

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902072996A1

Publication Date

20121027

Applicant

POLITECNICO DI TORINO

Title

POLIURETANI ANFIFILICI TERMOSENSIBILI E SOLUZIONE ACQUOSA
INIETTABILE A BASE DI TALE MATERIALE.

Descrizione dell'Invenzione Industriale avente per titolo:

“POLIURETANI ANFIFILICI TERMOSENSIBILI E SOLUZIONE
ACQUOSA INIETTABILE A BASE DI TALE MATERIALE”

a nome: POLITECNICO DI TORINO, di nazionalità italiana, con sede in
5 Corso Duca degli Abruzzi 24 - 10129 TORINO (TO).

Inventori designati: CIARDELLI Gianluca – SARTORI Susanna –
BOFFITO Monica – SERAFINI Piero Maria.

Depositata il al n.

DESCRIZIONE

10 La presente invenzione si riferisce a soluzioni acquose iniettabili e
termosensibili a base di poliuretani anfifilici, in particolare per usi in ambito
biomedicale.

Nell'ambito della medicina rigenerativa ed estetica, i sistemi
iniettabili rappresentano la soluzione ideale per la realizzazione d'interventi
15 minimamente invasivi e per l'ottenimento di sistemi di rilascio di farmaci,
locale e/o controllato. Le tecniche chirurgiche minimamente invasive
permettono di ridurre le problematiche connesse agli interventi tradizionali,
quali gli elevati costi ospedalieri (interventi di lunga durata, degenza del
paziente prolungata) e i tempi di guarigione dei pazienti (lungi periodi di
20 riabilitazione, elevato rischio di complicanze post operatorie). Il rilascio
locale di farmaci permette di minimizzare gli effetti collaterali dovuti ai
farmaci stessi.

Requisito necessario per i sistemi iniettabili, è di essere in forma
liquida o gel a bassa viscosità, al momento dell'iniezione. Tali materiali
25 risultano particolarmente interessanti per applicazioni in medicina

rigenerativa, estetica e per il rilascio controllato di farmaci, se formano gel
altamente viscosi in condizioni fisiologiche. Simili sistemi sono stati
ottenuti per lo più mediante procedure di reticolazione o polimerizzazione *in*
vivo. Queste procedure possiedono però dei limiti connessi al possibile
5 utilizzo di monomeri o agenti reticolanti scarsamente biocompatibili. Inoltre
alcune di queste reazioni sono esotermiche e provocano un innalzamento
locale della temperatura.

Inoltre sistemi di rilascio locale e controllato presenti in commercio
sono stati ottenuti mediante l'iniezione di soluzioni polimeriche, utilizzando
10 solventi organici (Atrigel®). Questi solventi sono però incompatibili con
l'utilizzo di alcune classi di molecole (ad esempio di natura proteica) che
possono denaturarsi in tali condizioni.

I sistemi sol-gel oggetto della presente invenzione rappresentano
un'alternativa promettente nel settore della rigenerazione di tessuti
15 danneggiati (medicina rigenerativa) e nel rilascio controllato di farmaci, in
quanto la gelificazione non avviene mediante processi reattivi, ma a seguito
della variazione delle condizioni al contorno. Tali sistemi risultano quindi
altamente biocompatibili e adatti all'incapsulamento di numerose classi di
molecole. Inoltre gli idrogeli iniettabili sono promettenti substrati per
20 l'ingegneria tissutale, poiché hanno un contenuto in acqua paragonabile a
quello dei tessuti naturali, garantiscono un efficace trasferimento di massa,
sono facilmente manipolabili e possono essere omogeneamente addizionati
con fattori di crescita, cellule o farmaci. La natura chimico-fisica degli
idrogeli garantisce inoltre una facile e omogenea colonizzazione del sistema
25 da parte delle cellule e il completo riempimento dei difetti tissutali,

indipendentemente dalla loro forma e dimensioni. L'iniettabilità e la gelificazione in situ, inoltre, fanno in modo che la formazione del gel avvenga a diretto contatto con le cellule: in questo modo si forma un deposito, risultato della creazione di un network, che può compenetrare le cellule e le proteine della matrice extracellulare del tessuto trattato. Un gel è un composto costituito da almeno due componenti: uno di essi (generalmente un polimero naturale o sintetico o una loro miscela) forma un reticolo tridimensionale immerso in un mezzo costituito dall'altro componente (liquido). In base al meccanismo di gelificazione cui vanno incontro, gli idrogeli iniettabili che trovano applicazione nell'ingegneria tissutale, possono essere classificati in gel fisici o reversibili e gel chimici o irreversibili. In particolare, nei gel fisici o reversibili il passaggio dallo stato di soluzione (sol) a quello di gel avviene tramite la formazione d'interazioni deboli tra le catene polimeriche basate su interazioni idrofobiche, legami a idrogeno, forze di Van der Waals o interazioni ioniche. Gli idrogeli fisici mostrano ex-vivo una transizione sol-gel reversibile: una transizione inferiore che comporta il passaggio dallo stato di sol a quello di gel, ed una superiore in corrispondenza della quale il gel collassa o si contrae espellendo parte o la totalità del solvente precedentemente assorbito. Queste transizioni possono essere indotte da variazioni della temperatura, della concentrazione di ioni, della composizione del solvente o del pH. Gli idrogeli che mostrano questo comportamento sono reattivi agli stimoli poiché un cambiamento del loro stato può essere indotto tramite variazioni delle condizioni dell'ambiente circostante. Gli idrogeli reattivi agli stimoli sono definiti intelligenti quando la transizione sol-gel viene indotta dalle

condizioni fisiologiche. Tali gel, quindi, si formano spontaneamente in determinate condizioni, senza richiedere l'introduzione di reticolanti che, tipicamente, sono tossici e possono limitarne la degradabilità. Come detto, la transizione può essere indotta da differenti stimoli; in base al tipo di
5 stimolo che induce la transizione sol-gel, gli idrogeli si possono distinguere in: (i) idrogeli termosensibili, (ii) idrogeli sensibili al pH, (iii) idrogeli sensibili a particolari analiti, (iv) idrogeli basati su peptidi e (v) idrogeli a base di polimeri anfifilici.

Come noto, un polimero anfifilico (o anfipatico) è costituito
10 dall'alternanza di gruppi idrofobici ed idrofilici. Queste caratteristiche molecolari fanno sì che, in un solvente acquoso, le catene polimeriche tendano ad aggregarsi spontaneamente dando origine a micelle che espongono i blocchi idrofilici all'esterno, cioè verso il mezzo acquoso, ed i blocchi idrofobici verso l'interno, massimizzando le interazioni tra i domini
15 idrofilici e l'ambiente esterno e minimizzando quelle tra i gruppi idrofobici e l'acqua.

Come noto, ogni soluzione polimerica può essere caratterizzata da una concentrazione critica (CGC), a partire dalla quale è possibile osservare la transizione dallo stato di soluzione a quello di gel e viceversa. La CGC, di solito, è inversamente proporzionale al peso molecolare del polimero
20 utilizzato. Alcuni sistemi mostrano una separazione tra solvente e gel oltre una certa temperatura; si parla in questi casi di sineresi. Per quanto riguarda gli idrogeli termosensibili, fissata una certa concentrazione (superiore alla CGC), la soluzione polimerica può essere caratterizzata da due temperature:
25 - la LCGT (Lower Critical Gelation Temperature): temperatura in

corrispondenza della quale avviene la transizione sol-gel. Per applicazioni biomedicali questa temperatura deve preferibilmente essere nell'intorno di quella corporea. Al di sotto della LCGT si hanno soluzioni polimeriche, al di sopra della LCGT si forma il gel;

5 - la UCGT (Upper Critical Gelation Temperature): temperatura alla quale avviene la transizione inversa gel-sol.

Fissata una certa concentrazione, a temperature inferiori alla LCGT, si formano micelle di piccole dimensioni che fluiscono liberamente nel mezzo acquoso. In queste condizioni i legami a idrogeno tra i segmenti idrofilici della catena polimerica e l'acqua sono predominanti.

10 All'aumentare della temperatura, le interazioni tra i segmenti idrofobici aumentano, i legami a idrogeno diventano più deboli e le dimensioni delle micelle aumentano per effetto dei legami idrofobici che s'instaurano tra le catene polimeriche. Posto che la concentrazione dell'idrogelo sia superiore

15 alla CGC, l'applicazione di un ulteriore aumento di temperatura ed il superamento della LCGT inducono la transizione sol-gel: le dimensioni delle micelle crescono, il grado di impacchettamento e di aggregazione tra le micelle aumenta fino a portare alla formazione di un gel. Un ulteriore incremento della temperatura al di sopra della UCGT, comporta la

20 distruzione delle strutture micellari ed il ritorno allo stato di soluzione. La modulazione delle proprietà del sistema sol-gel, al fine di ottenere la transizione di fase in condizioni fisiologiche e proprietà fisiche adeguate, può essere realizzata agendo sia sulla composizione del polimero, sia sulla

25 composizione della soluzione. È, ad esempio, possibile agire sull'idrofobicità del materiale polimerico (usando ad esempio macromerici a

differente peso molecolare), la concentrazione della soluzione, il peso molecolare del polimero, la presenza di additivi addizionati alla formulazione (sali quali, ad esempio, NaCl), la scelta del solvente.

Tra i polimeri utilizzati nella realizzazione d'idrogeli per applicazioni biomedicali, sono stati ampiamente studiati quelli di origine naturale (proteine, polisaccaridi) che però presentano alcune problematiche, quali il rischio di trasmissione di malattie e una veloce degradazione.

Sono stati inoltre esaminati poliuretani biodegradabili e non. Esempi di tali poliuretani sono descritti in US4822827, US5254662, US5900246, US20060051394. Nel settore biomedicale i poliuretani biodegradabili rappresentano una valida alternativa ai polimeri naturali per le eccellenti proprietà meccaniche, la buona biocompatibilità e processabilità.

I poliuretani sono sintetizzati utilizzando come reagenti un macrodiolo, un diisocianato ed eventualmente un estensore di catena. La scelta dei reagenti fa sì che le caratteristiche e le proprietà dei poliuretani possano essere modulate in funzione delle specifiche di una data applicazione.

I segmenti soft sono costituiti da polioli, generalmente con pesi molecolari compresi tra 400 e 5000 Da. I segmenti hard, invece, sono costituiti da diisocianati ed eventualmente estensori di catena. Questi ultimi sono solitamente dioli o diammine a basso peso molecolare. Un'accurata selezione dell'estensore di catena permette di impartire al poliuretano adeguate caratteristiche di biodegradazione, biomimetività (inserimento di sequenze amminoacidiche sensibili alla degradazione enzimatica, come la sequenza Ala-Ala, o sequenze di adesione quali, per esempio, il peptide

Arg-Gly-Asp), o inserire gruppi funzionali da utilizzare in una seconda fase per la funzionalizzazione del materiale (N-BOC serinolo).

I poliuretani, inoltre, possono essere soggetti *in vivo* a degradazione idrolitica, enzimatica o ossidativa, a seconda del tipo di monomeri utilizzati
5 nella loro sintesi. Poliuretani degradabili possono essere prodotti attraverso l'introduzione di legami idrolizzabili all'interno della catena principale del polimero. Il più comune metodo utilizzato per introdurre legami idrolizzabili all'interno della catena polimerica è quello che prevede l'impiego, come segmenti soft, di polioli contenenti blocchi idrolizzabili,
10 come polilattidi e poli(ϵ -caprolattone). In alternativa, è possibile introdurre gruppi idrolizzabili all'interno del polimero attraverso il segmento hard, in particolare tramite l'utilizzo di estensori di catena idrolizzabili.

La sintesi dei poliuretani per applicazioni biomedicali avviene tramite un processo a uno o a due stadi; quest'ultimo prevede un primo step
15 in cui avviene la sintesi del prepolimero e durante il quale viene fatto reagire un eccesso di diisocianato con il poliolo. Il prepolimero tipicamente ha un peso molecolare basso e l'aspetto di un liquido molto viscoso o di un solido bassofondente. La reazione successiva del prepolimero con l'estensore di catena costituisce il secondo step della sintesi e permette di ottenere il
20 polimero finale con una struttura multiblocco del tipo (AB)_n.

Non sono note composizioni sol-gel polimeriche termosensibili a base di poliuretani, o loro combinazioni con polimeri naturali.

Scopo quindi della presente invenzione è di risolvere i suddetti problemi della tecnica anteriore fornendo una composizione sol-gel
25 iniettabile termosensibile a base di poliuretani, in particolare per usi in

ambito biomedicale, che non comporti reazioni di polimerizzazione o reticolazioni durante o post-impianto, e pertanto che non necessiti dell'aggiunta *in vivo* di reticolanti o monomeri, potenzialmente sensibilizzanti o tossici.

5 Un altro scopo della presente invenzione è di fornire una composizione sol-gel iniettabile termosensibile a base di poliuretani, in particolare per usi in ambito biomedicale, che non provochi innalzamenti locali della temperatura.

 Inoltre uno scopo della presente invenzione è di fornire una
10 composizione sol-gel iniettabile termosensibile a base di poliuretani, in particolare per usi in ambito biomedicale, che siano iniettabili con sistemi d'iniezione minimamente invasivi.

 Un altro scopo della presente invenzione è di fornire una composizione poliuretanica, in particolare per usi in ambito biomedicale,
15 che possa essere facilmente confezionata sotto forma di polveri sterili per consentirne la successiva solubilizzazione per l'uso, rendendo quindi l'operazione veloce e priva di complicazioni operative.

 Inoltre uno scopo della presente invenzione è di fornire una composizione sol-gel iniettabile termosensibile a base di poliuretani, in
20 particolare per usi in ambito biomedicale, che presentino contemporaneamente alla verificata biocompatibilità dei poliuretani, la capacità di gelificazione delle soluzioni a temperature prossime a quella fisiologica; tale gel fornisce un sostegno meccanico a tessuti e organi e favorisce allo stesso tempo la rigenerazione.

25 Un altro scopo della presente invenzione è di fornire una

composizione sol-gel iniettabile termosensibile a base di poliuretani, in particolare per usi in ambito biomedicale, che possano avere tempistiche di degradazione comparabili con la rigenerazione del tessuto ed essere funzionalizzati con molecole bioattive.

5 Un altro scopo della presente invenzione è di fornire una composizione sol-gel poliuretanica addizionata con uno o più farmaci, in grado di rilasciare il farmaco *in vivo* in modo locale e/o controllato.

I suddetti e altri scopi e vantaggi dell'invenzione, quali risulteranno dal seguito della descrizione, vengono raggiunti con una composizione sol-
10 gel iniettabile termosensibile a base di poliuretani, in particolare per usi in ambito biomedicale, come quello descritto nella rivendicazione 1. Forme di realizzazione preferite e varianti non banali della presente invenzione, formano l'oggetto delle rivendicazioni dipendenti.

Resta inteso che tutte le rivendicazioni allegate formano parte
15 integrante della presente descrizione.

Risulterà immediatamente ovvio che si potranno apportare a quanto descritto innumerevoli varianti e modifiche (per esempio relative a forma, dimensioni, disposizioni e parti con funzionalità equivalenti) senza discostarsi dal campo di protezione dell'invenzione come appare dalle
20 rivendicazioni allegate.

La presente invenzione sarà descritta più dettagliatamente da alcune forme preferite di realizzazione, fornite a titolo esemplificativo e non limitativo.

La presente invenzione si riferisce quindi a una composizione sol-gel
25 iniettabile termosensibile composta da una soluzione acquosa di almeno un

poliuretano anfifilico, in particolare per usi in ambito biomedicale (ovvero una composizione polimerica che preferibilmente è in soluzione a temperatura ambiente e che gelifica, per aggregazione micellare in condizioni fisiologiche) sintetizzato utilizzando come monomeri/macromeri polieterei e diisocianati alifatici. Si noti come la scelta dei materiali costituenti la composizione, secondo la presente invenzione, sarà sempre finalizzata ad avere materiali non tossici dopo impianto e/o degradazione *in vivo*.

Il polietilenglicole (PEG) è spesso utilizzato come blocco idrofilico nella realizzazione di copolimeri anfifilici. Il PEG è un polietere caratterizzato da una completa miscibilità in acqua all'interno di un ampio range di temperature e pesi molecolari. Si tratta di un materiale che possiede numerose qualità, quali idrofilia e biocompatibilità, che lo rendono ideale per applicazioni biomediche. Poliuretani e poliuretani-urea a base di polietilenglicole presentano proprietà anfifiliche che li rendono una valida scelta per lo sviluppo di sistemi sol-gel che, combinando caratteristiche di biodegradabilità e iniettabilità, si prestano ad un inserimento miniminvasivo e sono soggetti ad un processo di gelificazione in condizioni fisiologiche.

Come si vedrà in seguito con maggiore dettaglio, la composizione secondo la presente invenzione appartiene alla categoria dei gel fisici o reversibili ed è soggetta a un processo di gelificazione temperatura-dipendente. L'aumento di temperatura determinato dal passaggio dall'ambiente esterno a quello fisiologico, quindi, determina la transizione dallo stato di sol a quello di gel, senza bisogno di nessun altro stimolo di natura chimica o ambientale.

In particolare, i poliuretani utilizzati nella composizione sol-gel iniettabile termosensibile, secondo la presente invenzione, sono sintetizzati utilizzando come reagenti almeno:

- una prima quantità Q_1 di almeno un macrodiolo contenente almeno un blocco costituito da polietilenglicole (PEG), in forma di oligomero o polimero. Preferibilmente, il blocco di polietilenglicole (PEG) ha un peso molecolare M_n compreso tra 200 e 5000 Da.
- una seconda quantità Q_2 di almeno un diisocianato di formula OCN-R-NCO, dove R rappresenta un gruppo alifatico o alifatico-aliciclico contenente da 4 a 26 atomi di carbonio.

Preferibilmente, il diisocianato è scelto tra 1,6-esametilen diisocianato, 1,4-butandiisocianato, 1,4-cicloesametilen diisocianato o L-lisindiisocianato.

Preferibilmente, la reazione di polimerizzazione avviene in ambiente anidro (tipicamente in atmosfera di gas inerti, quali azoto, N_2 , o argon Ar).

Preferibilmente, tale miscela di reazione può comprendere almeno un solvente come, per esempio, 1,2-diclorometano, tetraidrofurano, N,N-dimetilformammide, 1,2-dicloroetano. È possibile prevedere l'utilizzo di più solventi, per favorire la solubilizzazione dei reagenti e/o degli oligomeri che si formano nel corso della reazione. Reagenti e solventi utilizzati nella sintesi dovrebbero essere preferibilmente anidri o anidrificati precedentemente alla reazione di polimerizzazione; il contenuto in acqua viene ridotto con metodo adeguato in modo da ottenere una percentuale di tale molecola inferiore all'1% in peso rispetto alla miscela di reazione. Esempi di metodologie di anidificazione sono reflusso su setacci

molecolari e distillazione.

Preferibilmente, tale miscela di reazione comprende almeno un catalizzatore, per esempio, ammine terziarie (quali diamminocicloottano) o composti organometallici (quali dibutylstagnodilaurato).

5 In aggiunta, la miscela di reazione per la sintesi dei poliuretani utilizzati nella composizione sol-gel iniettabile termosensibile secondo la presente invenzione può comprendere almeno una terza quantità Q_3 di almeno un estensore di catena contenente due gruppi ossidrilici o amminici.

I dioli o diammine utilizzabili come estensori di catena, per la sintesi
10 della composizione poliuretanica secondo la presente invenzione, possono essere di varia natura; per esempio, l'estensore di catena può essere scelto tra:

- dioli o diammine contenenti sequenze aminoacidiche, quali ad esempio sequenze peptidiche di adesione (ad es. Arg-Gly-Asp), di
15 taglio (ad es. Ala-Ala) o peptidi cellula-penetranti;
- dioli o diammine costituiti da derivati aminoacidici (come, per esempio, estere etilico della lisina);
- dioli o diammine contenenti un gruppo funzionale protetto (come, per esempio, N-BOC serinolo);
- 20 - dioli o diammine ciclici (come, per esempio, cicloesandimetanolo).

Preferibilmente:

- la percentuale in peso di macrodiolo nella miscela di reazione è compresa tra il 20% e il 90% in peso (wt);
- la percentuale in peso di diisocianato nella miscela di reazione è
25 compresa tra l'80% e il 10% in peso (wt);

- la percentuale in peso di estensore di catena nella miscela di reazione varia tra lo 0% e il 65% in peso (wt).

La prima quantità Q_1 di macrodiolo, la seconda quantità Q_2 di diisocianato e la terza quantità Q_3 di estensore di catena sono presenti nella
5 miscela di reazione, secondo la presente invenzione, in un rapporto molare $Q_1:Q_2:Q_3$ che può variare preferibilmente tra 1:2:1 e 3:8:5.

La reazione dei gruppi ossidrilici (-OH) del macrodiolo con i gruppi isocianato (-NCO) del diisocianato comporta la formazione del gruppo uretanico (un appropriato rapporto tra gli equivalenti dei due reagenti è
10 necessario per l'ottenimento di un prodotto di reazione isocianato-terminato). La reazione di polimerizzazione viene condotta eventualmente in solventi, preferibilmente nei solventi organici elencati in precedenza.

Vantaggiosamente, i poliuretani sintetizzati secondo la presente invenzione, come sopradescritta, possono essere utilizzati nella preparazione
15 di soluzioni acquose: in particolare, la composizione poliuretanica secondo la presente invenzione può essere solubilizzata in:

- acqua;
- soluzione salina (come, per esempio, tampone fosfato, PBS);
- soluzione glucosata (soluzione di glucosio o destrosio);
- 20 - soluzione glucosalina.

La quantità Q_4 di poliuretano presente nella soluzione poliuretanica, oggetto della presente invenzione, è preferibilmente compresa tra l'1% ed il 99% peso/volume (più preferibilmente tra l'1% e il 50%).

In aggiunta, la soluzione poliuretanica, oggetto della presente
25 invenzione, può comprendere, oltre alla componente poliuretanica Q_4 ,

atmosfera inerte di N₂ per reflusso su setacci molecolari. L'operazione viene condotta per 8 ore;

b) prepolimerizzazione (primo step): il primo step della sintesi avviene al termine dell'anidificazione. La reazione di prepolimerizzazione, condotta
5 a 85°C per 150[M1] minuti, prevede l'aggiunta del diisocianato alla soluzione di macrodiolo in DCE (quantità di diisocianato pari al 22,43% della quantità in peso di macrodiolo) e di quantità catalitiche di catalizzatore (dibutylstagnodilaurato);

c) aggiunta dell'estensore di catena (secondo step): il secondo step
10 della sintesi avviene a temperatura ambiente e prevede l'aggiunta dell'estensore di catena (quantità di estensore pari al 9,6% della quantità in peso di macrodiolo) alla soluzione di prepolimero. La fase di estensione viene protratta per un periodo di 16 ore, al termine delle quali la reazione viene terminata con aggiunta di metanolo;

15 d) precipitazione e purificazione: la soluzione polimerica viene aggiunta goccia a goccia ad un non solvente del polimero (etere di petrolio), il sistema viene decantato e la soluzione separata dal polimero.

Il polimero viene solubilizzato in DCE e nuovamente precipitato per aggiunta di un non solvente (per esempio etere di petrolio). Al termine di
20 questa seconda precipitazione viene eseguita la decantazione/centrifugazione del polimero. Il polimero è quindi separato dal solvente e messo in stufa sottovuoto a 40°C per almeno 12 ore.

Stadio 2a

Di seguito si riporta a titolo esemplificativo la preparazione di una
25 composizione secondo la presente invenzione, avente la seguente

composizione:

- 10%wt poliuretano;
- 3%wt di gelatina (Gelatina di tipo B da pelle bovina);
- solvente: PBS (volume di sistema 3 ml).

5 Il poliuretano qui utilizzato è quello la cui sintesi è riportata nello stadio 1.

La composizione viene preparata seguendo il seguente protocollo:

- 90 mg di gelatina sono solubilizzati a caldo in 3 ml di PBS;
 - 0,3 g di poliuretano sono addizionati alla precedente soluzione e
- 10 solubilizzati.

STADIO 2b

Di seguito si riporta a titolo esemplificativo la preparazione di una formulazione secondo la presente invenzione, avente la seguente composizione:

- 15 • 10%wt poliuretano;
- 3%wt di gelatina (Gelatina di tipo B da pelle bovina);
 - solvente: PBS (volume di sistema 3 ml);
 - adenosina (concentrazione 4 mg/ml).

Il poliuretano qui utilizzato è quello la cui sintesi è riportata nello

20 stadio 1.

La composizione viene preparata seguendo il seguente protocollo:

- Il poliuretano (0,3 g) è solubilizzato in acetone (10% w/v); alla precedente soluzione sono aggiunti il farmaco (adenosina, 12 mg) e la PBS, in quantità tali da avere un rapporto in volume PBS:acetone
- 25 = 1:20;

- la soluzione così ottenuta è aggiunta goccia a goccia al volume di PBS;
- dalla soluzione così preparata viene allontanato l'acetone;
- alla soluzione viene aggiunta gelatina (90 mg).

5 I poliuretani sintetizzati secondo la presente invenzione, sono stati caratterizzati mediante:

- Cromatografia ad Esclusione Molecolare (SEC) per determinarne il peso molecolare medio numerale (M_n) e ponderale (M_w): i polimeri così sintetizzati, risultano avere M_n compresi tra 10.000 e 25.000 Da;

10

- Analisi Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC) per misurarne le proprietà termiche: l'obiettivo di questa tecnica è l'individuazione delle transizioni termiche e del grado di cristallinità del poliuretano.

15

I poliuretani sintetizzati secondo la presente invenzione presentano cristallinità nel range 25-30%;

- Spettroscopia Infrarossa in Trasformata di Fourier (FTIR) per l'analisi della struttura chimica. Nel dettaglio, dall'analisi dello spettro FTIR è stato possibile identificare i picchi caratteristici dei gruppi uretanici che confermano che la sintesi è avvenuta con successo. In particolare, il picco attorno ai 1710 cm^{-1} è caratteristico dello stretching dei gruppi C=O liberi e legati di gruppi uretanici. A circa 1100 cm^{-1} si può osservare lo stretching del gruppo $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$, caratteristico degli eteri alifatici, come ad esempio il PEG. Tutti gli altri picchi osservabili sugli spettri indicano una struttura in
- 20
- 25
- accordo con le previsioni. Non sono stati, inoltre, rilevati picchi

relativi ai gruppi diisocianato intorno a 2200cm^{-1} , indicando che la conversione di tali gruppi è stata quantitativa e che, di conseguenza, il processo di polimerizzazione è avvenuto in modo completo;

- bagnabilità superficiale tramite Angolo di Contatto statico, per valutarne le proprietà di superficie. I poliuretani sintetizzati secondo la presente invenzione mostrano valori di angolo di contatto variabili tra 40°C e 60°C . I poliuretani secondo la presente invenzione risultano quindi essere idrofilici.

Le composizioni sol-gel poliuretaniche, secondo la presente invenzione, sono state caratterizzate mediante:

- Prove d'Iniettabilità mediante siringhe graduate da 2,5 ml e un ago da 20Gauge. Le prove d'iniettabilità hanno evidenziato che le formulazioni sol-gel, oggetto della presente invenzione, possono essere caricate facilmente all'interno di una siringa e fluiscono senza difficoltà attraverso un ago a 20Gauge;
- Analisi Reologica: le prove reologiche sui sistemi sol-gel secondo la presente invenzione sono state eseguite tramite un reometro rotativo, per caratterizzarli dal punto di vista della viscosità (a temperatura ambiente e in condizioni fisiologiche) e individuare la temperatura di inizio transizione sol-gel. Prove di strain sweep sono state condotte preliminarmente su tutte le composizioni studiate per scegliere correttamente la deformazione da imporre in tutte le analisi successive. Sono state anche condotte prove di frequency sweep per caratterizzare il comportamento dei sistemi sol-gel in funzione della frequenza. In particolare, queste ultime prove hanno evidenziato che

le composizioni secondo la presente invenzione presentano un comportamento di tipo pseudoplastico, vale a dire la loro viscosità complessa η^* diminuisce all'aumentare della frequenza, aspetto che può essere anche sfruttato per facilitare l'iniezione delle composizioni sol-gel da parte dei sistemi di rilascio progettati. Le prove in rampa di temperatura hanno evidenziato che la viscosità complessa, così come i moduli di conservazione e di perdita G' e G'' , aumenta con la temperatura; questo comportamento è in linea con il processo di gelificazione dovuto all'aumento della temperatura. I valori di viscosità a temperatura ambiente (25°C) sono risultati variabili nel range 0,15 a 2,5 Pa*s; tali valori rendono le composizioni, secondo la presente invenzione, facilmente iniettabili mediante l'utilizzo di dispositivi in commercio (quali, per esempio, aghi da insulina). I test di cinetica a 37°C hanno permesso di evidenziare che le composizioni secondo la presente invenzione permangono in fase gel ($G' > G''$) per tutto l'intervallo di tempo considerato e che la viscosità complessa aumenta anche quando il sistema è mantenuto a temperatura costante, a dimostrazione che il processo di gelificazione non è solo temperatura-dipendente, ma anche tempo-dipendente.

Le composizioni secondo la presente invenzione possono trovare applicazione in numerosi campi della medicina rigenerativa ed estetica. Le composizioni proposte, infatti, possono servire sia come riempitivo, sia come veicolo di farmaci, fattori di crescita e cellule. Tali sistemi sono interessanti nella rigenerazione di numerosi tessuti quali, ad esempio, osso,

cartilagine e miocardio, nonché come micro- e macro-riempitivi, per applicazioni cosmetiche (“filler” dermici) ed estetiche (protesi).

Si sono descritte alcune forme preferite di attuazione dell'invenzione, ma naturalmente esse sono suscettibili di ulteriori
5 modifiche e varianti nell'ambito della medesima idea inventiva. In particolare, agli esperti nel ramo risulteranno immediatamente evidenti numerose varianti e modifiche, funzionalmente equivalenti alle precedenti, che ricadono nel campo di protezione dell'invenzione come evidenziato nelle rivendicazioni allegate.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione sol-gel iniettabile termosensibile costituita da una soluzione acquosa di almeno un poliuretano anfifilico.
2. Composizione secondo la rivendicazione precedente, caratterizzata
5 dal fatto che detto poliuretano anfifilico è sintetizzato mediante una miscela di reazione di polimerizzazione comprendente almeno:
 - una prima quantità (Q_1) di almeno un macrodiolo contenente almeno un blocco costituito da polietilenglicole (PEG) in forma di oligomero o polimero;
 - 10 - una seconda quantità (Q_2) di almeno un diisocianato di formula OCN-R-NCO, dove R rappresenta un gruppo alifatico contenente da 4 a 26 atomi di carbonio.
3. Composizione secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detta reazione di polimerizzazione avviene in ambiente anidro.
- 15 4. Composizione secondo la rivendicazione precedente, caratterizzata dal fatto che detto ambiente anidro è un'atmosfera di gas inerti.
5. Composizione secondo la rivendicazione 1, caratterizzata dal fatto che detta miscela di reazione comprende almeno un solvente.
6. Composizione secondo la rivendicazione precedente, caratterizzata
20 dal fatto che detto solvente è scelto tra 1,2-diclorometano, tetraidrofurano, N,N-dimetilformammide, 1,2-dicloroetano.
7. Composizione secondo la rivendicazione 2, caratterizzata dal fatto che detta miscela di reazione comprende almeno un catalizzatore.
8. Composizione secondo la rivendicazione precedente, caratterizzata
25 dal fatto che detto catalizzatore è scelto tra ammine terziarie o composti

organometallici.

9. Composizione secondo la rivendicazione 2, caratterizzata dal fatto che detta prima quantità (Q_1) di macrodiolo è compresa tra il 20% e il 90% in peso (wt) di detta miscela di reazione e detta seconda quantità (Q_2) di diisocianato è compresa tra l'80% e il 10% in peso (wt) di detta miscela di reazione.

10. Composizione secondo la rivendicazione 2, caratterizzata dal fatto che detto blocco di polietilenglicole (PEG) ha un peso molecolare M_n compreso tra 200 e 5000 Da.

10 11. Composizione secondo la rivendicazione 2, caratterizzata dal fatto che detto diisocianato è scelto tra 1,6-esametilen diisocianato, 1,4-butandiisocianato, 1,4-cicloesametilen diisocianato o L-lisindiisocianato.

12. Composizione secondo la rivendicazione 1, caratterizzata dal fatto di essere un gel fisico o reversibile.

15 13. Composizione secondo la rivendicazione 2, caratterizzata dal fatto che detta miscela di reazione comprende almeno una terza quantità (Q_3) di almeno un estensore di catena contenente due gruppi ossidrilici o amminici.

14. Composizione secondo la rivendicazione 13, caratterizzata dal fatto che detto estensore di catena è scelto tra dioli o diammine contenenti sequenze aminoacidiche, dioli o diammine costituite da derivati aminoacidici, dioli o diammine contenenti un gruppo funzionale protetto, dioli o diammine ciclici.

15. Composizione secondo la rivendicazione 13, caratterizzata dal fatto che la percentuale in peso di detta terza quantità (Q_3) di estensore di catena in detta miscela di reazione è compresa tra 0% e 65%.

16. Composizione secondo la rivendicazione 13, caratterizzata dal fatto che detta prima quantità (Q_1) di macrodiolo, detta seconda quantità (Q_2) di diisocianato e detta terza quantità (Q_3) di estensore di catena sono presenti in detta miscela in un rapporto molare $Q_1:Q_2:Q_3$ che può variare tra 1:2:1 e 3:8:5.
17. Composizione secondo la rivendicazione 1, caratterizzata dal fatto che una fase liquida in cui è solubilizzato detto polimero è acqua distillata, oppure una soluzione salina, oppure una soluzione glucosata, oppure una soluzione glucosalina.
18. Composizione secondo la rivendicazione 1, caratterizzata dal fatto che la formulazione iniettabile comprende almeno una sesta quantità (Q_6) di almeno un farmaco o una molecola bioattiva.
19. Composizione secondo la rivendicazione 18, caratterizzata dal fatto che detta sesta quantità (Q_6) è compresa tra lo 0% e il 30% peso/volume, più preferibilmente tra lo 0% e il 20%.
20. Uso di una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 19 per rigenerazione tissutale e in medicina estetica e protesica.
21. Uso, secondo la rivendicazione precedente, di detta composizione come riempitivo, come veicolo di farmaci, fattori di crescita e cellule.
22. Soluzione poliuretanica comprendente almeno una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 19, caratterizzata dal fatto di comprendere una quarta quantità (Q_4) di poliuretano, compresa tra l'1% ed il 99% peso/volume, più preferibilmente tra l'1% e il 50%.
23. Soluzione secondo la rivendicazione precedente, caratterizzata dal

fatto di comprendere una quinta quantità (Q_5) di almeno un polimero naturale e/o carboidrati e/o proteine.

24. Soluzione secondo la rivendicazione precedente, caratterizzata dal fatto che detto polimero naturale e/o carboidrati e/o proteine è scelto tra
5 acido ialuronico, gelatina, collagene.

25. Soluzione secondo la rivendicazione 23, caratterizzata dal fatto che detta quinta quantità (Q_5) è compresa tra lo 0% ed il 99% peso/volume, più preferibilmente tra l'1% e il 20%.

CLAIMS

1. Thermosensitive injectable sol-gel composition composed of an aqueous solution of at least one amphiphilic polyurethane.
2. Composition according to the previous claim, characterised in that
5 said amphiphilic polyurethane is synthesised through a polymerisation reaction mixture comprising at least:
 - a first amount (Q_1) of at least one macrodiol containing at least one block composed of polyethyleneglycol (PEG) as an oligomer or polymer;
 - a second amount (Q_2) of at least one diisocyanate with a formula
10 OCN-R-NCO , where R represents an aliphatic group containing 4 to 26 carbon atoms.
3. Composition according to claim 1, characterised in that said polymerisation reaction occurs in an anhydrous environment.
4. Composition according to the previous claim, characterised in that
15 said anhydrous environment is an atmosphere of inert gases.
5. Composition according to claim 1, characterised in that said reaction mixture comprises at least one solvent.
6. Composition according to the previous claim, characterised in that said solvent is chosen among 1,2-dichloromethane, tetrahydrofuran, N,N-dimethylformamide, 1,2-dichloroethane.
20
7. Composition according to claim 2, characterised in that said reaction mixture comprises at least one catalyst.
8. Composition according to the previous claim, characterised in that said catalyst is chosen between tertiary amines or organometallic
25 composites.

9. Composition according to claim 2, characterised in that said first amount (Q_1) of macrodiol is included between 20% and 90% in weight (wt) of said reaction mixture and said second amount (Q_2) of diisocyanate is included between 80% and 10% in weight (wt) of said reaction mixture.
- 5 10. Composition according to claim 2, characterised in that said block of polyethyleneglycole (PEG) has a molecular weight M_n included between 200 and 5000 Da.
11. Composition according to claim 2, characterised in that said diisocyanate is chosen among 1,6-esamethylen diisocyanate, 1,4-
10 butandiisocyanate, 1,4-cicloesamethylen diisocyanate or L-lisindiisocyanate.
12. Composition according to claim 1, characterised in that it is a physical or reversible gel.
13. Composition according to claim 2, characterised in that said reaction mixture comprises at least one third amount (Q_3) of at least one chain
15 extender containing two hydroxy or aminic groups.
14. Composition according to claim 13, characterised in that said chain extender is chosen among dioles or diamines containing aminoacid sequences, dioles or diamines composed of aminoacid derivatives, dioles or diamines containing a protected functional group, cyclic dioles or diamines.
- 20 15. Composition according to claim 13, characterised in that the weight percentage of said third amount (Q_3) of chain extender in said reaction mixture is included between 0% and 65%.
16. Composition according to claim 13, characterised in that said first amount (Q_1) of macrodiol, said second amount (Q_2) of diisocyanate and said
25 third amount (Q_3) of chain extender are present in said mixture in a molar

ratio $Q_1:Q_2:Q_3$ that can range between 1:2:1 and 3:8:5.

17. Composition according to claim 1, characterised in that a liquid phase in which said polymer is solubilised is distilled water, or a saline solution, or a glucosylated solution, or a glucosaline solution.

5 18. Composition according to claim 1, characterised in that the injectable formulation comprises at least one sixth amount (Q_6) of at least one drug or a bioactive molecule.

19. Composition according to claim 18, characterised in that said sixth amount (Q_6) is included between 0% and 30% weight/volume, more
10 preferably between 0% and 20%.

20. Use of a composition according to any one of claims 1 to 19 for tissue regeneration and in aesthetic and prosthetic medicine.

21. Use of the composition according to the previous claim as filler, as vehicle for drugs, growth factors and cells.

15 22. Polyurethane solution comprising at least one composition according to any one of claims 1 to 19, characterised in that it comprises a fourth amount (Q_4) of polyurethane, included between 1% and 99% weight/volume, more preferably between 1% and 50%.

23. Solution according to the previous claim, characterised in that it
20 comprises a fifth amount (Q_5) of at least one natural polymer and/o carbohydrates and/or proteins.

24. Solution according to the previous claim, characterised in that said natural polymer and/or carbohydrates and/or proteins is chosen among ialuronic acid, gelatine, collagene.

25. Solution according to claim 23, characterised in that said fifth amount (Q_5) is included between 0% and 99% weight/volume, more preferably between 1% and 20%.