



CONFEDERAZIONE SVIZZERA
UFFICIO FEDERALE DELLA PROPRIETÀ INTELLETTUALE

⑤① Int. Cl.³: A 61 K 9/70
A 61 K 31/42
A 61 K 31/505
D 01 F 1/08



Brevetto d'invenzione rilasciato per la Svizzera ed il Liechtenstein
Trattato sui brevetti, del 22 dicembre 1978, fra la Svizzera ed il Liechtenstein

⑫ FASCICOLO DEL BREVETTO A5

⑪

633 712

⑫① Numero della domanda: 2777/78

⑫② Data di deposito: 14.03.1978

⑫③ Priorità: 22.03.1977 IT 21482/77

⑫④ Brevetto rilasciato il: 31.12.1982

⑫⑤ Fascicolo del
brevetto pubblicato il: 31.12.1982

⑫⑥ Titolare/Titolari:
Anic S.p.A., Palermo (IT)

⑫⑦ Inventore/Inventori:
Walter Marconi, San Donato Milanese/Milano (IT)
Francesco Bartoli, Roma (IT)
Franco Morisi, San Giovanni in Persiceto (IT)
Francesco Pittalis, Roma (IT)

⑫⑧ Mandatario:
Dr. A.R. Egli & Co., Patentanwälte, Zürich

⑫⑨ Procedimento per la produzione di materiale polimero biocompatibile.

⑫⑩ Materiali polimeri biocompatibili possono essere prodotti aggiungendo, ad una soluzione di un polimero scelto tra diversi polimeri e copolimeri, una sostanza scelta fra gli antiaggreganti piastrinici, gli anticoagulanti e sostanze aventi una azione simile. Le sostanze possono anche essere applicate come strato esterno superficiale ad articoli preparati con le sostanze polimere.

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la produzione di materiale polimero biocompatibile consistente nell'aggiungere, direttamente nella miscela di reazione, alla soluzione polimerica un anti-aggregante piastrinico, un anticoagulante o un agente antitrombotico, e nell'aggiungere alla soluzione polimerica reagenti tali da formare filature o uno strato superficiale biocompatibile.

2. Procedimento come da rivendicazione 1, in cui i polimeri nella soluzione sono scelti fra i polimeri cellulosici, polimeri cellulosici esterificati, eterificati o nitrati, cloruri vinilici, polimeri o copolimeri di cloruro di vinilidene, esteri vinilici, vinilbutirrato, stirolo, polietilene, poliammidi, polimeri o copolimeri di acrilonitrile, butadiene e isoprene, acrilati, metacrilati.

3. Procedimento come da rivendicazione 1, in cui l'agente antiaggregante piastrinico, anticoagulante o antitrombotico è scelto fra il 4,5-difenil-2-bis(2-idrossietil)ammino-ossazolo, il 4,8-dipiperidino-2,6-dietanol-ammino-pirimido-5,4-pirimidina, dicumarolo.

4. Procedimento come da rivendicazione 1, consistente nell'aggiungere alla soluzione polimerica in più una o più sostanze biologicamente attive del gruppo anticorpi, antigeni o antisieri o enzimi chelanti.

5. Materiale polimero biocompatibile, ottenuto mediante il procedimento secondo la rivendicazione 1.

La presente invenzione si riferisce a metodi seguiti per l'ottenimento di nuovi materiali polimerici biocompatibili. In letteratura, ed in modo particolare nel brevetto italiano No. 836 462 della stessa Richiedente, è noto che è possibile preparare strutture filamentose mediante l'impiego di soluzioni contenenti polimeri capaci di dare fibre, nelle quali vengono disperse soluzioni contenenti prodotti da inglobare sotto forma di minutissime goccioline dell'ordine di grandezza delle emulsioni.

L'emulsione così ottenuta può essere filata a secco o ad umido per dare una fibra che presenta nel suo interno piccolissime cavità nelle quali si dispongono i prodotti inglobati che sono separati dall'ambiente esterno mediante una membrana che ne impedisce l'uscita ma, al tempo stesso, permette la libera diffusione delle sostanze su cui i preparati inglobati debbono operare.

Le strutture così ottenute hanno attività elevate a causa dell'elevato rapporto superficie/volume ed offrono possibilità di inglobamento di sostanze anche a purezza non molto elevata. Mediante i processi, che costituiscono il principale oggetto della presente invenzione, siamo riusciti a mettere a punto la composizione di fibre, dalle proprietà simili a quelle sopra descritte, biocompatibili, cioè in grado di poter essere introdotte in un organismo vivente, o comunque in grado di essere inserite a contatto con il sangue, senza comportare il rischio di emorragie o di tossicità come avviene nel caso di un impiego di prodotti anticoagulanti solubili.

Dette fibre possono anche essere usate allorché sia necessario porre a contatto col sangue opportune sostanze come enzimi, antigeni, anticorpi o agenti disintossicanti, che è possibile inglobare in esse secondo processi del resto già noti in letteratura.

Il procedimento secondo l'invenzione per la produzione di materiale polimero biocompatibile è caratterizzato nella rivendicazione 1 precedente.

Tra i materiali utilizzabili secondo la presente invenzione si possono citare: i polimeri cellulosici, i polimeri cellulosici esterificati, eterificati o nitrati, le poliammidi, i polimeri o copolimeri di acrilonitrile, butadiene o isoprene, acrilati,

metacrilati, esteri vinilici, cloruri vinilici, i polimeri o copolimeri di cloruro di vinilidene, stirolo, vinilbutirrato, γ -metilglutammato, poliuretani così pure come miscele dei suddetti polimeri.

5 Tra i prodotti che miscelati con tali polimeri permettono l'ottenimento di manufatti biocompatibili si possono citare antiaggreganti piastrinici come il 4,5-difenil-2-bis(2-idrossietil)ammino-ossazolo il 4,8-dipiperidino-2,6-dietanolammino-pirimido (5,4 d) pirimidina, derivati dell'acido salicilico
10 come l'aspirina ed il salolo ecc. Sono parimenti utilizzabili a tale scopo polimeri di per sé biocompatibili come vari tipi di poliuretani, impiegati da soli o in mescola con polimeri di supporto o come ricoprimento di un altro polimero.

Gli esempi che di seguito riportiamo devono essere considerati illustrativi, ma non limitativi della presente invenzione.

Esempio 1

10 g di triacetato di cellulosa (Fluka) sono stati sciolti in 133 g di cloruro di metilene (C. Erba reagente puro) a
20 temperatura ambiente. Alla soluzione polimerica è stato aggiunto 1 g di 4,5-difenil-2-bis(2-idrossietil)ammino-ossazolo preparato secondo quanto descritto in letteratura: V. Rosnati, E. Marchetti, C. Mattalia, Journal Medical Chemistry 11, pagg. 1092-1093, 1968.

25 Alla soluzione polimerica previamente raffreddata a 0°C sono stati aggiunti 20 g di una soluzione acquosa contenente glicerina al 30%.

Mediante agitazione è stata ottenuta una emulsione costituita da goccioline di fase acquosa disperse nella fase polimerica e aventi diametri di $4 \div 5$ micron.

L'emulsione è stata lasciata a riposo per 20' e, quindi, è stata travasata in un cilindro di acciaio collegato in alto ad una bombola di azoto e terminante in basso con una filiera immersa in un bagno di toluolo. Esercitando una pressione
35 di azoto, l'emulsione veniva fatta fuoriuscire dalla filiera nel bagno di toluolo dove coagulava.

Il filo risultante è stato raccolto su di un rullo e trattato con una corrente di aria per eliminare il toluolo e il cloruro di metilene.

40 Una seconda preparazione è stata fatta con lo stesso procedimento utilizzando per l'emulsione una soluzione di invertasi concentrata BDH al posto della soluzione acquaglicerina. L'attività esplicata dalla fibra contenente invertasi è stata saggiata usando come substrato una soluzione di
45 saccarosio al 20% (p/v) in tampone fosfato 0,1 M pH 4,5 a 25°C.

L'attività risultante è stata pari al 30% dell'attività totale inglobata e si è mantenuta costante anche dopo 30 giorni di lavaggio continuo con tampone fosfato 0,1 M
50 pH 4,5.

Un catetere intravenoso di Teflon (Wallace) (lunghezza 30 cm, diametro interno 0,69 mm, diametro esterno 1,14 mm) è stato ricoperto con un film di triacetato di cellulosa per immersione della sonda in una soluzione di polimero in
55 cloruro di metilene al 2% (p/p) contenente 4,5-difenil-2-bis(2-idrossietil)ammino-ossazolo in quantità pari al 10% rispetto il triacetato. Sulla sonda così ottenuta sono stati avvolti in modo omogeneo, lungo tutta la sua lunghezza 60 mg della fibra inglobante la soluzione di acqua e glicerina.

60 La sonda è stata inserita nella vena femorale di un cane di media taglia in anestesia generale (Pentotal), respirazione libera.

E' stato isolato un ramo laterale della vena femorale; vi è stata introdotta la sonda per tutta la sua lunghezza in
65 modo che gran parte di essa veniva a trovarsi fluttuante nella vena iliaca e nella vena cava inferiore. L'estremità della sonda è stata legata al ramo collaterale della vena femorale e coperta con i fasci muscolari. Infine è stata fatta

una sutura cutanea. Durante e immediatamente dopo l'intervento è stata somministrata eparina all'animale per evitare trombi vascolari dovuti alle lesioni chirurgiche.

E' stato seguito lo stato clinico dell'animale per 90 giorni e sono stati fatti controlli periodici dei seguenti parametri ematici: fibrinogenia, aggregazione piastrinica, tempo di protrombina, tromboelastogramma, emazie, globuli rossi, bilirubinemia.

I dati clinici, riportati in tabella 1, dimostrano che per tutta la durata dell'esperimento le condizioni generali dell'animale si sono mantenute normali. Infine le sonde sono state estratte e ad un esame accurato sono risultate prive di trombi. L'esame autoptico della vena ha mostrato l'assenza di lesioni vascolari.

TABELLA 1

Parametri ematici

Tempo (giorni)	Stato clinico	Fibrinogeno mg/100 ml	Tensio- elastogramma r + K am		Aggregazione piastrinica	Emazie %	Emoglobina %	Bilirubina mg/100 ml
1	buono	240	10	72	38	44	14,0	0,56
7	buono	250	10	70	42	46	14,2	0,62
30	buono	210	12	74	40	45	13,8	0,64
60	buono	220	9	72	35	46	13,9	0,60
86	buono	230	10	71	38	43	14,4	0,60

Esempio 2

In 133 g di cloruro di metilene sono stati sciolti 10 g di triacetato di cellulosa e 1 g di 4,4'-diamminodifenilmetano. Alla soluzione polimerica sono stati aggiunti sotto agitazione 20 g di una soluzione di acqua e glicerina al 30%.

L'agitazione è stata protratta fino alla formazione di una emulsione omogenea.

L'emulsione è stata travasata nel deposito di filatura descritto nell'esempio 1 dove il solvente di coagulo era costituito da una soluzione di toluolo contenente l'1% di polietilenglicole-biscloroformiato (P.M. 325). Durante la filatura la diammina contenuta nella fase polimerica reagiva con il biscloroformiato disciolto nel toluolo ricoprendo la fibra di triacetato con uno strato di poliuretano.

Un catetere intravenoso come quello descritto nell'esempio 1 è stato ricoperto con un film ottenuto per una prima immersione del catetere stesso in una soluzione di triacetato al 2% e 4,4'-diamminodifenilmetano allo 0,2% in cloruro di metilene e una successiva immersione in toluolo contenente polietilenglicole-biscloroformiato all'1%.

60 mg di fibra sono stati avvolti sul catetere ricoprendolo omogeneamente per tutta la sua lunghezza.

Quindi la sonda è stata inserita nella vena femorale di un cane di media taglia come già descritto nell'esempio 1.

L'esperimento ha avuto una durata di 90 giorni.

In tabella 2 vengono riportati i valori dei parametri ematici misurati durante la sperimentazione.

Infine, dopo 90 giorni di permanenza in vena, la sonda è stata estratta secondo le modalità già descritte nell'esempio 1 ed è risultata priva di trombi. L'osservazione all'autopsia della vena femorale ha mostrato l'assenza di lesioni vasali.

TABELLA 2

Parametri ematici

Tempo (giorni)	Stato clinico	Fibrinogeno mg/100 ml	Tensio-elastogramma r + K am		Aggregazione piastrinica	Emazie %	Emoglobina %	Bilirubina mg/100 ml
1	buono	310	9	68	48	49	15,0	0,62
7	buono	320	12	65	52	48	15,6	0,70
30	buono	290	13	74	50	49	15,4	0,70
60	buono	280	12	75	45	46	14,0	0,54
86	buono	290	12	70	56	45	15,0	0,80

Esempio 3

In 100 mg di cloruro di metilene sono stati sciolti a temperatura ambiente 15 g di triacetato di cellulosa.

Alla soluzione polimerica sono stati aggiunti 1,5 g di 4,5-difenil-2-bis(2-idrossietil)ammino-ossazolo.

La soluzione è stata lasciata evaporare fino a completa eliminazione del solvente.

È stata ottenuta una lastra avente uno spessore di 4 mm. Il teste di adesività piastrinica è stato eseguito con il metodo di Hellem A.J. (Platelet adhesiveness in Von Willebrand's disease. A study with a new modification of the glass bead filter method. Scand. J. Haemat. 7, 374, 1970), utilizzando 6 ml di sangue nativo di un soggetto sano, prelevati ed immediatamente fatti passare attraverso una colonnina con biglie di vetro (Adeplat - Mascia Brunelli), mediante una pompa che permettesse una portata di 4 ml/min.

Quindi le biglie di vetro sono state sostituite con un pezzo di triacetato del peso di 200 mg ed è stato ripetuto il procedimento sopra descritto.

I conteggi delle piastrine sono stati eseguiti prima e dopo il passaggio del sangue attraverso le biglie di vetro o il materiale cellulosico raccogliendo il sangue in soluzione acquosa contenente EDTA dipotassico alla concentrazione di 6 g in 10 ml.

La conta delle piastrine è stata effettuata con un microscopio in contrasto di fase secondo la metodica di Brecher e Cronkite (Morphology and enumeration of human blood platelets - J. Appl. Physiol. 3, 365, 1950).

Nel caso delle biglie di vetro l'adesività piastrinica è risultata del 78,8%, mentre nel caso del materiale cellulosico la diminuzione delle piastrine non è risultata misurabile, cioè è risultata inferiore alla sensibilità del metodo di misura.

Esempio 4

20 g di PVC commerciale in chips sono stati lavorati su di un mescolatore a rulli aperti alla temperatura di 120-130°C per 20'.

Alla massa del polimero è stato aggiunto un grammo di 4,5-difenil-2-bis(2-idrossietil)ammino-ossazolo.

È stata ottenuta per raffreddamento a temperatura ambiente una lastrina dello spessore di 5 mm.

Su 200 mg del materiale ottenuto è stata misurata l'adesività piastrinica con il metodo descritto nell'esempio precedente. Anche in questo caso non è stata evidenziata nessuna

diminuzione delle piastrine dopo il passaggio del sangue sul materiale.

Esempio 5

Un tubo costituito da poli-dimetilsilossano avente un diametro interno di 7 mm, un diametro esterno di 9 mm e una lunghezza di 1 m è stato riempito con una soluzione acetonica all'1% di 4,5-difenil-2-bis(2-idrossietil)ammino-ossazolo e quindi è stato chiuso alle due estremità. Dopo 24 ore a temperatura ambiente, la soluzione era completamente evaporata e le pareti del tubo, osservate alla lampada UV risultavano intensamente ed omogeneamente fluorescenti dimostrando una regolare dispersione dell'antiaggregante nel polimero.

Un pezzo del tubo così trattato ed un analogo tubo di riferimento non trattato sono stati sottoposti alla prova di adesività piastrinica secondo il metodo di A.J. Hellem (Platelet adhesiveness in Von Willebrand's disease. A study with a new modification of the glass bead filter method, Scand. J. Haemat. 7, 374, 1970), utilizzando sangue nativo di un soggetto sano prelevato e fatto passare nei tubi sottoposti al test mediante una pompa che permetteva una portata di 4 ml/min.

In conteggi delle piastrine sono stati eseguiti prima e dopo il passaggio del sangue nei tubi raccogliendo dei campioni di sangue in soluzione acquosa contenente EDTA dipotassico alla concentrazione di 6 mg in 10 ml.

La conta delle piastrine è stata fatta con un microscopio in contrasto di fase secondo la metodica di Brecher e Cronkite (Morphology and enumeration of human blood platelets - J. Appl. Physiol. 3, 365, 1950).

Nel caso di tubo non trattato l'adesività piastrinica è risultata del 58,5%.

Nel caso del tubo trattato non si è osservata una diminuzione apprezzabile del numero di piastrine inizialmente presenti.

Esempio 6

Un tubo di «tygon» avente un diametro interno di 7 mm, un diametro esterno di 9 mm ed una lunghezza di 1 m è stato trattato con la soluzione di antiaggregante come nell'esempio 1. Quindi è stato sottoposto al test di adesività piastrinica in confronto con un tubo non trattato secondo le modalità descritte nell'esempio 1.

Anche in questo caso non si è osservata una diminuzione apprezzabile delle piastrine nel tubo trattato, mentre per il tubo di riferimento l'adesività è stata del 48%.