



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

UIBM

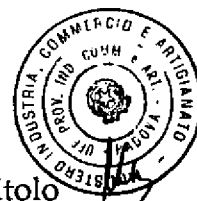
DOMANDA NUMERO	101995900437316
Data Deposito	27/04/1995
Data Pubblicazione	27/10/1996

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	08	B		

Titolo

PELLE ARTIFICIALE UMANA COSTITUITA DA MATERIALI BIOCOMPATIBILI A BASE DI
DERIVATI DELL'ACIDO IALURONICO

PD 95 A 0 0 0 0 8 3



Descrizione di una domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo
"Pelle artificiale umana costituita da materiali biocompatibili a base di derivati
dell'acido ialuronico" della Fidia Advanced Biopolymers S.r.l. con sede in Via
De' Carpentieri, 3 - 72100 Brindisi, Italia, nella persona del suo Legale
Rappresentante e Consigliere Delegato, Dr. Lanfranco Callegaro.

Inventori: Soranzo Carlo

Abatangelo Giovanni

Callegaro Lanfranco

Depositata il con n°

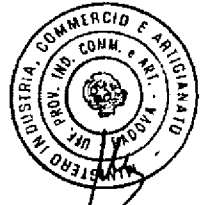
OGGETTO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione descrive la preparazione di una pelle artificiale, costituita da un'epidermide completamente differenziata e da un annesso dermico, a partire da due materiali biocompatibili a base di derivati dell'acido ialuronico (HA). Il prodotto così risultante è costituito da una membrana perforata a base dell'estere benzilico dell'acido ialuronico sulla quale sono stati seminati cheratinociti umani (kc) e sotto di essa viene posto un tessuto non-tessuto, a base di estere benzilico dell'acido ialuronico, all'interno del quale sono stati seminati e fatti proliferare fibroblasti umani.

La pelle artificiale in questo modo ottenuta può essere vantaggiosamente impiegata nei trapianti cutanei in generale, come sistema di veicolazione di farmaci e in diagnostica.

PD 95 A 0 0 0 0 8 3

TECNICA ANTERIORE



Le perdite di materiale cutaneo, dovute a fatti di origine traumatologica o patologica, vengono comunemente risolte impiegando la tecnica dell'autotrapianto, utilizzando cioè espianti di pelle da aree donatrici. Una svolta importante nel trattamento di queste lesioni, mediante terapia chirurgica ricostruttiva, si è verificata con la messa a punto della tecnica per la coltura in vitro di kc (J. Rheinwald and H. Green, Cell, 6:331, 1975), che ha permesso l'espansione in vitro di queste colture, ottenendo membrane di cellule epidermiche potenzialmente idonee alla copertura delle aree lesionate. Questa tecnica è stata ampiamente impiegata in clinica, principalmente nel caso di pazienti ustionati (G.G. Gallico et al, M. Engl. J. Med., 311:448, 1984), ma fin dalle prime applicazioni sono emersi numerosi problemi quali la difficoltà di attecchimento del trapianto, la fragilità della pellicola epiteliale e la conseguente difficoltà di maneggiamento da parte del chirurgo.

Un approccio diverso è stato seguito da Yannas et al (Science, 215:174, 1982), il quale ha impiegato, come sostituti dermici, materiali porosi riassorbibili costituiti da co-precipitati di collagene e glicosaminoglicani (GAG), in particolare il condroitin-6-solfato, ricoperti da una sottile pellicola di membrana siliconica. La caratteristica di tali materiali è quella di presentare pori non standardizzati e intercomunicanti in maniera simile ad una spugna.

S. Boyce e J. Hansbrough (Surgery, 103:421, 1988), hanno descritto l'impiego di membrane formate da collagene e GAG per promuovere la crescita di kc sulla loro superficie, riducendo la porosità superficiale del materiale. Allo scopo di



limitare lo sviluppo della coltura epidermica alla superficie della membrana, viene inoltre interposto uno strato continuo non poroso.

La tecnologia dei trapianti di cute deve considerare inoltre l'interazione tra i kc, la membrana basale ed il derma sottostante. Oggigiorno è generalmente accettato che il trapianto autologo di cute, nel caso di una lesione a tutto spessore, possa essere considerevolmente migliorato attraverso la collocazione, sulla ferita stessa, di un letto dermale sottostante al foglietto epiteliale.

I kc basali risultano così adagiati su di un substrato più fisiologico e possono sviluppare una membrana basale e strutture dermo-epidermiche di giunzione in grado di conferire la necessaria resistenza alla cute trapiantata.

Recenti studi clinici, infatti, suggeriscono come il metodo di Cuono (Langdon et al, J. Invest. Dermatol. 91 5: 478, 1988), in cui la ferita "a tutto spessore" viene trattata con un letto dermale eterologo ricavato da pelle di cadavere, dia migliori risultati in termini di % di attecchimento del trapianto e di qualità globale della cute a guarigione ultimata.

In ogni caso, i tessuti da trapiantare sono di difficile reperimento, costosi nella preservazione e sono possibili vettori di virus patogeni.

Emerge perciò la necessità di trovare dei nuovi sostituti dermici artificiali biodegradabili in grado di evitare tali problemi e, al tempo stesso, soddisfare i seguenti requisiti:

- 1) le loro superfici dovrebbero permettere l'adesione e la crescita cellulare;
- 2) ne' i polimeri tal quali ne' i loro prodotti di degradazione dovrebbero provocare infiammazioni e/o essere tossici qualora impiantati in vivo;

- 3) il manufatto dovrebbe essere costantemente riproducibile nelle tre dimensioni;
- 4) la porosità dovrebbe essere almeno del 90%, al fine di fornire un'elevata area superficiale necessaria alle interazioni cellule-polimero, sufficiente volume per la deposizione di matrice extracellulare e minimi, o nulli, impedimenti migrazionali durante la coltivazione in vitro;
- 5) il polimero di supporto dovrebbe riassorbirsi una volta cessata la funzione di sostegno del tessuto rigenerato. Infatti, materiali estranei, in vivo, mantengono elevato il rischio di infezione e/o infiammazione.

Si è visto, infatti, che i prodotti presenti sul mercato, o in fase di sviluppo, presentano alcuni inconvenienti: la loro degradazione avviene in modo non controllato ed interferisce con il processo di guarigione della ferita, contribuendo a generare infiammazioni. Inoltre, tali sostituti richiedono alte densità di semina delle cellule epiteliali e lungo tempo per la proliferazione sul supporto stesso.

Alcuni esempi dei prodotti ad oggi noti, ed in genere indicati nel trattamento di ustioni gravi, sono:

- 1) Dermagraft, sviluppato dalla ATS (California), in cui fibroblasti umani eterologhi vengono coltivati su un materiale riassorbibile spugnoso costituito da acido poli-lattico, poli-glicolico o poli-galattosidico. Su questi materiali vengono poi seminati i kc autologhi;
- 2) GraftSkin, prodotto da Organogenesis Inc. (Boston, USA), in cui fibroblasti umani eterologhi vengono coltivati su un substrato a base di collagene;



3) AlloDerm, prodotto da Life Cell Corp. (Texas, USA), a base di cute umana o porcina, in cui la membrana basale e la matrice dermica vengono conservate intatte. Tale tessuto viene conservato a bassa temperatura (-80°C), al momento dell'uso viene poi seminato con kc e fibroblasti autologhi e quindi trapiantato nel paziente.

Tuttavia questi, e altri prodotti, non consentono di ottenere la ricostruzione in vitro di una giunzione dermo-epidermica perfettamente funzionale.

E' stato inoltre descritto l'uso di derivati dell'acido ialuronico (EPA n. 0216453) per la preparazione di manufatti idonei, ed in particolar modo di membrane quali supporti per la crescita di kc umani (EPA n. 0462426) e di materiale tessuto non-tessuto (WO 93/11803). Abatangelo et al (Wound Repair and Regeneration, January-March, p. 80, 1995) hanno riportato l'impiego del tessuto non-tessuto come supporto per colture miste fibroblasti-kc umani: pur tuttavia, lo strato epiteliale osservato non era omogeneo a causa della semina dei kc tra le maglie del tessuto non-tessuto, il che comportava uno spessore eccessivamente variabile, in particolar modo, dello strato epiteliale. La degradazione dei polimeri considerati produce principalmente acido ialuronico (HA), il quale è un normale costituente della matrice extracellulare e perciò ha il vantaggio di essere metabolizzato da normali meccanismi cellulari.

Le modificazioni chimiche apportate, inoltre, permettono un tempo di permanenza al sito di impianto notevolmente maggiore rispetto al polimero naturale, pur mantenendo l'interazione recettoriale. A questo proposito, si deve ricordare che il principale recettore dell'HA, denominato CD44, è normalmente espresso nei tessuti epiteliali, ed in particolare negli strati basale



e spinoso dell'epidermide, mentre l'espressione della proteina va decrescendo negli strati superiori fino a scomparire nei kc completamente differenziati (Carter et al, J. Cell. Biol., 113:207, 1991). Inoltre, il ruolo del CD44 nel meccanismo di degradazione dell'HA è ben documentato (Culty et al, J. Cell. Biol., 111:2765, 1990; Underhill, Dev. Biol., 155:324, 1993).

SCOPO DELL'INVENZIONE

Scopo principale della presente invenzione consiste nel mettere a disposizione un nuovo derivato tissutale, in cui siano presenti cellule dello strato dermale e kc, ambedue i tipi cellulari in attiva proliferazione e separati, all'interfaccia, da una matrice proteica avente le caratteristiche della giunzione dermo-epidermica.

Il trovato considerato, grazie alla sua biodegradabilità, conseguente anche al meccanismo recettoriale già richiamato, viene spontaneamente riassorbito in tempi prefissati, lasciando così depositato, al sito della lesione, il tessuto neoformato. Tale tessuto è costituito da strati omogenei dei due componenti cellulari (kc e fibroblasti) e dalla matrice extracellulare. In tal modo si ritiene di migliorare considerevolmente l'esito finale nella guarigione delle ferite, con particolare riferimento ai casi di:

- 1) ustioni profonde di II e III grado;
- 2) ulcere di diversa natura: diabetiche, venose, da decubiti in genere;
- 3) interventi di chirurgia plastica.

Le cellule impiegate nella costituzione finale del manufatto potranno pervenire da autodonazioni o da donazioni eterologhe o da combinazioni delle due. Infatti, una copertura fisiologica di tali ferite, ancorchè composta da cellule

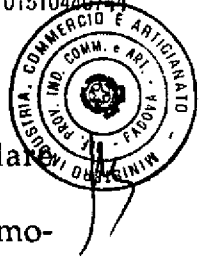


eterologhe, riduce i rischi connessi ad un'eccessiva perdita di liquidi organici di infezione. Inoltre, la presenza del letto dermale proliferante comporta la secrezione di sostanze (ad oggi non completamente note), quali fattori di crescita e citochine, in grado di accelerare la guarigione.

La presente invenzione può essere altresì applicata in trattamenti di terapia genica, in cui cellule di un paziente (kc, fibroblasti o ambedue i tipi) vengono geneticamente modificate, al fine, ad esempio, di correggere malformazioni congenite, quindi seminate sul dispositivo inventato e successivamente reimpiantate nella lesione da trattare. Un ulteriore aspetto della presente invenzione riguarda la possibilità di veicolare farmaci e/o proteine o peptidi biologicamente attivi, mediante adsorbimento di tali sostanze alle fibre del tessuto non-tessuto e/o alla membrana microperforata Laserskin. Tra le proteine si possono considerare i fattori di crescita, quali, ad esempio, FGF (Fibroblast Growth Factors), TGF β (Transforming Growth Factor β), KGF (Keratinocyte Growth Factor), NGF (Nerve Growth Factor), ed altri. In aggiunta, proteine della matrice extracellulare quali, ad esempio, Fibronectina, Laminina, Collagene, possono essere adsorbite alle fibre del tessuto non-tessuto ai fini di migliorare il processo di attecchimento cellulare.

Inoltre, esiste la possibilità di utilizzare la pelle artificiale come un dispositivo atto alla conduzione di test diagnostici in vitro su prodotti e/o sostanze destinate a venire a contatto della cute e quindi utilizzabili in campo chimico, farmaceutico, cosmetico e nel settore dell'agricoltura.

Infine, la pelle artificiale così ottenuta può essere crioconservata a bassa temperatura (-80°C o in azoto liquido); si potrà così disporre di una "banca



tissutale" per trapianti immediati in grado di garantire una capillare distribuzione del prodotto anche in centri non specializzati in colture dermo-epidermiche.

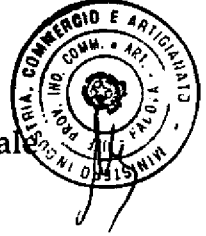
DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La presente invenzione descrive la produzione di un sostituto dermo-epidermico da impiegarsi nei trapianti cutanei ed in situazioni in cui modelli artificiali di cute siano richiesti. Il foglietto epiteliale viene ricostituito seminando kc umani su una membrana microperforata preparata in accordo con la domanda di brevetto EPA 0462426, mentre i fibroblasti umani vengono coltivati su un materiale denominato tessuto non-tessuto e descritto nella domanda di brevetto n. WO 93/11803.

Ambedue i supporti sono costituiti dall'estere benzilico dell'HA, con % di esterificazione che può essere compresa tra il 75% e il 100%. Variando opportunamente la % di esterificazione dei derivati dell'HA impiegati, è possibile controllare la cinetica di degradazione del supporto tissutale e quindi il tempo di permanenza al sito di impianto.

Essi possono essere quindi preparati secondo la seguente procedura:

- 1) I kc (al P1 o dopo scongelamento) vengono dapprima espansi su fiasche di plastica, in accordo con le tradizionali tecniche di coltura, e fondamentalmente secondo quanto descritto da Rheinwald e Green (Cell, 6:331, 1975). Viene utilizzato il terreno di coltura CEC (Green H. et al, J. Proc. Nation. Acad. Sci., 76:5665, 1979) e si impiega un "feeder-layer" di fibroblasti murini 3T3-J2 non proliferanti, la densità di semina dei kc è compresa tra 1000 e 100.000 cell/cm² (preferibilmente tra 5000 e 20.000 cell/cm²), il tempo

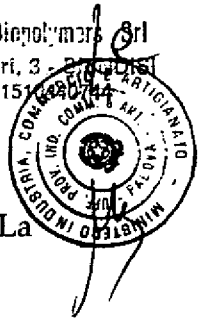


medio di confluenza è di 7-12 gg (circa 15-24 gg dall'allestimento iniziale della coltura).

- 2) I fibroblasti umani, isolati dal derma o da altri distretti mediante le tecniche usuali, vengono coltivati in terreno di DMEM contenente il 10% di siero fetale bovino. Dopo aver condizionato le cellule alla proliferazione in vitro mediante semina su plastica al P1, le cellule vengono quindi seminate nel tessuto non-tessuto; la coltura viene poi protratta per il tempo ritenuto opportuno, in genere fino al trapianto o al congelamento.
- 3) A raggiunta confluenza, il foglietto epiteliale cresciuto sulla membrana microperforata Laserskin™ viene adagiato sul tessuto non-tessuto colonizzato dai fibroblasti, facendo attenzione che i lembi esterni della membrana forata non tocchino il fondo della piastra e, comunque, debordino leggermente rispetto al tessuto non-tessuto sottostante.
- 4) I due suddetti componenti possono essere normalmente fissati l'un l'altro mediante sistemi che prevedono l'impiego di materiali biologici quali, ad esempio, collagene, fibrina o colla di fibrina. Nel caso di trapianti autologhi, il fissante usato potrà essere la fibrina ricavata dal siero del paziente stesso, eliminando così ogni possibile rischio di trasmissione di agenti patogeni non rilevati o sconosciuti.

In alternativa, i due componenti possono essere adagiati l'uno sull'altro per semplice appoggio ed adesione, senza ricorrere a collanti biologici.

- 5) Si aggiunge un volume sufficiente di medium CEC completo, mantenendo la coltura emersa in modo tale che i kc dello strato superiore della membrana Laserskin™ siano disposti all'interfaccia aria-liquido. Al primo



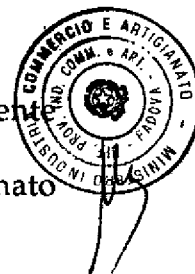
cambio di terreno, ed ai successivi, si aggiunge acido ascorbico (1 µg/ml). La coltura è protratta per altri 15 giorni circa.

E' possibile dimostrare che i kc migrano, attraverso i micropori presenti sulla membrana, nella parte superiore del tessuto non-tessuto direttamente a contatto della membrana, mentre i fibroblasti producono una notevole quantità di matrice extracellulare proteica.

Di notevole interesse è, inoltre, il fatto che i kc approfonditisi nel tessuto non-tessuto, ed a contatto dei fibroblasti, assumono l'aspetto di cellule epiteloidi basali, esprimendo marcatori di membrana tipici delle cellule dello strato basale dell'epidermide. Tra questi, si è esaminata l'espressione del CD44, trovando che la proteina è localizzata negli strati basali più interni del composito e, soprattutto, nelle cellule epiteliali a diretto contatto dello Hyaff 11 (estere benzilico dell'HA), sia in forma di tessuto non-tessuto sia di membrana Laserskin™. Questo suggerisce che il biomateriale, oltre ad avere una funzione di supporto cellulare, interagisce attivamente con le cellule ad esso adese.

Infine, si nota la produzione di proteine specifiche della giunzione dermo-epidermica (laminina, collagene dei tipi III, IV e VII), mentre sul versante "dermale" si riscontra un'abbondante produzione di matrice extracellulare, evidenziata mediante colorazioni specifiche e metodi immunoistologici (vedi esempio applicativo n.1).

Poichè è nota la possibilità di coltivare i kc in terreni in assenza di siero fetale e di substrato nutrizionale ("feeder-layer" di fibroblasti murini), la pelle artificiale oggetto della presente invenzione può essere ottenuta mediante semina contemporanea dei fibroblasti umani nel tessuto non-tessuto e dei kc



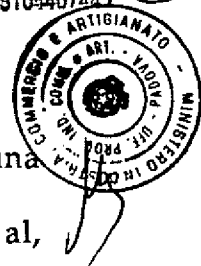
sulla membrana Laserskin™. In tal caso si impiega un terreno "chimicamente definito" adatto alla crescita dei kc, quale, ad esempio, il terreno denominato MCDB 153 commercialmente disponibile. Si procede come segue:

- 1) si seminano i fibroblasti umani sul tessuto non-tessuto secondo le densità di semina prima descritte;
- 2) si adagia la membrana Laserskin™ sul tessuto non-tessuto facendo debordare leggermente la membrana stessa rispetto al tessuto non-tessuto sottostante (la membrana può essere fissata con collanti biologici, oppure mantenuta in sede meccanicamente);
- 3) si seminano i kc umani, secondo le modalità precedenti, sulla membrana Laserskin™;
- 4) si protrae la coltura fino a completa confluenza dei kc sulla membrana Laserskin™;
- 5) si prosegue poi come sopra descritto.

A titolo puramente indicativo, ma non limitativo, vengono riportati alcuni esempi in cui si è caratterizzato il tessuto neo-formato.

Esempio 1

Un pezzo di non-tessuto (1.5 x 1.5 cm) costituito da Hyaff 11 (estere benzilico dell'HA) viene adagiato al fondo di una piastra di coltura e ivi fissato ai quattro angoli mediante colla di fibrina. Fibroblasti umani primari vengono seminati sul non-tessuto (0.1×10^6 cell in 0.2 ml di medium) imbibendo lentamente il non-tessuto stesso. Si copre la piastra e si lascia a riposo per circa 30 min. sotto cappa sterile, quindi si porta al volume di 2 ml con medium DMEN 10% FCS e si colloca la piastra in incubatore a 37°C in atmosfera al 5% in CO₂.

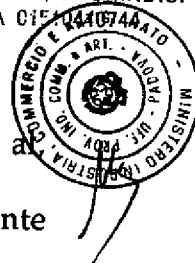


I kc umani, tra il II e il IV passaggio in coltura, vengono seminati su una membrana di Laserskin™ delle dimensioni di 5 x 5 cmq, (Andreassi et al, Wounds 3:116, 1991). I kc possono essere coltivati in medium CEC (Rheiwald and Green, Cell, 6:331, 1975) in presenza di "feeder-layer", oppure in assenza di questo, impiegando però un terreno chimicamente definito (Andreassi et al, Wounds, 3:116, 1991). Sia nella coltura dei fibroblasti, sia nella coltura dei kc, i terreni nutrizionali relativi vengono ripristinati ogni 48-72 ore.

Alla formazione di un foglietto epiteliale ben stratificato, la membrana Laserskin™ viene tagliata sterilmente con un bisturi in pezzi delle dimensioni di 1.5 x 1.5 cm, mentre la coltura fibroblastica sul tessuto non-tessuto viene adagiata su una reticella d'acciaio (alta circa 3 mm), preventivamente sterilizzata; il tutto viene posto in una capsula di Petri del diametro di 6 cm. La lamina epiteliale viene adagiata sopra il tessuto non-tessuto, avendo cura che non rimangano bolle d'aria all'interfaccia tra i due materiali (nell'esempio citato non è stato impiegato alcun collante per fissare la membrana epitelioide al tessuto non-tessuto).

Si aggiunge medium adatto alla crescita dei kc, CEC o MCDB 153, in volume tale che il livello del liquido non imbibisca completamente il tessuto non-tessuto, lasciando però scoperta la faccia superiore del foglietto epiteliale.

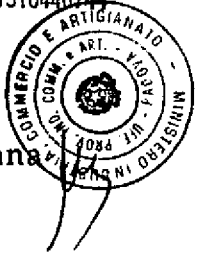
Il medium viene ripristinato ogni 72 ore, al primo cambio di terreno, al fine di favorire la produzione di matrice extracellulare, il medium viene arricchito di acido ascorbico (1 µg/ml). L'emersione della coltura ha lo scopo di mimare la condizione fisiologica della cute; tale condizione costituisce lo stimolo alla differenziazione completa delle cellule epiteliali, come ampiamente riportato



in letteratura (Prunieras et al, J. Invest. Dermatol., 81:280, 1983; Bernstam et al, In vitro Cell. Biol., 22:695, 1986). La coltura viene protratta per 14 gg; durante questo periodo l'osservazione al microscopio in contrasto di fase permette solamente di poter osservare l'espansione dello strato epiteliale oltre i bordi della membrana. L'opacità del materiale, infatti, rende difficili ulteriori osservazioni. Al termine della coltura, il materiale composito viene tagliato a metà con un bisturi, avendo cura di preservarne la struttura. Una parte viene trattata secondo le tradizionali tecniche istologiche (colorazione all'ematossilina-eosina), mentre l'altra viene immersa in OCT (medium per la crioconservazione dei tessuti, Milestones, USA), congelata in azoto liquido e quindi conservata a -80°C. Quest'ultimo materiale viene sezionato al criostato in fettine di 6 µm di spessore, sulle quali verranno poi condotte le indagini immunoistochimiche, impiegando anticorpi contro marcatori dello stato di differenziazione dei kc, della giunzione dermo-epidermica e della matrice extracellulare.

Risultati della colorazione istologica all'ematossilina-eosina

In Figura 1 (x100) si evidenzia un epitelio ben stratificato sopra la membrana microperforata Laserskin™. Lo strato superiore più esterno è in via di corneificazione: sulla parte inferiore della membrana i kc risultano ben distribuiti, avendo colonizzato in misura notevole il tessuto non-tessuto sottostante. Lo strato epiteliale è molto compatto con uno spessore variabile ma di almeno 10-15 cellule. Si nota chiaramente la linea di demarcazione tra lo strato di cellule epiteliali ed i fibroblasti sottostanti. Sono chiaramente visibili



le fibre in sezione del tessuto non-tessuto come pure la membrana microperforata Laserkin™.

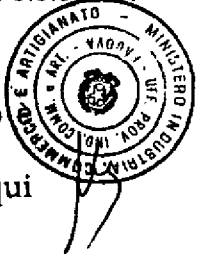
Caratterizzazione Immunoistochimica

Gli studi sui marcatori tissutali sono stati condotti con i seguenti anticorpi:

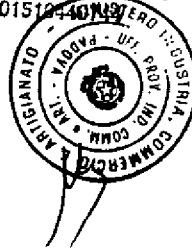
- 1) anticorpo anti-cheratina KL4 (Istituto Dermatologico dell'Immacolata, Roma)
- 2) anticorpo policlonale anti-involucrina (Istituto Dermatologico dell'Immacolata, Roma)
- 3) anticorpo monoclonale anti-integrina umana $\beta 4$ (Istituto Dermatologico dell'Immacolata, Roma)
- 4) anticorpo monoclonale anti-integrina umana $\beta 1$ (Istituto Dermatologico dell'Immacolata, Roma)
- 5) anticorpo monoclonale anti-CD44 umano (prof. Abatangelo, Istituto di Istologia ed Embriologia dell'Università. di Padova)
- 6) anticorpo policlonale anti-collagene III (Chemicon, CA, USA)
- 7) anticorpo policlonale anti-collagene IV (Sigma)
- 8) anticorpo policlonale anti-laminina (Sigma)
- 9) anticorpo policlonale anti-fibronectina (Sigma)

L'indagine immunoistologica ha evidenziato che:

- a) lo strato epiteliale più esterno è ben differenziato ed in via di corneificazione poichè l'immunopositività all'involucrina è molto marcata (Fig. 2, x200)



- b) lo strato cellulare compatto sulla parte superiore del tessuto non-tessuto costituito effettivamente da kc poichè la risposta alla citocheratina è qui molto forte rispetto alla componente fibroblastica sottostante (Fig. 3, x200);
- c) le subunità $\beta 4$ e $\beta 1$ delle integrine sono presenti in quello che si configura come un strato basale del tessuto neo-formato. Tali subunità, e la $\beta 4$ in particolare, sono infatti espresse nell'epidermide a livello della lamina basale, nelle strutture di ancoraggio della lamina stessa al derma sottostante (emidesmosomi). Nella "cute artificiale" qui riprodotta le cellule $\beta 4$ positive (Fig. 4a, x100) esprimono la proteina in modo predominante nella parte basale, mentre l'integrina $\beta 1$ viene espressa nei ponti intercellulari di giunzione tra i kc (Fig. 4b, x100). Le osservazioni qui riportate costituiscono un importante indice di corretta "polarizzazione" dell'epidermide neo-formata.
- d) I kc a diretto contatto delle fibre del tessuto non-tessuto, come pure le cellule a contatto della faccia superiore ed inferiore della Laserskin™, mostrano una marcata immunopositività al CD44 (Fig. 5, x200). Si ritiene che ciò rappresenti una notevole peculiarità della coltura composita qui descritta: il CD44, infatti, può essere in grado di mediare l'adesione delle cellule al materiale (costituito da acido ialuronico modificato), come pure la degradazione di questo.
- e) A livello della lamina basale, e perciò della giunzione dermo-epidermica, si riscontra una matrice extracellulare tipica, i cui componenti sono essenzialmente prodotti dai kc basali residenti nella zona. Marcatori caratteristici sono perciò la laminina ed il collagene di tipo IV e di tipo VII.



A conferma della osservazioni qui riportate, i tre componenti sono espressi a livello della zona di interposizione tra lo strato basale dei kc approfonditisi nel tessuto non-tessuto ed i fibroblasti sottostanti. In particolare l'entità della risposta alla laminina (Fig. 6, x200) è focalizzata su quella che si configura come una vera e propria "lamina basale artificiale".

- f) Infine, sul versante dermale, si riscontra una forte immunopositività alla fibronectina (Fig. 7, x200), che è una proteina della matrice prodotta dai fibroblasti di cui il derma è ovviamente ricco. L'assenza di risposta nello strato epidermico indica di nuovo che si è artificialmente indotta la formazione di un tessuto dermale ben strutturato, con un'architettura tipica della cute.

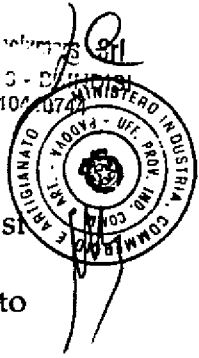
Esempio 2

Allo scopo di dimostrare la possibilità di criopreservare la pelle artificiale così riprodotta, la coltura dermo-epidermica viene congelata in presenza di un agente crioconservante quale il dimetilsolfossido (DMSO), secondo la tecnica usuale. In breve, la coltura viene sollevata e posta in una capsula di Petri del diametro di 10 cm, contenente 20 ml di terreno per il congelamento (45% DMEN, 45% FCS, 10% DMSO) raffreddato a 4°C. Si lascia equilibrare per circa 5 min., quindi la capsula viene portata alla temperatura di -80°C tramite un processo di congelamento in continuo in ragione di -1°C/min, a partire dalla temperatura di 4°C.

Dopo una settimana la "pelle artificiale" viene scongelata, portando velocemente la temperatura a 37°C e lavando più volte la coltura con terreno DMEN 10% FCS, al fine di eliminare completamente il DMSO residuo. Si lascia

PD 95 A 0 0 0 0 8 3

Fidra Alimentare S.p.A.
Via De' Capponi, 3 - 20121 Milano
Partita IVA 01510040724



a riposo per 24 ore in incubatore a 37°C (in atmosfera al 5% CO₂), quindi si procede all'esame istologico ed immunoistologico del tessuto come descritto all'esempio 1.

Risultati

Non sono state riscontrate alterazioni morfologiche e/o strutturali significative rispetto al materiale prima del congelamento.

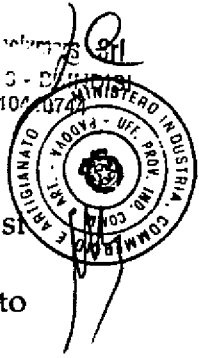
L'insieme di questi risultati indica che la pelle artificiale qui descritta può essere impiegata per la costituzione di "banche tissutali", grazie alla resistenza al congelamento.

RIVENDICAZIONI

- 1) Pelle artificiale umana costituita da materiali biocompatibili a base di derivati dell'acido ialuronico.
- 2) Pelle artificiale umana secondo la rivendicazione 1, in cui i materiali biocompatibili sono costituiti da una membrana microperforata ed un tessuto non-tessuto a base di un estere dell'acido ialuronico.
- 3) Pelle artificiale umana secondo le rivendicazioni 1-2, in cui l'estere dell'acido ialuronico è l'estere benzilico.
- 4) Pelle artificiale umana secondo le rivendicazioni 1-2, in cui la membrana microperforata viene previamente sottoposta alla coltura di cheratinociti umani.
- 5) Pelle artificiale umana secondo le rivendicazioni 1-2, in cui il tessuto non-tessuto viene previamente sottoposto alla coltura di fibroblasti umani.
- 6) Processo per la preparazione di pelle artificiale umana secondo le rivendicazioni 1-5, che prevede la coltura di fibroblasti in un materiale

PD 95 A 0 0 0 0 8 3

Fidra Alimentare S.p.A.
Via De' Capponi, 3 - 20121 Milano
Partita IVA 01510040724



a riposo per 24 ore in incubatore a 37°C (in atmosfera al 5% CO₂), quindi si procede all'esame istologico ed immunoistologico del tessuto come descritto all'esempio 1.

Risultati

Non sono state riscontrate alterazioni morfologiche e/o strutturali significative rispetto al materiale prima del congelamento.

L'insieme di questi risultati indica che la pelle artificiale qui descritta può essere impiegata per la costituzione di "banche tissutali", grazie alla resistenza al congelamento.

RIVENDICAZIONI

- 1) Pelle artificiale umana costituita da materiali biocompatibili a base di derivati dell'acido ialuronico.
- 2) Pelle artificiale umana secondo la rivendicazione 1, in cui i materiali biocompatibili sono costituiti da una membrana microperforata ed un tessuto non-tessuto a base di un estere dell'acido ialuronico.
- 3) Pelle artificiale umana secondo le rivendicazioni 1-2, in cui l'estere dell'acido ialuronico è l'estere benzilico.
- 4) Pelle artificiale umana secondo le rivendicazioni 1-2, in cui la membrana microperforata viene previamente sottoposta alla coltura di cheratinociti umani.
- 5) Pelle artificiale umana secondo le rivendicazioni 1-2, in cui il tessuto non-tessuto viene previamente sottoposto alla coltura di fibroblasti umani.
- 6) Processo per la preparazione di pelle artificiale umana secondo le rivendicazioni 1-5, che prevede la coltura di fibroblasti in un materiale



denominato tessuto non-tessuto e di cheratinociti su di una membrana microperforata.

- 7) Processo in accordo alle rivendicazioni 1-6, in cui la percentuale di esterificazione dei due biomateriali è compresa tra il 75% ed il 100%.
- 8) Processo in accordo alle rivendicazioni 6 e 7, in cui ambedue i tipi cellulari possono essere di origine umana o di specie compatibili con il trapianto nell'uomo.
- 9) Processo in accordo alla rivendicazione 8, in cui, nel caso vengano impiegate cellule di origine umana, la donazione può essere eterologa o omologa od una combinazione delle due.
- 10) Processo in accordo alla rivendicazione 6, in cui l'associazione tra la coltura fibroblastica nel tessuto non-tessuto ed il foglietto epiteliale cresciuto sulla membrana microperforata avviene mediante collanti biocompatibili o in assenza di questi.
- 11) Processo in accordo alla rivendicazione 6, in cui alla semina dei fibroblasti nel tessuto non-tessuto segue la giustapposizione della membrana microperforata con conseguente semina delle cellule epiteliali.
- 12) Impiego di pelle artificiale umana secondo le riv. 1-11 in medicina e chirurgia.
- 13) Impiego di pelle artificiale umana secondo la rivendicazione 12 per l'esecuzione di trapianti nel caso di perdita di aree cutanee.
- 14) Impiego di pelle artificiale umana secondo le riv. 1-11 in campo diagnostico.

PD 95 A 0 0 0 0 8 3

Edizione 1984
Via D. ...
P.O. ...



- 15) Impiego di pelle artificiale umana secondo la rivendicazione 14 come test in vitro atto ad evidenziare eventuali effetti tossici di prodotti chimici, dermatologici, cosmetici o destinati all'uso in agricoltura.
- 16) Impiego di pelle artificiale umana secondo le rivendicazioni 1-12 per i trattamenti di terapia genica in pazienti affetti da malformazioni congenite della cute.
- 17) Impiego di pelle artificiale umana secondo le rivendicazioni 1-12 per la preparazione di sistemi di rilascio controllato di sostanze farmacologicamente attive e/o proteine o peptidi.
- 18) Impiego di pelle artificiale umana secondo la rivendicazione 17, in cui la sostanza farmacologicamente attiva e/o la proteina o peptide è adsorbita alla fibra del tessuto e/o alla membrana microperforata.
- 19) Impiego di pelle artificiale umana secondo le rivendicazioni 17-18, in cui la proteina è costituita da un fattore di crescita quali il FGF, TGF β , KGF o NGF.
- 20) Impiego di pelle artificiale umana secondo le rivendicazioni 17-18, in cui la proteina è una proteina della matrice extra-cellulare quali la fibronectina, laminina o il collagene.
- 21) Processo che prevede la crioconservazione della pelle artificiale umana di cui alle rivendicazioni precedenti per la costituzione di una "banca tissutale" per trapianti.

Edizione 1984
Via D. ...
P.O. ...

[Handwritten signature]