



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

UIBM

DOMANDA NUMERO	102000900898585
Data Deposito	28/12/2000
Data Pubblicazione	28/06/2002

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	F		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	L		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N		

Titolo

USO DI MATERIALE BIOLOGICO COMPRENDENTE MATRICI TRIDIMENSIONALI DI
DERIVATI DI ACIDO IALURONICO PER LA PREPARAZIONE DI IMPIANTI IN ARTROSCOPIA.

Domanda di brevetto per Invenzione Industriale dal titolo :

"Uso di materiale biologico comprendente matrici tridimensionali di derivati di acido ialuronico per la preparazione di impianti in artroscopia"

Titolare : FIDIA ADVANCED BIOPOLYMERS S.r.l.

con sede in : BRINDISI

Inventore designato : CALLEGARO Lanfranco

depositata il

con il n°

MI 2000A002845

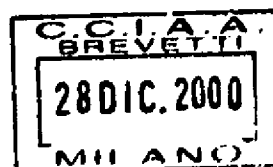
* * * * *

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda l'uso di materiale biologico comprendente cellule supportate su matrici tridimensionali comprendenti almeno un derivato di acido ialuronico per la preparazione di impianti adatti per la tecnica artroscopica.

STATO DELLA TECNICA

La cartilagine articolare è un tessuto deputato al movimento dell'articolazione in una situazione di assenza di attrito: le sue particolari caratteristiche biologiche permettono infatti all'articolazione di assorbire forze almeno cinque volte maggiori rispetto al peso corporeo del soggetto. La capacità riparativa della cartilagine articolare, o ialina, è molto limitata per cui, in seguito a danno, il tipo di cartilagine spontaneamente rigenerata non ha più le caratteristiche proprie del tessuto originale e si forma un tessuto denominato fibrocartilagine, privo della capacità di lubrificazione e di assorbimento delle forze meccaniche. La degenerazione della cartilagine ialina è accompagnata, nella fase finale, da dolore e limitata mobilità, che può determinare il blocco



Handwritten signature or initials.

dell'articolazione; nel lungo termine il processo degenerativo può arrivare a provocare l'insorgenza di complicazioni quali l'osteoartrosi. Nei casi più gravi l'articolazione, generalmente il ginocchio, deve essere sostituita da una protesi metallica; tale procedura è costosa, ma soprattutto non definitiva, in quanto molte protesi devono essere sostituite dopo circa 10-15 anni. Per questo motivo, in pazienti di età inferiore ai 50 anni, la sostituzione protesica del ginocchio rappresenta l'estrema opzione terapeutica.

Nel trattamento delle lesioni alla cartilagine articolare sono utilizzate, attualmente, alcune tecniche chirurgiche artroscopiche principalmente al fine di ridurre il dolore, rallentare il processo di degenerazione e, ove possibile, riparare il danno. Una di queste tecniche prevede lo "shaving" dei margini del difetto cartilagineo, ovvero, con opportuni strumenti, i margini della lesione vengono normalizzati e il tessuto necrotico o sofferente viene rimosso; altre tecniche artroscopiche prevedono la perforazione, o microfrattura, della cartilagine sana fino a raggiungere l'osso subcondrale, dal quale migrano elementi cellulari in grado di colonizzare la zona lesa. Infine, la mosaicoplastica è una tecnica artroscopica secondaria, mediante la quale vengono prelevati, da zone dell'articolazione non compromesse, piccoli tasselli di tessuto cartilagineo che, dopo perforazione, vengono inseriti nel sito della lesione come fossero pioli.

Tutte queste procedure portano a colmare il difetto cartilagineo con una forma di cartilagine di qualità inferiore, detta fibrocartilagine, non dotata delle caratteristiche meccaniche tipiche della cartilagine ialina; il

recupero funzionale dell'articolazione non sarà, quindi, completo.

Recentemente, un gruppo svedese ha messo a punto una tecnica di reinnesto *ex-vivo* di condrociti autologhi, in cui le cellule condrogeniche vengono isolate da una piccola biopsia cartilaginea, espanse *in-vitro* e quindi reimpiantate nello stesso soggetto (Brittberg M., Lindahl A., Nilsson A., "Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation", N. Eng. J. Med. 1994, 331, 889-895). Secondo gli autori, durante la fase di coltivazione cellulare, sotto lo stimolo di fattori di crescita idonei, i condrociti temporaneamente de-differenziano e si moltiplicano; una volta innestati nella zona lesionata, la memoria fenotipica viene ripristinata e, conseguentemente, le cellule ri-differenziano in condrociti in grado di produrre una matrice cartilaginea di tipo ialino. La procedura chirurgica è in realtà piuttosto complessa: innanzitutto l'operazione deve essere condotta a cielo aperto; inoltre, il difetto cartilagineo deve essere ben localizzato, chiuso alla superficie da un lembo periostale (prelevato nella stessa sessione operatoria), che deve essere ermeticamente sigillato al tessuto cartilagineo attraverso una combinazione di punti di sutura e guarnizione con colla di fibrina (autologa o allologa), in modo da creare una camera stagna entro la quale iniettare la sospensione cellulare autologa; una sigillatura non perfetta, infatti, provocherebbe la fuoriuscita delle cellule introdotte, con conseguente insuccesso dell'intervento.

Riassumendo, i principali svantaggi di queste procedure sono: operazione di difficile esecuzione, tecnica invasiva, impianto di cellule non perfettamente differenziate.



E' inoltre noto da tempo l'uso dei derivati dell'acido ialuronico come supporto per colture cellulari quali fibroblasti, cheratinociti, e cellule staminali da midollo osseo ottenute mediante modesti prelievi biotici (EP 0462426, WO 97/18842), allo scopo di preparare tessuti *in vitro* da re-innestare poi in un soggetto ricevente.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

La Richiedente ha ora sorprendentemente trovato che è possibile utilizzare efficacemente matrici tridimensionali a base di derivati dell'acido ialuronico come supporto per materiale cellulare, da impiantare nel paziente impiegando tecniche artroscopiche, e che l'uso di tali matrici risolve i problemi sopra esposti relativi all'applicazione delle tecniche artroscopiche.

L'impiego di matrici tridimensionali biocompatibili e biorassorbibili a base di acido ialuronico, su cui le cellule sono coltivate, rappresenta un grande avanzamento della tecnica artroscopica. Infatti, già durante la fase di coltivazione sulla matrice, le cellule iniziano il processo di differenziamento condrocitario, grazie allo stimolo tridimensionale e alla presenza di fattori di crescita opportuni; la differenziazione cellulare, con produzione di abbondante matrice ialina, continua poi nel sito di innesto. Il fatto che le cellule, prima dell'impianto, siano già veicolate su di un supporto tridimensionale, dotato delle note proprietà di biocompatibilità e biorassorbibilità dell'acido ialuronico, elimina la necessità di una copertura periostale a perfetta tenuta stagna, in quanto è necessario solo garantire una copertura del difetto atta a mantenere in sede l'innesto per il tempo necessario alla sua integrazione con il tessuto

cartilagineo circostante. In tal senso è sufficiente una guarnizione con colla di fibrina (autologa o allologa), oppure con altro collante biologico, per un tempo molto limitato. L'abolizione del lembo periostale determina un secondo importante vantaggio: la sostituzione della tecnica in artrotomia, comunemente impiegata nel modello svedese con tecniche chirurgiche artroscopiche, meno invasive e costose.

Rappresenta pertanto oggetto della presente invenzione l'uso di un materiale biologico comprendente cellule supportate su matrici tridimensionali comprendenti almeno un derivato di acido ialuronico per la preparazione di impianti adatti per la tecnica artroscopica.

DESCRIZIONE DELLA FIGURA

In figura 1 ed in Figura 2 si riportano i risultati rispettivamente dell'esempio 3 e dell'esempio 4 in forma di istogramma, dove in ordinata si riporta la densità ottica a 470 nm espressa in unità assoluta misurata con spettrofotometro FLOW.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Tra tutti i derivati dell'acido ialuronico che possono essere impiegati nelle matrici tridimensionali dell'invenzione, i seguenti sono i preferiti:

- esteri dell'acido ialuronico in cui una parte o tutte le funzioni carbossiliche sono esterificate con alcoli della serie alifatica, aromatica, arilalifatica, cicloalifatica o eterociclica (EP 0216453 B1);
- esteri reticolati dell'acido ialuronico in cui una parte o tutte le funzioni carbossiliche sono esterificate con le funzioni alcoliche della stessa catena polisaccaridica o di altre catene (EP 0341745 B1);
- esteri reticolati dell'acido ialuronico in cui una parte o tutte le funzioni

carbossiliche sono esterificate con polialcoli della serie alifatica, aromatica, arilalifatica, cicloalifatica, eterociclica, generando delle reticolazioni mediante catene spaziatrici (EP 0265116 B1);

- emiesteri dell'acido succinico o sali di metalli pesanti degli emiesteri dell'acido succinico con acido ialuronico o con esteri parziali o totali dell'acido ialuronico (WO 96/357207);

- derivati O-solfatati dell'acido ialuronico (WO 95/25751) o N-solfatati (WO 98/01973);

- sali di ammonio quaternario, ad esempio sali con tetrabuttilammonio e feniltrimetilammonio, dell'acido ialuronico o di derivati dell'acido ialuronico scelti nel gruppo consistente di acido ialuronico N-solfatato, acido ialuronico O-solfatato, emiesteri dell'acido succinico con acido ialuronico eventualmente parzialmente salificati con metalli pesanti;

- acido ialuronico O-solfatato o N-solfatato e suoi derivati, legati covalentemente a poliuretano (WO 99/43728).

Le presenti matrici tridimensionali possono inoltre comprendere l'associazione di più tipi di derivati di acido ialuronico, e possono essere in forme diverse, quali ad esempio tessuto non tessuto come descritto in US 5,520,916, reti contemplate nel brevetto EP216453B1, membrane perforate come descritto in EP462426B1 e continue come quelle contemplate in EP216453B1. Tali matrici possono comprendere anche l'associazione con polimeri naturali, semisintetici o sintetici.

Polimeri naturali che possono essere usati secondo l'invenzione sono, ad esempio, collagene, coprecipitati di collagene e glicosamminoglicani, cellulosa, polisaccaridi in forma di gel quali chitina, chitosano, pectina o

acido pectico, agar, agarosio, xantano, gellano, acido alginico o alginati, polimannani o poliglicani, amido, gomme naturali.

I polimeri semisintetici possono essere ad esempio scelti nel gruppo consistente di collagene reticolato con agenti quali aldeidi o precursori delle stesse, acidi dicarbossilici o loro alogenuri, diammine, derivati della cellulosa, dell'acido ialuronico, della chitina o del chitosano, del gellano, dello xantano, della pectina o dell'acido pectico, dei poliglicani, del polimannano, dell'agar, dell'agarosio, della gomma naturale, e dei glicosamminoglicani.

Infine, esempi di polimeri sintetici che possono essere utilizzati sono l'acido polilattico, l'acido poliglicolico o loro copolimeri o derivati, polidiossani, polifosfazeni, resine polisulfoniche, poliuretani e PTFE.

Le presenti matrici tridimensionali possono inoltre comprendere sostanze farmaceuticamente o biologicamente attive, come agenti antiinfiammatori, antibiotici, fattori di crescita, antimicotici, antimicrobici ed agenti antivirali.

Le cellule utilizzate per la preparazione del presente materiale biologico sono scelte tra condrociti, osteociti, cellule mesenchimali e cellule staminali.

Il processo di coltura cellulare seguito per realizzare il materiale biologico dell'invenzione è quello descritto in Aigner et al., "Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester", J. Biomed. Mat. Res. 1998, 42(2), 172-181.

A partire dal giorno 7 dopo che sono state seminate sulla matrice

tridimensionale a base di derivati di acido ialuronico, e preferibilmente a partire dal giorno 14, il materiale biologico è pronto per l'innesto.

Il presente materiale biologico può essere ad esempio ridotto, mediante impattatore da mosaicoplastica, alle dimensioni del difetto cartilagineo da correggere al momento dell'innesto, ovvero in sede di seduta operatoria subito prima dell'introduzione mediante lo strumento chirurgico. Oppure il materiale può essere fatto passare attraverso una cannula, strumento comunemente impiegato in chirurgia artroscopica.

Il materiale biologico secondo l'invenzione può inoltre essere usato sia per la preparazione di impianti autologhi che di impianti allologhi adatti a tecniche artroscopiche.

Un ulteriore vantaggio della presente invenzione risiede nel fatto che può essere preventivamente criopreservato allo scopo di conservarne le caratteristiche di vitalità cellulare in vista di innesti programmati in tempi successivi.

I seguenti esempi sono riportati a scopo illustrativo e non limitativo della presente invenzione.

ESEMPIO 1

Preparazione del materiale biologico

Il processo di coltura cellulare è descritto in Brun et al., "Chondrocyte aggregation and reorganization into three dimensional scaffolds", J. Biomed. Mater. Res. 1998, 46, 337-346. Il tessuto cartilagineo, prelevato da una zona non sopportante carico marginale alla lesione, viene dissociato mediante trattamento con collagenasi di tipo II, e le cellule ricavate vengono seminate in fiasche ventilate in terreno HAM'S F12

addizionato di siero fetale bovino, 1% streptomicina-penicillina, 1% glutammina, e dei seguenti fattori trofici ciascuno in quantità compresa tra 1 e 10 ng/ml: TGF β 1, EGF ricombinante umano, insulina ricombinante umana, e bFGF ricombinante umano.

Le cellule vengono espanse *in vitro* da uno a quattro passaggi seriali, quindi seminate su HYALOGRAFT®C (un non-tessuto a base di HYAFF®11t - estere benzilico totale dell'acido ialuronico), con una densità di semina compresa tra 0.5×10^6 e 4×10^6 cell/cm², ed il terreno di coltura descritto sopra; ad ogni cambio di terreno (2-10 ml ogni 48-72 ore) vengono aggiunti 50 µg/ml di acido ascorbico.

ESEMPIO 2

Valutazione della vitalità cellulare mediante test MTT

La vitalità cellulare del materiale biologico viene determinata mediante incorporazione del colorante vitale MTT (Dezinot F, Lang R. "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability" J. Immunol. Methods, 1986, 22(89), 271-277). Una soluzione preparata sciogliendo 0.5 mg/ml di MTT in tampone fosfato pH 7.2 (PBS) viene aggiunta al materiale biologico in esame e posta in incubatore a 37°C per 4 ore. A fine incubazione, la soluzione di MTT viene aspirata, il materiale è lavato più volte con PBS, quindi si aggiungono 5 ml di soluzione estraente costituita da 10% di dimetilsolfossido in alcol isopropilico. Dopo centrifugazione, l'assorbanza del surnatante viene determinata mediante una lettura spettrofotometrica a 470 nm.

ESEMPIO 3

Verifica del recupero di vitalità cellulare dopo passaggio in cannula

Per la verifica del recupero di vitalità cellulare dopo il passaggio attraverso una cannula, strumento comunemente impiegato in chirurgia artroscopica e qui usata per il posizionamento artroscopico del materiale biologico, è impiegato il test MTT già descritto sopra nell'Esempio 2.

I risultati sono riportati in Figura 1 dove viene mostrato il recupero di vitalità cellulare relativo ad un costrutto cartilagineo bioingegnerizzato (Hyalograft®C di dimensioni 2x2 cm), preparato come descritto nell'Esempio 1 che, dopo 72 ore nel contenitore di packaging, ovvero nelle condizioni di maggiore stress metabolico, è stato estruso delicatamente attraverso una cannula del diametro di 9 mm. Si è trovato che il passaggio attraverso l'orifizio della cannula non modifica la vitalità cellulare del presente materiale.

ESEMPIO 4

Verifica del recupero di vitalità cellulare dopo riduzione con impattatore da mosaicoplastica

Sempre impiegando il test MTT già descritto sopra nell'Esempio 2, è stata verificata la vitalità di un costrutto bioingegnerizzato ridotto alle dimensioni desiderate mediante impattatore da mosaicoplastica, mimando così il caso in cui il materiale bioingegnerizzato è ridotto alle dimensioni del difetto cartilagineo da correggere al momento dell'innesto, ovvero in sede di seduta operatoria, subito prima dell'introduzione mediante lo strumento chirurgico.

In questo esperimento un costrutto cellulare è stato mantenuto nel

contenitore di packaging fino al limite della data di scadenza del prodotto (72 ore), quindi è stato sezionato in pezzi del diametro di 9 mm con impattatore da mosaicoplastica. La vitalità dei singoli pezzi è stata normalizzata per unità di superficie, e confrontata con il materiale biologico residuo.

In Figura 2 sono riportati i risultati relativi a questo esperimento.

I test di vitalità cellulare sopra descritti hanno dimostrato che l'applicazione artroscopica del presente materiale, ovvero costrutti biologici giunti al limite della data di scadenza (72 ore) in condizioni di massimo stress metabolico, non ne influenza la qualità biologica. Questo a prescindere dal tipo di strumento chirurgico impiegato nell'operazione di riduzione e dalle condizioni di packaging del prodotto stesso.

RIVENDICAZIONI

1. Uso di un materiale biologico comprendente cellule supportate su matrici tridimensionali comprendenti almeno un derivato di acido ialuronico per la preparazione di impianti autologhi e/o allologhi adatti all'innesto mediante tecniche artroscopiche.
2. L'uso di un materiale biologico secondo la rivendicazione 1, in cui dette cellule autologhe e/o allologhe sono scelte tra condrociti, osteociti, cellule mesenchimali e cellule staminali.
3. L'uso di un materiale biologico secondo la rivendicazione 1, in cui dette matrici tridimensionali comprendono inoltre polimeri naturali, semisintetici o sintetici.
4. L'uso di un materiale biologico secondo la rivendicazione 3, in cui detti polimeri naturali sono scelti nel gruppo consistente di collagene, coprecipitati di collagene e glicosamminoglicani, cellulosa, polisaccaridi in forma di gel quali chitina, chitosano, pectina o acido pectico, agar, agarosio, xantano, gellano, acido alginico o alginati, polimannani o poliglicani, amido, e gomme naturali.
5. L'uso di un materiale biologico secondo la rivendicazione 3, in cui detti polimeri semisintetici sono scelti nel gruppo consistente di collagene reticolato con agenti quali aldeidi o precursori delle stesse, acidi dicarbossilici o loro alogenuri, diammine, derivati della cellulosa, dell'acido ialuronico, della chitina o del chitosano, del gellano, dello xantano, della pectina o dell'acido pectico, dei poliglicani, del polimannano, dell'agar, dell'agarosio, della gomma naturale, e dei glicosamminoglicani.



6. L'uso di un materiale biologico secondo la rivendicazione 3, in cui detti polimeri sintetici sono scelti nel gruppo consistente di acido polilattico, acido poliglicolico o loro copolimeri o derivati, polidiossani, polifosfazeni, resine polisulfoniche, poliuretani e PTFE.
7. L'uso di un materiale biologico secondo la rivendicazione 1, in cui detto derivato dell'acido ialuronico è scelto nel gruppo consistente di esteri dell'acido ialuronico in cui una parte o tutte le funzioni carbossiliche sono esterificate con alcoli della serie alifatica, aromatica, arilalifatica, cicloalifatica o eterociclica.
8. L'uso di un materiale biologico secondo la rivendicazione 1, in cui detto derivato dell'acido ialuronico è scelto nel gruppo consistente di esteri reticolati dell'acido ialuronico in cui una parte o tutte le funzioni carbossiliche sono esterificate con le funzioni alcoliche della stessa catena polisaccaridica o di altre catene.
9. L'uso di un materiale biologico secondo la rivendicazione 1, in cui detto derivato dell'acido ialuronico è scelto nel gruppo consistente di esteri reticolati dell'acido ialuronico in cui una parte o tutte le funzioni carbossiliche sono esterificate con polialcoli della serie alifatica, aromatica, arilalifatica, cicloalifatica, eterociclica, generando delle reticolazioni mediante catene spaziatrici.
10. L'uso di un materiale biologico secondo la rivendicazione 1, in cui detto derivato dell'acido ialuronico è scelto tra gli emiesteri dell'acido succinico o sali di metalli pesanti degli emiesteri dell'acido succinico con acido ialuronico o con esteri parziali o totali dell'acido ialuronico.
11. L'uso di un materiale biologico secondo la rivendicazione 1, in cui



- detto derivato dell'acido ialuronico è scelto nel gruppo consistente di derivati O-solfatati o N-solfatati dell'acido ialuronico.
12. L'uso di un materiale biologico secondo la rivendicazione 1, in cui detto derivato dell'acido ialuronico è un sale di ammonio quaternario dell'acido ialuronico o di suoi derivati scelti nel gruppo consistente di derivati O-solfatati dell'acido ialuronico, derivati N-solfatati dell'acido ialuronico, emiesteri dell'acido succinico con acido ialuronico eventualmente parzialmente salificati con metalli pesanti.
13. L'uso di un materiale biologico secondo la rivendicazione 1, in cui detto derivato dell'acido ialuronico è scelto nel gruppo consistente di acido ialuronico O-solfatato o N-solfatato e suoi derivati legati covalentemente a poliuretano.
14. L'uso di un materiale biologico secondo la rivendicazione 1, in cui dette matrici tridimensionali consistono di almeno un derivato dell'acido ialuronico.
15. L'uso di un materiale biologico secondo la rivendicazione 1, in associazione con sostanze farmaceuticamente o biologicamente attive.
16. L'uso di un materiale biologico secondo la rivendicazione 15, in cui dette sostanze farmaceuticamente o biologicamente attive sono scelte nel gruppo consistente di agenti antiinfiammatori, antibiotici, fattori di crescita, antimicotici, antimicrobici e agenti antivirali.
17. L'uso di un materiale biologico secondo le rivendicazioni precedenti, in cui il costruito sia stato preventivamente criopreservato allo scopo di conservarne le caratteristiche di vitalità cellulare in vista di innesti

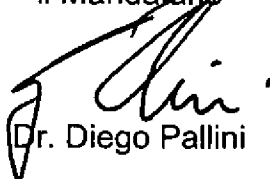
programmati in tempi successivi.

(ASE/BRA)

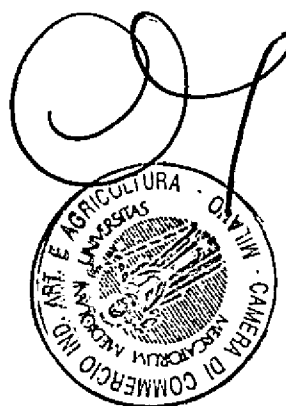
Milano,

p. Fidia Advanced Biopolymers S.p.A.

il Mandatario


Dr. Diego Pallini

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.



The bar chart displays the recovery of cell vitality after passage through a cannula. The y-axis represents vitality, ranging from 0,000 to 0,500. The x-axis shows two groups: Controllo and Canula da 9 mm. The Controllo group has a vitality of approximately 0,42, while the Canula da 9 mm group has a vitality of approximately 0,39. Error bars are present for both groups.

Gruppo	Vitalità (approssimativa)
Controllo	0,42
Canula da 9 mm	0,39

Recupero di vitalità cellulare dopo riduzione mediante impattore da artroscopia

Area	Recupero di vitalità cellulare (media)
Controllo (area esterna)	~0,42
area interna	~0,39

21