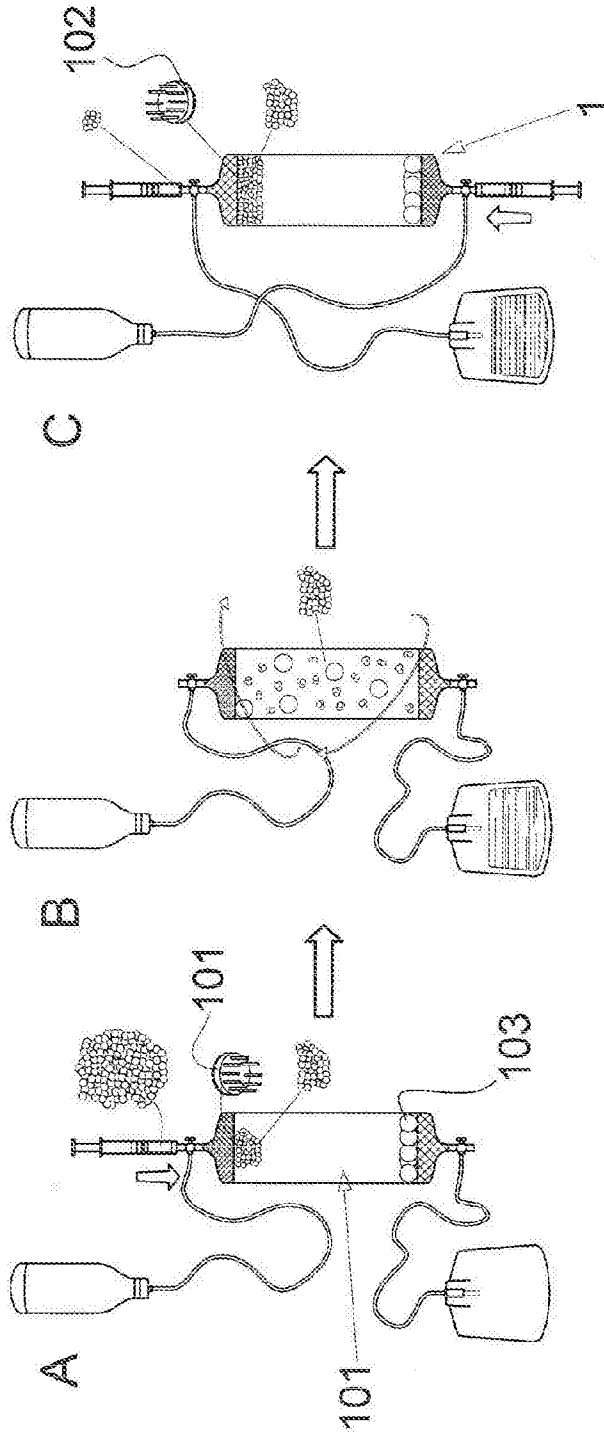
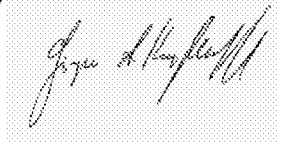


Fig.1

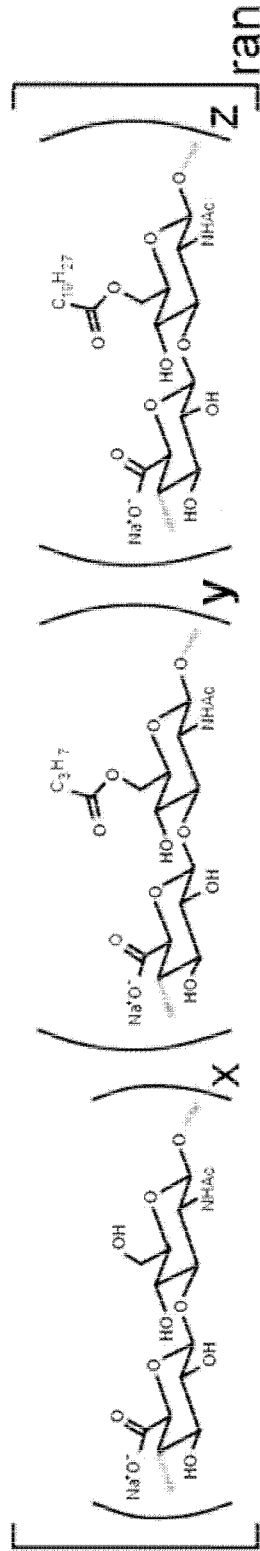
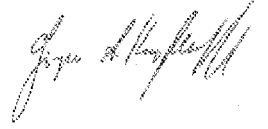


Fig.2