



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

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102015000059715
Data Deposito	08/10/2015
Data Pubblicazione	08/04/2017

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	L	27	24

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	L	27	46

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	L	27	52

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	L	27	54

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	L	27	58

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	L	31	04

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	L	31	12

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	L	31	14

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	L	31	16

Titolo

UN PROCESSO PER LA PREPARAZIONE DI FILM DI COLLAGENE

TITOLO
UN PROCESSO PER LA PREPARAZIONE
DI FILM DI COLLAGENE
DESCRIZIONE

5 Campo dell'Invenzione

La presente invenzione riguarda in generale il campo dei materiali ausiliari chirurgici, e più precisamente si riferisce a un processo per la preparazione di collagene in forma di film, utili in particolare come materiali riassorbibili per impianti chirurgici.

10 Stato dell'Arte

Il collagene, o collagene, è la principale proteina del tessuto connettivo negli animali e la proteina più abbondante nei mammiferi, rappresentando circa il 6% del peso corporeo nell'uomo, dove ha una distribuzione ubiquitaria (si trova nelle ossa, nei muscoli, nei tendini e nella pelle) e dove fornisce un vero e proprio supporto strutturale
15 al corpo umano.

Esistono svariati tipi di collagene propriamente detto, e diverse proteine che hanno struttura polipeptidica largamente assimilabile al collagene. In letteratura sono stati finora descritti 28 tipi di collagene. Tra questi, i più comunemente studiati sono: il collagene di tipo I, che rappresenta il 90% del collagene totale, ed entra nella
20 composizione dei principali tessuti connettivi, come pelle, tendini, ossa e cornea; il collagene di tipo II, che forma la cartilagine, i dischi intervertebrali e il corpo vitreo; il collagene di tipo III, che riveste una grande importanza nel sistema cardiovascolare; il collagene di tipo IV, che va a comporre la membrana basale; seguono poi il collagene di tipo V e VI che, associati a quello di tipo I, vanno a costituire il tessuto interstiziale; e
25 così via (Bosman F.T. et al, *The Journal of Pathology*, Volume 200, Issue 4, pages 423-428, July 2003).

La fonte di collagene commerciale più prolifica è quella animale, quella equina in particolare. La più alta percentuale di collagene disponibile in commercio è infatti quella estratta dai tendini dei cavalli, in particolare di cavalli di allevamenti argentini ed
30 europei, controllati e autorizzati all'estrazione da soli animali sani, secondo le

normative vigenti. Il gel di collagene estratto dai tendini di animali sani è esente da qualsiasi virus o agente infettivo trasmissibile; i tendini di animali sani sono in particolare esenti da BSE o da rischio di contaminazione virale. I tessuti animali di origine equina, e in particolare il tessuto connettivo (tendini) è classificato dall'EMA
5 come prodotto di classe IV, con infettività non rilevabile ("no detectable infectivity").

Numerosi prodotti derivati da questo collagene di origine animale sono stati sviluppati e sono da tempo in uso come dispositivi medico-chirurgici, con svariate applicazioni, tutte generalmente legate alla riassorbibilità e all'azione rigenerativa caratteristiche del collagene. Si trovano in commercio, ad esempio, pellicole di
10 collagene indicate per il trattamento di ferite e il controllo del sanguinamento in particolare in campo odontoiatrico. Tali prodotti, oltre ad essere efficaci nelle applicazioni cliniche a cui sono destinati, si sono inoltre dimostrati non citotossici né mutageni, e non provocano alcuna irritazione o sensibilizzazione nei tessuti con cui si trovano in contatto.

15 Più in generale, i materiali derivati da collagene, incluso quello di origine equina, hanno una biocompatibilità oramai riconosciuta nella comunità medica e scientifica, oltre ad un tempo di degradazione che può essere regolato entro valori ideali per lo svolgimento dell'azione medica richiesta al materiale, ad esempio mediante derivatizzazione del collagene. A tal proposito si menzionano a titolo di esempio i
20 materiali descritti nella domanda di brevetto Internazionale pubblicata con il N. WO 2012/062898 a nome della stessa Richiedente, in cui il collagene è coniugato a un poliestere sintetico ottenuto da polimerizzazione o co-polimerizzazione di un idrossiacido scelto tra acido lattico, acido glicolico o loro miscele; tali materiali, grazie alla derivatizzazione, hanno mostrato un tempo di riassorbimento ottimale e possono
25 essere processati in forma di membrane per re-idratazione in soluzione fisiologica e successivo essiccamento; lo spessore di tali membrane era dell'ordine di svariati millimetri.

La forma della membrana o del film è in effetti particolarmente richiesta per le applicazioni medico-chirurgiche, avendo buone caratteristiche di flessibilità e
30 maneggevolezza per il rivestimento delle ferite e per l'applicazione su zone relativamente ampie, e potendo inoltre essere utilizzata come scaffold per la

preparazione di materiali tissutali ingegnerizzati. Il collagene liofilizzato non derivatizzato, se semplicemente sottoposto a re-idratazione con acqua o con soluzione fisiologica seguita da essiccamento, non fornisce invece un materiale soddisfacente in termini di consistenza. La sua re-idratazione al momento dell'uso fornisce infatti un
5 materiale gelatinoso che non può ad esempio essere suturato e non si adatta all'applicazione laddove è richiesto invece un film sottile, meccanicamente resistente.

Membrane di collagene di piccoli spessori, anche nanometrici, sono state in effetti preparate con tecnologie note nel settore dei polimeri, quali la filmatura per soffiaggio e l'elettrofilatura o *electrospinning* (si veda ad esempio Matthews J.A. et al.,
10 *Biomacromolecules*, 2002, 3(2):232-8). Si tratta però di tecnologie complesse, che richiedono apparecchiature dedicate, di costo elevato, il cui utilizzo è stato finora limitato alla preparazione di nanofilm per applicazioni speciali.

Resta dunque tuttora sentita l'esigenza di disporre di un metodo semplice, poco costoso, per preparare film di collagene per uso medico-chirurgico, aventi piccolo
15 spessore, inferiore al millimetro, e dotati di buona flessibilità e resistenza meccanica.

Sommario dell'invenzione

Ora la Richiedente ha trovato un processo di preparazione per ottenere, con una procedura estremamente semplice ed economica, facilmente scalabile anche a livello industriale, film di collagene di spessore inferiore al millimetro, che mantengono una
20 buona resistenza a carico e a trazione, a cui uniscono anche un'elevata elasticità e maneggevolezza.

Rappresenta pertanto oggetto dell'invenzione un processo per la preparazione di film di collagene di spessore inferiore a 1 millimetro, come definito nella prima delle rivendicazioni annesse.

25 I film di collagene ottenibili con il suddetto processo, e il loro uso come materiale ausiliario chirurgico, come definiti nelle rivendicazioni indipendenti 10 e 11, rappresentano ulteriore oggetto dell'invenzione.

Altre importanti caratteristiche del processo di preparazione dei film di collagene, e dei film stessi, nonché del loro uso secondo l'invenzione, sono definite nelle
30 rivendicazioni dipendenti qui annesse, e riportate nella descrizione dettagliata che segue.

Breve descrizione delle figure

La Figura 1 mostra l'andamento nel tempo del grado di rigonfiamento S del film dell'invenzione (—■—) e di tre prodotti commerciali a base di collagene: Bio-Gide® (—▲—), MeRG® (—◆—) e Resodont® (—●—).

5 La Figura 2 mostra una rappresentazione grafica del modo di taglio di provini del film dell'invenzione da sottoporre a prove dinamomeccaniche di trazione.

La Figura 3 mostra un istogramma dei valori di stress di trazione in kPa necessari per elongare un provino del 10% della sua lunghezza iniziale per il film dell'invenzione e per i tre prodotti commerciali indicati, ciascuno testato in forma di
10 provini diversi, tagliati lungo l'asse x e rispettivamente l'asse y come descritto nell'Esempio 4.

La Figura 4 mostra un istogramma dei valori del modulo di Young in MPa misurati in un test di trazione al 50% sul film dell'invenzione e sui tre prodotti commerciali indicati, ciascuno testato in forma di provini diversi, tagliati lungo l'asse x e
15 rispettivamente l'asse y come descritto nell'Esempio 4.

La Figura 5 mostra i valori di deformazione % del provino vs. i valori di stress a trazione in Pa per il film dell'invenzione e per i tre prodotti commerciali di confronto indicati, ciascuno testato in forma di provini diversi, tagliati lungo l'asse x e rispettivamente l'asse y come descritto nell'Esempio 4.

20 Le Figure 6 e 7 mostrano rispettivamente il profilo di degradazione enzimatica del film dell'invenzione (—■—) in confronto con il collagene liofilizzato di partenza (—●—) e il profilo di degradazione dei tre prodotti commerciali a base di collagene: Bio-Gide® (—▲—), MeRG® (—◆—) e Resodont® (—●—) in confronto con la placca di collagene liofilizzato di partenza (—■—).

25 Descrizione dettagliata dell'invenzione

Il presente processo di preparazione di film di collagene di spessore inferiore a 1 millimetro comprende: i) uno stadio di nebulizzazione di una placca di collagene liofilizzato con una soluzione acquosa di glicerolo o di un suo estere o glicol solubile in acqua in concentrazione compresa tra 1 e 5% in peso rispetto al volume totale della
30 soluzione, seguito da: ii) uno stadio di essiccamento a temperatura ambiente.

Esteri di glicerolo solubili in acqua sono ad esempio i monogliceridi, mentre per

glicol si intende ad esempio un polietilenglicol (PEG). Secondo una forma di realizzazione preferita del processo dell'invenzione, la placca di collagene di partenza viene nebulizzata con una soluzione acquosa di glicerolo.

La placca di collagene liofilizzato di partenza può avere ad esempio spessore
5 variabile tra gli 8 e i 15 mm, tipicamente tra gli 8 e i 12 mm, e può essere ottenuta a partire da gel di collagene di origine equina, in particolare ottenuto da estrazione di tendine equino, che è classificabile come collagene di Tipo I.

In una forma realizzativa preferita del presente processo la soluzione acquosa di glicerolo o di un suo estere o glicol solubile in acqua ha una concentrazione pari a circa
10 il 3% p/v. La nebulizzazione di questa soluzione può essere realizzata con qualsiasi mezzo noto, anche se l'uso di un nebulizzatore manuale non pressurizzato è preferibile per mantenere in posizione la placca e garantire un'applicazione della soluzione il più uniforme possibile su tutta la superficie.

La successiva fase di essiccamento a temperatura ambiente è preferibilmente
15 condotta a pressione ridotta per un tempo compreso ad esempio tra 6 e 8 ore. Si ottiene in questo modo un prodotto secco completamente diverso dalla placca di collagene liofilizzato di partenza, non solo nell'aspetto e nello spessore inferiore al millimetro, compreso ad esempio tra 100 e 1000 micrometri, ma anche nelle
20 caratteristiche strutturali: la struttura del materiale ottenuto è quella del film, non è più la struttura porosa del liofilizzato. Quando il materiale viene inoltre re-idratato al momento dell'uso, non si otterrà un materiale gelatinoso ma un film flessibile di elevata resistenza meccanica, adatto anche all'applicazione mediante sutura.

Secondo il presente processo la placca di collagene liofilizzato di partenza è preferibilmente ottenuta mediante liofilizzazione di una soluzione acquosa di gel di
25 collagene, la cui concentrazione può essere ad esempio compresa tra 0,5 e 2 % in peso rispetto al volume totale della soluzione, e preferibilmente è pari a circa l'1% p/v. Tale soluzione acquosa di gel di collagene può essere vantaggiosamente diluita con una soluzione acquosa di acido acetico, di concentrazione compresa ad esempio tra 1,5 e 3% in peso rispetto al volume totale della soluzione; in questo caso la fase di
30 liofilizzazione sarà seguita da una fase di essiccamento per eliminare ogni residuo di acido acetico; di preferenza l'essiccamento è condotto qui a circa 37°C di temperatura

e a pressione ridotta, per un tempo ad esempio di circa 48 ore. A parità di prodotto di partenza, infatti, l'aggiunta di acido acetico alla soluzione acquosa di gel di collagene prima della liofilizzazione, consente di ottenere spessori inferiori del film di collagene finale.

5 Con il processo della presente invenzione si ottengono film di collagene che hanno spessore inferiore a 1 millimetro, e compreso ad esempio tra 100 e 1000 nm, con dimensioni fino a circa 225 cm².

Tali film, oltre a mantenere la biocompatibilità dei materiali di partenza e a poter essere facilmente sottoposti a sterilizzazione, sono estremamente maneggevoli ed elastici dopo re-idratazione, con un'elevata resistenza a carico e a trazione. In effetti, a fronte di una notevole riduzione di spessore rispetto alle membrane ottenute con i processi di preparazione noti grazie alla derivatizzazione del collagene, i film ottenuti con il presente processo sono costituiti da fitte fibre di collagene mantenendo come materiale una buona consistenza e resistenza, tanto da poter essere suturati. Più in particolare, i film ottenibili con il presente processo, seppure di spessore molto sottile e di elevata flessibilità, mostrano una notevole resistenza alla trazione come descritto in dettaglio nella parte sperimentale che segue: anche film di spessore di circa 100 µm non si rompono se sottoposti ad elongazione del 50% o a stress di 4,5-5,5 MPa, i valori caratteristici di stress a rottura ed elongazione a rottura di questo materiale essendo
15 dunque più alti di tali valori.

I film dell'invenzione, inoltre, presentano un basso grado di rigonfiamento in acqua o solventi acquosi, molto più basso rispetto alla placca di collagene liofilizzato di partenza, e mostrano inoltre rispetto a questa anche una maggiore resistenza alla degradazione enzimatica da parte dell'enzima collagenasi.

25 Si tratta quindi di materiali che offrono la massima adattabilità ai tessuti da trattare sui quali devono essere applicati, che il chirurgo potrà tagliare delle dimensioni desiderate una volta re-idratati in soluzione fisiologica, posizionare sul sito ricevente, quindi fissare con pins riassorbibili o colla di fibrina, oppure suturare direttamente ai tessuti limitrofi senza pericolo di rotture o sfaldamenti. L'applicazione ai tessuti, in

particolare la sutura da parte del chirurgo, risulta particolarmente facilitata dal piccolo spessore del film.

Si è inoltre verificato che i film ottenuti con il presente processo sono completamente biorassorbibili in un periodo di tempo sufficientemente lungo da
5 consentire la formazione dei nuovi tessuti, tipicamente pari a 4-6 mesi. In altre parole, essi si mantengono stabili per un tempo sufficiente a svolgere la loro funzione, dopodiché vengono completamente riassorbiti dall'organismo. La funzione svolta è, al pari delle membrane di collagene note, principalmente quella di guidare la crescita e la rigenerazione dei tessuti impedendone l'invaginazione e l'accartocciamento durante le
10 operazioni artroscopiche e favorendo la ripresa dell'attività delle cellule tissutali e la liberazione dei fattori di crescita.

Per le caratteristiche sopra descritte, i film di collagene ottenibili con il processo dell'invenzione si prestano a essere utilizzati per la preparazione di materiali per la rigenerazione tissutale guidata, per l'uso nel trattamento di ferite, come supporti per la
15 preparazione di tessuti ingegnerizzati per impianti chirurgici, e simili.

Secondo una particolare forma realizzativa dell'invenzione, i film di collagene preparati con il presente processo possono comprendere uno o più principi farmacologicamente e/o biologicamente attivi, coniugati o comunque inglobati nella struttura del film, così da esplicare la loro specifica azione farmacologica nel sito di
20 applicazione del film direttamente per contatto con i tessuti dove il film viene applicato oppure, successivamente, per rilascio a seguito della degradazione del film. I suddetti principi attivi possono ad esempio essere aggiunti alla soluzione iniziale di gel di collagene, oppure disciolti in un loro solvente farmaceuticamente accettabile e, nella soluzione così ottenuta, nebulizzati sulla placca di collagene liofilizzato. Tra i principi
25 attivi aggiunti si menzionano come preferiti granuli di idrossiapatite, che hanno una comprovata azione osteoinduttiva e tipicamente dimensioni dei granuli comprese tra 300 e 600 μm ; risulta dunque possibile il loro inglobamento in una soluzione acquosa di gel di collagene che, sottoposta a liofilizzazione e a un trattamento di nebulizzazione di glicerolo o esteri o glicoli idrosolubili secondo l'invenzione, quindi essiccata, dà luogo

a un film di collagene contenente granuli di idrossiapatite inglobati, che può mantenere uno spessore inferiore a 1 mm e le eccellenti caratteristiche di flessibilità, resistenza alla degradazione enzimatica e resistenza a trazione dei presenti film.

I seguenti esempi sono riportati a scopo illustrativo e non limitativo della presente
5 invenzione.

ESEMPIO 1

Preparazione della soluzione di gel di collagene

In un miscelatore planetario sono stati trasferiti 13,5 Kg di gel di collagene da tendini di origine equina e si sono posti sotto agitazione alla velocità di 100 rpm,
10 mantenendo la temperatura a 37°C. Nell'arco di circa 4 ore, mantenendo le condizioni di temperatura e agitazione di cui sopra, si è quindi aggiunta a porzioni una soluzione acquosa diluita di acido acetico all'1,5% preparata miscelando, sotto agitazione, 67,5 g di acido acetico glaciale e 1,5 litri di acqua p.p.i.

Terminata l'aggiunta, si è lasciata la miscela sotto agitazione per ulteriori 30
15 minuti a 37°C, quindi si sono fermati sia l'agitazione sia il riscaldamento, e si è utilizzato tutto il collagene diluito con la soluzione di acido acetico per la successiva liofilizzazione.

La stessa preparazione sopra descritta è stata ripetuta nelle medesime condizioni ad eccezione della concentrazione della soluzione di acido acetico, questa
20 volta pari al 3%; tale soluzione è stata ottenuta miscelando 135 g di acido acetico glaciale in 1,5 litri di acqua p.p.i.

ESEMPIO 2

Preparazione delle placche di collagene

Le due soluzioni di gel di collagene diluite con le soluzioni di acido acetico,
25 preparate come descritto sopra nell'Esempio 1, sono state distribuite nei vassoi di un liofilizzatore in misura di circa 1 litro di soluzione per vassoio di dimensioni 30x35x3 cm, e sottoposte ad un ciclo di liofilizzazione nelle seguenti condizioni: rampa di raffreddamento rapida fino a -35°C e liofilizzazione graduale con rampa di riscaldamento fino a 25°C nell'arco di 72-96 ore.

I prodotti liofilizzati così ottenuti sono stati sottoposti a un ulteriore trattamento di essiccamento in stufa per eliminare ogni possibile residuo di acido acetico e garantire l'assenza, o comunque la presenza al di sotto dei limiti previsti dalla farmacopea. L'essiccamento in stufa è stato condotto in condizioni di vuoto, con riscaldamento a
5 37°C per circa 48 ore.

Il suddetto trattamento di liofilizzazione e l'essiccamento in stufa sono stati condotti in parallelo anche sul gel di collagene tal quale, non diluito con la soluzione acquosa di acido acetico, ottenendo prodotti che sostanzialmente differiscono solo per la "trama" più o meno densa del liofilizzato, proporzionalmente alla concentrazione del
10 collagene in acido acetico.

Le placche di collagene liofilizzato ed essiccato così ottenute avevano dimensioni 28 cm x 33 cm e uno spessore tra circa 0,5 cm e circa 1 cm.

ESEMPIO 3

Preparazione dei film di collagene secondo l'invenzione

15 Le placche di collagene liofilizzato ed essiccato come descritto sopra nell'Esempio 2 sono state sottoposte a nebulizzazione con una soluzione acquosa di glicerolo al 3%. Tale soluzione è stata preparata aggiungendo, sotto agitazione, 30 g di glicerolo a 500 ml di acqua p.p.i. quindi, di seguito, aggiungendo ulteriori 470 ml di acqua p.p.i. e mantenendo sotto agitazione per qualche minuto a circa 800 rpm.

20 Con un nebulizzatore manuale non pressurizzato sono nebulizzati su ciascuna placca di collagene circa 80 ml di soluzione acquosa di glicerolo preparata come detto sopra. Quindi le placche sono ricoperte con teli filtranti in polipropilene, e sottoposte a essiccamento su piastre di essiccamento collegate a un sistema ad alto vuoto, a temperatura ambiente e per un periodo di tempo di 6-8 ore.

25 Si sono così ottenuti film di collagene di dimensioni circa 28 cm x 33 cm e spessore uniforme, di dimensioni crescenti all'aumentare della concentrazione di collagene nel prodotto di partenza.

I film ottenuti come descritto sopra sono stati poi ritagliati delle dimensioni desiderate, confezionati e sterilizzati per irraggiamento a 25 kGy con
30 un'apparecchiatura standard.

ESEMPIO 4

Caratterizzazione del film di collagene

Uno dei film di collagene ottenuto dalla soluzione a minor concentrazione di collagene, come descritto negli Esempi precedenti, è stato caratterizzato mediante valutazione del suo spessore e della densità e sottoposto alle seguenti prove:

- 5 - prova di trazione (caratterizzazione dinamomeccanica);
- prova di *water uptake* o assorbimento dell'acqua;
- degradazione enzimatica.

Le prove sono state eseguite sia sul campione di prodotto dell'invenzione sia, per confronto, sul collagene liofilizzato di partenza e su prodotti commerciali, ossia i film di collagene conosciuti con i nomi commerciali Bio-Gide[®], MeRG[®] e Resodont[®].

Misura dello spessore e della densità del film

Con l'ausilio di uno spessimetro Positector 6000 il film ottenuto con il processo dell'invenzione è stato sottoposto a misurazione dello spessore in diversi punti della sua superficie, trovando uno spessore medio pari a $110 \pm 15 \mu\text{m}$ contro uno spessore medio di circa 7,5 mm della placca di collagene di partenza. La densità media del film è risultata pari a $12 \pm 1 \text{ mg/cm}^2$, mentre la placca di collagene di partenza aveva una densità media di circa $6,5 \pm 0,7 \text{ mg/cm}^2$.

Prova di water uptake o assorbimento dell'acqua

Le cinetiche di assorbimento dell'acqua sono state studiate in acqua a 37°C, applicando il metodo modificato della British Pharmacopoeia (1993, Addendum 1995, pagine 1705-1707). Tale procedura prevede il rigonfiamento in acqua dei film per 30 minuti, tuttavia il film ottenuto con la presente invenzione e i film commerciali testati non raggiungono il loro equilibrio se non in tempi più lunghi, dunque lo studio è stato fatto nell'arco delle 24 ore, ottenendo i risultati mostrati in Figura 1. La Figura 1 mostra appunto l'andamento nel tempo del grado di rigonfiamento S del film dell'invenzione (—■—) e di tre prodotti commerciali a base di collagene: Bio-Gide[®] (—●—), MeRG[®] (—○—) e Resodont[®] (—□—). Per il film dell'invenzione si è trovato in particolare che esso raggiunge in 30 minuti un grado di rigonfiamento $S = 2,4 \pm 0,4$, che è pari a circa l'80% del valore all'equilibrio ($S = 2,9 \pm 0,3$ dopo 24 ore), e inferiore al grado di rigonfiamento anche del miglior prodotto commerciale, ad indicare una minore porosità della superficie. Nell'ambito di questa prova, si è inoltre testata anche la placca di collagene

di partenza, trovando un valore del grado di rigonfiamento pari a $S = 44 \pm 2$, dunque molto più elevato del film ottenibile con il semplice trattamento della placca con soluzione di glicerolo.

Prova di trazione

5 Il film ottenuto con il processo dell'invenzione è stato ritagliato a formare due campioni quadrati di circa 5 cm di lato; uno di questi è stato ulteriormente tagliato in provini di circa 5 mm in verso orizzontale, lungo l'asse x, mentre l'altro è stato tagliato in provini lungo il verso perpendicolare al primo, lungo l'asse y, secondo lo schema illustrato in Figura 2.

10 I provini così tagliati sono stati poi dimensionati con l'ausilio di calibro e spessimetro, reidratati in acqua e sottoposti alle seguenti prove di trazione:

- trazione (velocità 1 mm/s) fino al 10% della lunghezza iniziale per determinare la forza di elongazione necessaria in regime di linearità a basse deformazioni;
 - trazione (velocità 1 mm/s) fino al 50% della lunghezza iniziale per verificare
- 15 eventuali deformazioni irreversibili in seguito a trazioni elevate.

Le prove sono state effettuate per confronto anche sui tre prodotti commerciali sopra menzionati, mentre non è stato possibile effettuare prove di trazione sulla placca di collagene di partenza; tale materiale, infatti, a causa della sua elevata porosità e rigonfiabilità in acqua, una volta reidratato, perde completamente la sua forma e

20 consistenza, diventando simile al cotone idrofilo bagnato e rendendo impossibile l'innesto del campione nei morsetti del dinamometro.

Nelle Figure 3 e 4 sono rispettivamente riportati i valori di resistenza a trazione al 10% di elongazione e i valori di modulo di Young in forma di istogrammi per i quattro prodotti testati indicati in figura. Nelle Figure 3 e 4 per ciascun prodotto sono riportati

25 due istogrammi, che rappresentano i valori ottenuti per i due provini tagliati lungo l'asse x e lungo l'asse y rispettivamente. I risultati ottenuti mostrano chiaramente la superiorità del film ottenuto con il processo dell'invenzione in termini di resistenza a trazione. In particolare, le prove di trazione al 50% di elongazione, i cui risultati sono riportati in Figura 4, hanno mostrato come i provini del film dell'invenzione non si

30 rompono a seguito della sollecitazione imposta in questa prova, ma si deformano arrivando ad una lunghezza finale pari a circa il 120% di quella iniziale.

In Figura 5 sono riportate le curve di trazione (1 mm/s) per i quattro prodotti analizzati, il film dell'invenzione e i tre prodotti commerciali di confronto, ciascuno nelle due forme di provino tagliato lungo l'asse x e rispettivamente lungo l'asse y. Tali curve sono ottenute riportando i valori di deformazione % del provino vs. i valori di stress a trazione in Pa, e mostrano chiaramente come il film dell'invenzione abbia una deformazione lineare lungo tutta la sollecitazione a differenza di quanto si osserva ad esempio per il prodotto commerciale Bio-Gide® per il quale è evidente una regione di incrudimento (*strain hardening*) per trazioni superiori al 25% di deformazione, mentre gli altri prodotti commerciali testati sopportano sollecitazioni molto inferiori. Il prodotto MeRG®, ad esempio, si rompe a seguito di deformazioni del 16 e del 21% rispettivamente per il provino tagliato lungo l'asse x e per il provino tagliato lungo l'asse y, mentre il prodotto Resodont® subisce rottura lungo entrambi gli assi all'11% di deformazione.

Nella seguente Tabella 1 sono riportati i valori di stress a rottura e di elongazione a rottura per i prodotti testati. Nei casi in cui i provini non si sono rotti fino a tale deformazione, nella tabella è stato inserito un valore di elongazione a rottura >>50%, e un valore di stress a rottura >> del valore ottenuto al 50% di deformazione.

Tabella 1

	Asse x		Asse y	
	Stress a rottura (MPa)	Elongazione a rottura (%)	Stress a rottura (MPa)	Elongazione a rottura (%)
Film dell'invenzione	>>4,5	>>50	>>5,5	>>50
Bio-Gide®	3,2	40	>>4,5	>>50
Resodont®	0,35	11	0,35	11
MeRG®	1,06	16	1,4	21

Prova di degradazione enzimatica

Il film dell'invenzione è stato inoltre sottoposto a prove di degradazione enzimatica con enzima collagenasi estratto da *Clostridium hystolyticum*, per confronto con la placca di collagene liofilizzata di partenza; anche i tre prodotti commerciali menzionati sopra sono stati sottoposti allo stesso tipo di prova, con un diverso lotto

dello stesso enzima detto sopra anche se alla stessa concentrazione, e confrontati con il collagene di partenza. In entrambi i casi sono stati misurati i valori percentuali del peso rimanente di prodotto a seguito della degradazione, riportati nei grafici di Figura 6 e Figura 7 in funzione del tempo di degradazione.

5 Da tali grafici risulta evidente come il film ottenuto con il processo dell'invenzione subisca una degradazione decisamente più lenta rispetto alla placca di collagene di partenza (Figura 6), così come si può notare un profilo di degradazione molto diverso tra i tre prodotti commerciali, dei quali solo il prodotto Bio-Gide® mostrava una degradazione più lenta del collagene di partenza.

10

La presente invenzione è stata fin qui descritta con riferimento a sue forme di realizzazione preferite. È da intendersi che possono esistere altre forme di realizzazione che afferiscono al medesimo nucleo inventivo, tutte rientranti nell'ambito di protezione delle rivendicazioni qui di seguito riportate.

RIVENDICAZIONI

1. Un processo per la preparazione di un film di collagene di spessore inferiore al millimetro, comprendente i seguenti stadi:
 - i) nebulizzazione su una placca di collagene liofilizzato di una soluzione acquosa di glicerolo o di un suo estere o glicol solubile in acqua in concentrazione compresa tra 1 e 5% in peso rispetto al volume totale della soluzione;
 - ii) essiccamento a temperatura ambiente del materiale liofilizzato su cui è stata nebulizzata detta soluzione.
2. Il processo secondo la rivendicazione 1, in cui detta placca di collagene liofilizzato ha uno spessore compreso tra 8 e 15 mm.
3. Il processo secondo la rivendicazione 2, in cui detta placca di collagene liofilizzato ha uno spessore compreso tra 8 e 12 mm.
4. Il processo secondo la rivendicazione 1, in cui detta soluzione acquosa di glicerolo o di un suo estere o glicol solubile in acqua ha una concentrazione pari a circa il 3% p/v.
5. Il processo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti in cui detto film di collagene ottenuto ha spessore compreso tra 100 e 1000 micrometri.
6. Il processo secondo la rivendicazione 1, in cui detta placca di collagene liofilizzato è ottenuta per liofilizzazione di una soluzione acquosa di gel di collagene da estrazione di tendine equino, che è collagene di Tipo I.
7. Il processo secondo la rivendicazione 6, in cui detta soluzione acquosa di gel di collagene comprende inoltre uno o più principi farmacologicamente e/o biologicamente attivi, preferibilmente consistenti di granuli di idrossiapatite.
8. Il processo secondo la rivendicazione 6, in cui la concentrazione di gel di collagene in detta soluzione acquosa è compresa tra 0,5 e 2% in peso rispetto al volume totale della soluzione, e preferibilmente è pari a circa l'1% in peso.
9. Il processo secondo le rivendicazioni 6-8, in cui detta soluzione acquosa di gel di collagene è diluita con una soluzione acquosa di acido acetico.
10. Il processo secondo la rivendicazione 9, in cui detta soluzione acquosa di acido acetico ha una concentrazione compresa tra 1,5 e 3% in peso rispetto al volume

totale della soluzione.

11. Il processo secondo la rivendicazione 9, comprendente inoltre una fase di essiccamento del prodotto ottenuto dalla liofilizzazione, condotta a pressione ridotta e circa 37°C di temperatura.
- 5 12. Un film di collagene di spessore inferiore a 1 millimetro e resistenza a trazione superiore al 50% di elongazione del film o a 4,5 MPa di stress, detto film essendo ottenibile con il processo delle rivendicazioni 1-11.
13. Il film della rivendicazione 12, comprendente uno o più principi farmacologicamente e/o biologicamente attivi, coniugati o comunque inglobati
10 nella struttura di detto film.
14. Il film della rivendicazione 13, in cui detti principi attivi sono granuli di idrossiapatite.
15. Il film delle rivendicazioni 12-14 per l'uso nel trattamento di ferite o nella terapia di rigenerazione tissutale guidata.

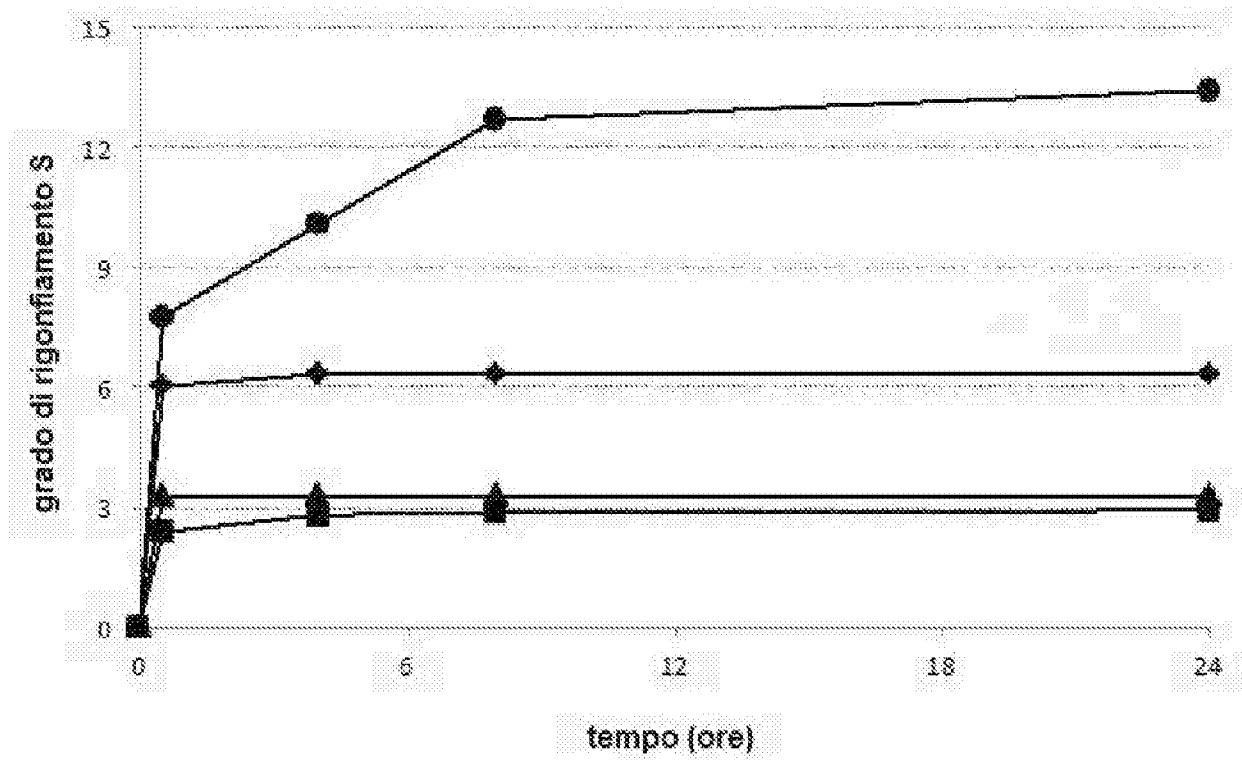


Figura 1

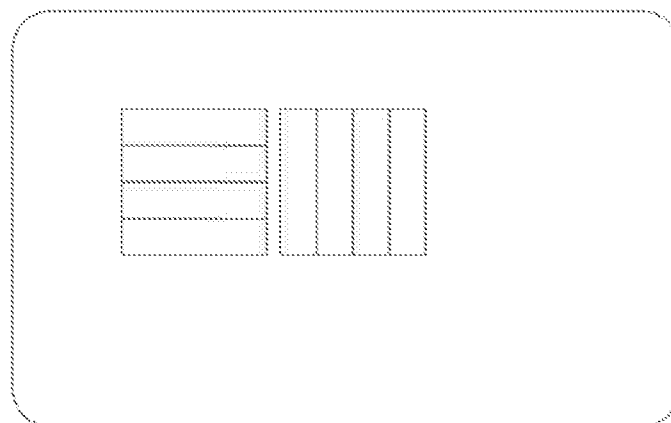


Figura 2

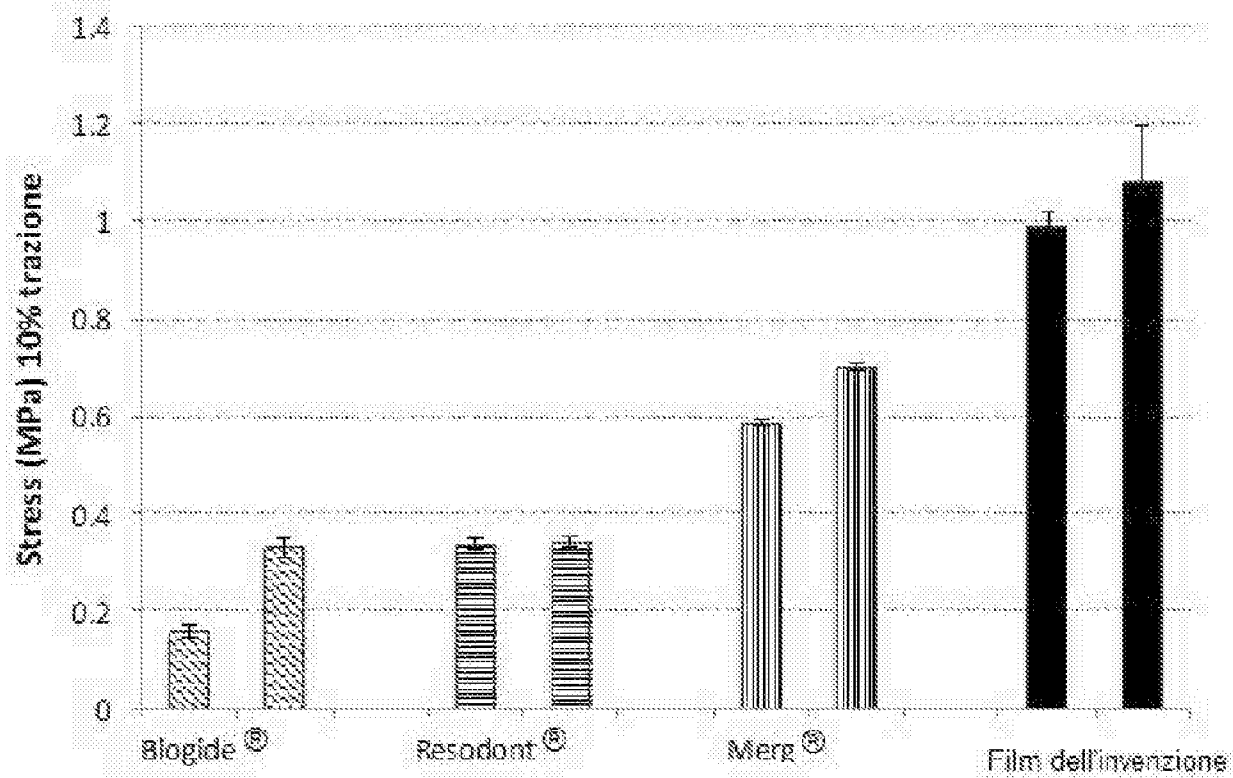


Figura 3

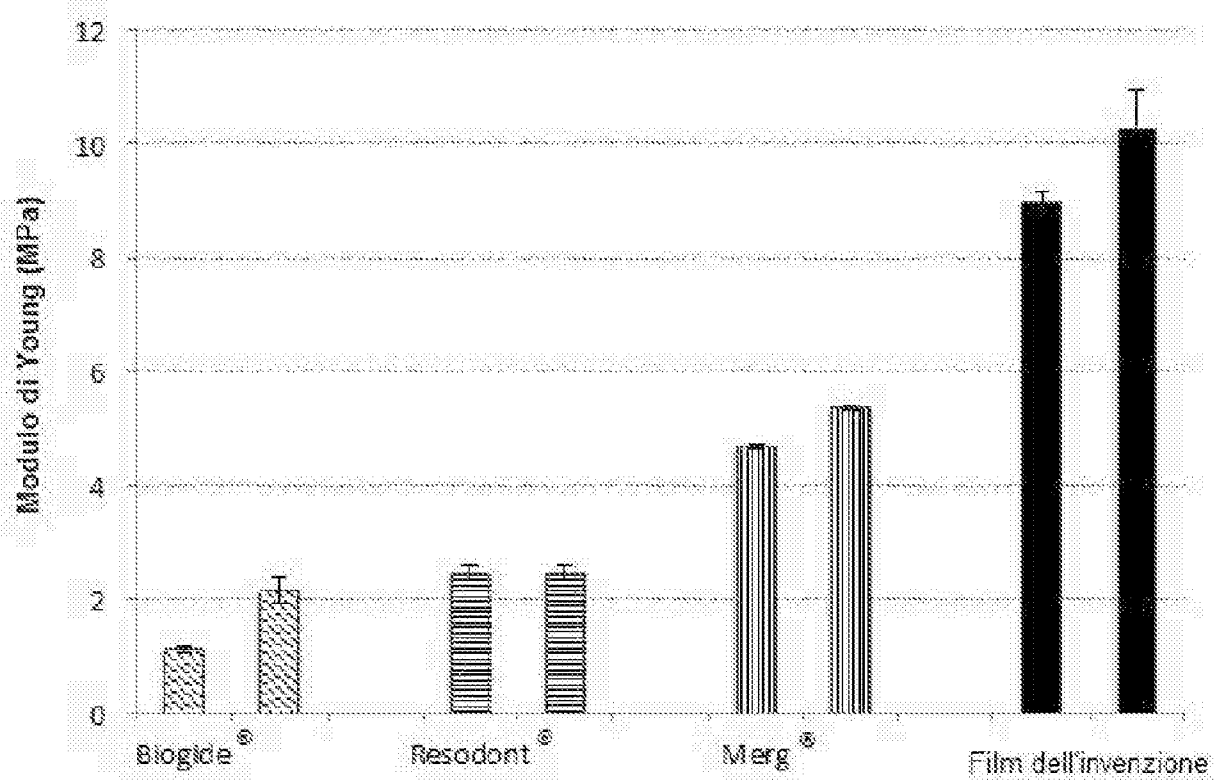


Figura 4

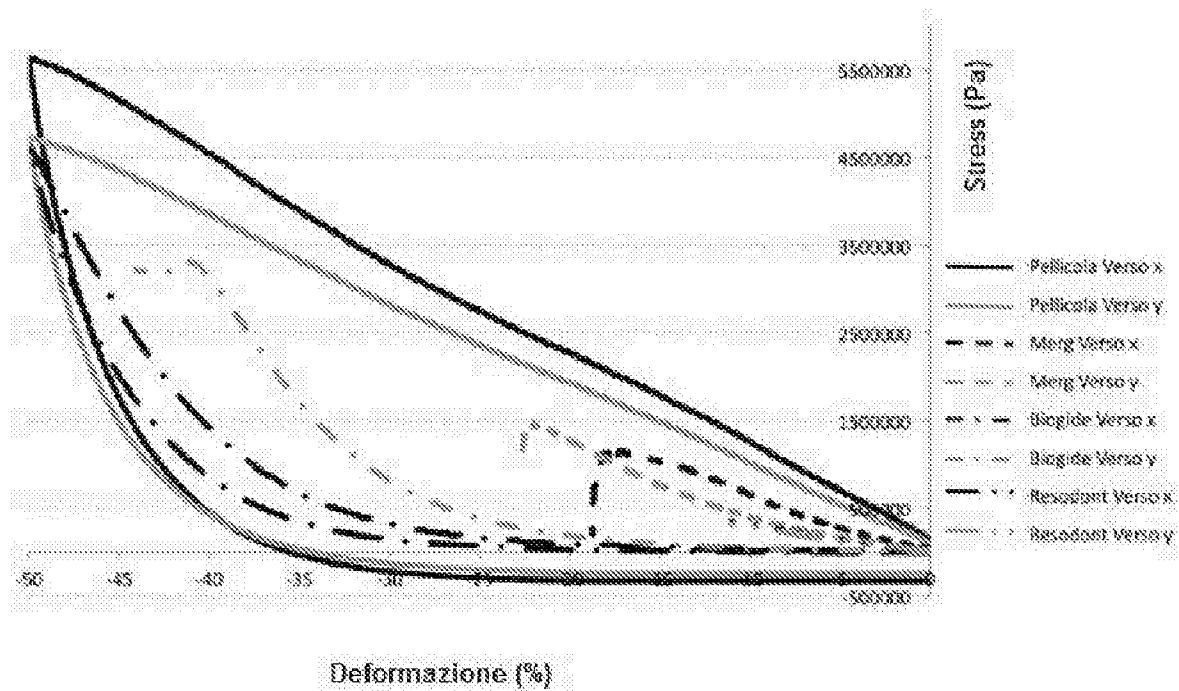


Figura 5

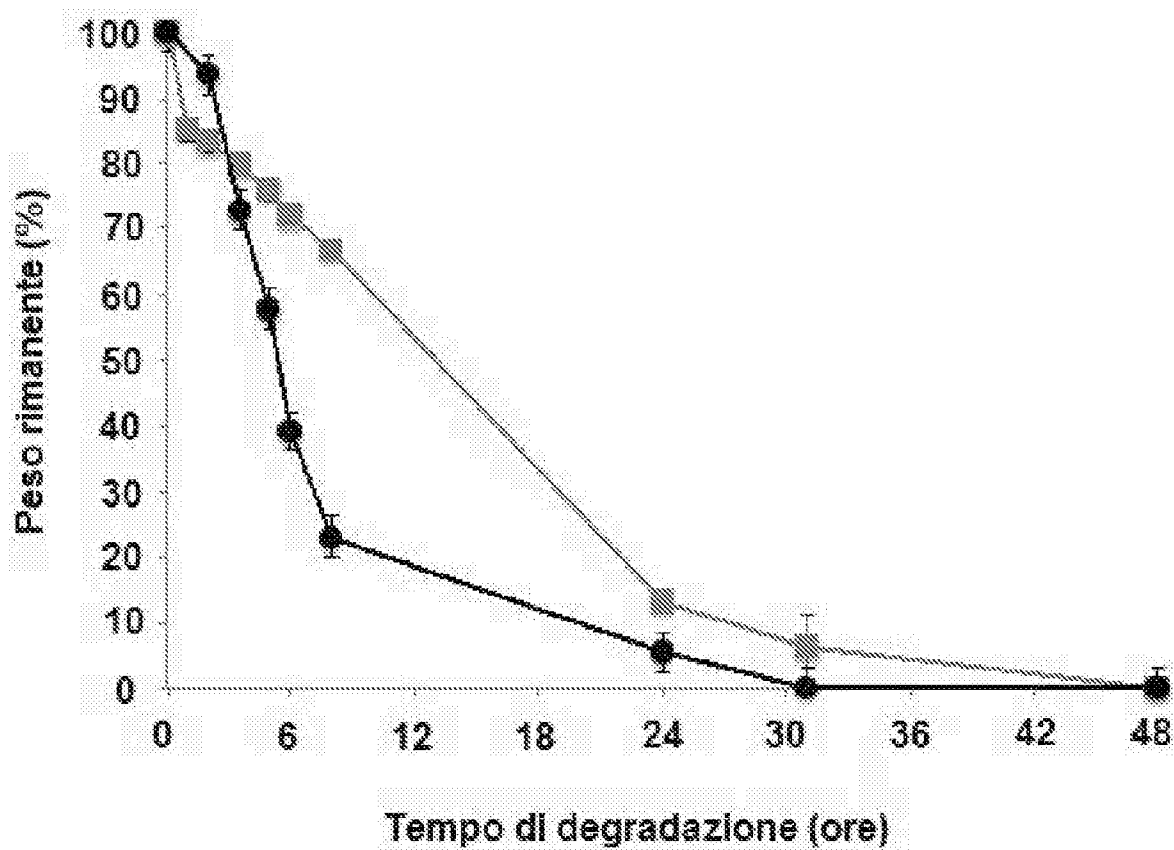


Figura 6

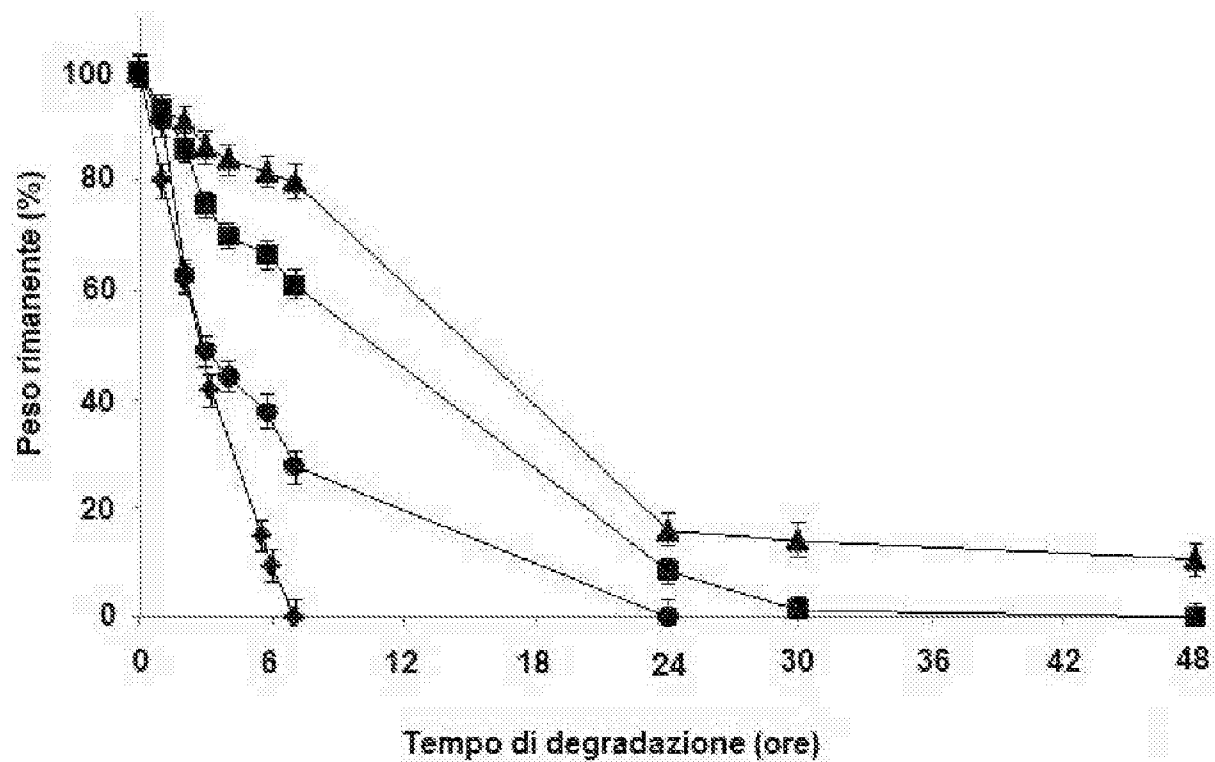


Figura 7