

|                                     |                        |
|-------------------------------------|------------------------|
| <b>DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO</b> | <b>102021000025796</b> |
| <b>Data Deposito</b>                | <b>08/10/2021</b>      |
| <b>Data Pubblicazione</b>           | <b>08/04/2023</b>      |

Classifiche IPC

| Sezione | Classe | Sottoclasse | Gruppo | Sottogruppo |
|---------|--------|-------------|--------|-------------|
| A       | 61     | L           | 27     | 50          |

| Sezione | Classe | Sottoclasse | Gruppo | Sottogruppo |
|---------|--------|-------------|--------|-------------|
| A       | 61     | L           | 27     | 54          |

| Sezione | Classe | Sottoclasse | Gruppo | Sottogruppo |
|---------|--------|-------------|--------|-------------|
| A       | 61     | L           | 29     | 16          |

| Sezione | Classe | Sottoclasse | Gruppo | Sottogruppo |
|---------|--------|-------------|--------|-------------|
| A       | 61     | L           | 31     | 16          |

Titolo

|                                                                              |
|------------------------------------------------------------------------------|
| Metodo per la preparazione di superfici, in particolare di protesi cardiache |
|------------------------------------------------------------------------------|

**Richiedente: Biocompatibility Innovations S.r.l.**

**Titolo: "Un metodo per la preparazione delle superfici, in particolare delle protesi cardiache"**

Background dell'invenzione

La presente invenzione trova applicazione in campo medico e, in particolare, nella preparazione di superfici biologiche a contatto con fluidi corporei.

È stato riportato che le valvole cardiache bioprotesiche fissate con glutaraldeide (BHV) sono soggette a calcificazione distrofica dopo l'impianto a medio/lungo termine nell'uomo, essendo questo il principale fattore limitante che influenza la loro longevità. La calcificazione è un processo complesso e multifattoriale non ancora completamente compreso, che include il rimodellamento tissutale simile all'aterosclerosi e l'esposizione prolungata allo stress meccanico. Tra le cause responsabili della distrofia tissutale calcifica va tenuto in debita considerazione anche il trattamento con glutaraldeide (GLU).

GLU è spesso usato come fissativo e agente sterilizzante preferito per molti prodotti bioprotesici commerciali, specialmente nelle valvole cardiache impiantabili (THV) chirurgiche e transcateretere. L'impianto THV è considerato una procedura minimamente invasiva che prevede l'utilizzo di un catetere guida per il posizionamento della protesi, evitando l'intervento chirurgico di apertura del cuore. I THV possono essere un'opzione per le persone a rischio intermedio o alto di complicanze dovute alla sostituzione chirurgica della valvola cardiaca. Sfortunatamente, l'instabilità chimica del GLU è strettamente coinvolta nell'esposizione di potenziali siti di legame del calcio (aldeidi residue, acidi, basi di Schiff, ecc.). Come risultato dell'interazione tra residui di amminoacidi tissutali e GLU, possono essere creati gruppi di acidi carbossilici caricati negativamente che possono interagire elettrostaticamente con ioni di  $\text{Ca}^{2+}$  caricati positivamente, diventando un enorme sito di attrazione per il calcio. A peggiorare le cose, anche i gruppi aldeidici liberi di reagire possono essere facilmente ossidati in residui carbossilici attraverso l'aria, il sangue in vivo e l'ossidazione dei macrofagi.

Per ridurre l'influenza sul processo di calcificazione, i produttori di BHV hanno proposto diversi cambiamenti nei protocolli di fissazione della GLU, inclusa l'aggiunta di nuovi passaggi volti alla stabilizzazione chimica dell'aldeide reattiva e dei gruppi carbossilici. La detossificazione della GLU da urazolo, l'estensione dello spacer diammina, il trattamento con acido 2-ammino oleico o l'incubazione in etanolo sono solo alcuni dei processi sviluppati nella sfida di stabilizzare la GLU, con la speranza di ritardare la distrofia tissutale calcifica.

Sebbene la degenerazione calcificata dei BHV sia l'evento a lungo termine generalmente responsabile del fallimento definitivo di tali dispositivi biomedici, non va dimenticato che esistono una serie di processi degenerativi che iniziano a interessare la protesi già poche ore dopo l'impianto, compromettendo principalmente l'aspetto strutturale del dispositivo.

La degenerazione strutturale precoce del BHV è un percorso complesso dovuto a molteplici meccanismi attivi e passivi strettamente correlati tra loro. È ormai ben stabilito come i meccanismi attivi degenerativi siano innescati dalla risposta precoce dell'ospite entro poche ore dopo l'impianto, spesso correlata a infiammazione, trombosi subclinica dei lembi e/o infezione batterica. D'altro canto, il deterioramento passivo è strettamente correlato alla fatica dell'innesto con conseguente formazione di buchi, lacerazione e abrasione dei lembi.

Degenerazione strutturale precoce - fattori passivi

Come è noto, i BHV commerciali non costituiscono un tessuto vitale e, per definizione, non sono in grado di rigenerare e rimodellare la matrice extracellulare in modo tale da considerare eventuali cambiamenti nel reticolo di collagene (delaminazione, riarrangiamenti strutturali e distruzione) derivanti dal carico ciclico danni irreversibili. Il carico ciclico prolungato durante i test di usura accelerata ha evidenziato una marcata diminuzione dell'estensibilità radiale a causa dell'irrigidimento dell'efficace rete di fibre di collagene. L'irrigidimento dei lembi nel tempo, causando anomalie nella distribuzione delle sollecitazioni meccaniche, porta a sovraccarichi soprattutto nelle zone di piegatura e nelle zone di sutura intorno allo stent. La valutazione istologica dei BHV espantati ha dimostrato che le lacerazioni dei lembi e i fasci di fibre di collagene rotti sono caratteristici di un'area ad alto ceppo, anche in assenza di calcificazioni associate.

#### Degenerazione strutturale precoce - fattori attivi

La trombosi subclinica dei lembi si è verificata frequentemente nella sostituzione dei BHV, più comunemente nei THV (frequenza del 13%) rispetto ai BHV chirurgici (4%). Coinvolge il 30% dei BHV a 1 anno dall'impianto. Tale patologia mostra segni clinici entro i primi 30 giorni dall'impianto determinando una riduzione della mobilità del lembo. Nei pazienti con ridotta mobilità dei lembi (HALT – ispessimento ipoattenuante dei lembi), lo spessore dei lembi era significativamente alterato con la completa immobilità di almeno una cuspidale valvolare. Lo sviluppo HALT rappresenta una forma lieve di disfunzione valvolare correlata a un trombo, calcificazione precoce e/o degenerazione dei lembi valvolari.

La terapia anticoagulante (sia nuovi anticoagulanti orali NOAC che warfarin) è efficace nel ridurre le complicanze dell'HALT, ma l'HALT si è ripresentato nel 50% dei pazienti in cui l'anticoagulazione è stata interrotta. È importante notare che la doppia terapia antiplateletica, lo standard di cura per l'impianto della valvola transcateretere, non è risultata efficace nella prevenzione o nel trattamento della trombosi subclinica dei lembi.

L'infezione batterica è un altro aspetto preoccupante che contribuisce alla degenerazione precoce dei BHV, soprattutto nel caso dei THV. L'endocardite infettiva (IE) ha un impatto significativo sia sulla popolazione che sulla gestione del paziente. Negli Stati Uniti ci sono da 40.000 a 50.000 nuovi casi/anno, con spese ospedaliere medie superiori a 120.000 dollari/paziente. Nonostante i miglioramenti nella diagnosi e nell'intervento chirurgico, la mortalità a 1 anno da EI è rimasta invariata in oltre 2 decenni. Nei casi in cui il trattamento antibiotico prolungato non sia sufficiente, è necessaria la sostituzione chirurgica della valvola.

La capacità di batteri specifici di colonizzare i BHV è un aspetto cruciale per il futuro delle sostituzioni delle valvole cardiache poiché i THV hanno mostrato buoni risultati anche nei pazienti a medio e basso rischio ampliando enormemente il numero di persone sottoposte a questo tipo di intervento minimamente invasivo. La sostituzione di un BHV chirurgico degenerato viene spesso eseguita adottando un approccio valve-in-valve. In questo caso, un THV viene distribuito all'interno del BHV chirurgico disfunzionale senza la sua rimozione preliminare. Ciò potrebbe potenzialmente portare alla migrazione batterica dal BHV disfunzionale al nuovo THV con conseguente crescita batterica e colonizzazione dei tessuti.

Infine, le agenzie di regolamentazione richiedono che i dispositivi medici siano testati per la pirogenicità mediata dal materiale seguendo "ISO 10993-11:2017 Valutazione biologica dei dispositivi medici - Parte 11: Test per la tossicità sistemica". Il termine pirogeno (dal greco pyros: fuoco) definisce le sostanze che provocano la febbre. Una risposta pirogena indotta da un dispositivo medico può essere dovuta a diverse cause a seconda della presenza dei cosiddetti "pirogeni mediati da materiale". Una classe di pirrogeni esogeni ben noti e ben caratterizzati è la classe delle endotossine. Le endotossine sono componenti lipopolisaccaridi presenti sulle pareti cellulari dei batteri Gram-negativi. Un'altra ampia classe di pirrogeni esogeni sono i pirrogeni non endotossici, che includono sostanze come l'acido lipoteicoico provenienti da batteri Gram-positivi e altri composti provenienti da funghi, lieviti, virus, batteri e parassiti. La terza classe di pirrogeni non endotossici è quella dei pirrogeni mediati da materiale. Sebbene non esista una definizione formale di pirrogeni mediati da materiali, si pensa che possano lisciviare dai materiali o dalle superfici dei dispositivi medici. I

pirogeni mediati dal materiale possono anche derivare da contaminazioni introdotte durante la produzione e l'imballaggio, come residui di fluidi da taglio, distacchi di stampi, detergenti e coadiuvanti tecnologici. Pertanto, è di fondamentale importanza sviluppare trattamenti in grado di migliorare gli esiti dei BHV senza introdurre sostanze chimiche o contaminanti responsabili dell'innalzamento delle reazioni pirogene.

#### Riassunto dell'invenzione

Gli inventori della presente domanda di brevetto hanno sorprendentemente trovato un metodo per prevenire gli eventi degenerativi precoci sia attivi che passivi in una matrice biologica (in particolare di dispositivi medici e ancor più in particolare di protesi cardiache) ottenendo una stabilizzazione GLU, resistenza sia superficiale senza precedenti. adesione piastrinica e rilascio di fibrina e colonizzazione superficiale dei microrganismi. Infine, tale metodo ha mostrato un interessante effetto migliorativo sulle proprietà biomeccaniche della matrice biologica trattata.

#### Breve descrizione delle figure

Figura 1 – Diminuzione percentuale di gruppi aldeidici e carbossilici liberi di reagire nei cerotti pericardici fissati con GLU trattati con polifenoli (n=16 per ciascun tipo di determinazione del gruppo chimico).

Figura 2 – Percentuale di accumulo di trombi in campioni pericardici trattati con polifenoli e non trattati (GLU) (n=6 per ogni tipo di determinazione del gruppo chimico).

Figura 3 – Confronto del carico di rottura tra campioni trattati con polifenoli e non trattati (GLU, n=36 per ogni tipo di determinazione del gruppo chimico).

Figura 4 – Percentuale di confronto dell'allungamento tra campioni trattati con polifenoli e non trattati (GLU, n=36 per ogni tipo di determinazione del gruppo chimico).

Figura 5 – Correlazione del modulo di Young tra campioni F trattati con polifenoli e non trattati (GLU, n=36 per ogni tipo di determinazione del gruppo chimico).

#### Oggetto dell'invenzione

In un primo oggetto, la presente invenzione descrive un metodo per il trattamento di una superficie da contattare con fluidi biologici.

Secondo un aspetto preferito, detta superficie è la superficie di un dispositivo medico.

Secondo un aspetto più preferito, detta superficie è la superficie di una protesi biologica, che può essere una protesi cardiaca.

In un secondo oggetto, la presente invenzione descrive una superficie da contattare con fluidi biologici ottenuti con il metodo dell'invenzione.

Secondo un aspetto preferito, detta superficie è la superficie di un dispositivo medico.

Secondo un aspetto più preferito, detta superficie è la superficie di una protesi biologica, che può essere una protesi cardiaca.

Il dispositivo medico, la protesi biologica e la protesi cardiaca comprendenti la superficie secondo l'invenzione rappresentano ulteriori oggetti dell'invenzione.

In un quarto oggetto, la presente invenzione divulga un metodo per il trattamento di una malattia comprendente l'uso del dispositivo medico, della protesi biologica o della protesi cardiaca dell'invenzione.

Secondo un aspetto preferito, detta malattia è una malattia cardiaca.

Per un aspetto, detta malattia è in un essere umano, mentre per un altro aspetto, detta malattia è in un animale.

Una soluzione comprendente un composto fenolico o una miscela di composti fenolici da utilizzare nel metodo della presente domanda rappresenta un ulteriore oggetto dell'invenzione.

Secondo un altro oggetto dell'invenzione, viene divulgato un metodo per la preparazione della soluzione dell'invenzione comprendente un composto fenolico o una miscela di composti fenolici.

In un altro oggetto ancora, la presente invenzione divulga un kit per eseguire il metodo dell'invenzione.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Secondo un primo scopo, la presente invenzione descrive un metodo per il trattamento di una superficie da contattare con fluidi biologici.

Un fluido biologico nell'ambito della presente invenzione è rappresentato da sangue, siero, plasma, gel vitreo, lacrime, urina, saliva, feci; compreso il liquido sinoviale, peritoneale, pericardico, pleurico e amniotico.

Una superficie biologica può essere rappresentata da una superficie di origine umana o animale.

In particolare, le superfici di origine animale possono essere di origine equina, suina o bovina e preferibilmente di origine suina o bovina; tali superfici possono essere considerate come matrici biologiche.

Secondo un aspetto particolare dell'invenzione, detta superficie è una superficie artificiale.

In particolare, detta superficie artificiale è una superficie di un dispositivo medico.

I dispositivi medici secondo la presente invenzione possono essere rappresentati da: vaso artificiale, valvola cardiaca, tendine, legamento, pericardio, fascia muscolare, dura madre, membrana timpanica, sottomucosa intestinale, cartilagine, tessuto adiposo e osseo, pelvico, addominale, mammario e tessuto dermico.

Secondo un altro aspetto dell'invenzione, detta superficie è la superficie di una protesi biologica.

Una protesi biologica secondo l'invenzione può essere rappresentata da: un vaso, una valvola cardiaca, un tendine, un legamento, pericardio, fascia muscolare, dura madre, membrana timpanica, sottomucosa intestinale, cartilagine, tessuto adiposo e osseo, pelvico, addominale, seno e tessuto dermico.

In una forma di realizzazione preferita, la protesi biologica secondo l'invenzione è rappresentata da una protesi cardiovascolare, quale una valvola cardiaca, o un cerotto di tessuto pericardico.

In una forma di realizzazione più preferita, una valvola cardiaca trattabile secondo la presente invenzione è rappresentata da una valvola cardiaca chirurgica.

In una forma di realizzazione ancora più preferita, la valvola cardiaca trattabile secondo la presente invenzione è rappresentata da una valvola cardiaca impiantabile transcatetere; detta valvola necessita di essere impiantata tramite un catetere e sono ripiegate per essere alloggiate all'interno del catetere.

Secondo il metodo dell'invenzione, la superficie divulgata viene messa a contatto con una soluzione comprendente un composto fenolico o una miscela di composti fenolici.

Ai fini della presente invenzione, un composto fenolico deve essere inteso come un composto fenolico o polifenolico (in alcuni casi entrambi sono indicati solo come "fenolico" o "polifenolico") qui utilizzati come sinonimi) selezionato dal gruppo comprendente: fenoli, aldeidi fenoliche, acidi fenolici, fenilamine, composti fenolici, flavonoidi, fenilpropanoidi e tannini.

In particolare, un composto fenolico è scelto nel gruppo comprendente: vanillina, acidi cinnamici, fenilalanina, cumarine, xantoni, catechine, flavononi, flavoni, calconi, flavanonoli, flavanoli, leucoantocianidine, antocianidine, acidi idrossicinnamici.

Più, in particolare, un composto fenolico può essere selezionato nel gruppo comprendente: resveratrolo, aloina, cianrina, epigallocatechina, acido tannico, acido caffeico, acido clorogenico, idrossitirosolo, acido rosmarinico, narigenina, acido gallico, esperitina, acido chinico, acido eleonolico, pinosresinol, luteolin, apigenin, tangeritin, isorhamnetin, kaempferol, miricetin, eriodictiol, esperetin, naringenin, teaflavin, tearubigins, daidzein, genistein, gliciteina, pterostilbene, delphinidin, malvidina, pelargonidina, peonidin, acido cicorico, acido ferulico, acido salicilico.

Ai fini della presente invenzione sono compresi anche i derivati del composto fenolico o polifenolico sopra descritto; ad esempio possono essere utilizzati anche sali o esteri o isomeri.

In una forma di realizzazione dell'invenzione, la soluzione dell'invenzione comprende una miscela di due o più dei composti fenolici o polifenolici sopra descritti.

Secondo una forma di realizzazione preferita, la soluzione dell'invenzione può comprendere una miscela di due o più dei fenilpropanoidi sopra descritti.

Di seguito sono riportati alcuni componenti ed alcune soluzioni secondo l'invenzione:

| <b>Soluzione</b> | <b>Componente A</b>  | <b>Componente B</b> |
|------------------|----------------------|---------------------|
| <b>1</b>         | Resveratrolo         | Acido Tannico       |
| <b>2</b>         | Resveratrolo         | Cinarina            |
| <b>3</b>         | Aloina               | Epigallocatechina   |
| <b>4</b>         | Aloina               | Acido Clorogenico   |
| <b>5</b>         | Acido Caffeico       | Acido Tannico       |
| <b>6</b>         | Acido Caffeico       | idrossitirosolo     |
| <b>7</b>         | Rosmarinico<br>Acido | Cinarina            |
| <b>8</b>         | Naringenina          | Acid Gallico        |
| <b>9</b>         | Hesperetina          | Acid Gallico        |

Come per la preparazione della soluzione dell'invenzione, un composto fenolico o polifenolico viene solubilizzato in un solvente alcolico.

Nel caso in cui venga preparata una miscela del composto fenolico o polifenolico, la soluzione di ciascun composto viene preparata separatamente e quindi mescolata insieme.

Secondo una forma di realizzazione preferita dell'invenzione, la soluzione comprende una miscela di composti fenolici e più preferibilmente una miscela di composti fenilpropanoidi.

A tal fine, un primo componente viene solubilizzato in una soluzione alcolica (Componente A), preferibilmente il 10% del volume finale della soluzione.

Un solvente alcolico secondo l'invenzione può comprendere metanolo, etanolo, isopropanolo, butanolo, ecc. e preferibilmente comprende o è rappresentato da etanolo.

All'interno della soluzione dell'invenzione, un secondo componente viene solubilizzato in una soluzione tamponata isotonica (Componente B), preferibilmente il 90% del volume finale della soluzione.

In una forma di realizzazione dell'invenzione, la soluzione finale è una soluzione idroalcolica.

Secondo la presente invenzione, nel metodo divulgato la soluzione di un composto fenolico o di una miscela di composti fenolici ha preferibilmente un valore di pH compreso tra 5 e 7.

Una volta preparata, la soluzione può essere opzionalmente filtrata con un filtro da 0,22  $\mu\text{m}$ .

Secondo la presente invenzione, nel metodo descritto la superficie viene posta a contatto con la soluzione di un composto fenolico o di una miscela di composti fenolici per un periodo di tempo inferiore a 2 ore.

Preferibilmente, il contatto viene continuato per un periodo di circa un'ora.

Più preferibilmente, il contatto viene continuato per un periodo di circa 30 minuti.

In una forma di realizzazione ancora più preferita, il contatto comprende una prima fase ed una seconda fase.

In una forma di realizzazione preferita, la prima fase di contatto viene eseguita per 30 minuti e la seconda fase di contatto viene eseguita per 30 minuti.

Facoltativamente, tra le due fasi di contatto, può essere eseguita una fase di risciacquo (definita anche fase di lavaggio).

Secondo una forma di realizzazione preferita dell'invenzione, il metodo viene eseguito al buio e più preferibilmente completamente al buio (cioè evitando qualsiasi esposizione alla luce).

Secondo una forma di realizzazione preferita, il metodo viene eseguito agitando la soluzione.

Per quanto riguarda la temperatura della fase di contatto, essa viene preferibilmente eseguita ad una temperatura di circa  $+20^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ .

In una forma di realizzazione preferita dell'invenzione, dopo la fase di contatto, la superficie trattata, dispositivo medico, protesi biologica o protesi cardiaca può essere sottoposta ad una o più fasi di lavaggio.

Preferibilmente, ciascuna di dette fasi di lavaggio viene eseguita con un opportuno tampone; per esempio, un tampone adatto può essere rappresentato da un tampone fosfato.

In una forma di realizzazione, ciascuna fase di lavaggio può essere eseguita per un periodo di circa 15-30 minuti.

In un'altra forma di realizzazione, ciascuna fase di lavaggio può essere eseguita per un periodo di circa 12-48 ore.

Secondo una forma di realizzazione della presente invenzione in cui il metodo descritto viene eseguito su una superficie biologica, detta superficie biologica può essere preventivamente sottoposta ad una fase di pretrattamento.

In particolare, detta fase di pretrattamento può avere uno o più dei seguenti effetti:

- proteine stabilizzanti,
- stabilizzare o rimuovere i lipidi,
- stabilizzare o rimuovere le strutture cellulari,

- abbassando l'antigenicità.

Ai fini della presente invenzione, detta fase di pretrattamento può comprendere una fase di pretrattamento con uno o più tra glutaraldeide, formaldeide, quercetina o genipina nonché un trattamento per la rimozione di fosfolipidi.

Secondo una particolare forma di realizzazione dell'invenzione, prima di sottoporre la superficie biologica alla fase di pretrattamento, essa può essere sottoposta ad una fase di preparazione con un agente di incappucciamento scelto dal gruppo comprendente: glicerolo, eparina, ammine (cioè alchilammine, ammino alcoli, etanolamina), amminoacidi (lisina, idrossilisina, ammino solfonati, taurina, ammino solfati, destrano solfato, condroitin solfato), polimeri multifunzionali idrofili (es. -deossiglucosone, gliossale), idrazidi (es. idrazide adipica), N,N-disuccinimidil carbonato, carbodiimmide (es. 1-etil-3-(3-dimetilammino propil) carbodiimmide cloridrato – EDC, N-cicloesil-N'-(2-morfolino etile) carbodiimmide – CMC, 1,3-di-cicloesil carbodiimmide – DCC, 2-cloro-1-metil piridinio ioduro - CMPI, 2-cloro-1-metil piridinio ioduro - CMPI), antibiotici, agenti di reclutamento cellulare, agenti di emocompatibilità, agenti antinfiammatori, agenti antiproliferativi, agenti riducenti (es. sodio cianoborodruro, sodio borodruro, sodio bisolfito + acetilacetone, acido formico-formaldeide, mono-, di- o poliepossici alcani).

Secondo la presente invenzione, il metodo per il trattamento di una superficie da contattare con un fluido biologico secondo l'invenzione è un metodo di stabilizzazione.

In particolare, detto metodo di stabilizzazione inattiva i gruppi reagenti disponibili sulla superficie pretrattata.

Più in particolare, detto metodo di stabilizzazione inattiva i gruppi aldeidici e carbossilici disponibili sulla superficie pretrattata.

Secondo la presente invenzione, il metodo descritto è un metodo anticalcare.

Una superficie ottenuta con il metodo dell'invenzione rappresenta un altro oggetto della presente domanda.

Una protesi biologica, un dispositivo medico ed in particolare una protesi cardiaca comprendente la superficie ottenuta secondo il metodo della presente domanda rappresentano ulteriori oggetti della presente invenzione.

Una superficie ottenuta con il pretrattamento e il metodo di trattamento dell'invenzione rappresenta un altro oggetto della presente domanda.

Una protesi biologica, un dispositivo medico ed in particolare una protesi cardiaca comprendente la superficie ottenuta secondo il pretrattamento ed il metodo di trattamento della presente domanda rappresentano ulteriori oggetti della presente invenzione.

Secondo la presente invenzione, il metodo per il trattamento di una superficie da contattare con un biologico fluido secondo l'invenzione è un metodo protettivo.

In particolare, detto metodo di protezione previene l'insorgenza di trombosi subcliniche.

Più in particolare, il metodo dell'invenzione è un metodo di adesività antiplastrinica.

Ancor più in particolare, il metodo dell'invenzione impedisce il rilascio di fibrina.

Il rilascio di fibrina è legato all'attivazione del fibrinogeno solubile in polimeri di fibrina insolubili. Tali polimeri si aggregano lateralmente per formare fibre, che poi si ramificano per formare una rete tridimensionale e, interagendo con le piastrine circolanti, portano alla formazione del coagulo di fibrina essenziale per l'emostasi e la coagulazione della ferita. Se il coagulo entra nel flusso sanguigno si chiama trombo e può ostruire vasi di piccole/medie dimensioni provocando ischemia, ictus e infarto.

In particolare, il metodo protettivo dell'invenzione ha dimostrato di prevenire ed evitare l'ancoraggio delle piastrine circolanti sulle superfici biologiche trattate e/o pretrattate secondo l'invenzione.

Una superficie ottenuta con il metodo dell'invenzione rappresenta un altro oggetto della presente domanda.

Una protesi biologica, un dispositivo medico ed in particolare una protesi cardiaca comprendente la superficie ottenuta secondo il metodo della presente domanda rappresentano ulteriori oggetti della presente invenzione.

Una superficie ottenuta con il pretrattamento e il metodo di trattamento dell'invenzione rappresenta un altro oggetto della presente domanda.

Una protesi biologica, un dispositivo medico ed una protesi cardiaca comprendenti la superficie ottenuta secondo il pretrattamento e il metodo di trattamento della presente domanda rappresentano ulteriori oggetti della presente invenzione.

Secondo la presente invenzione, il metodo per il trattamento di una superficie da contattare con un biologico fluido secondo l'invenzione è un metodo per preservare e mantenere le corrette proprietà biomeccaniche strutturali.

In particolare, il metodo dell'invenzione ha dimostrato di aumentare le proprietà di allungamento dei tessuti trattati biologicamente.

In particolare, tale metodo preserva la struttura del collagene dei lembi di BHVs.

Di conseguenza, il metodo per il trattamento di una superficie da contattare con un fluido biologico secondo l'invenzione è un metodo protettivo per mantenere le corrette proprietà fisiologiche eme e fluidodinamiche dei BHV trattati.

Una superficie ottenuta con il metodo dell'invenzione rappresenta un altro oggetto della presente domanda.

Una protesi biologica, un dispositivo medico ed una protesi cardiaca comprendenti la superficie ottenuta secondo il metodo della presente domanda rappresentano ulteriori oggetti della presente invenzione.

Una superficie ottenuta con il pretrattamento e il metodo di trattamento dell'invenzione rappresenta un altro oggetto della presente domanda.

Una protesi biologica, un dispositivo medico ed una protesi cardiaca comprendenti la superficie ottenuta secondo il pretrattamento e il metodo di trattamento della presente domanda rappresentano ulteriori oggetti della presente invenzione.

Secondo la presente invenzione, il metodo per il trattamento di una superficie da contattare con un biologico fluido secondo l'invenzione è un metodo antimicrobico ed antivirale, in quanto è un metodo disinfettante della superficie trattata.

In particolare, il metodo antimicrobico dell'invenzione ha un'azione battericida.

Più in particolare, il metodo antimicrobico dell'invenzione ha un'azione battericida nei confronti di microrganismi responsabili dell'insorgenza di endocardite.

In una forma di realizzazione, detti microrganismi sono batteri Gram+, batteri Gram-, lieviti e muffe.

In un'altra forma di realizzazione, detti microrganismi sono micobatteri, come *Mycobacterium chelonae*.

Di conseguenza, il metodo per il trattamento di una superficie da contattare con un fluido biologico secondo l'invenzione è un metodo anti Gram+, un metodo anti Gram-, un metodo antilievito, un metodo antimuffa, un metodo antimicobatteri.

In particolare, il metodo antivirale dell'invenzione ha un'azione virucida nei confronti dei virus.

Più in particolare, tale azione virucida è secondo la norma EN 14476.

In particolare, detti virus appartengono alle famiglie dei Picornaviridae, Adenoviridae e Caliciviridae.

Più in particolare, detti microrganismi sono Poliovirus Tipo 1 LSc-2ab (RVB-1260), Adenovirus Tipo 5 (ATCC VR-5) e Murine norovirus ceppo S-99 (RVB-651).

Una superficie ottenuta con il metodo dell'invenzione rappresenta un altro oggetto della presente domanda.

Una protesi biologica, un dispositivo medico ed una protesi cardiaca comprendenti la superficie ottenuta secondo il metodo della presente domanda rappresentano ulteriori oggetti della presente invenzione.

Una superficie ottenuta con il pretrattamento e il metodo di trattamento dell'invenzione rappresenta un altro oggetto della presente domanda.

Una protesi biologica, un dispositivo medico ed una protesi cardiaca comprendenti la superficie ottenuta secondo il pretrattamento ed eventualmente il metodo di trattamento della presente domanda rappresentano ulteriori oggetti della presente invenzione.

Più, in particolare, detta protesi biologica può essere rappresentata da una protesi cardiovascolare ottenuta con il pretrattamento ed eventualmente il metodo di trattamento dell'invenzione.

Secondo un terzo oggetto dell'invenzione, viene divulgato un metodo per il trattamento di una malattia comprendente l'uso del dispositivo medico, della protesi biologica o della protesi cardiaca sopra descritti.

Secondo un aspetto preferito, detta malattia è una malattia cardiaca.

Per un aspetto, detta malattia è in un essere umano, mentre per un altro aspetto, detta malattia è in un animale.

In una particolare forma di realizzazione, il metodo per il trattamento della malattia secondo l'invenzione comprende un approccio valve-in-valve, in cui una valvola viene dispiegata all'interno di una valvola disfunzionale senza la sua rimozione preliminare.

Come ulteriore oggetto della presente invenzione, viene divulgata una soluzione comprendente un composto fenolico o una miscela di composti fenolici da utilizzare nel metodo della presente domanda.

In particolare, la preparazione di detta soluzione comprende una prima fase, in cui il composto fenolico viene solubilizzato in un solvente alcolico.

Ad esempio, può essere risolto un composto fenolico dall'elenco A di cui sopra.

Se necessario, un ulteriore composto fenolico può essere solubilizzato in una soluzione tamponata isotonica.

Ad esempio, può essere risolto un composto fenolico dall'elenco B di cui sopra.

Secondo una forma di realizzazione preferita, la soluzione del composto A rappresenta il 10% (volume) della soluzione finale e la soluzione del composto B rappresenta il 90% (volume) della soluzione finale.

Secondo un aspetto preferito, la preparazione della soluzione viene effettuata al buio e preferibilmente al buio completo, cioè evitando qualsiasi esposizione alla luce.

La presente invenzione verrà ulteriormente descritta in connessione con la seguente sezione sperimentale.

La seguente sessione sperimentale mostra i risultati di saggi effettuati su superfici trattate secondo la presente invenzione.

#### Soluzioni polifenoliche

La tabella seguente riporta alcuni esempi di soluzioni polifenoliche secondo l'invenzione.

| <b>Soluzione</b> | <b>Componente A</b>                 | <b>Componente B</b>               |
|------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| <b>1</b>         | Resveratrolo $3 \pm 2$ mg/ml        | Acido Tannico $4 \pm 3.5$ mg/ml   |
| <b>2</b>         | Resveratrolo $3 \pm 2$ mg/ml        | Cinarina $2 \pm 1.5$ mg/ml        |
| <b>3</b>         | Aloina $1.5 \pm 1$ mg/ml            | Epigallocatechina $2 \pm 1$ mg/ml |
| <b>4</b>         | Aloina $1.5 \pm 1$ mg/ml            | Acido Clorogenico $4 \pm 3$ mg/ml |
| <b>5</b>         | Acido Caffeico $2 \pm 1.5$ mg/ml    | Acido Tannico $4 \pm 3.5$ mg/ml   |
| <b>6</b>         | Acido Caffeico $2 \pm 1.5$ mg/ml    | Idrossitirosolo $4 \pm 2.5$ mg/ml |
| <b>7</b>         | Acido Rosmarinico $2.5 \pm 2$ mg/ml | Cinarina $2 \pm 1$ mg/ml          |
| <b>8</b>         | Naringenina $1 \pm 0.5$ mg/ml       | Acido Gallico $1.5 \pm 1$ mg/ml   |
| <b>9</b>         | Esperetina $2 \pm 1.5$ mg/ml        | Acido Gallico $1.5 \pm 1$ mg/ml   |

In particolare, le superfici sono state trattate con la Soluzione 5 secondo quanto sopra descritto.

#### Preparazione della Soluzione Polifenolica 5

L'acido caffeico come Componente A è stato pesato secondo le concentrazioni indicate e solubilizzato in etanolo ad un volume finale del 10% della miscela polifenolica. L'acido tannico come colonna Componente B è stato pesato secondo le concentrazioni indicate e solubilizzato in tampone fosfato modificato al 90% del volume finale della miscela polifenolica. Entrambi i passaggi vengono eseguiti al buio. Quando la solubilizzazione è completa, le due soluzioni vengono mescolate. Il pH è regolato a 5-7. La soluzione viene filtrata con un filtro da 0,22  $\mu$ m. Questa soluzione è indicata come Soluzione 5 o Soluzione Polifenolica.

Altre soluzioni secondo la presente invenzione possono essere preparate in analogia con quanto descritto.

#### Stabilizzazione con glutaraldeide

##### Trattamento dei tessuti

Diverse pericardie bovine sono state accuratamente selezionate per ottenere patch rettangolari (n=32). Tutti i cerotti sono stati sottoposti a trattamento preliminare di reticolazione GLU. In breve, il tessuto pericardico è stato incubato in una soluzione GLU tamponata per tre passaggi di 24 ore ciascuno in una stanza buia. Per questo esempio, una soluzione GLU è uno  $0,6\% \pm 0,5\%$  v/v per il primo e il secondo passaggio seguito da uno  $0,2\% \pm 0,15\%$  v/v per il terzo. I cerotti pericardici trattati con GLU sono stati sottoposti a due fasi di lavaggio in tampone fosfato per 15 minuti ciascuna.

Sedici cerotti sono stati incubati con la Soluzione 5 dell'invenzione preparata come sopra descritto sotto moderata ma costante agitazione al buio, per due fasi di  $25 \pm 10$  minuti ciascuna, a temperatura ambiente (TA).

Al termine dell'incubazione, i cerotti trattati sono stati sottoposti a cinque lavaggi in tampone fosfato per 15-30 minuti ciascuno. I campioni sono indicati come TRATTATI.

I restanti cerotti pericardici fissi GLU sono stati adottati come controllo (GLU, n=16).

#### Determinazione del contenuto di gruppi carbossilici liberi

I cerotti pericardici sono stati inclusi in OCT (Optimal Cutting Temperature) e congelati mediante immersione in isopentano preraffreddato in azoto liquido. Sono state quindi prodotte criosezioni con uno spessore di 7  $\mu\text{m}$  utilizzando vetrini MirrIR idonei per studi di riflettanza all'infrarosso come supporto e analizzate mediante microscopia FT-IR in riflettanza e modalità mosaico con 64 scansioni per ogni area selezionata. Il rivelatore utilizzato è FPA con risoluzione 4  $\text{cm}^{-1}$ . I tessuti trattati hanno mostrato una minore concentrazione di gruppi carbossilici al numero d'onda 1233  $\text{cm}^{-1}$  (corrispondente allo stiramento dei legami C-O dei gruppi carbossilici) rispetto ai campioni fissati solo in GLU.

Considerando il totale dei gruppi carbossilici liberi quantificati nei campioni fissati GLU come 100% dei gruppi disponibili, i campioni trattati hanno riportato una diminuzione pari al 76% del totale.

#### Determinazione del contenuto di gruppi aldeidi liberi

Preparare 150 ml di soluzione A: acido citrico 0,2 M, idrossido di sodio 0,5 M e cloruro di stagno (II) 8 mM in acqua ultrapura. Preparare 25 ml di Soluzione B: ninidrina 0,22 M sciolta in 25 ml di Monometilene di Glicole Etilenico (Cellosolve) in un flacone scuro con tappo a vite. Unire un volume di Soluzione A con un volume uguale di Soluzione B e mescolare al buio per 45 minuti per ottenere la Soluzione C. Si prega di notare che sono necessari 2 ml di Soluzione C per ogni campione da analizzare.

I campioni di tessuto devono essere preparati per avere un peso umido di circa 20 mg ciascuno. Ciascun campione viene incubato a 100°C in 2 ml di Soluzione C per 20 minuti al buio, raffreddato in acqua e diluito con 15 ml di Isopropanolo al 50%. Il colore sviluppato viene letto a 570 nm entro 30 minuti. Le nmoli dei gruppi aldeidici sono determinate rispetto ad uno standard di glicina.

Considerando il totale di aldeide libera quantificata nei campioni fissati GLU come 100% dei gruppi disponibili, i campioni trattati hanno riportato una diminuzione pari al 56,3% del totale.

La Figura 1 mostra la percentuale di diminuzione dei gruppi aldeidici e carbossilici liberi di reagire nei cerotti di tessuto pericardico trattati (n=16 per ciascun tipo di determinazione del gruppo chimico).

#### Valutazione dell'adesività piastrinica

##### Trattamento dei tessuti

Per valutare la propensione all'adesività piastrinica e al rilascio di fibrina in condizioni di flusso, è stato adottato un modello di flusso sanguigno in vitro. Diversi pericardi bovini sono state accuratamente selezionate per ottenere patch rettangolari (n=12). Tutti i cerotti sono stati sottoposti a trattamento preliminare di reticolazione GLU. In breve, il tessuto pericardico è stato incubato in una soluzione GLU tamponata per tre passaggi di 24 ore ciascuno in una stanza buia. Per questo esempio, una soluzione GLU è uno  $0,6\% \pm 0,5\%$  v/v per il primo e il secondo passaggio seguito da uno  $0,2\% \pm 0,15\%$  v/v per il terzo. I cerotti pericardici trattati con GLU sono stati sottoposti a due fasi di lavaggio in tampone fosfato per 15 minuti ciascuna.

Sei cerotti sono stati incubati con la Soluzione 5 dell'invenzione preparata come sopra descritto sotto moderata ma costante agitazione al buio, per due fasi di  $25 \pm 10$  minuti ciascuna, a temperatura ambiente (TA).

Al termine dell'incubazione, i cerotti trattati sono stati sottoposti a cinque lavaggi in tampone fosfato per 15-30 minuti ciascuno. I campioni sono indicati come TRATTATI.

I restanti cerotti pericardici fissi GLU sono stati adottati come controllo (GLU, n=6).

#### Quantificazione dell'adesività delle piastrine

Il sangue bovino eparinizzato è stato raccolto da 3 diversi animali ed è stato aggiunto il radioisotopo per la quantificazione dei trombi. Strisce di tessuto pericardico sono state dispiegate in un condotto di 25,4 mm e il flusso sanguigno a 2,5 L/min è stato abilitato con una pompa peristaltica per 1 ora. Le strisce sono state risciacquate con soluzione fisiologica e poste in un contatore gamma per la quantificazione della radiazione (riflettente della relativa trombosi). I valori medi di radiazione sono 73,133 conteggi al minuto (cpm) per GLU e 35,165 cpm per i campioni trattati. Nella Figura 2 i risultati sono espressi come percentuale di riduzione della propensione piastrinica nei tessuti trattati con polifenoli, tenendo conto dei campioni di GLU come 100%.

#### Proprietà meccaniche del tessuto trattato

##### Trattamento dei tessuti

Settantadue strisce rettangolari (lunghe circa 10 mm e larghe 8 mm) di pericardia bovina sono state processate con la soluzione GLU come sopra descritto ("Tissue processing"). Le strisce pericardiche trattate con GLU sono state sottoposte a due fasi di lavaggio in tampone fosfato per 15 minuti ciascuna. Trentasei cerotti sono stati incubati con la Soluzione 5 sopra descritta sotto moderata ma costante agitazione al buio, per due fasi di  $25 \pm 10$  minuti ciascuna, a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione, i cerotti trattati sono stati sottoposti a cinque lavaggi in tampone fosfato per 15-30 minuti ciascuno. I campioni sono indicati come TRATTATI.

Le rimanenti strisce pericardiche fisse GLU sono state adottate come controllo (GLU, n=36).

##### Valutazione delle proprietà meccaniche

Ogni striscia è stata montata sull'attrezzatura di trazione per essere sottoposta a una prova di trazione uniassiale fissata con impugnature in gomma (Thumler Z3-X500 dotato di cella di carico da 100 N / 500 N). La lunghezza iniziale del campione (distanza tra le impugnature) è stata fissata a 50 mm. La prova di trazione è stata eseguita a 50 mm/min.

Ogni striscia è stata caratterizzata dimensionalmente in termini di lunghezza (lunghezza utile 50 mm), larghezza e spessore (valore medio delle misurazioni) ed è stata calcolata l'area della sezione trasversale (con x spessore). Da ciascuna curva di trazione sono stati ottenuti i seguenti parametri:

- Resistenza alla rottura [N], in termini di resistenza massima prima della rottura;
- Carico di rottura [MPa], in termini di resistenza massima divisa per l'area della sezione trasversale (UTS);
- Deformazione a rottura [%], in termini di deformazione alla massima resistenza;
- Modulo di Young [MPa], in termini di pendenza della regione lineare della curva sforzo-deformazione (fase elastica);

Per ogni parametro è stato calcolato il valore medio dai campioni, ottenendo un valore per ogni patch. Il valore medio è stato calcolato nuovamente dai cerotti, ottenendo un valore per ogni gruppo di test.

La Figura 3 mostra il confronto del carico di rottura tra campioni trattati e non trattati (GLU). L'Ultimate Tensile Strength (UTS), spesso abbreviato in resistenza alla trazione (TS), è lo stress massimo che un materiale può sopportare mentre viene allungato o tirato prima di rompersi. Il trattamento polifenolico non riporta una differenza statisticamente significativa rispetto al campione di controllo (GLU).

La Figura 4 mostra la percentuale di confronto dell'allungamento tra campioni trattati e non trattati (GLU).

La Figura 5 mostra la correlazione del modulo di Young tra campioni trattati e non trattati (GLU). La percentuale di allungamento è strettamente correlata al Modulo di Young. Il Modulo di Young o Modulo di Elasticità è una caratteristica, caratteristica di un materiale, che esprime la relazione tra tensione e deformazione nel caso di condizioni di carico uniassiale e nel caso di comportamento elastico (reversibile) del materiale. È definito come il rapporto tra la sollecitazione applicata e la deformazione risultante. All'aumentare del Modulo di Young, aumenta anche la rigidità del materiale. L'aumento del livello di elasticità del tessuto trattato porta ad una conseguente diminuzione del suo Modulo di Young rispetto al pericardio non trattato (GLU).

Il guadagno in elasticità consente una migliore distribuzione del carico meccanico, soprattutto a vantaggio delle zone BHV soggette a maggiore pressione. Questo evita la formazione di lacrime e preserva la struttura del collagene dei lembi valvolari.

Il potenziale battericida della soluzione polifenolica

L'attività battericida (BA) delle soluzioni polifenoliche dell'invenzione è stata valutata per quanto riguarda i seguenti diversi microrganismi: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Salmonella enterica typhimurium* ATCC 14028, *Streptococcus viridans* ATCC 6249, un micobatterio non tubercolare *Mycobacterium chelonae* ATCC 35752, un lievito *Candida albicans* ATCC 10231 e un fungo *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

Il saggio BA consiste in un metodo di sospensione con un'unica incubazione per 24 ore dei batteri a concentrazione nota della Soluzione 5 dell'invenzione (inoculo). Al termine del tempo di incubazione, il contenuto di ciascuna provetta viene seminato in piastre Petri sterili da 90 mm in uno specifico terreno agarizzato, con tecnica pour plate o spread plate a seconda dei microrganismi testati, previa diluizione in Tryptone Salt Broth (brodo MRD). Quindi le piastre ottenute vengono incubate a condizioni e temperature specifiche in base alle esigenze di crescita di ciascun microrganismo.

Preparazione dell'inoculo

Per ogni tipo di microrganismo, è stata quantificata una sospensione microbica in MRD Broth attraverso lo spettrofotometro a una lunghezza d'onda di 620 nm in una cuvetta monouso con percorso di 10 mm. Si misura l'assorbanza di una parte aliquota della sospensione: il range compreso tra 0,150 e 0,460 corrisponde ad una concentrazione di cellule compresa tra  $1 \times 10^8$  CFU/ml e  $3 \times 10^8$  CFU/ml (con *Candida albicans* compresa tra  $1 \times 10^7$  CFU/ml e  $3 \times 10^7$  CFU/ml). Per lo *Streptococcus oralis*, poiché non vi era alcuna correlazione tra la misura di assorbanza e la concentrazione di batteri, la quantificazione è stata eseguita mediante conta cellulare al microscopio.

I dati sono stati elaborati confrontando la crescita sul campione con la concentrazione di batteri a t0, per vedere un effetto nella promozione o inibizione della crescita, ed espressi come percentuale di attività battericida. I risultati sono stati confrontati con campioni di controllo (antibiotici e soluzioni di etanolo).

La tabella sottostante riporta la percentuale di attività battericida rispetto agli anticorpi standard e alla soluzione etanolica.

|  |  |  | ATTIVITA' BATTERICIDA % |
|--|--|--|-------------------------|
|  |  |  |                         |

| MICROORGANISMO                                   | ATCC<br>Codice | FAMILIA       | SOLUZIONE<br>5 | ANTIBIOTICO | ETANOLO |
|--------------------------------------------------|----------------|---------------|----------------|-------------|---------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                    | 9027           | GRAM -        | 99.999         | 99.999      | 99.99   |
| <i>Salmonella enterica</i><br><i>typhimurium</i> | 14028          | GRAM -        | 99.999         | 99.999      | 90      |
| <i>Enterococcus faecalis</i>                     | 29212          | GRAM +        | 99.99          | 99.999      | 0       |
| <i>Listeria monocytogenes</i>                    | 19111          | GRAM +        | 99.999         | 99.999      | 0       |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                     | 6538           | GRAM +        | 99.999         | 99.999      | 99      |
| <i>Streptococcus viridans</i>                    | 6249           | GRAM +        | 99.999         | 99.999      | 90      |
| <i>Candida albicans</i>                          | 10231          | Yeast         | 99.999         | 99.999      | 99.9    |
| <i>Aspergillus brasiliensis</i>                  | 16404          | Fungi         | 99.9           | 99.999      | 90      |
| <i>Mycobacterium chelonae</i>                    | 35752          | Mycobacterium | 99.999         | 99.999      | 99      |

#### Il potenziale virucida della soluzione polifenolica

L'attività virucida della Soluzione polifenolica 5 è stata valutata secondo le linee guida: Metodo di prova e requisiti Standard Europeo EN 14476:2013+A2:2019/UNI EN 14476:2019 – Disinfettanti chimici e antisettici. Test quantitativo in sospensione per la valutazione dell'attività virucida in area medica. Metodo di prova e requisiti (Fase 2/Fase 1). Il test virucida è stato eseguito per quanto riguarda il seguente ceppo di virus: Poliovirus Tipo 1 LSc-2ab (RVB-1260), Adenovirus Tipo 5 (ATCC VR-5) e Murine norovirus S99 (RVB-651). La tabella sottostante riporta la percentuale di attività virucida della Soluzione polifenolica 5 diluita all'80% (corrispondente alla massima concentrazione possibile valutabile secondo il metodo).

|                                            | Percentuale di inattivazione del virus |
|--------------------------------------------|----------------------------------------|
| <b>Poliovirus Type 1 LSc-2ab – RVB1260</b> | 99.00 ± 3.20                           |
| <b>Adenovirus Type 5 – ATCC VR5</b>        | 99.70 ± 1.02                           |
| <b>Murine norovirus S99 – RVB651</b>       | 99.48 ± 1.54                           |

#### Effetto antiadesivo della soluzione polifenolica su diversi ceppi di microrganismi

L'attività antiadesiva sulle superfici trattate è stata valutata con riferimento ai seguenti diversi microrganismi: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Salmonella enterica typhimurium* ATCC 14028, *Streptococcus viridans* 6249, un micobatterio non tubercolare *Mycobacterium chelonae* ATCC 35752, un lievito *Candida albicans* ATCC 10231 e un fungo *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

Ciascun ceppo di microrganismo è stato coltivato durante la notte in un brodo dedicato a 37°C. Al termine dell'incubazione, sono state contate le unità formanti colonie (UFC) per determinare la concentrazione effettiva del microrganismo.

#### Trattamento dei tessuti

Novanta campioni di circa 2 cm<sup>2</sup> ciascuno di pericardia bovina sono stati processati con la soluzione GLU come sopra descritto ("Tissue processing"). I campioni pericardici trattati con GLU sono stati sottoposti a due fasi di lavaggio in tampone fosfato per 15 minuti ciascuna. Al termine dell'incubazione, 45 cerotti sono stati trattati con la Soluzione 5 dell'invenzione secondo il metodo descritto e quindi sono stati sottoposti a cinque lavaggi in tampone fosfato da 15 a 30 minuti ciascuno. Questi campioni sono indicati come TRATTATI.

I restanti campioni pericardici fissati con GLU sono stati adottati come controllo (GLU).

#### Valutazione dell'effetto antiadesivo

I cerotti trattati con polifenoli e non trattati sono stati lavati con PBS e incubati per una notte a temperatura ambiente in PBS + antibiotici (300 µg/mL). Sono stati utilizzati diversi tipi di antibiotici specifici per ogni tipo di ceppo di microrganismi (neomicina, penicillina, cefalosporina, polimixina, rifamicina, lipiarmicina, chinolone, sulfonamide, macrolide, lincosamide, tetraciclina, aminoglicoside, doxiciclina, minociclina, ampicillina, amoxicillina/acido clavulanico, azitromicina, carbapenemi, piperacillina/tazobactam, chinoloni, cloramfenicolo, ticarcillina, trimetoprim/sulfametossazolo). Dopo l'incubazione notturna, i cerotti di tessuto sono stati lavati ampiamente in PBS per rimuovere ogni traccia di antibiotico non legato. Successivamente, i campioni trattati e non trattati sono stati esposti singolarmente ai diversi ceppi di microrganismi (carico di microrganismi 1 X 10<sup>7</sup> CFU/mL) per 90 minuti a temperatura ambiente sotto moderata ma costante agitazione. Al termine dell'incubazione, i campioni di tessuto sono stati sottoposti a tre passaggi di vortex moderati per facilitare il distacco dei batteri debolmente legati. Infine, i campioni sono stati omogeneizzati con Stomacher® 400 e diluizioni seriali degli omogeneizzati ottenuti, piastrati in piastre Petri contenenti gli appropriati terreni di crescita selettivi. Dopo 24 ore di incubazione a 37°C, le unità formate da colonie sono state contate per ogni tipo di campione.

I risultati sono stati espressi come diminuzione percentuale dei microrganismi attaccati valutata nei cerotti pericardici trattati rispetto ai cerotti pericardici fissi GLU non trattati (n=5 per ogni ceppo di microrganismi).

La tabella sottostante riporta la diminuzione percentuale dei microrganismi attaccati valutata nei cerotti pericardici trattati. Il valore percentuale è stato determinato dal confronto tra cerotti pericardici GLU fissati e non trattati (n=5 per ogni ceppo di microrganismi).

| MICRORGANISMO                                    | ATCC<br>Code | FAMILIA | % di rimozione<br>microrganismi |
|--------------------------------------------------|--------------|---------|---------------------------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                    | 9027         | GRAM -  | 90.4 ± 1.2                      |
| <i>Salmonella enterica</i><br><i>typhimurium</i> | 14028        | GRAM -  | 93.2 ± 2.3                      |
| <i>Enterococcus faecalis</i>                     | 29212        | GRAM +  | 92.8 ± 4.6                      |
| <i>Listeria monocytogenes</i>                    | 19111        | GRAM +  | 94.4 ± 4.8                      |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                     | 6538         | GRAM +  | 95.3 ± 3.8                      |
| <i>Streptococcus viridans</i>                    | 6249         | GRAM +  | 96.1 ± 7.2                      |
| <i>Candida albicans</i>                          | 10231        | Yeast   | 91.7 ± 3.2                      |
| <i>Aspergillus brasiliensis</i>                  | 16404        | Fungi   | 93.6 ± 4.8                      |

|                               |       |                      |            |
|-------------------------------|-------|----------------------|------------|
| <i>Mycobacterium chelonae</i> | 35752 | <i>Mycobacterium</i> | 92.9 ± 1.1 |
|-------------------------------|-------|----------------------|------------|

#### Apirogenicità del tessuto trattato con polifenoli

Il test di attivazione dei monociti (MAT) è stato qualificato e convalidato per la rilevazione dei pirogeni dal Centro europeo per la convalida dei metodi alternativi (ECVAM) nel 2005 e dall'Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) nel 2008. È stato tra i metodi compendiali per la rilevazione dei pirogeni nella Farmacopea Europea dal 2010 (Capitolo 2.6.30) e menzionato dalla FDA "Guidance For Industry — Pyrogen and Endotoxins testing: Questions and Answers". Il test di attivazione dei monociti (MAT) è l'alternativa umana in vitro al test pirogeno di coniglio (RPT) e consente

la rilevazione dell'intera gamma di pirogeni, comprese le endotossine e i pirogeni non endotossici (NEP).

#### Trattamento dei tessuti

Diciotto campioni di pericardia bovina di circa 2 cm<sup>2</sup> ciascuno sono stati processati con la soluzione GLU come sopra descritto ("Tissue processing"). I campioni pericardici trattati con GLU sono stati sottoposti a due fasi di lavaggio in tampone fosfato per 15 minuti ciascuna. Nove cerotti sono stati incubati con la Soluzione 5 sotto moderata ma costante agitazione al buio, per due fasi di 25 ± 10 minuti ciascuna, a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione, i cerotti trattati sono stati sottoposti a cinque lavaggi in tampone fosfato per 15-30 minuti ciascuno. I campioni sono indicati come TRATTATI.

I restanti nove campioni pericardici fissi GLU sono stati adottati come controllo (GLU, n=9).

#### Valutazione della pirogenicità

I campioni sono stati posti per 1 ora in 40 ml di acqua priva di endotossine sotto moderata agitazione a 37°C. L'acqua è stata analizzata con il test MAT. In breve, l'acqua è stata portata a contatto con cellule monocitiche umane, imiterà ciò che accade nel corpo umano: in presenza di pirogeni, i monociti si attivano e producono diversi tipi di citochine tra cui l'interleuchina-6 (IL6). Le citochine vengono quindi rilevate utilizzando un test immunologico (ELISA) che coinvolge anticorpi specifici e una reazione cromatica enzimatica.

La tabella seguente riporta la valutazione dell'Unità di endotossine nei cerotti pericardici trattati e non trattati (GLU). Valore di riferimento da considerare pirogeno: NMT 20 EU/dispositivo.

| <b>Tipo tessuto</b> | <b>Endotossina<br/>unità/campione</b> |
|---------------------|---------------------------------------|
| GLU                 | < 0.666                               |
| TRATTATO            | < 0.666                               |

Data la descrizione sopra riportata, risulteranno evidenti i vantaggi del metodo della presente invenzione.

In particolare, il metodo dell'invenzione ha dimostrato di non alterare le altre proprietà delle superfici trattate ed eventualmente pretrattate secondo quanto descritto, e dei dispositivi medici, protesi biologiche ed in particolare protesi cardiache comprendenti dette superfici.

Come ulteriore vantaggio, il metodo descritto ha mostrato di inattivare i gruppi reagenti aldeidici e carbossilici disponibili sulla superficie trattata o pretrattata.

Inoltre, poiché la deposizione piastrinica sul reticolo di fibrina è responsabile dell'insorgenza della trombosi subclinica dei lembi (SLT), che a sua volta è responsabile dell'alterazione della mobilità dei lembi valvolari, il metodo dell'invenzione previene la compromissione della funzionalità dei BHV.

Si è riscontrato che l'azione protettiva del metodo dell'invenzione è responsabile di una migliore distribuzione del carico meccanico, che evita la formazione di strappi, abrasioni e buchi.

Come ulteriore vantaggio, il metodo dell'invenzione impedisce l'adesione di microrganismi e la formazione di biofilm sulle superfici trattate ed eventualmente pretrattate.

Ancora, il metodo divulgato evita la contaminazione batterica e virale di una superficie trattata ed eventualmente pretrattata secondo la presente invenzione.

Come ulteriore vantaggio, il metodo descritto mantiene la caratteristica apirogena delle superfici trattate ed eventualmente pretrattate.

#### Rivendicazioni:

1. Metodo per il trattamento di una superficie da contattare con fluidi biologici, detto metodo comprendendo la fase di mettere a contatto detta superficie con una soluzione comprendente un composto fenolico o una miscela di composti fenolici.
2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detta superficie è la superficie di un dispositivo medico.
3. Metodo secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui detta superficie è la superficie di una protesi biologica.
4. Metodo secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni da 1 a 3, in cui detta superficie è la superficie di una protesi cardiaca o di una valvola cardiaca o di un *patch* di tessuto pericardico o di una valvola cardiaca chirurgica.
5. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detto fluido biologico è scelto nel gruppo comprendente: sangue, siero, plasma, gel vitreo, lacrime, urina, saliva, feci; compreso il liquido sinoviale, peritoneale, pericardico, pleurico e amniotico.
6. Metodo secondo la rivendicazione precedente, in cui detto composto fenolico o detta miscela di composti fenolici sono scelti dal gruppo comprendente: fenoli, aldeidi fenoliche, acidi fenolici, fenilammine, composti fenolici, flavonoidi, fenilpropanoidi e tannini.
7. Metodo secondo la rivendicazione precedente, in cui detto composto fenolico o detta miscela di composti fenolici sono scelti dal gruppo comprendente: vanillina, acidi cinnamici, fenilalanina, cumarine, xantoni, catechine, flavononi, flavoni, calconi, flavanonoli, flavanoli, leucoantocianidine, antocianidine, acidi idrossicinnamici.
8. Metodo secondo la rivendicazione precedente, in cui detto composto fenolico o una miscela di composti fenolici è scelto dal gruppo comprendente: resveratrolo, aloina, cianarina, epigallocatechina, acido tannico, acido caffeico, acido clorogenico, idrossitirosolo, acido rosmarinico, narigenina, acido gallico, esperitina, acido chinico, acido eleonolico, pinoresinolo, luteolina, apigenina, tangeritina, isorhamnetina, kaempferol, miricetina, eriodictiol, esperetina, naringenina, teaflavina, thearubigins, daidzein, genisteina, gliciteina, pterostilbene, delphinidina, malvidina, pelargonidin, peonidina, acido cicorico, acido cicorico, acido ferulico, acido salicilico.
9. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detto metodo comprende la fase di mettere a contatto detta superficie con la soluzione di detto composto fenolico o di una miscela di detti composti fenolici per un periodo di tempo inferiore a 2 ore.
10. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detto metodo comprende una prima ed una seconda fase di contatto, in cui tra detta prima e detta seconda fase di contatto viene eseguita una fase di risciacquo.
11. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detto metodo comprende una fase di pretrattamento con uno o più dei composti scelti dal gruppo comprendente; glutaraldeide, formaldeide, quercetina o genipina.
12. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detta fase di pretrattamento comprende inoltre la rimozione di fosfolipidi.
13. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detta fase di pretrattamento comprende inoltre una fase di preparazione comprendente l'uso di un agente di incappucciamento.

14. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, che è una o più tra: un metodo per preservare e mantenere le proprietà biomeccaniche strutturali adeguate, un metodo protettivo per mantenere le proprietà emodinamiche e fluidodinamiche fisiologiche della superficie trattata, un metodo antimicrobico e antivirale per la disinfezione della superficie trattata.
15. Superficie a contatto con fluidi biologici ottenuti secondo il metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 14.
16. Dispositivo medico o protesi biologica comprendente la superficie della rivendicazione 15.
17. Dispositivo medico secondo la rivendicazione precedente, che è selezionato nel gruppo comprendente: vaso artificiale, valvola cardiaca, tendine, legamento, pericardio, fascia muscolare, dura madre, membrana timpanica, sottomucosa intestinale, cartilagine, tessuto adiposo e osseo tessuto pelvico, addominale, mammario e dermico.
18. Metodo per il trattamento di una malattia comprendente l'uso del dispositivo medico o della protesi biologica secondo la rivendicazione 16.
19. Metodo per il trattamento di una malattia secondo la rivendicazione 18, in cui detta malattia è una malattia cardiaca.
20. Metodo per il trattamento di una malattia secondo la rivendicazione 18 o 19, in cui detta malattia è nell'uomo o negli animali.
21. Metodo per il trattamento di una malattia secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 18 a 20, in cui detto metodo comprende un approccio *valve-in-valve*.

Fig. 1

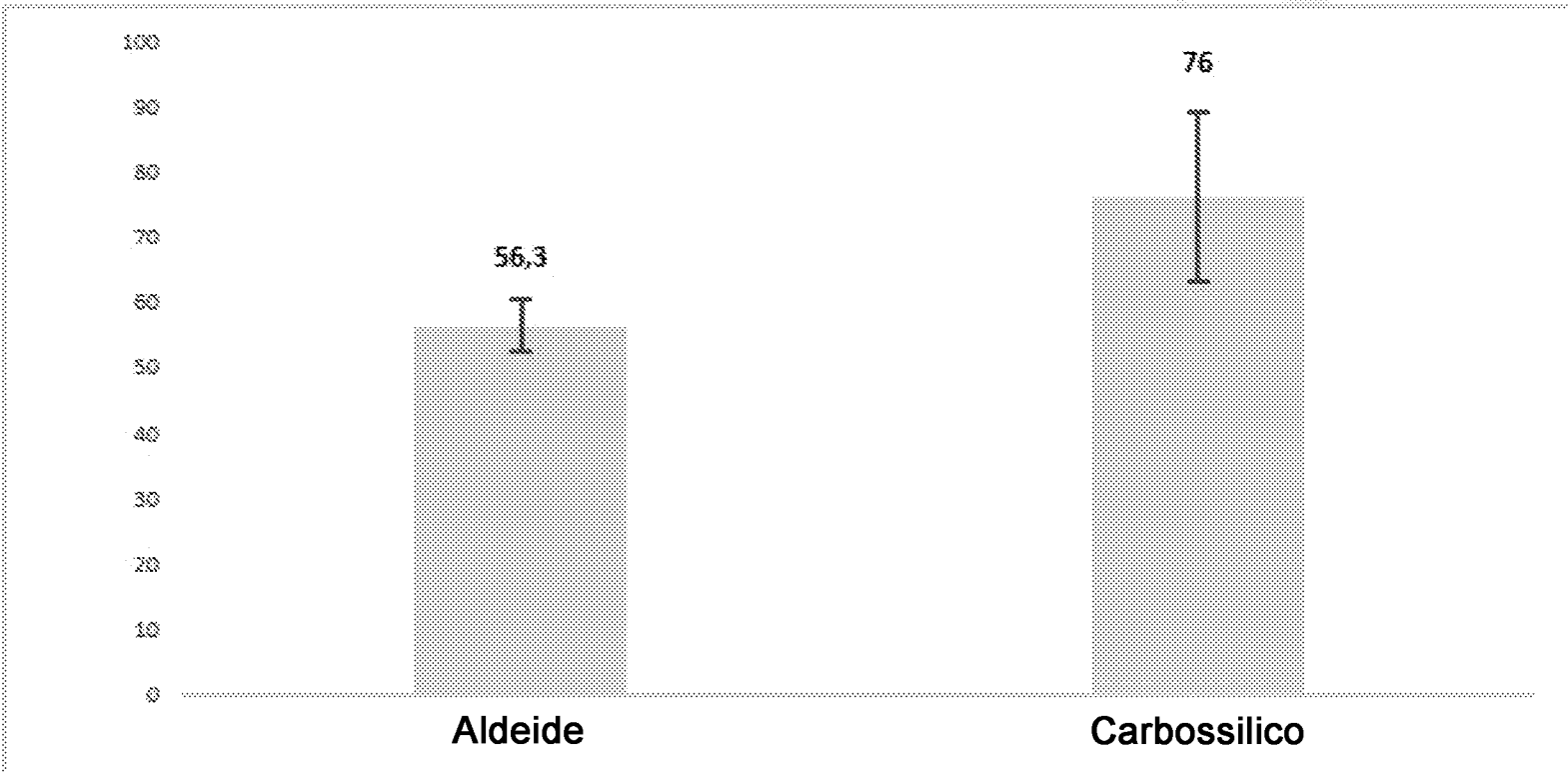


Fig. 2

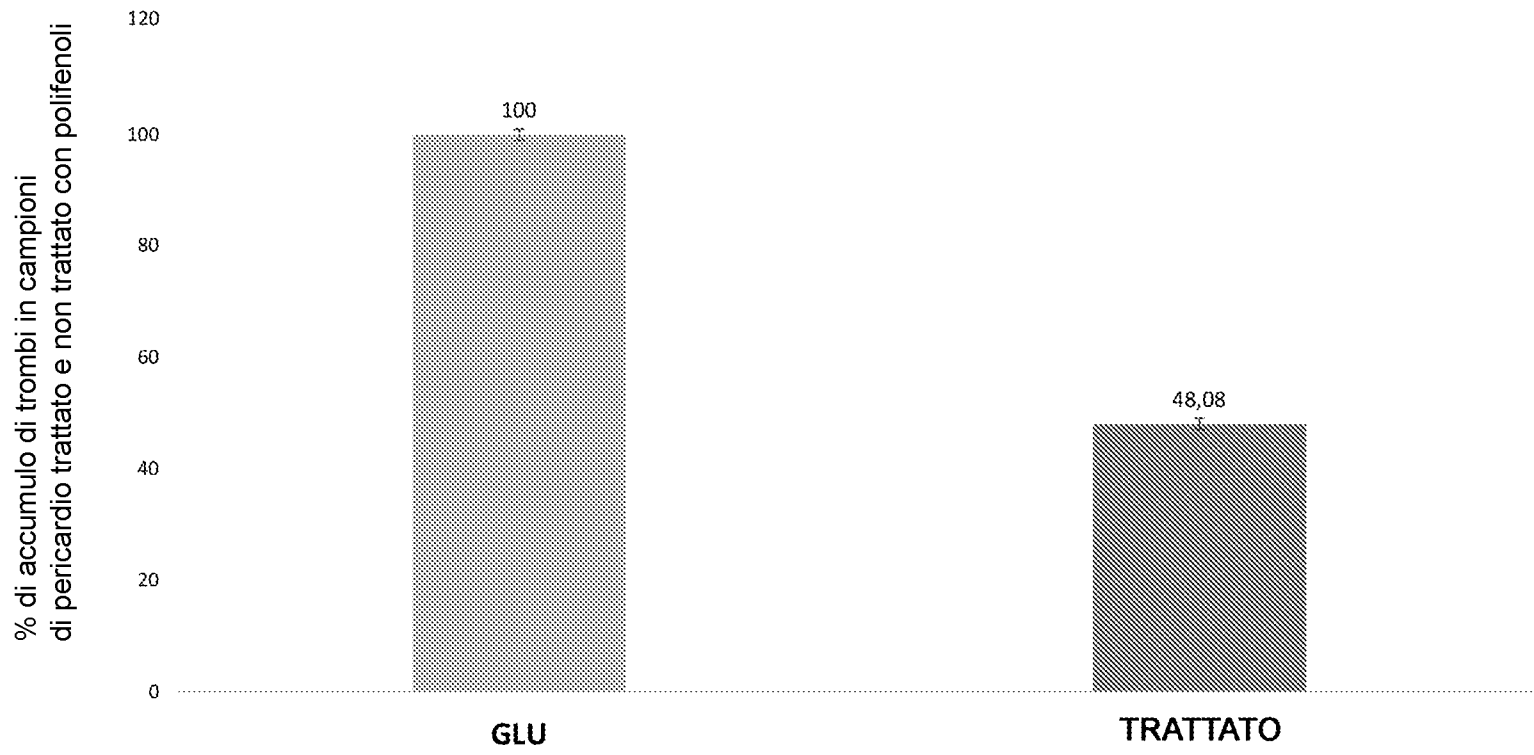


Fig. 3

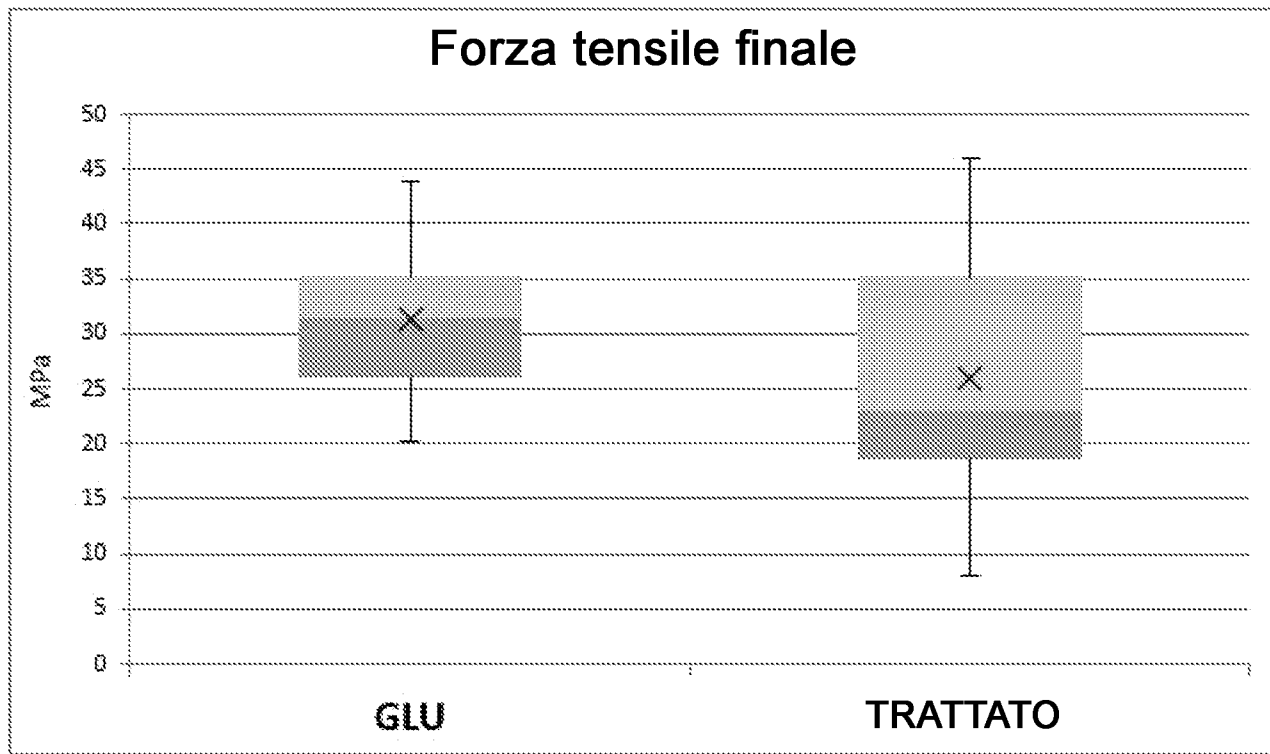


Fig. 4

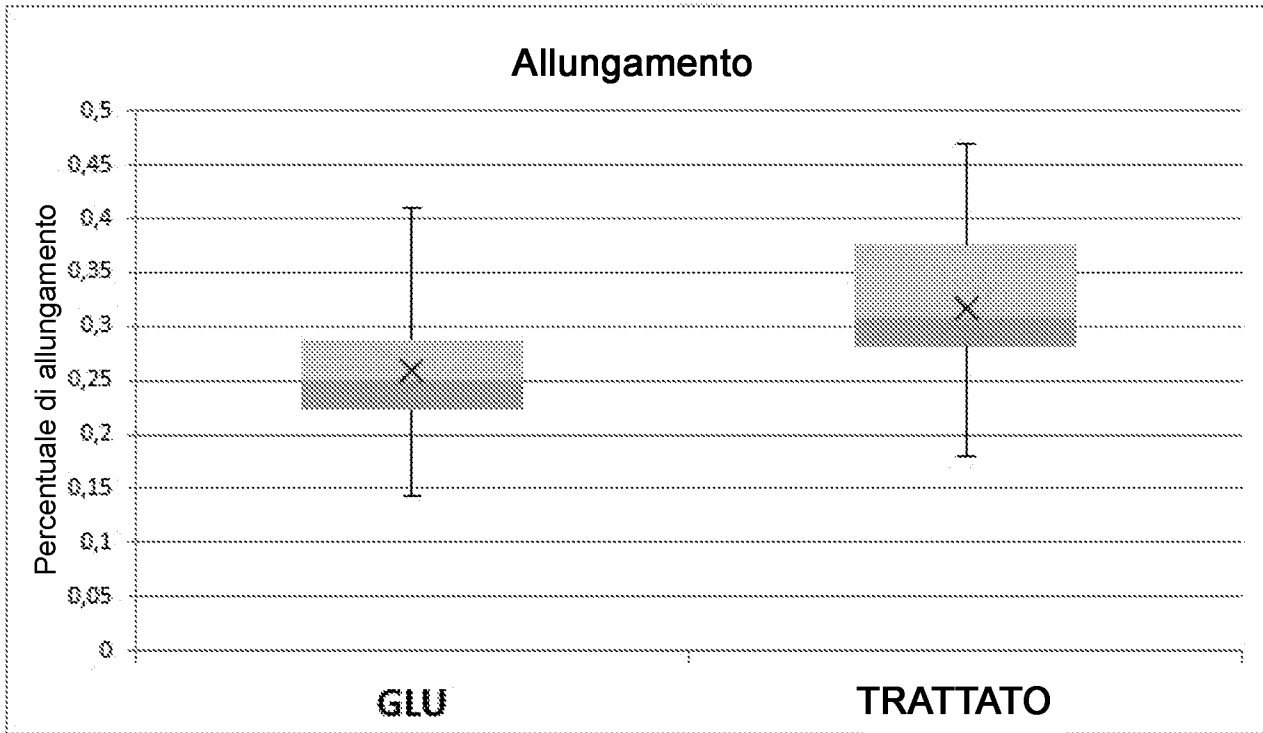


Fig. 5

