



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

DOMANDA NUMERO	102007901562601
Data Deposito	09/10/2007
Data Pubblicazione	09/04/2009

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	M		

Titolo

BIOREATTORE PER LA GENERAZIONE E LA STIMOLAZIONE MECCANICA COMPLESSA DI
TESSUTO BIOLOGICO INGEGNERIZZATO.

Titolare: Politecnico di Milano

Titolo "Bioreattore per la generazione e la
stimolazione meccanica complessa di tessuto biologico
5 ingegnerizzato"

DESCRIZIONE

La presente invenzione si riferisce ad un
bioreattore in accordo con il preambolo della
rivendicazione 1 per la generazione e la stimolazione
10 meccanica di tessuto biologico ingegnerizzato, quale
ad esempio cartilagine ingegnerizzato.

Secondo un ulteriore aspetto la presente invenzione si
riferisce altresì ad un metodo per la stimolazione
meccanica di tessuto biologico ingegnerizzato.

15 Per semplicità di esposizione, la presente
descrizione è fatta in modo esemplificativo e non
limitativo con particolare riferimento ad una
cartilagine ingegnerizzata da utilizzarsi nelle
articolazioni, essendo altresì possibile utilizzare
20 tale cartilagine in altri distretti anatomici quali,
ad esempio, il disco intervertebrale.

La cartilagine è un tessuto che ricopre la
superficie delle articolazioni e la sua importanza
funzionale risiede nelle sue ottime qualità
25 lubrificanti e nella sua capacità di ridistribuire,

omogeneizzare ed ammortizzare i carichi applicati alle articolazioni durante l'attività motoria.

La funzionalità di questo tessuto è spesso compromessa a seguito di eventi traumatici dell'articolazione o per l'insorgere di patologie degenerative, per le quali, ad oggi, non esistono terapie farmacologiche o chirurgiche realmente efficaci e definitive. Infatti, le capacità autorigenerative della cartilagine e l'assorbimento dei farmaci assunti sono limitati dalla sua avascolarizzazione.

Per quanto riguarda le tecniche chirurgiche attualmente disponibili, giova rilevare che esse non sono in grado di restituire alla cartilagine le sue caratteristiche funzionali in maniera completa e duratura, così da consentire all'articolazione il recupero della piena efficienza.

In conseguenza di ciò, una soluzione al problema è stata individuata nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti, consistendo nell'impianto in vivo di tessuti ingegnerizzati generati in vitro, a partire da prelievi cellulari autologhi. In sostanza si provvede chirurgicamente a sostituire il tessuto cartilagineo malato o danneggiato con un tessuto biologico ingegnerizzato.

Nell'ambito dello sviluppo dei tessuti ingegnerizzati, non solo di tipo cartilagineo, si è costatata l'importanza di alcune condizioni ambientali di crescita che meglio favoriscono la generazione in vitro del tessuto cartilagineo in relazione alla qualità del tessuto biologico ingegnerizzato ottenuto.

In particolare, sulla base dell'esperienza acquisita nel corso degli anni, si è avuto modo di constatare l'importanza di sottoporre i tessuti, durante l'accrescimento in vitro, a diverse tipologie di stimolazione meccanica, in quanto è stato dimostrato che colture statiche non acquisiscono caratteristiche di resistenza sufficienti per un efficace impianto in vivo. Così, ad esempio, per quanto riguarda la cartilagine è risultato essere necessario stimolare i condrociti seminati a produrre matrice extracellulare, in quantità e qualità comparabili con quella nativa dal momento che, in vivo, le caratteristiche meccaniche del tessuto cartilagineo sono prevalentemente sostenute dalla componente non cellulare.

Nell'ambito dei tessuti ingegnerizzati è dunque molto sentita l'esigenza di riuscire a far accrescere il materiale ingegnerizzato in modo che durante la

crescita tale materiale sia stimolato con lo stesso tipo di sollecitazioni meccaniche con cui il tessuto si troverà sottoposto una volta effettuato l'impianto in vivo. In altre parole, fornire i corretti stimoli meccanici al tessuto in accrescimento fa parte del corretto processo di crescita del materiale ingegnerizzato da impiantare, sia esso una cartilagine piuttosto che un tessuto osseo o vascolare. In particolare si è avuto modo di appurare che la compressione meccanica diretta, la compressione idrostatica nonché la perfusione del costrutto e le conseguenti sollecitazioni di taglio sono risultati essere gli stimoli meccanici importanti nella sintesi del tessuto biologico ingegnerizzato, in quanto riproducono le sollecitazioni cui tale tessuto biologico ingegnerizzato sarà sottoposto dopo l'impianto in vivo.

Al fine di assicurare le corrette condizioni ambientali di coltura ed applicare stimoli meccanici corretti, l'accrescimento del tessuto biologico ingegnerizzato viene effettuato in bioreattori i quali oltre alla capacità di generare un ambiente controllato per la crescita del tessuto biologico ingegnerizzato permettono la generazione di prefissati pattern di stimolazione ripetibili cui sottoporre il

tessuto biologico ingegnerizzato ivi in accrescimento.

È bene precisare che per ottenere l'accrescimento di tessuto biologico ingegnerizzato tridimensionale è necessario prevedere la presenza di scaffold, ovvero di matrici tridimensionali, in grado di favorire una omogenea adesione cellulare e sui quali fare avvenire l'accrescimento cellulare. Ad esempio, nel caso di costrutti cartilaginei tridimensionali, i condrociti seminati sono esposti su scaffold individuati da matrici tridimensionali polimeriche o di altro tipo). È evidente che il tipo di scaffold, così come la sua struttura, può variare in funzione delle specifiche caratteristiche del tessuto biologico ingegnerizzato da produrre.

Una volta seminati gli scaffold vengono mantenuti, per un prolungato periodo di tempo necessario all'accrescimento delle cellule, in un bioreattore, all'interno del quale è possibile fissarli mediante opportuni mezzi di trattenimento.

Il documento WO200168800 riguarda un bioreattore per la generazione di cartilagine ingegnerizzata con proprietà meccaniche simili a quelle del tessuto nativo, in particolare una cartilagine capace di sostenere i carichi tipici fisiologici. Questo bioreattore permette di coltivare condrociti seminati

su scaffold tridimensionali, esponendo i costrutti a sollecitazioni meccaniche dovute a compressione idrostatica e deformazione per compressione diretta. Le due suddette sollecitazioni sono ottenute
5 meccanicamente tramite attuatori lineari: un piatto mosso da uno degli attuatori comprime i costrutti, mentre l'altro attuatore è collegato a un pistone che pressurizza il mezzo di coltura. Questo bioreattore presenta il limite di non poter sottoporre i costrutti
10 a perfusione o ad altro trattamento in grado di indurre sollecitazione a taglio sulle cellule, né di assicurare lo scambio convettivo di metaboliti e cataboliti tra cellule e medium nel quale avviene la coltura.

15 II documento CA2543374 riguarda un metodo e un bioreattore per la coltura e la stimolazione di tessuti tridimensionali vitali e meccanicamente resistenti. Il bioreattore è costituito da una camera di coltura all'interno della quale viene posizionato
20 il tessuto. All'interno della camera di coltura un mini-attuatore comandato magneticamente permette di effettuare la sollecitazione meccanica del tessuto. Tuttavia, questo bioreattore non garantisce la simmetria e la bidirezionalità delle sollecitazioni
25 meccaniche imposte, non è in grado di garantire e

controllare la perfusione diretta dei costrutti e non è in grado di imporre contemporaneamente ai costrutti sollecitazioni derivanti da compressione idrostatica e da sforzo di taglio. Al riguardo si segnala
5 l'importanza di poter applicare contemporaneamente queste due sollecitazioni in vitro, al fine di esercitare il tessuto biologico ingegnerizzato con sollecitazioni corrispondenti a quelle che troverà in vivo.

10 Il problema alla base della presente invenzione è quello di escogitare un bioreattore per la generazione e la stimolazione meccanica complessa di tessuto biologico ingegnerizzato, il quale presenti
15 caratteristiche strutturali e funzionali tali da soddisfare la suddetta esigenza, ovviando nel contempo agli inconvenienti e ai limiti di cui si detto con riferimento ai bioreattori della tecnica nota.

Tale problema è risolto da un bioreattore per la generazione e la stimolazione meccanica complessa di
20 tessuto biologico ingegnerizzato in accordo con le caratteristiche della rivendicazione 1.

Secondo un ulteriore aspetto, il problema è risolto da un metodo in accordo con la rivendicazione
15.

25 Ulteriori caratteristiche ed i vantaggi del

bioreattore per la generazione e la stimolazione meccanica complessa di tessuto biologico ingegnerizzato secondo la presente invenzione risulteranno dalla descrizione di seguito riportata di
5 alcuni suoi esempi preferiti di realizzazione, data a titolo indicativo e non limitativo, con riferimento alle annesse figure, in cui:

- la figura 1 rappresenta uno schema rappresentante il bioreattore secondo l'invenzione
10 unitamente ai mezzi di azionamento e ai mezzi di controllo;

- la figura 2 rappresenta un disegno schematico in sezione del corpo del bioreattore unitamente ai pistoni e ai serbatoi del liquido di coltura;

15 - la figura 3 rappresenta una vista semplificata in sezione trasversale del corpo del bioreattore unitamente ai pistoni senza la rappresentazione dei serbatoi del liquido di coltura;

- la figura 4 rappresenta una vista in sezione
20 trasversale del solo corpo del bioreattore;

- le figure 5a e 5b rappresentano una sequenza di fasi relative ad un trattamento di compressione diretta dello scaffold attuato dai due pistoni;

- le figure 6a-6c una sequenza di fasi relative
25 ad un trattamento di compressione idrostatica ciclica

dello scaffold attuato dai due pistoni;

- le figure 7a-7c rappresentano una sequenza di fasi relative ad un trattamento di compressione idrostatica e contemporanea perfusione dello scaffold
5 attuato dai due pistoni;

- le figure 8a-8c rappresentano una sequenza di fasi relative ad un trattamento di perfusione dello scaffold e contemporaneo ricambio del liquido di coltura attuato dai due pistoni;

10 Con riferimento alle annesse figure, con 1 è globalmente indicato un bioreattore per la generazione e la stimolazione meccanica complessa di tessuto biologico ingegnerizzato secondo la presente invenzione.

15 Giova premettere che, in modo di per sé convenzionale, l'accrescimento cellulare del tessuto biologico ingegnerizzato avviene su supporti denominati scaffold, vale a dire su matrici tridimensionali in grado di favorire una omogenea
20 adesione e crescita cellulare. Come detto nella parte iniziale della presente descrizione, nel caso di costrutti cartilaginei tridimensionali, i condrociti seminati sono esposti su matrici, ad esempio polimeriche, tridimensionali che individuano i
25 suddetti scaffold.

Una volta effettuata la semina, l'accrescimento cellulare in liquido di coltura avviene in un prolungato periodo di tempo, durante il quale gli scaffold sono mantenuti in bioreattori, vale a dire in
5 dispositivi in grado di ricreare le condizioni ambientali ottimali per stimolare la vitalità e l'organizzazione strutturale di una semina cellulare. A puro titolo indicativo, un bioreattore deve essere in grado di assicurare il trasporto efficiente delle
10 sostanze nutritive alle cellule e la rimozione dei prodotti di scarto derivanti dall'attività metabolica delle cellule, garantendo il mantenimento di condizioni ambientali adeguate per l'accrescimento cellulare.

15 Il bioreattore 1 comprende:

- un corpo 2 definente una camera di coltura 3 di un prefissato volume, la quale è atta ad essere riempita con un liquido di coltura,
- mezzi di supporto 4 per supportare nella
20 suddetta camera di coltura 3 almeno uno scaffold S e
- mezzi attuatori atti ad essere azionati per operare su detto volume di detta camera, in modo da interagire con il liquido di coltura con cui detta camera è atta ad essere riempita e per interagire
25 direttamente sullo scaffold S supportato nella camera

di coltura 3.

I mezzi di supporto 4 comprendono elementi di trattenimento per gli scaffold S, altrimenti individuabili come porta scaffold 4.

5 In accordo con la forma di realizzazione illustrata, il corpo 2 del bioreattore è individuato da un corpo cilindrico cavo, esteso secondo una prefissata direzione assiale X-X, preferibilmente ma non esclusivamente a sezione trasversale circolare.
10 Per le ragioni che meglio risulteranno dal seguito della descrizione, giova rilevare che le contrapposte estremità di testa del corpo cilindrico cavo 2 sono aperte.

La forma circolare cilindrica del corpo 2 che può
15 convenientemente essere realizzato con un acciaio, ad esempio un acciaio inossidabile AISI 316L, risulta vantaggiosa per:

- garantire la sterilizzabilità di tutto il volume della camera di coltura 3,
- 20 - permettere l'applicazione di pressioni idrostatiche elevate e
- permettere l'instaurazione all'interno della camera di coltura 3 di adeguate condizioni fluidodinamiche del liquido di coltura, come meglio
25 risulterà dal seguito della descrizione.

Nell'esempio qui considerato (Fig. 2), i mezzi di supporto 4, ovvero il porta scaffold, sono posizionati in corrispondenza della sezione trasversale mediana del corpo cilindrico 2, suddividendo il suddetto prefissato volume della camera 3 in un primo volume 3a ed in un secondo volume 3b. In sostanza, quando uno scaffold S è trattenuto in posizione nella camera 3 del bioreattore 1 dal suddetto porta scaffold 4, tale scaffold S viene ad individuare un setto divisorio ideale che separa la camera nei due suddetti volumi 3a e 3b. È bene precisare che la suddetta divisione della camera 3 nel primo volume 3a e nel secondo volume 3b risulta dal punto geometrico ma, in effetti, la presenza dello scaffold S, pur intercettando il flusso di liquido in transito non impedisce il passaggio e lo scambio di liquido di coltura da un volume all'altro della camera di coltura.

Secondo un aspetto vantaggioso, i suddetti mezzi attuatori comprendono almeno un primo pistone tuffante 5 ed un secondo pistone tuffante 6, ciascun pistone 5, 6 essendo scorrevolmente associato a tenuta con detto corpo 2 in modo da potersi inserire in esso e compiere in detta camera 3 una prefissata corsa di lavoro da una posizione arretrata (fig. 2) ad una posizione avanzata (fig. 5b).

Ciascun pistone 5, 6 comprende una parete di testa ed un mantello laterale cilindrico.

Con riferimento alla struttura cilindrica cava precedentemente descritta del corpo 2, giova rilevare
5 che nella forma di realizzazione illustrata i pistoni 5, 6 sono vantaggiosamente inseriti nella camera di coltura 3 attraverso una rispettiva estremità aperta del corpo 2, in modo che l'estremità di testa del pistone risulti affacciata al porta scaffold 4 e allo
10 scaffold S su di esso eventualmente trattenuto.

In considerazione della struttura sopra descritta, i due pistoni 5, 6 risultano dunque essere affacciati fra loro in contrapposizione e i mezzi di supporto 4 degli scaffold S risultando interposti fra
15 i due pistoni 5, 6.

Come detto, ciascun pistone 5, 6 è scorrevolmente inserito nella camera di coltura 3, a partire da una rispettiva estremità aperta di quest'ultima, per compiere una prefissata corsa reversibile da una
20 posizione arretrata ad una posizione di fine corsa avanzata.

Nella posizione arretrata la parete di testa di ciascun pistone 5, 6 è posizionata in modo da sopravanzare di una prefissata quantità limitata la
25 rispettiva estremità aperta del corpo 2.

Differentemente, nella posizione di fine corsa avanzata ciascun pistone 5,6 è inserito nel corpo 2 fino ad arrivare a ridosso dei suddetti mezzi di supporto 4, in modo tale per cui la parete frontale di ciascun pistone 5, 6 possa esercitare un'efficace azione di compressione diretta sul lato ad essa affacciato dello scaffold S trattenuto dai mezzi di supporto 4.

Al fine di evitare il contatto con l'atmosfera esterna e la contaminazione della camera di coltura 3 del bioreattore 1, è bene che i pistoni 5, 6 eseguano le rispettive corse di lavoro senza mai fuoriuscire dal corpo cilindrico cavo 2.

Con riferimento alle figure qui allegate, è evidente che il primo pistone 5 agisce sul primo volume 3a della camera 3, mentre il secondo pistone 6 agisce sul secondo volume 3b della camera 3.

La tenuta a pressione di ciascun pistone 5, 6 con il corpo 2 della camera è assicurato dalla presenza di opportuni mezzi di guarnizione. Nell'esempio, ciascun pistone 5, 6 presenta sedi di guarnizione circonferenziali ricavate nel mantello laterale cilindrico, nelle quali sono alloggiati guarnizioni anulari. Queste guarnizioni anulari aggettano per una prefissata porzione dal mantello laterale del pistone

per fare tenuta con il corpo 2, indicativamente fino a valori di almeno 20 MPa.

Il bioreattore 1 comprende altresì mezzi di azionamento 8 per azionare il primo pistone 5 e il secondo pistone 6 nel modo sopra descritto. Secondo una forma di realizzazione preferita, i mezzi di azionamento 8 consentono azionare il primo pistone 5 ed il secondo pistone 6 in modo indipendente fra loro, così da rendere possibile l'azionamento anche di un solo pistone o l'azionamento contemporaneo e sincrono dei due pistoni in uno stesso verso o con verso opposto.

In particolare, ciascun pistone 5, 6 è collegato ad un rispettivo motore 10 mediante mezzi di trasmissione 9.

In una forma preferita di realizzazione il motore 10 è un motore elettrico di tipo passo-passo, grazie al quale è possibile controllare in modo preciso la posizione del pistone nella camera di coltura 3 del corpo 2. In alternativa è possibile prevedere un azionamento dei pistoni di tipo idraulico, pneumatico, elettromagnetico o di qualunque altro tipo idoneo a garantire precisione e velocità negli spostamenti.

Il bioreattore 1 comprende anche mezzi di azionamento e controllo per gestire il funzionamento

del bioreattore, ed in particolare per gestire il movimento dei pistoni 5, 6, secondo le modalità più sotto precisate. I mezzi di azionamento e controllo, comprendenti fra l'altro sensori, schede di acquisizione dati nonché mezzi di elaborazione e memorizzazione dati 12, sono in sé noti ad un tecnico del ramo e non verranno qui descritti.

Il corpo 2 del bioreattore comprende una prima luce di travaso 13 atta a mettere in comunicazione di fluido il primo volume 3a della camera 3 con un serbatoio di liquido di coltura 15 e una seconda luce di travaso 14 atta a mettere in comunicazione di fluido il secondo volume 3b con un secondo serbatoio di liquido di coltura 16. Giova rilevare che la rappresentazione dei suddetti serbatoi è stata omessa nelle figure 1, 3 e 4 per semplicità di rappresentazione.

Eventualmente è possibile prevedere la realizzazione di un unico serbatoio in comunicazione con entrambe le luci di travaso.

Come risulta dalle figure, la prima luce di travaso 13 è posizionata rispetto al corpo 2 in modo da risultare in corrispondenza di un tratto sostanzialmente mediano della corsa compiuta dal primo pistone 5 nel passare dalla posizione arretrata alla

posizione avanzata. In conseguenza di ciò, quando il primo pistone 5 è nella posizione arretrata, la luce di travaso 13 è aperta, vale a dire consente di stabilire una comunicazione di fluido fra il primo volume 3a della camera 3 e il serbatoio 15. Differentemente, quando il primo pistone 5 si trova a sopravanzare la luce di travaso 13, il mantello cilindrico laterale del primo pistone 5 assicura la chiusura della luce di travaso 13, interrompendo la comunicazione di fluido fra il primo volume 3a della camera 3 e il serbatoio 15.

In sostanza, il primo pistone 5 agisce come organo di intercettazione del flusso di fluido della luce di travaso 13, in grado consentire o impedire la comunicazione di fluido fra il serbatoio 15 e la camera 3 a seconda della sua posizione all'interno della camera 3.

Analogamente, a quanto sopra descritto per la prima luce di travaso 13, anche la seconda luce di travaso 14 è posizionata rispetto al corpo 2 in modo da risultare in corrispondenza di un tratto sostanzialmente mediano della corsa percorsa dal secondo pistone 6 per passare dalla posizione arretrata alla posizione avanzata. Anche in questo caso, il secondo pistone 6 agisce come organo di

intercettazione del flusso di fluido della luce di
travaso 14 in grado di consentire o di impedire la
comunicazione di fluido fra il serbatoio 16 e la
camera di coltura 3 a seconda della sua posizione
5 nella camera 3.

La posizione delle luci di travaso 13 e 14
rispetto al corpo 2 può anche differire da quella
mediana rispetto alla corsa dei rispettivi pistoni 5 e
6 sopra considerata, ma, in accordo con una forma di
10 realizzazione preferita, è bene che le luci di travaso
non vengano ad essere posizionate troppo a ridosso dei
mezzi di supporto 4.

In alternativa a quanto sopra descritto è
possibile associare a ciascuna luce di travaso
15 specifici mezzi valvolari di intercettazione di
fluido, eventualmente asserviti ai suddetti mezzi di
azionamento e controllo nel loro funzionamento di
apertura o chiusura. Ciò consente vantaggiosamente di
rendere indipendente dalla posizione dei pistoni la
20 condizione di apertura o chiusura delle luci di
travaso, seppure a fronte di una maggior complicazione
strutturale dovuta alla presenza dei mezzi valvolari
di intercettazione di fluido ed alla necessità di
doverne gestire l'azionamento in apertura/chiusura. In
25 questo caso le luci di travaso possono essere

convenientemente posizionate anche a ridosso dei mezzi di supporto degli scaffold e, eventualmente, prevedere la presenza di una sola luce di travaso anziché di due.

5 Ulteriormente, il corpo 2 del bioreattore 1 comprende un'apertura di scarico 18 attraverso la quale effettuare lo svuotamento completo del liquido di coltura contenuto nella camera di coltura 3. Vantaggiosamente, l'apertura di scarico 18 è
10 posizionata a ridosso dei mezzi di supporto 4 e ad essa sono associati ulteriori mezzi valvolari 19 di intercettazione di fluido, eventualmente asserviti ai suddetti mezzi di regolazione e controllo nel loro funzionamento di apertura o chiusura.

15 Come di seguito esposto, mediante una opportuna movimentazione dei pistoni 5,6, il bioreattore 1 sopra descritto permette di applicare alle cellule seminate sullo scaffold S supportato dai mezzi di supporto 4 i seguenti stimoli meccanici:

- 20 - compressione diretta, costante o ciclica;
 - compressione idrostatica, costante o ciclica;
 - sforzo di taglio a seguito di perfusione e
 - applicazione contemporanea di compressione idrostatica e sforzo di taglio.

25 Ulteriormente è possibile effettuare una efficace

azione di risciacquo dello scaffold S e di ricambio del liquido di coltura nella camera di coltura 3.

SOLLECITAZIONE PER COMPRESSIONE DIRETTA

Partendo da una condizione iniziale in cui il liquido di coltura è stato completamente scaricato dalla camera di coltura 3 attraverso l'apertura di scarico, la compressione diretta delle cellule in accrescimento su uno scaffold S supportato dai mezzi di supporto 4 è facilmente ottenibile facendo avanzare (anche in modo indipendente) entrambi i pistoni 5, 6 fino a portarli nella suddetta posizione operativa avanzata (fig. 5b) nella quale la parete frontale della testa di ciascun pistone 5, 6 agisce direttamente contro lo scaffold S supportato dai mezzi di supporto.

La compressione meccanica diretta cui il tessuto biologico ingegnerizzato in vitro è sottoposto può essere di tipo costante, ciclico o variato in qualunque altro modo a seconda delle specifiche necessità.

Nel caso in cui la camera di coltura 3 contenga del liquido, è sufficiente far avvicinare i pistoni 5 e 6 fra loro mentre l'apertura di scarico 18 è aperta (cfr. fig. 5a). In questo modo il primo volume 3a e il secondo volume 3b vengono ridotti a zero e il liquido di coltura contenuto fra le due contrapposte

estremità di testa dei pistoni 5 e 6 può essere convenientemente scaricato dalla camera di coltura attraverso l'apertura di scarico 18.

SOLLECITAZIONE PER COMPRESSIONE IDROSTATICA COSTANTE

5

O CICLICA

Partendo da una condizione iniziale in cui nella camera di coltura 3 è contenuto del liquido di coltura, la compressione idrostatica delle cellule in accrescimento su uno scaffold S supportato nella
10 camera 3 dai mezzi di supporto 4 è conseguibile facendo avvicinare i due pistoni 5, 6 in modo che entrambi si trovino a sopravanzare le rispettive luci di travaso 13 e 14. Al raggiungimento di tale condizione, si provvede a mantenere chiusa l'apertura
15 di scarico 18 e ad avvicinare ulteriormente i due pistoni fra loro per pressurizzare fino al valore di pressione prestabilito il liquido di coltura ancora contenuto nella camera individuata fra le due contrapposte pareti frontali dei pistoni 5, 6 (figure.
20 6a e 6c). È evidente che essendo il liquido di coltura praticamente incomprimibile per pressurizzare tale liquido è sufficiente agire sui due pistoni 5, 6 con una opportuna forza (indicata con F nelle figure 6a e 6c) senza che i pistoni stessi debbano compiere uno
25 spostamento apprezzabile. Per applicare una

sollecitazione di compressione idrostatica pulsante, ad esempio con frequenza di 1 Hz e ampiezza oscillante fra 15 MPa e 0 MPa, è sufficiente movimentare con una corsa trascurabile almeno uno dei due pistoni in
5 allontanamento (fig. 6b) e in avvicinamento dai mezzi di supporto 4 a partire dalla condizione precedentemente descritta nella quale il liquido è pressurizzato al valore di pressione desiderato.

SOLLECITAZIONE CON SFORZI DI TAGLIO

10 Partendo da una condizione iniziale in cui fra le due contrapposte pareti frontali dei pistoni 5,6 vi sia del liquido di coltura non pressurizzato, per sollecitare con sforzi di taglio le cellule di uno scaffold S supportato nella camera 3 dai mezzi di
15 supporto 4 è sufficiente far muovere nello stesso verso e in sincronia i due pistoni 5, 6, prima in un verso e poi nell'altro, ottenendo la perfusione del liquido attraverso lo scaffold S e le cellule su di esso seminate. Giova rilevare che nel caso in cui il
20 movimento simultaneo dei pistoni in un verso o nell'altro sia tale da non determinare mai l'apertura di una luce di travaso o dell'altra, la perfusione si realizza senza scambio di liquido con i serbatoi 15 e
16.

25 Differentemente, nel caso in cui la corsa di uno

dei due pistoni sia tale da determinare l'apertura di una delle due luci di travaso, la perfusione si realizza con contemporaneo parziale ricambio del liquido di coltura (figure 8a-8c).

5 Il ricambio del liquido di coltura può essere ottenuto fermando un pistone in modo che la rispettiva luce di travaso risulti aperta e facendo muovere avanti e indietro l'altro pistone.

APPLICAZIONE CONTEMPORANEA DI COMPRESSIONE

10 IDROSTATICA E SFORZI DI TAGLIO

Vantaggiosamente, il bioreattore 1 secondo l'invenzione consente di applicare alle cellule in accrescimento su uno scaffold S supportato nella camera 3 dai mezzi di supporto 4 sollecitazioni
15 simultaneamente derivanti da compressione idrostatica e perfusione (sforzi di taglio). In questo modo è possibile sottoporre le cellule in accrescimento del tessuto biologico ingegnerizzato ad una sollecitazione di tipo complesso (figure 7a-7c).

20 Per ottenere ciò, partendo da una condizione iniziale nella quale il liquido di coltura contenuto fra le due pareti frontali dei pistoni è pressurizzato al valore di pressione desiderato (secondo la modalità precedentemente descritta e illustrata in figura 7a),
25 è sufficiente spostare in modo simultaneo nello stesso

verso e della stessa quantità i due pistoni 5, 6,
prima in un verso (fig. 7b) e poi nell'altro verso
(fig. 7c), facendo in modo che la corsa di entrambi i
pistoni 5, 6 sia limitata in modo da non determinare
5 l'apertura delle luci di travaso. Più nel dettaglio,
per evitare di aprire le luci di travaso e avere
ancora una discreta corsa utile, è sufficiente partire
da una condizione iniziale di pressurizzazione (fig.
7a) nella quale le contrapposte pareti frontali dei
10 due pistoni sono abbastanza vicine (ad esempio
distanziate di una distanza pari alla metà della
distanza fra le due luci di travaso).

In particolare, il metodo per la stimolazione
meccanica complessa di un tessuto biologico
15 ingegnerizzato mediante un bioreattore in accordo con
la presente invenzione comprende le fasi di:

- posizionare uno scaffold S seminato sui mezzi
di supporto 4 nella camera di coltura 3,
- riempire la camera di coltura 3 con un liquido
20 di coltura,

- posizionare il primo pistone 5 e il secondo
pistone 6 in modo da pressurizzare fino ad un
prefissato valore di soglia il liquido di coltura
contenuto nel volume ristretto compreso fra le
25 estremità di testa dei contrapposti pistoni 5, 6, e

- pilotare il primo pistone 5 e il secondo pistone 6 in modo da ottenere una contemporanea traslazione sincrona, limitata e in uno stesso verso del primo pistone 5 e del secondo pistone 6, così da
5 ottenere una corrispondente traslazione del suddetto volume ristretto pressurizzato. La traslazione del suddetto volume ristretto in pressione determina dunque la perfusione dello scaffold S in concomitanza con la sollecitazione di compressione idrostatica
10 dovuta alla pressurizzazione del suddetto volume ristretto.

A titolo indicativo, il suddetto volume ristretto è pressurizzato ad una pressione superiore a 10 MPa e fino a valori di pressione di 16 MPa, preferibilmente
15 15MPa.

Come si può apprezzare da quanto descritto, il bioreattore per la generazione e la stimolazione meccanica complessa di tessuto biologico ingegnerizzato secondo la presente invenzione consente
20 di soddisfare la suddetta esigenza e di superare nel contempo gli inconvenienti di cui si è riferito nella parte introduttiva della presente descrizione con riferimento alla tecnica nota. Infatti, il suddetto bioreattore consente di sottoporre le cellule in
25 accrescimento a sollecitazioni per: compressione

meccanica diretta (di tipo costante, ciclica o variata in un qualunque altro modo), compressione idrostatica (costante, ciclica o variata in un qualunque altro modo) e sforzo di taglio, nonché a sollecitazioni
5 complesse comprendenti una contemporanea sollecitazione di compressione idrostatica e sforzo di taglio.

Ulteriormente, il bioreattore consente di effettuare una efficace azione di risciacquo dello
10 scaffold S e di ricambio del liquido di coltura nella camera di coltura.

Inoltre, il bioreattore secondo la presente invenzione non pone alcun problema di debollamento della camera di coltura, evitando la presenza di
15 bolle d'aria che inficerebbe la ripetibilità delle prove di coltura sia in pressione che in perfusione. Infatti, analisi qualitative volte ad evidenziare l'evoluzione delle linee di flusso all'interno della camera di coltura e condotte con l'uso di un
20 tracciante durante l'esecuzione della fase di perfusione, hanno dimostrato che la fluidodinamica all'interno della camera di coltura permette una uniforme distribuzione del flusso di liquido di coltura sull'intera superficie dello scaffold S e non
25 sono rilevabili zone di ricircolo e di ristagno del

flusso. Ciò garantisce una uniforme stimolazione ed un omogeneo apporto di nutrienti a tutti i condrociti coltivati.

Test quantitativi condotti durante
5 l'applicazione di trattamenti di perfusione hanno evidenziato la capacità del bioreattore secondo l'invenzione di processare con buona precisione anche portate di liquido di coltura molto basse, permettendo l'applicazione sui condrociti seminati di
10 sforzi di taglio pari a quelli agenti in vivo. È stata riscontrata la possibilità di impostare adeguatamente il sistema di controllo dei motori passo-passo al fine di definire adeguate accelerazioni che consentano di ottenere cicli di
15 pressurizzazione ottimali, ad esempio 0-15 MPa alla frequenza di 1 Hz.

Un altro vantaggio del bioreattore per la generazione e la stimolazione meccanica complessa di tessuto biologico ingegnerizzato secondo la presente
20 invenzione risiede nel fatto che il funzionamento del bioreattore è totalmente automatizzabile ed offre la possibilità di generare i più svariati pattern di stimolazione del tessuto in fase di sviluppo, tramite un sistema di controllo preciso, versatile e di
25 semplice utilizzo.

Un ulteriore vantaggio del bioreattore per la generazione e la stimolazione meccanica complessa di tessuto biologico ingegnerizzato secondo la presente invenzione risiede nella inusitata semplicità strutturale del bioreattore, tale da assicurare la semplicità di realizzazione e l'affidabilità di funzionamento.

Ovviamente, un tecnico del ramo, allo scopo di soddisfare esigenze contingenti e specifiche, potrà apportare numerose modifiche e varianti al bioreattore per la generazione e la stimolazione meccanica complessa di tessuto biologico ingegnerizzato sopra descritto, tutte peraltro contenute nell'ambito di protezione dell'invenzione quale definito dalle seguenti rivendicazioni.

Così, è possibile prevedere la presenza di più di due pistoni, ad esempio nel caso in la camera di coltura sia individuata da un corpo a più rami, ad esempio a T o a crociera.

20

*** * ***

RIVENDICAZIONI

1. Bioreattore per la generazione e la stimolazione meccanica complessa di tessuto biologico ingegnerizzato, comprendente:

5 - un corpo (2) definente una camera di coltura (3) di un prefissato volume atta ad essere riempita con un liquido di coltura,

- mezzi di supporto (4) per supportare in detta camera di coltura (3) almeno uno scaffold (S) e

10 - mezzi attuatori (5,6) atti ad essere azionati per operare su detto volume di detta camera di coltura (3), in modo da interagire con il liquido di coltura con cui detta camera di coltura (3) è atta ad essere riempita,

15 detti mezzi di supporto (4) suddividendo il volume di detta camera di coltura (3) in un primo volume (3a) ed in un secondo volume (3b),

caratterizzato dal fatto che detti mezzi attuatori comprendono almeno un primo pistone (5) ed un secondo

20 pistone (6), ciascun pistone tuffante essendo scorrevolmente associato a tenuta con detto corpo (2) per compiere in detta camera di coltura (3) una prefissata corsa di lavoro da una posizione arretrata ad una posizione avanzata, in cui detto primo pistone
25 (5) agisce su detto primo volume (3a) e detto secondo

pistone (6) agisce su detto secondo volume (3b) di detta camera di coltura (3).

2. Bioreattore in accordo con la rivendicazione 1, comprendente mezzi di azionamento (10,12) per
5 azionare detto primo pistone (5) e detto secondo pistone (6) in detta camera di coltura (3) in modo indipendente fra loro.

3. Bioreattore in accordo con la rivendicazione 1 o 2, comprendente una prima luce di travaso (13) atta a
10 mettere in comunicazione di fluido detto primo volume (3a) di detta camera di coltura (3) con un serbatoio di liquido di coltura (15).

4. Bioreattore in accordo con la rivendicazione 3, comprendente una seconda luce di travaso (14) atta a
15 mettere in comunicazione di fluido detto secondo volume (3b) di detta camera di coltura (3) con un serbatoio di liquido di coltura (16).

5. Bioreattore in accordo con la rivendicazione 3 o 4, in cui detta prima luce di travaso (13) è
20 posizionata in detto corpo (2) in modo da risultare in corrispondenza di un tratto percorso da detto primo pistone (5) durante detta corsa di lavoro dalla posizione arretrata alla posizione avanzata, quando detto primo pistone (5) è posizionato in detta camera
25 di coltura (3) in modo da sopravanzare la prima luce

di travaso (13), detta prima luce di travaso (13) risultando chiusa.

6. Bioreattore in accordo con la rivendicazione 5, in cui detta seconda luce di travaso (14) è
5 posizionata in detto corpo (2) in modo da risultare in corrispondenza di un tratto percorso da detto secondo pistone (6) durante detta corsa di lavoro dalla posizione arretrata alla posizione avanzata, quando detto secondo pistone (6) è posizionato in
10 detta camera di coltura (3) in modo da sopravanzare la seconda luce di travaso (14), detta seconda luce di travaso (14) risultando chiusa.

7. Bioreattore in accordo con la rivendicazione 3, in cui a detta prima luce di travaso (13) sono
15 associati mezzi valvolari di intercettazione di fluido.

8. Bioreattore in accordo con la rivendicazione 4, in cui a detta seconda luce di travaso (14) sono associati mezzi valvolari di intercettazione di
20 fluido.

9. Bioreattore in accordo con una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 8, in cui detto corpo (2) comprende un'apertura di scarico (18) di detta camera di coltura (3), a detta apertura di scarico (18)
25 essendo associati mezzi valvolari (19) di

intercettazione di fluido atti a comandare l'apertura e la chiusura di detta apertura di scarico (18).

10. Bioreattore in accordo con la rivendicazione 9, in cui detta apertura di scarico è posizionata a
5 ridosso di detti mezzi di supporto (4) per supportare in detta camera di coltura (3) almeno uno scaffold (S).

11. Bioreattore in accordo con una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 10, in cui ciascuno di detti
10 primo pistone (5) e secondo pistone (6) è mobile in detto corpo (2) fino ad una posizione di fine corsa avanzata nella quale detto pistone (5,6) arriva a ridosso di detti mezzi di supporto (4) per esercitare una azione di compressione diretta su uno scaffold
15 (S) ivi trattenuto.

12. Bioreattore in accordo con una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 11, in cui detti primo pistone (5) e secondo pistone (6) sono contrapposti fra loro.

13. Bioreattore in accordo con una qualunque delle
20 rivendicazioni da 1 a 12, in cui detto corpo (2) è un corpo cilindrico cavo avente contrapposte estremità aperte attraverso le quali detto primo pistone (5) e detto secondo pistone (6) si inseriscono in detta camera di coltura (3).

25 14. Bioreattore in accordo con una qualunque delle

rivendicazioni da 1 a 13, comprendente mezzi di guarnizione atti ad assicurare una tenuta a pressione fino a valori di almeno 20 MPa fra detti pistoni e detto corpo (2).

5 15. Metodo per la stimolazione meccanica complessa di tessuto biologico ingegnerizzato mediante un bioreattore in accordo con una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 13, detto metodo comprendendo le fasi di:

10 - posizionare uno scaffold (S) seminato su detti mezzi di supporto (4) in detta camera di coltura (3),

- riempire detta camera di coltura (3) del bioreattore (1) con un liquido di coltura,

15 - posizionare detti primo pistone (5) e secondo pistone (6) in modo da pressurizzare fino ad un prefissato valore di soglia il liquido di coltura

contenuto in un volume ristretto individuato nella camera di coltura (3) fra le contrapposte estremità di detti pistoni nel quale è inserito detto scaffold

20 (S), caratterizzato dal fatto di comprendere la fase di pilotare detto primo pistone (5) e detto secondo pistone (6) in modo da ottenere:

- una contemporanea traslazione limitata in uno stesso verso di detto primo pistone (5) e di detto

25 secondo pistone (6) e

- una corrispondente traslazione di detto volume ristretto pressurizzato

così da ottenere la perfusione dello scaffold (S) in concomitanza con una sollecitazione di compressione idrostatica.

16. Metodo in accordo con la rivendicazione 15, in cui detta fase di pilotare detti primo pistone (5) e secondo pistone (6) in modo da ottenere una contemporanea traslazione limitata in uno stesso verso detti primo pistone (5) e secondo pistone (6) e una corrispondente traslazione di detto volume ristretto pressurizzato viene ripetuta alternativamente in un verso e nell'altro.

17. Metodo in accordo con la rivendicazione 15 o 16, in cui detto volume ristretto è pressurizzato ad una pressione superiore a 10 MPa.

18. Metodo in accordo con la rivendicazione 17, in cui detto volume ristretto è pressurizzato fino a valori di pressione di 16 MPa, preferibilmente 15MPa.

20

Ing. Massimo SIMINO
N. Iscr. ALBO 813 B
(in proprio e per gli altri)

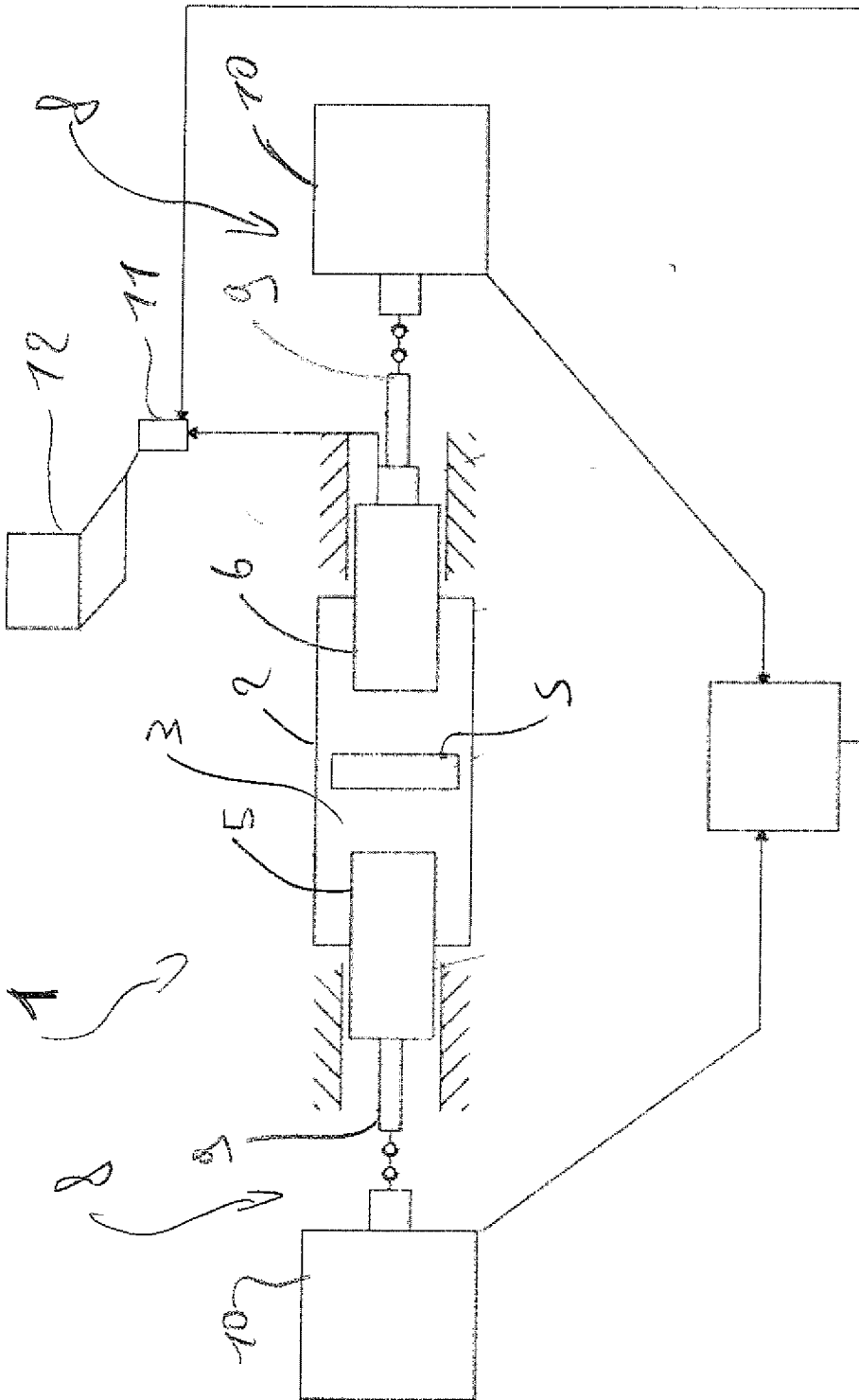


Fig. 1

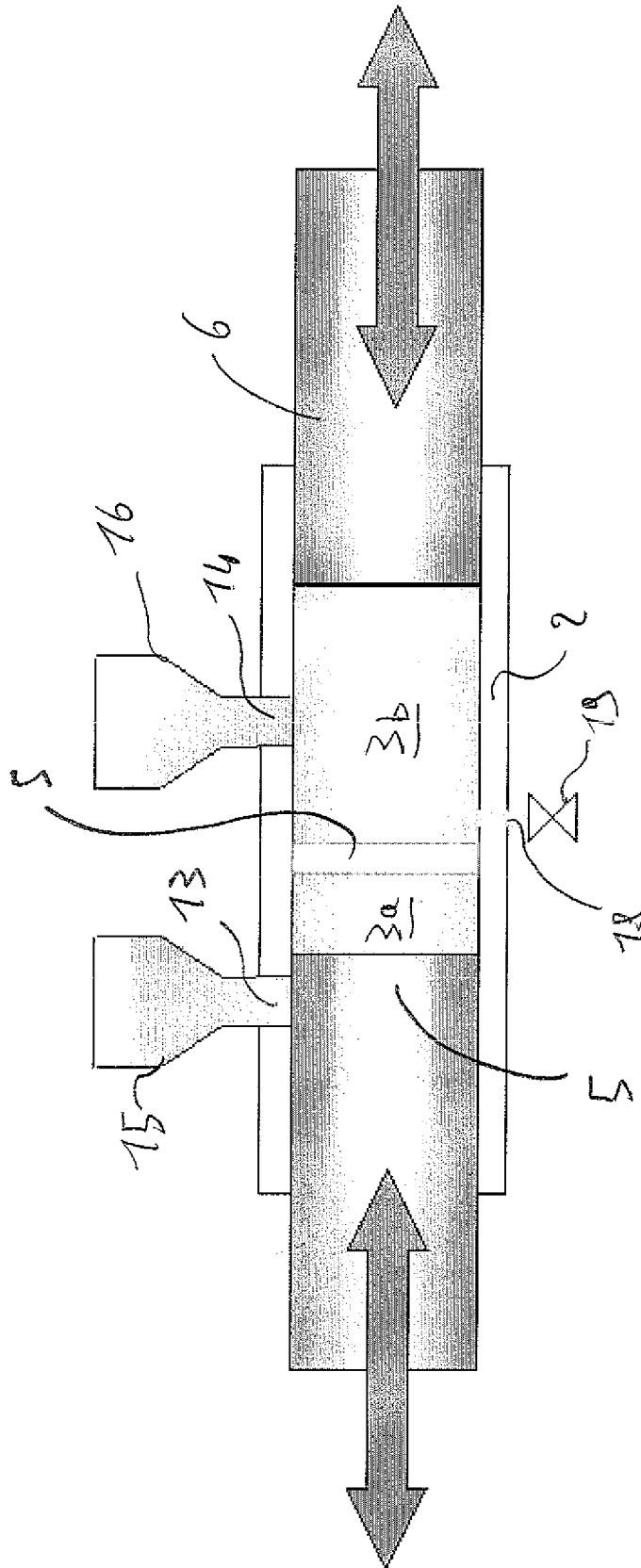


Fig. 2

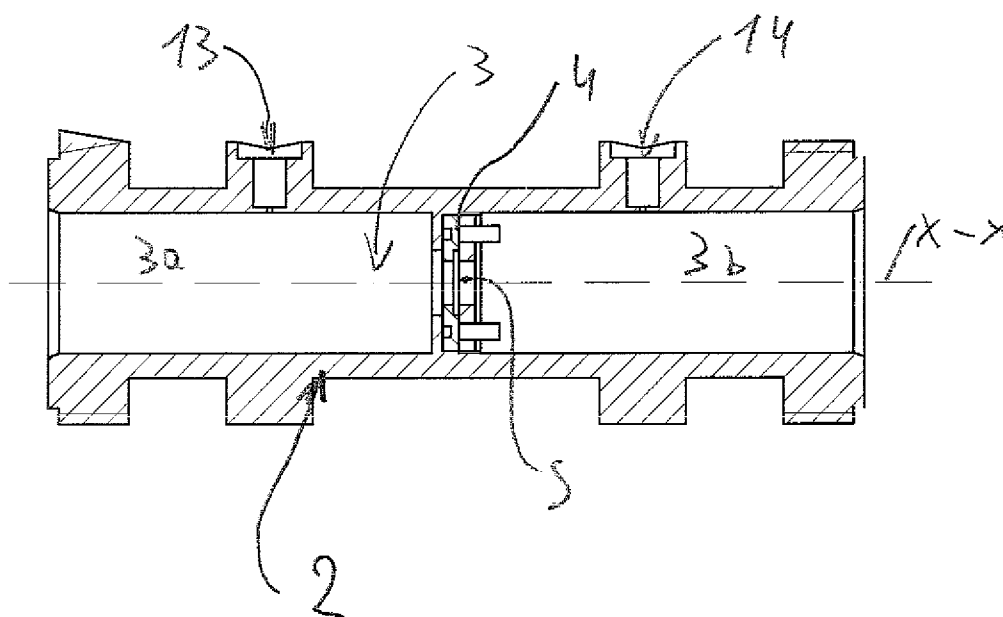


Fig. 4

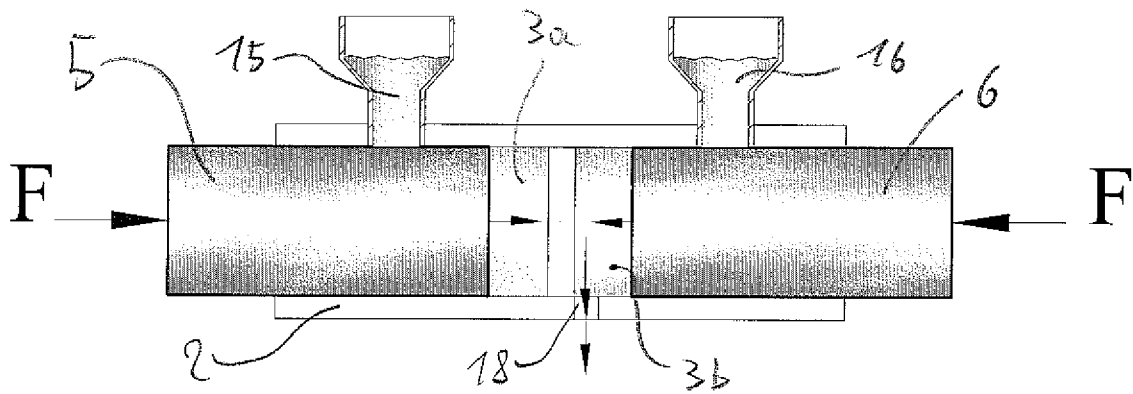


Fig. 5a

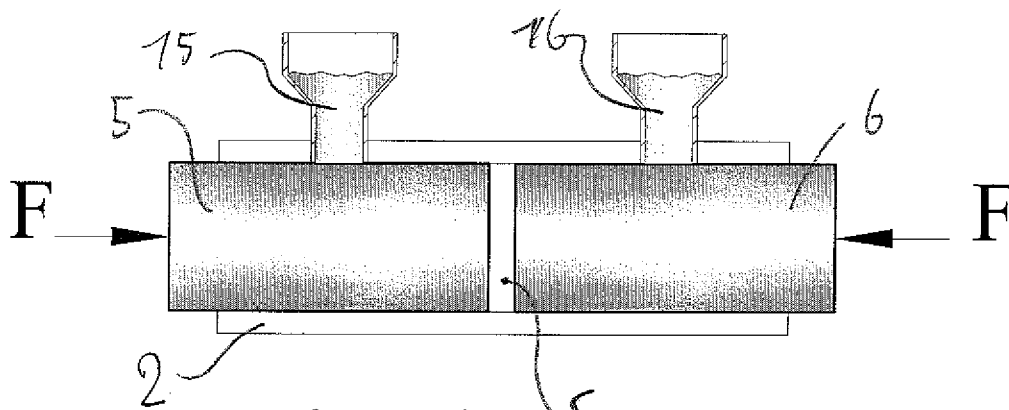


Fig. 5b

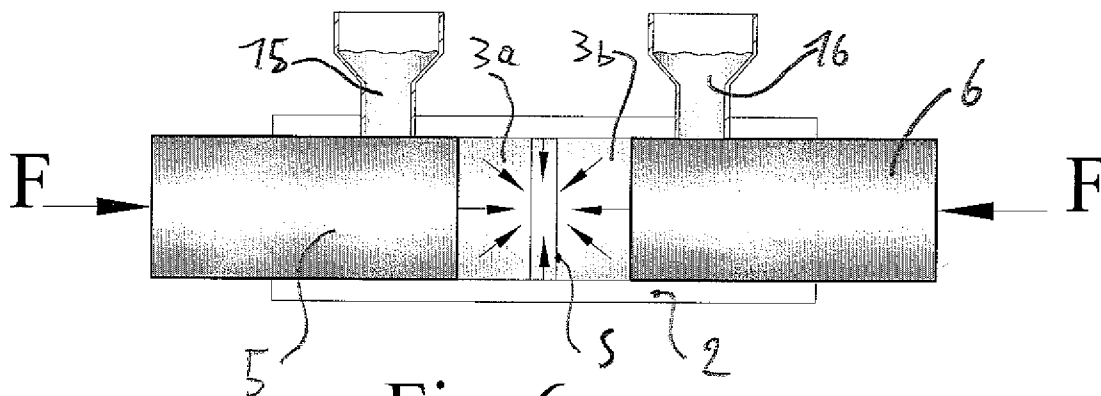


Fig. 6a

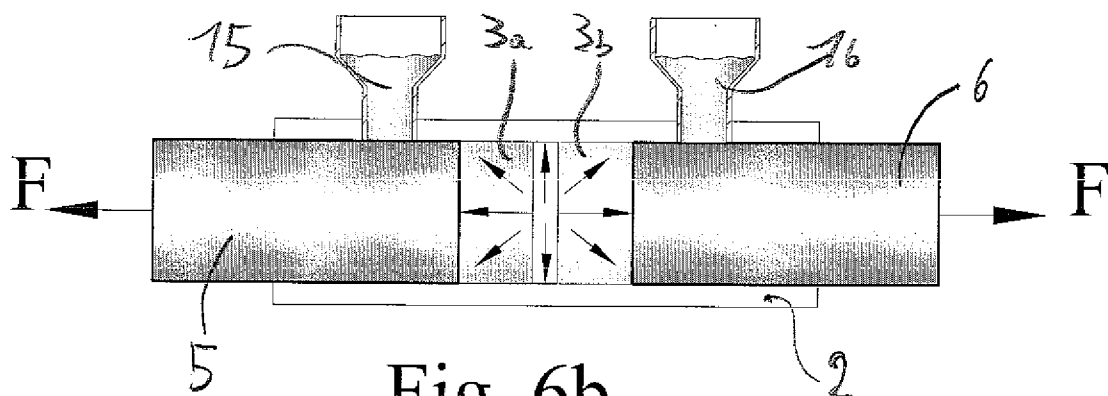


Fig. 6b

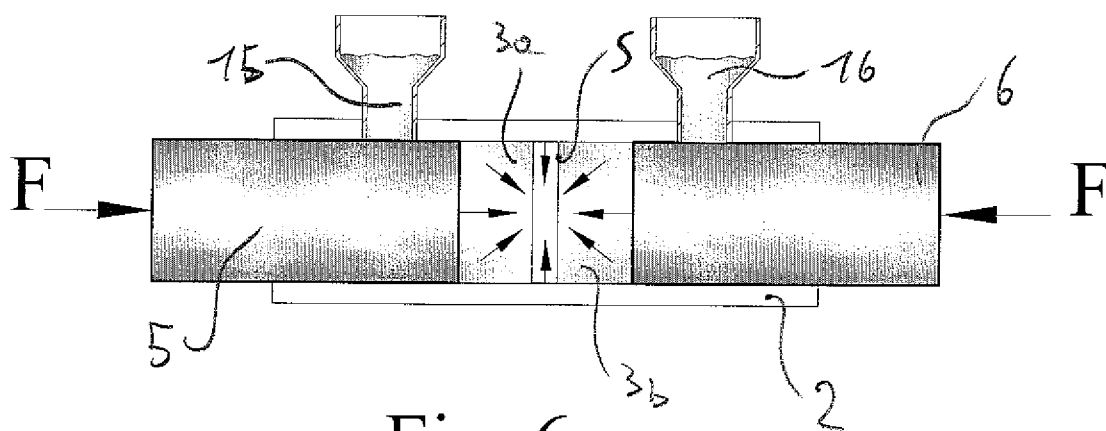


Fig. 6c

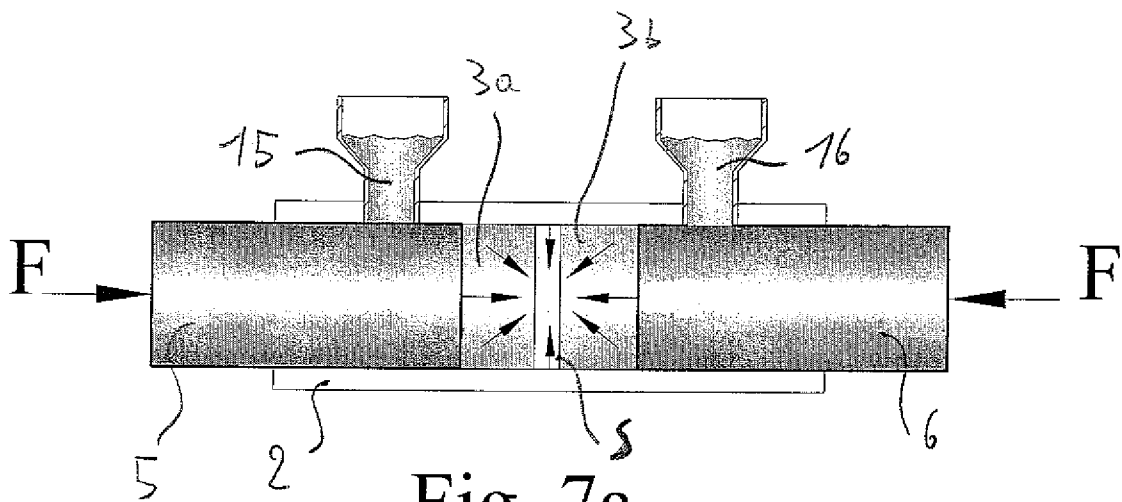


Fig. 7a

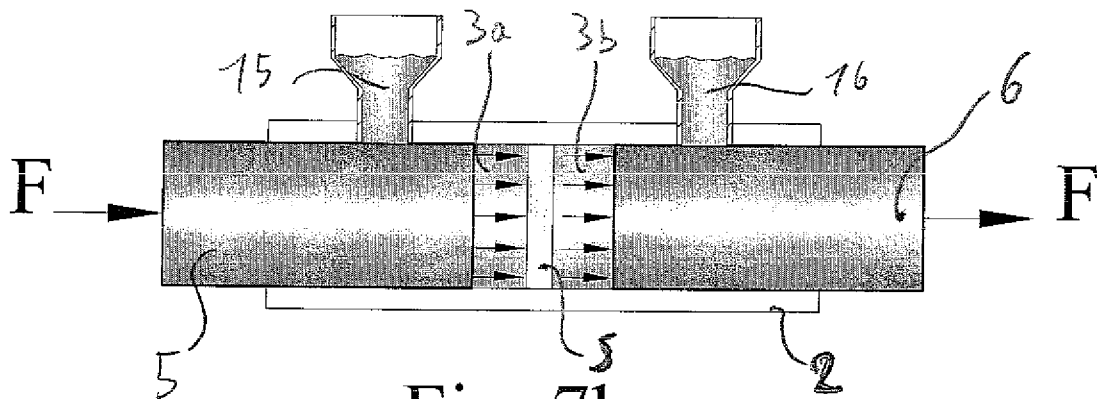


Fig. 7b

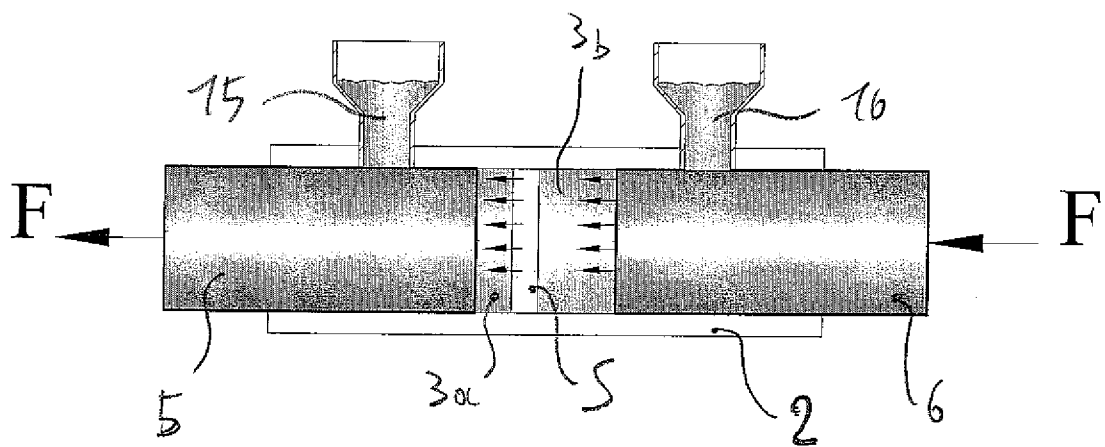


Fig. 7c

