

E. Ghinelli, K.R. Kenyon, L. Vedovelli, L. Cavenaghi, A. Paolin

**"Estratto Liofilizzato di Membrana Amniotica Umana:
dagli studi di laboratorio,
alla distribuzione di massa,
passando per la Banca Dei Tessuti
e la Sperimentazione Clinica"
Risultati definitivi del Trial Clinico Europeo.**

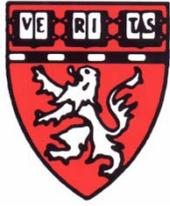
Bologna, SIBO 24 Febbraio 2011



Che cos'è L'estratto Liofilizzato di Membrana Amniotica

Anche chiamato "AMX"

**A. Amniotic
M. Membrane
X. Extract**



Banca dei Tessuti
della Regione Veneto



Che cos'è L'estratto Liofilizzato di Membrana Amniotica

L' AMX NON E'...

NULLA DI NUOVO!!!

**MA SOLO MEMBRANA AMNIOTICA UMANA
IN DIVERSO STATO FISICO**

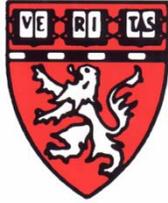


Che cos'è L'estratto Liofilizzato di Membrana Amniotica

L' AMX è Un Metodo Brevettato

**U.S. PAT. No. 7,871,646
(Issue Date: Jan 18th 2011)**

**di Manipolazione Tessutale Minima
Allo scopo di modificare lo stato Fisico
Della Membrana Amniotica Umana**



METHODS

1. Mol. , Tox. , Cell. , and Animal Studies

(E. Ghinelli 3 min.)

2. Why the Tissue Bank and How to Trial

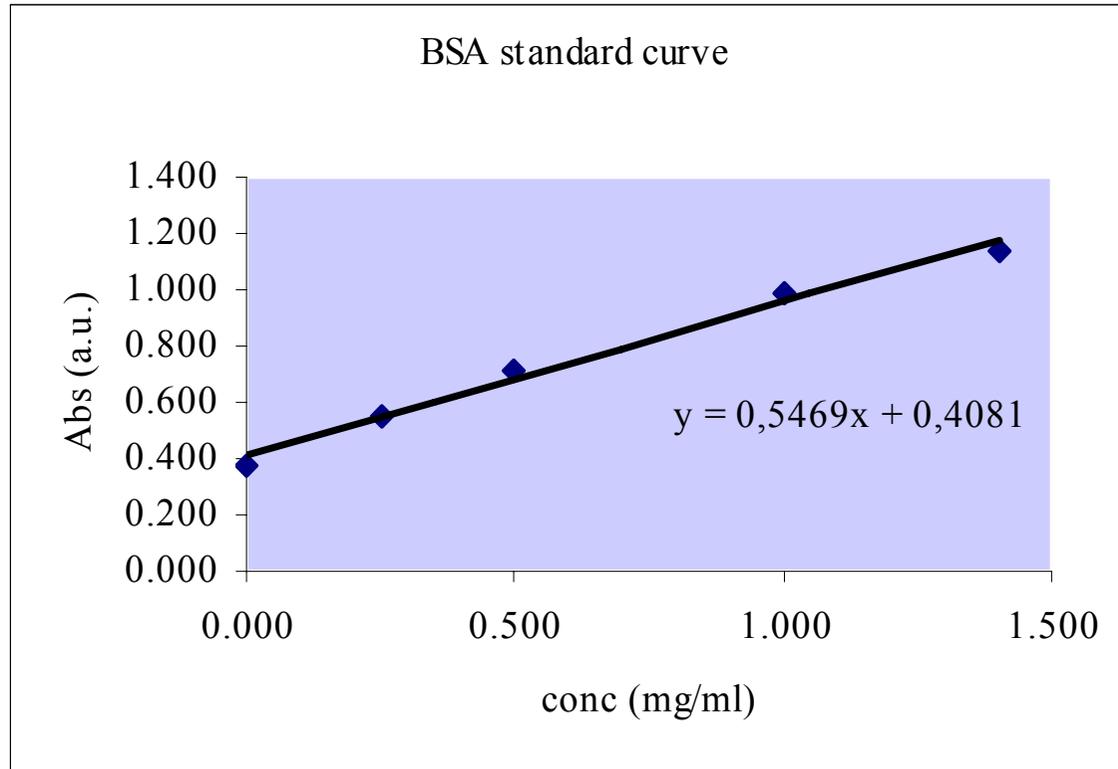
(A. Paolin 3 min.)

3. Standard & Appropriate Mass Production

(L. Cavenaghi 3 min.)

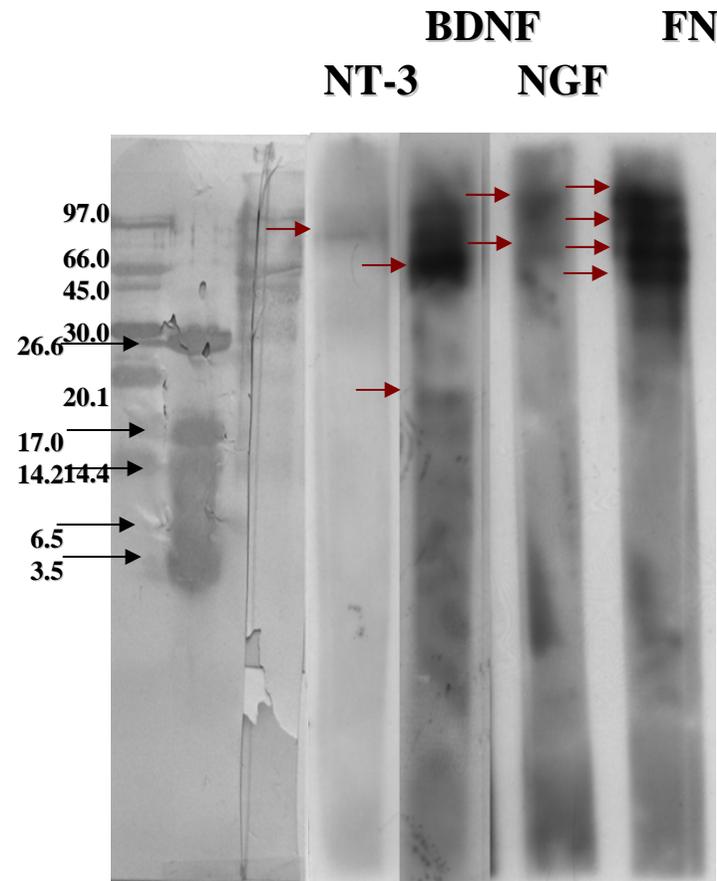
MOLECULAR STUDIES:

AMX TOTAL PROTEIN CONCENTRATION



<i>BSA conc mg/ml</i>	<i>Abs</i>	<i>SAMPLE</i>	<i>mean concentration (mg/ml)</i>	<i>weighted mg</i>	<i>resuspension volume (µl)</i>	<i>µg protein/mg weighted</i>	<i>% of recovery</i>
0,000	0,371	NF NS	0,209 ± 0,002	1,5 ± 0,1	160 ± 1	22,280	100
0,250	0,555	F NS	0,119 ± 0,004	1,2 ± 0,1	160 ± 1	12,658	56,8
0,500	0,711	F S	0,091 ± 0,010	1,3 ± 0,1	160 ± 1	9,732	43,7
1,000	0,989	NF S	0,136 ± 0,013	1,7 ± 0,1	160 ± 1	14,543	65,3

MOLECULAR STUDIES: WESTERN BLOT



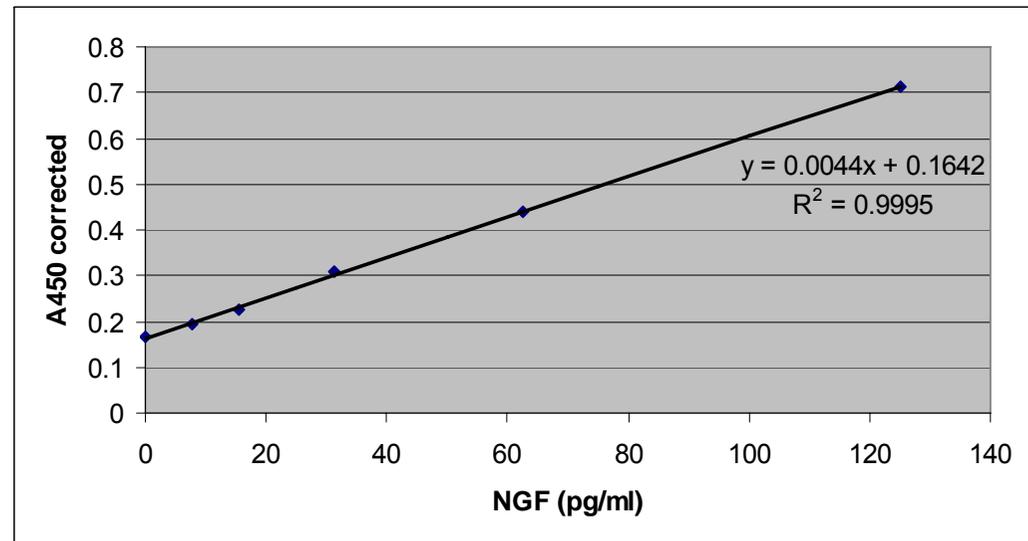
**Apparent MW consistent for :
Fibronectin, NGF, BDNF and NT-3 presence**

MOLECULAR STUDIES:

ELISA TEST (Promega NGF Emax)

Standard Curve

			Mean	Std. Dev.
1.612	1.564	1.522	1.566	0.045033
1.157	1.043	1.04	1.08	0.066701
0.771	0.683	0.686	0.713333	0.049963
0.435	0.442	0.442	0.439667	0.004041
0.314	0.315	0.298	0.309	0.009539
0.219	0.225	0.237	0.227	0.009165
0.19	0.192	0.203	0.195	0.007
0.149	0.157	0.195	0.167	0.024576



NGF levels: 8.4 pg/mL

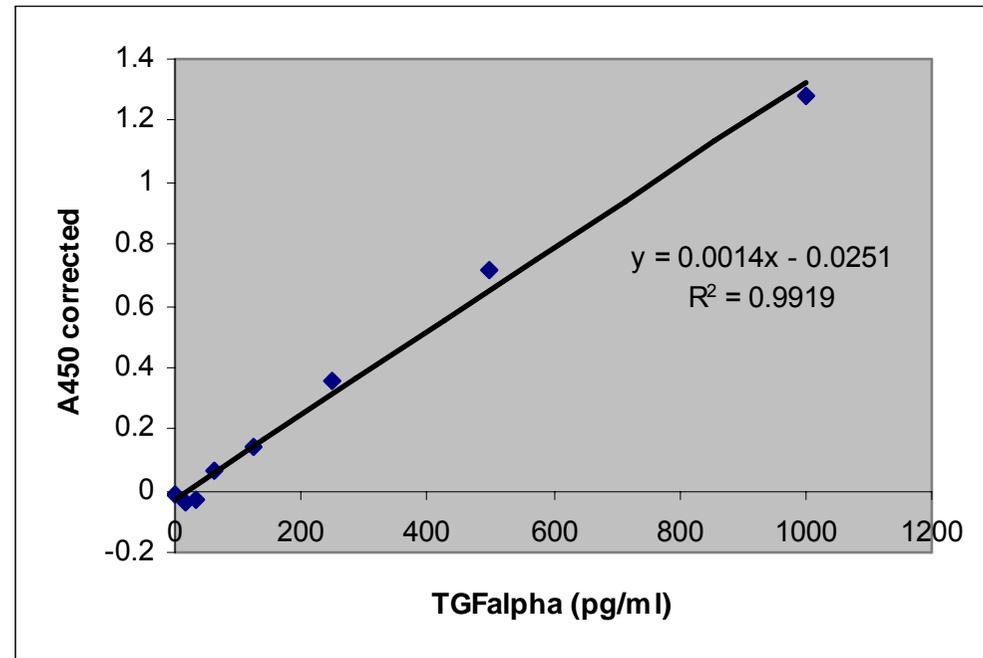
$p < 0.01$

MOLECULAR STUDIES:

ELISA TEST (R&D TGF-alpha Quantikine)

Standard Curve

pg/ml				Mean
1000	1.164	1.286	1.402	1.284
500	0.708	0.637	0.812	0.719
250	0.297	0.398	0.376	0.357
125	0.144	0.082	0.196	0.140667
62.5	0.056	0.12	0.012	0.062667
31.2	-0.064	0.04	-0.072	-0.032
15.6	-0.051	0.026	-0.1	-0.04167
0	-0.081	-0.007	0.065	-0.00767



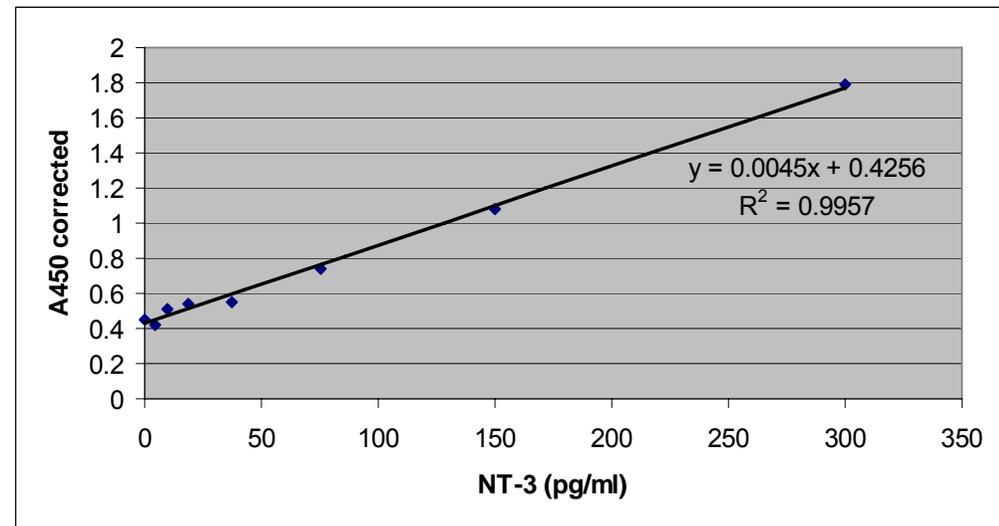
TGF-alpha levels: 15.4 pg/mL

$p < 0.01$

MOLECULAR STUDIES:

ELISA TEST (Promega NT-3 Emax)

pg/ml	Standard Curve			Mean	Std. Dev.
300	1.728	1.992	1.657	1.7923 33	0.1765 23
150	1.113	1.086	1.038	1.079	0.0379 87
75	0.743	0.737	0.739	0.7396 67	0.0030 55
37.5	0.567	0.544	0.553	0.5546 67	0.0115 9
18.8	0.54	0.485	0.599	0.5413 33	0.0570 12
9.4	0.499	0.461	0.561	0.507	0.0504 78
4.7	0.391	0.421	0.447	0.4196 67	0.0280 24
0	0.403	0.513	0.426	0.4473 33	0.0580 2



NT-3 levels: 25.05 pg/mL

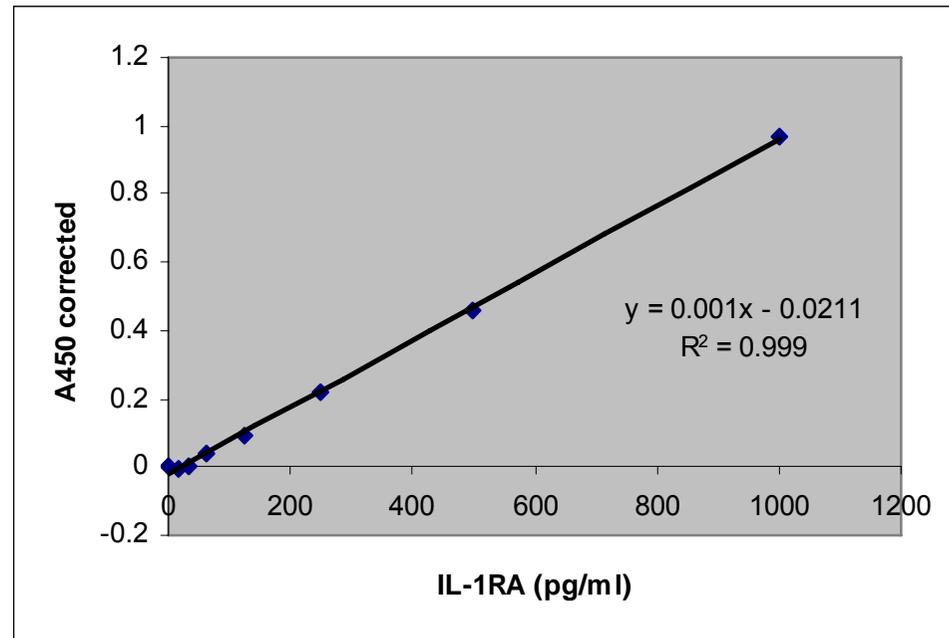
$p < 0.01$

MOLECULAR STUDIES:

ELISA TEST (R&D IL-1ra Quantikine)

Standard Curve

pg/ml				Mean
1000	0.959	0.992	0.959	0.97
500	0.444	0.44	0.501	0.461667
250	0.214	0.209	0.225	0.216
125	0.089	0.094	0.097	0.093333
62.5	0.037	0.038	0.039	0.038
31.2	0.008	0.001	0.004	0.004333
15.6	-0.004	0.002	-0.004	-0.002
0	-0.009	0.018	-0.006	0.001

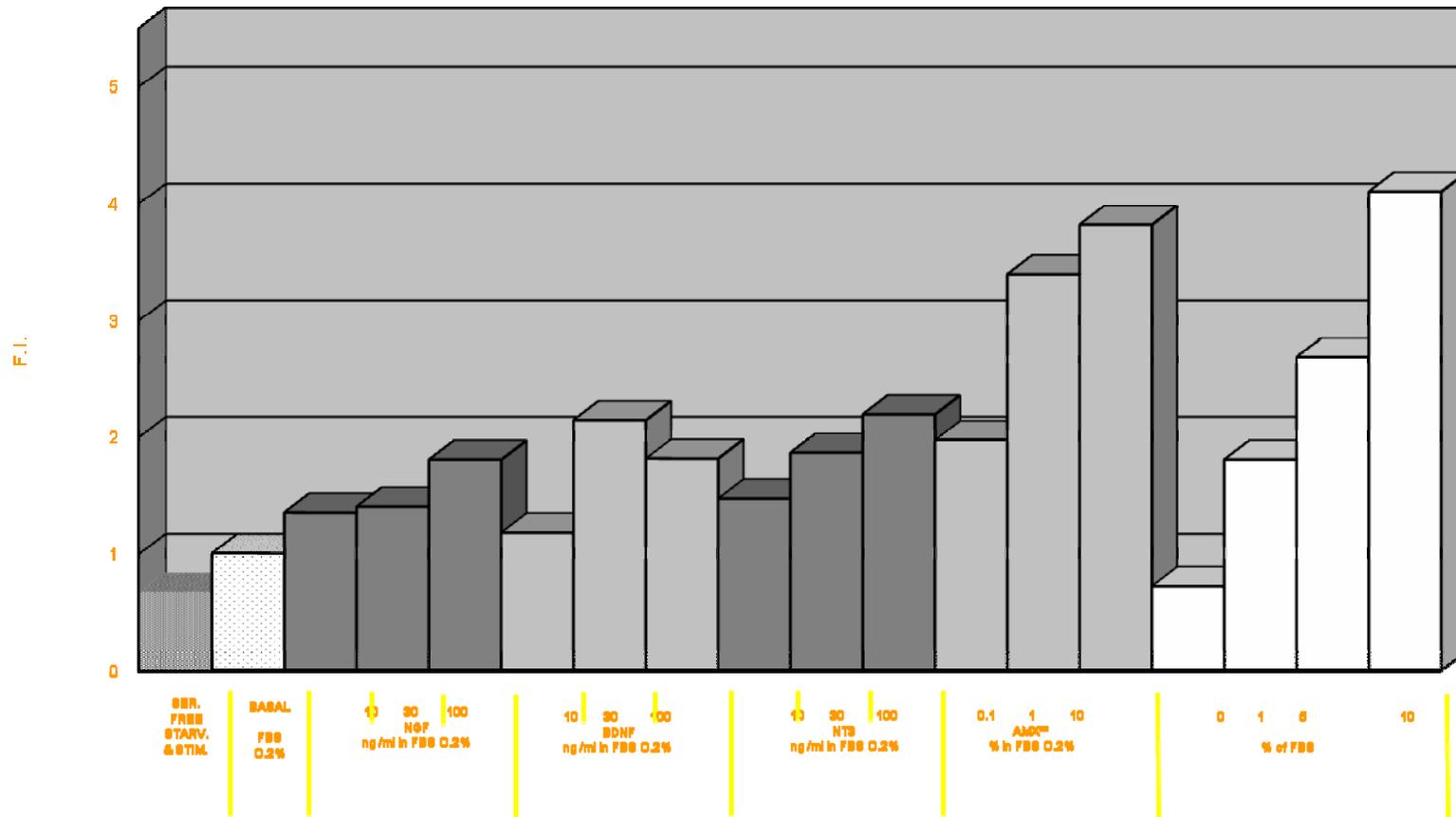


IL-1ra levels: 851.11 pg/mL

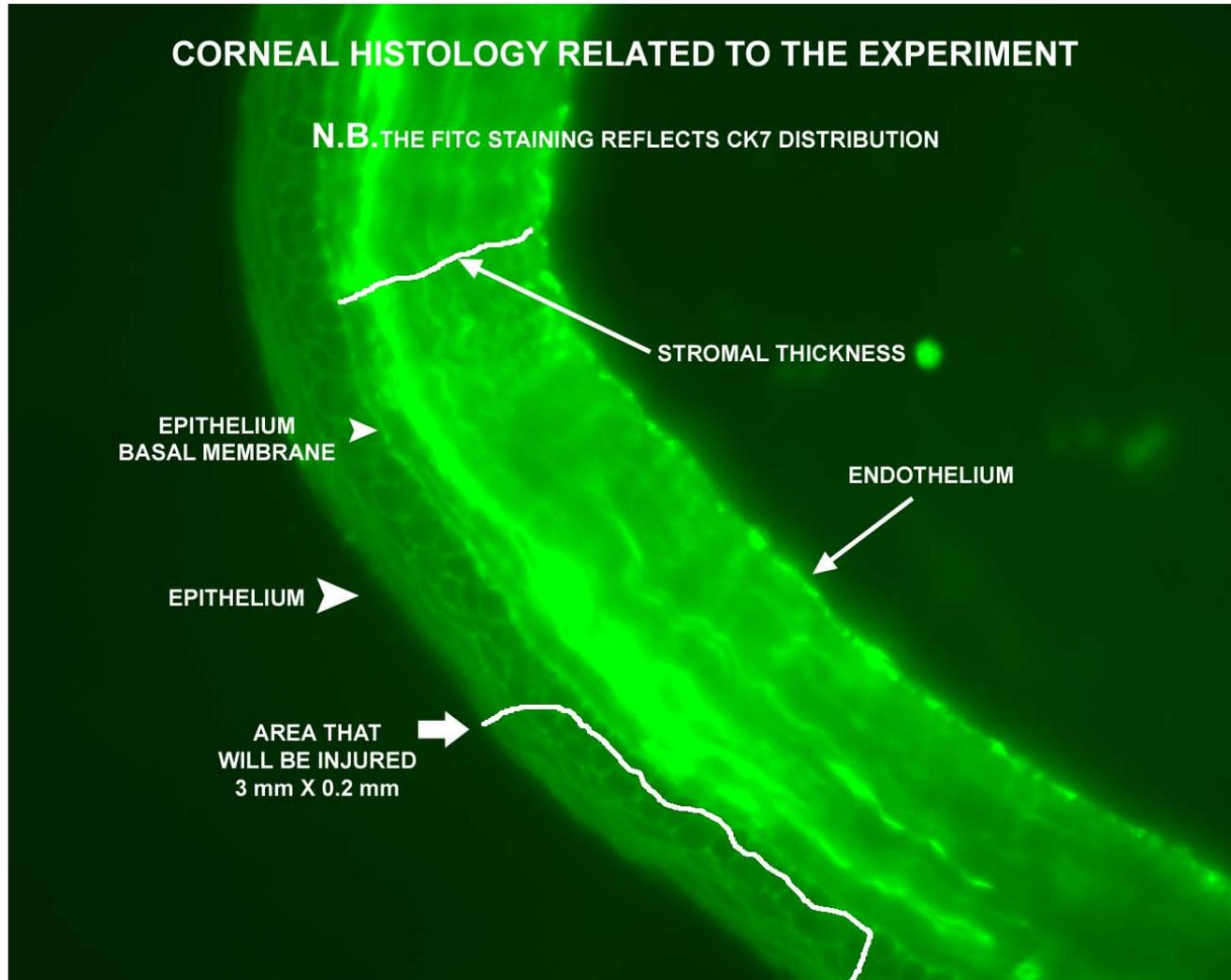
$p < 0.01$

TOXICITY AND CELL STUDIES RESULTS

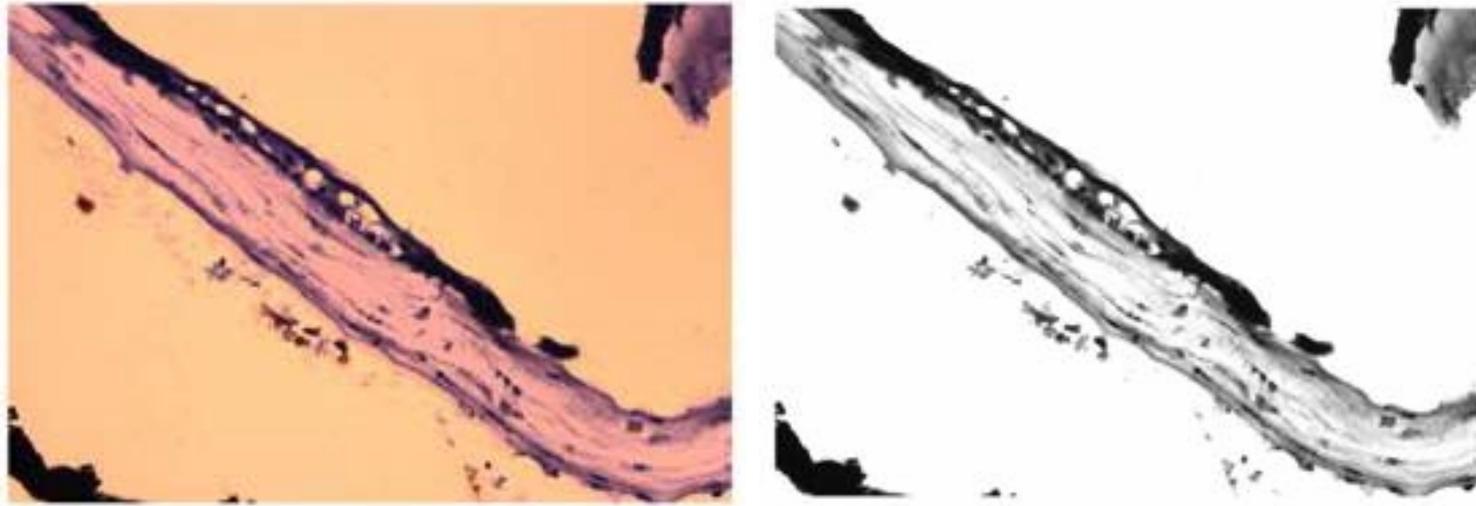
In-Vitro PROLIFERATION RATE
 HUMAN EPITHELIAL CELLS FROM CONJUNCTIVAL SCRAPING (n=5)



ANIMAL STUDIES



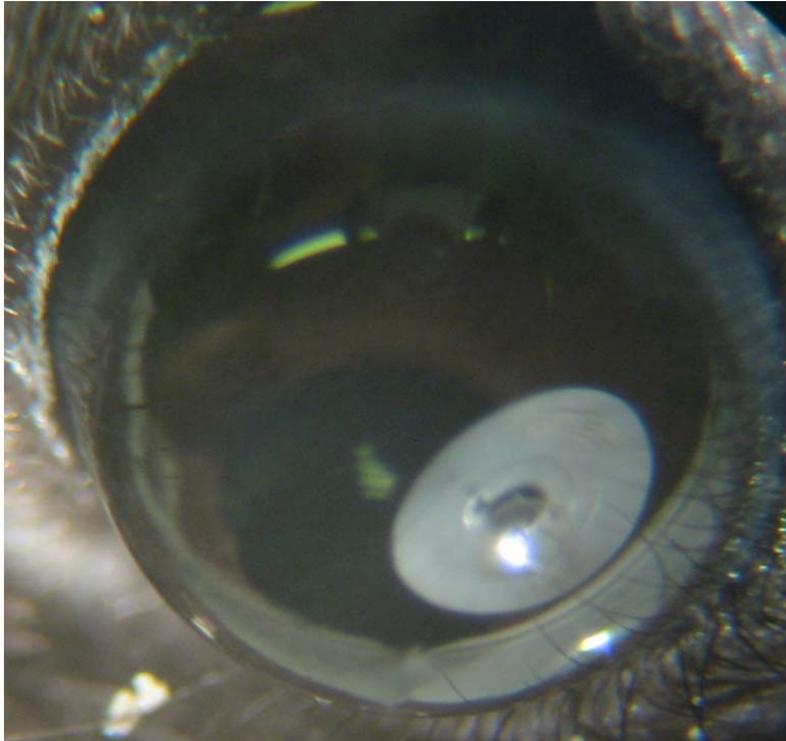
ANIMAL STUDIES



AMX Healing rate in a murine model of 20% ETOH
for 60 seconds corneal epithelial debridement 3mm
diameter**

Evaluated after 12 hours

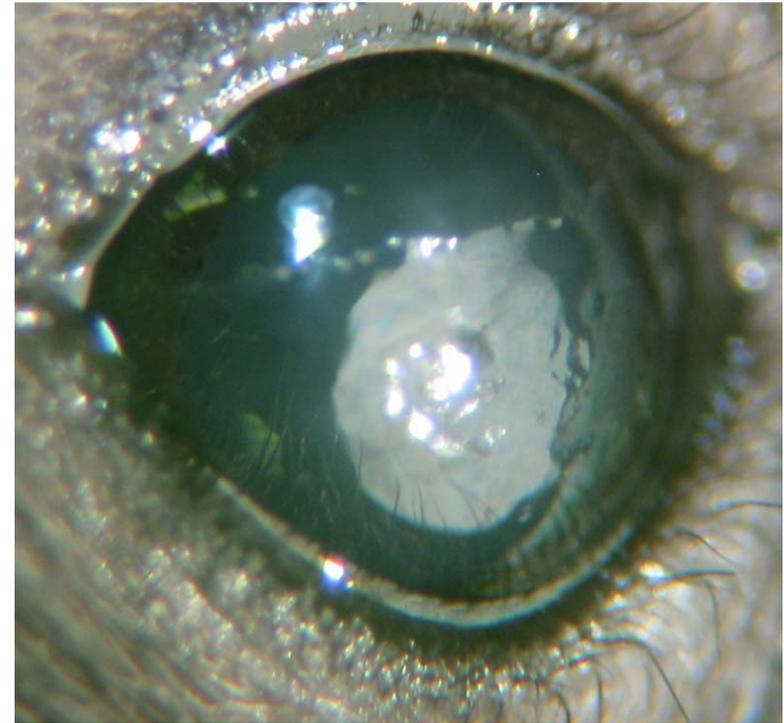
ANIMAL STUDIES RESULTS



AMX +

12 hours after treatment with AMX** eye drops in Balanced Saline Solution

n = 9



NO AMX

12 hours after Balanced Saline Solution eye drops treatment

n = 9



Banca dei Tessuti
di Treviso



- **2001-Treviso avvia la lavorazione della placenta per estrarre la Membrana Amniotica che viene poi crioconservata**
- **Dal 2001 al 2010 raccolte 1.370 placente, distribuiti 4.800 patch di membrana amniotica per uso oculare, dermatologico, ortopedico**

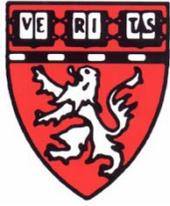


Banca dei Tessuti
di Treviso



Perchè la Banca ha avviato il progetto AMX?

Risposta alle richieste degli utilizzatori che chiedevano un uso della Membrana amniotica non solo chirurgico



Nel rispetto di:

- **Allegato II - Sez.B – Punti 1.2.3.4.5.6.7.8. della Direttiva Europea 2006/86**
- **Sez. A - Punti 1. 2. delle Linee Guida Italiane 19/06/2007**

abbiamo avviato un progetto per valutare la fattibilità di un Trial Clinico



Banca dei Tessuti
di Treviso



2007 - Incontro con potenziali partecipanti studio multicentrico

2008 - Ispezione ad ARETA s.r.l. per congruità dei laboratori per il processo di liofilizzazione

2009 - Presentazione ed accettazione del progetto da parte del Comitato Etico Provinciale

2009 - Quality Agreement Areta/Banca Tessuti

Autorizzazione Comitato Etico Provinciale



AZIENDA UNITA' LOCALE SOCIO - SANITARIA N.9 di TREVISO

Borgo Cavalli n. 42 - 31100 TREVISO
Cod. Ente 050-109 - Cod. Fisc. 03084880263

S.C. QUALITA', PIANI E PROGRAMMI, COMUNICAZIONE E MARKETING

NUCLEO DI RICERCA CLINICA

Treviso li, 13.06.2008

Prot. n. 60135

Allegati:

Per lo sperimentatore: originale verbale + scheda
monitoraggio
Per la Regione: copia verbale

Egr. Dott.
Adolfo Paolin
Banca dei Tessuti
della Regione Veneto
Presidio Ospedaliero di Treviso
Azienda U.L.S.S. n° 9



RACCOMANDATA A.R.

e p.c. Regione Veneto
Direzione Regionale
Programmazione Socio Sanitaria
Servizio Farmaceutico
Palazzo Molin - S. Polo 2531
30125 Venezia

OGGETTO: "Trial aperto - Estratto di membrana amniotica (AMX**) per il trattamento di disordini della superficie oculare: difetti epiteliali corneali persistenti", Studio clinico n° 61/AULSS 9: Autorizzazione.

Il Comitato Etico Provinciale per la Sperimentazione Clinica della Provincia di Treviso, nella seduta del 29/05/2008 ha esaminato e approvato lo studio clinico dal titolo Trial aperto - Estratto di membrana amniotica (AMX**) per il trattamento di disordini della superficie oculare: difetti epiteliali corneali persistenti", come da verbale allegato.

Con delibera del Direttore Generale n. 619 del 11/06/2008 è stato autorizzato l'avvio dello studio clinico in oggetto.

Lo studio è stato registrato dal Comitato come "studio clinico n° 61/AULSS 9" quale codice di identificazione per ogni comunicazione e/o informazione da parte del Promotore/sperimentatore.

Lo sperimentatore è tenuto a notificare al Nucleo di Ricerca Clinica la data di arruolamento del primo paziente e un rapporto annuale sullo stato di avanzamento dello studio, utilizzando il modello del monitoraggio allegato.

Distinti saluti.

Dott. Gianluigi Scannapieco

\\De031\cart\dati\dati\CEP_Treviso\CEP_dell_616_2007\Sperimentazioni numerate\61_AULSS9\Studio n. 61 AULSS9_autorizzazione.doc

NUCLEO DI RICERCA CLINICA - Tel. 0422322477 - 2817 - 8306 Fax 0422322670 e-mail segcomitatoeticotv@ulss.tv.it



Banca dei Tessuti
di Treviso



Centri Partecipanti

Munich	Rozzano (MI)	Treviso	Volta Mantovana	Monselice	Roma
3	3	5	6	17	3

Pazienti totali

Total
37



Banca dei Tessuti
di Treviso



AMX Trial Results

Population

Total Cases: **37** (age 59±20 years)

- One eye treated: **32**
- Two eyes treated: **5**
- Retreatment: **1**

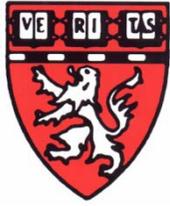
Treated Eyes
with complete CRFs: **43**

(37 patients – 5 both eyes - 1 retreatment)



Pathologies

DIAGNOSE	NUMBER
Post Bacterial Infection keratitis	2
Diabetes Mellitus	1
Post-Surgical PED	7
Herpes neurotrophic keratitis	9
Contact lens-related	2
Neurotrophic keratitis	7
Anhydria	1
Corneal Ulceration in sicca syndrome	3
Corneal Ulceration / Depithelialization	2
Other PED	3



Banca dei Tessuti
di Treviso



AMX Trial Results

Safety

Adverse Drug Reactions: 0/37



Banca dei Tessuti
di Treviso



AMX Trial Results

Efficacy

Average PED per eye : 6.7 mm²

- **Complete Healing of PED: 35/37
(95%)**
- **Non-Healing: 2/37 (5%)**



Banca dei Tessuti
di Treviso



AMX Trial Results

Efficacy

Decreased Symptoms* : 35/37 (94%)

* Pain, Photophobia, Burning, Foreign Body
Sensation.

Decreased Conjunctival Inflammation : 30/31 (97%)



Banca dei Tessuti
di Treviso



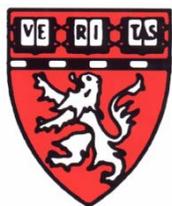
AMX Trial Results

Efficacy

Time to Healing : 21 days (7-28 days)

Stable post-PED Healing : 36/37 (98%)

Recurrent PED : 1/37 (2%)



Banca dei Tessuti
di Treviso



Statistica riassuntiva

Parametro (unità di misura)	Inizio Median (IQ range)	Termine Median (IQ range)	Wilcoxon Signed- Rank (p value)
Visual Acuity (decimi)	0.1 (0-0.5)	0.4 (0.1-0.8)	<0.001
Inflammation (score 0-3)	1 (1-1)	0 (0-0)	<0.001
Symptoms (score 0-4)	3 (1-3)	0 (0-2)	<0.001
PED (sqmm)	4 (1.25-8.25)	0 (0-0)	<0.001



- **Settembre 2010 chiusura trial**
- **Febbraio 2011 presentazione risultati al CBE**
- **Avvio iter per la distribuzione:**
 - **approvazione aziendale;**
 - **approvazione CRT;**
 - **informazione CNT;**



Banca dei Tessuti
della Regione Veneto



Liofilizzazione della membrana amniotica

La produzione di  prevede un processo in cui la membrana amniotica viene sottoposta ad una **manipolazione minima** (vedi **Regolamento CE n. 1394** del 2007 allegato 1):

Filling → Liofilizzazione → Ghieratura&Etichettatura → Storage

In accordo al Regolamento CE n. 1394, la liofilizzazione della membrana amniotica non la rende un medicinale di Terapia Avanzata pertanto viene prodotta nel rispetto della **Direttiva UE 2004/23/CE** in materia di qualità e sicurezza per i tessuti e le cellule umane destinati ad applicazione sull'uomo.



Banca dei Tessuti
della Regione Veneto



Vantaggi della produzione in condizioni GMP

Per garantire la massima sicurezza e qualità, la produzione avviene nell'impianto GMP di Areta International autorizzato da AIFA

- Tutto il processo di produzione è chiaramente definito e sottoposto a periodiche revisioni
- I passaggi critici della produzione sono stati validati
- Utilizzo di strumentazione idonea e qualificata
- Procedure e istruzioni sono scritte in forma chiara e comprensibili a tutti senza possibilità di errori
- Training continuo del personale e verifica delle capacità
- Tracciabilità della distribuzione dei lotti prodotti al fine di minimizzare i rischi sulla qualità degli stessi
- Riproducibilità del processo e dei test di controllo qualità



Banca dei Tessuti
della Regione Veneto



La sterilità senza la sterilizzazione

La sterilità del prodotto si ottiene combinando diversi parametri:

- Certificazione della sterilità della membrana amniotica ottenuta dalla Banca dei Tessuti
- Produzione in classe A con contorno di classe B
- Monitoraggio in continuo della contaminazione particellare e microbiologica di aria superfici e operatori
- Utilizzo di materiali disposable sterili
- Impiego di personale di produzione altamente qualificato
- Esecuzione di Media Fill simulando condizioni peggiorative del processo produttivo
- Cleaning validation e procedure di pulizia per ambienti e strumenti
- Test di sterilità secondo Eu. Ph. sul prodotto finito

Grazie

Thank you

Merci

Gracias

Danke

Takk

Cảm ơn cô

谢谢

ありがとう

شكراً