



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETA' INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101995900457998
Data Deposito	28/07/1995
Data Pubblicazione	28/01/1997

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	L		

Titolo

PROCEDIMENTO DI FUNZIONALIZZAZIONE SUPERFICIALE DI POLIESTERI- ALIFATICI BIOCOMPATIBILI E BIOASSORBIBILI E POLIESTERI COSI' ATTIVATI

"PROCEDIMENTO DI FUNZIONALIZZAZIONE SUPERFICIALE DI POLIESTERI ALIFATICI BIOCOMPATIBILI E BIOASSORBIBILI E POLIESTERI COSI' ATTIVATI"

A nome: SANITARIA SCALIGERA S.p.A. a Verona

Inventori designati: Gabriele Perego, Gian Domenico Cella,
Alessandro Zuccato.

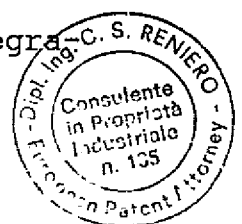


DESCRIZIONE

La presente invenzione si riferisce a copolimeri di acido lattico ed ϵ -caprolattone funzionalizzati superficialmente ed al procedimento per la loro preparazione.

In tempi recenti omo e copolimeri dell'acido lattico hanno ricevuto una crescente attenzione per le loro potenziali applicazioni, in parte già realizzate, nel settore biomedico. Tali applicazioni, che si avvantaggiano della biocompatibilità e biodegradabilità di questi materiali, comprendono tra l'altro la fabbricazione di impianti protesi, fili di sutura, microsfele per la veicolazione di principi attivi.

Un vantaggio rilevante di questi materiali è quello di eliminare la necessità di un reintervento, talvolta necessario per rimuovere l'impianto, grazie alla graduale biodegradazione.





dabilità che favorisce la rigenerazione dei tessuti preesistenti.

Questo vantaggio è stato sfruttato, ad esempio, nella preparazione di fili di sutura bioassorbibili impiegando omopolimeri e copolimeri dell'acido glicolico, commercialmente noti con le denominazioni DEXON (marchio della ditta Davis and Jeck) e VICRYL (marchio della ditta Ethicon). In tempi più recenti è iniziata la commercializzazione dei primi prodotti per il settore ortopedico, noti come BIOFIX (marchio della ditta Bioscience Oy) e come ORTHOSORB (marchio della ditta Johnson & Johnson).

Un settore di impiego di materiali bioassorbibili che riveste una grande potenzialità di impiego riguarda la preparazione di protesi vascolari. Gli impianti attualmente disponibili, realizzati spesso in DACRON (un materiale prodotto dalla Du Pont de Nemours) in quanto non bioassorbibili mancano di alcuni requisiti importanti, quali una completa assenza di trombogenicità della parete interna o di proprietà elastiche che rimangano inalterate nel tempo [New Polymeric Mater., 1 (2), 111-126 (1988)]. Queste limitazioni acquistano importanza soprattutto nel caso di protesi al di sotto di 6 mm di diametro, la qual cosa costringe spesso



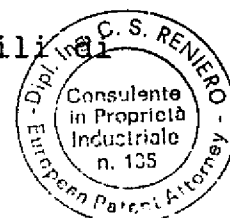


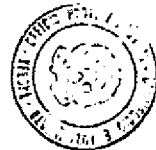
sede chirurgica ad innestare vene autologhe per riparare arterie a basso calibro, con tutti i problemi che ne derivano.

Lo sviluppo di una protesi vascolare biodegradabile, che promuova quindi la rigenerazione dei tessuti preesistenti, riveste un grande interesse ed è attualmente oggetto di molti studi [si veda, ad esempio, Colloid Polym. Sci. 264, 854-858 (1986)], ma risente anch'essa del problema della trombogenicità per i bassi calibri.

La formazione di trombi sulla parete interna della protesi avviene soprattutto durante il periodo iniziale dell'impianto, prima cioè che tale parete sia stata ricoperta da cellule endoteliali, per cui un materiale biocompatibile e bioassorbibile da utilizzare per la fabbricazione di una protesi vascolare trarrebbe un rilevante vantaggio da modifiche superficiali che siano atte ad accelerare il processo di endotelizzazione.

I copolimeri di acido (L-lattico) ed ϵ -caprolattone, sviluppati nel 1975 da Gulf Oil [si veda il brevetto US-4.057.537 (Sinclair)] sono dei materiali molto interessanti per vari impieghi biomedici, tra cui la realizzazione di guide nervose [Biomaterials 15 (3), 189-193 (1994), J. Mater. Sci., Mater. in Medicine 4, 521-525 (1993)], fili e

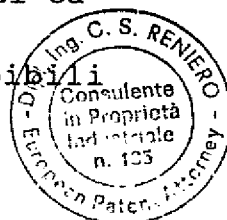




sutura e protesi vascolari bioassorbibili. L'interesse per questi materiali è legato, oltre che alla loro biocompatibilità e bioassorbibilità, anche alle ottime proprietà elastiche [Polymer Bulletin 25, 335-341 (1991)] che risultano stabili nel tempo soprattutto per i copolimeri con quantità circa equivalenti dei due comonomeri [Makromol. Chem. 194, 2463-2469 (1993)].

Questi materiali, d'altra parte, risentono per gli impieghi biomedici di una bassa idrofilicità che ne riduce la bagnabilità e quindi l'adesione da parte delle cellule dell'organismo, quali le cellule endoteliali. Per il poli(L-lattide-co- ϵ -caprolattone) 50/50 in peso, ad esempio, l'angolo di contatto misurato con acqua distillata in aria a 23°C è di 82°, quindi molto elevato.

Uno scopo della presente invenzione è quello di escogitare un procedimento mirato di modificazione superficiale di un materiale a base di uno o più dei copolimeri di acido lattico ed ϵ -caprolattone tale da comportare un sostanziale aumento della idrofilicità superficiale e, conseguentemente, un significativo abbassamento dell'angolo di contatto misurato con acqua a 23°C in aria. Ciò può favorire in molti casi l'adesione cellulare a protesi mediche bioassorbibili.





realizzate con questi materiali e così funzionalizzate superficialmente, come ad esempio in processi di endotelizzazione di protesi vascolari.

Un altro scopo della presente invenzione è che il detto trattamento mirato sia atto a ridurre l'autoadesività del detto materiale per conseguire notevoli vantaggi nella manipolazione e nell'impiego di film, protesi mediche e simili.

Secondo un primo aspetto della presente invenzione si fornisce un procedimento di attivazione o funzionalizzazione superficiale di poliesteri alifatici biocompatibili e bioassorbibili scelti dal gruppo formato da omo e copolimeri derivati da L-lattide, D-lattide, D,L-lattide racemo, meso D,L-lattide, ϵ -caprolattone, glicolide, δ -valerolattone, di preferenza copolimeri di L-lattide, D-lattide, D,L-lattide racemo, meso D,L-lattide con ϵ -caprolattone, il quale consiste nell'effettuare almeno uno dei seguenti trattamenti: idrolisi acida o basica, trattamento tramite plasma freddo, tramite reazioni chimiche o radiazioni elettromagnetiche.

Vantaggiosamente, il processo di idrolisi viene condotto in presenza di una soluzione acquosa di una base o di un acido per accelerare la reazione superficiale, in quanto





procedimenti di attivazione eccessivamente prolungati possono indurre una riduzione di peso molecolare e quindi di proprietà meccaniche del materiale.

Attualmente si preferisce l'impiego di una soluzione acquosa di una base che costituisce una condizione preferenziale in quanto ha mostrato una maggiore attività.

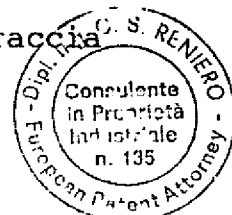
Basi idonee all'ottenimento di soluzioni acquose adatte allo scopo sono, ad esempio, gli alcali forti, quali NaOH, KOH, Na₂CO₃, LiOH, Ca(OH)₂ e le basi deboli, quali ad esempio NH₄OH e le ammine, quali la metilammina, l'etilammina, la dietilammina e la dimetilammina.

Acidi adatti al trattamento di idrolisi superficiale possono essere scelti, ad esempio, tra HCl, HClO₃, HClO₄, H₂SO₃, H₂SO₄, H₃PO₃, H₃PO₄, HI, HIO₃, HBr, acido lattico.

La funzionalizzazione superficiale mediante idrolisi può essere condotta a temperature preferibilmente comprese tra 0°C e la temperatura di rammollimento del materiale.

Nel caso del poli (L-lattide-co-ε-caprolattone) 50/50 risultano, ad esempio, idonee temperature comprese tra 10°C e 60°C, preferibilmente tra 30°C e 50°C.

Il trattamento di idrolisi superficiale viene fatto seguire da un lavaggio accurato per allontanare ogni traccia





di acido o base.

Si è riscontrato che tale trattamento idrolitico superficiale

- produce una rilevante modifica superficiale accompagnata da un abbassamento dell'angolo di contatto misurato con acqua a 23°C in aria, che nel caso del poli(L-lattide-co-ε-caprolattone) 50/50 in peso passa da 82° sino a 30°,

- modifica morfologicamente la superficie del materiale con la creazione di numerose porosità, anch'esse utili ai processi di colonizzazione cellulare, quale ad esempio il processo di endotelizzazione,

- riduce sostanzialmente l'autoadesività del materiale, la cui forza di distacco per scorrimento da 10 Kg/cm² iniziale passa a 0 Kg/cm² in seguito a sovrapposizione, con notevoli vantaggi nella manipolazione e nell'impiego di films, protesi mediche, ecc.,

- inaspettatamente, la viscosità inerente del copolimero durante il processo di funzionalizzazione non subisce variazioni apprezzabili, tali da ridurne le proprietà meccaniche.

Il procedimento secondo l'invenzione viene eseguito con omo e copolimeri dell'acido lattico, preferibilmente con i copolimeri di acido lattico ed ε-caprolattone.



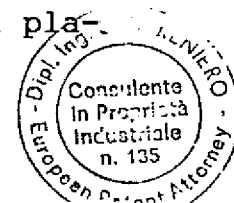


Questi copolimeri possono essere ottenuti, come è noto, mediante polimerizzazione per apertura di anello del dimero ciclico dell'acido lattico (L-lattide, nel caso di acido L-lattico) e di ϵ -caprolattone, a temperature generalmente comprese tra 100°C e 200°C ed in presenza di un catalizzatore adatto, quale ad esempio Sn ottanoato, SnCl₂, Al (iOPr)₃, ecc.

I copolimeri di acido lattico ed ϵ -caprolattone sono adatti a essere lavorati con le comuni metodologie impiegate per la termoformatura delle materie plastiche, quali, ad esempio, estrusori, presse per stampaggio ad iniezione, ecc. Sono inoltre solubili in vari solventi organici, tra cui, ad esempio, acetato di metile, acetato di etile, cloruro di metilene, cloroformio, ecc. per cui numerosi manufatti, ad esempio protesi canalicolari, possono essere ottenuti anche sfruttando questa solubilità, con i procedimenti noti, come per esempio per deposizione, spalmatura, ecc.

Il trattamento al plasma può essere eseguito sia in presenza di un gas reattivo, ad esempio l'aria, con la formazione di funzionalità superficiali di tipo ossigenato, quali -OH, -CHO, -COOH.

Il trattamento superficiale, sia idrolitico che al plasma,





sma, può essere mantenuto tal quale oppure può essere seguito da modifiche chimiche ulteriori. Così ad esempio, i gruppi $-COONa$ generati da un'idrolisi basica possono essere successivamente convertiti in gruppi $-COOH$ mediante trattamento con acidi minerali forti.

Inoltre, la liberazione superficiale di gruppi alcolici ad opera di un procedimento di idrolisi può essere seguita da reazione mediante aggiunta di un composto dotato di gruppo o gruppi funzionali in grado di reagire con gruppi alcolici superficiali, come per esempio mediante aggiunta di un'anidride, quale l'anidride succinica, con la conversione dei gruppi $-OH$ in $-O-CO-CH_2-CH_2-COOH$.

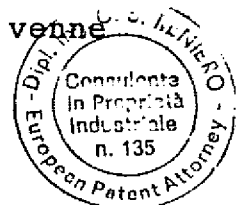
Secondo un altro aspetto della presente invenzione si forniscono impianti protesici realizzati con omo e copolimeri dell'acido lattico superficialmente funzionalizzati per l'ottenimento di materiali biocompatibili e biodegradabili.

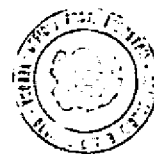
Il procedimento secondo l'invenzione è descritto più dettagliatamente qui di seguito con riferimento a specifici esempi di realizzazione pratica.

Esempio 1

Preparazione di poli (L-lattide-co-ε-caprolattone)

Si sintetizzò allo scopo L-lattide, il quale venne





ricristallizzato 3 volte da metilisobutilchetone anidro, essiccato sotto vuoto a 45°C per 24 ore e conservato sotto azoto. Si distillò a pressione ridotta poco prima dell'impiego e si conservò sotto azoto ϵ -caprolattone anidrificato su CaH_2 , fornito da Fluka. Si fece rifluire esano, fornito da Farmitalia Carlo Erba, su LiAlH_4 , si distillò e conservò sotto azoto.

In un pallone da 500 ml a due colli, preferibilmente silanizzato con $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}_2$ e posto sotto azoto, sono stati collocati 200 g di L-lattide, 200 g (186 ml) di ϵ -caprolattone ed un magnete agitatore. Il pallone fu quindi immerso in un bagno ad olio la cui temperatura venne gradatamente portata a 130°C omogeneizzando il sistema, non appena reso possibile dalla fusione del lattide, mediante agitazione elettromagnetica.

A parte era stata preparata una soluzione di 1,19 g. di Sn ottanoato in esano, sino ad un volume di 10 ml, dalla quale si prelevò un'aliquota di 2,13 ml, pari ad un contenuto di 0,254 g di Sn ottanoato (con funzione di catalizzatore), che fu unita alla miscela di monomeri. Circa 45 minuti dopo l'aggiunta del catalizzatore, la cui quantità corrispondeva ad un rapporto molare monomeri/catalizzatore





5000, l'agitazione elettromagnetica della miscela veniva resa inefficace dalla viscosità del sistema.

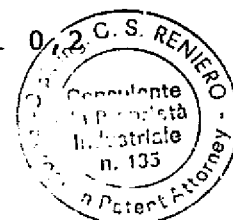
La reazione fu protratta per 24 ore, ottenendo così un materiale elastico, trasparente, avente una viscosità inerente misurata in cloroformio a 25°C di 3,80 dl/g ed un contenuto di monomeri residui del 2.3 %, come stimato tramite TGA (analisi termo-gravimetrica - isoterma a 150°C per 60 minuti).

Esempio 2

Preparazione di dischetti in poli (L-lattide-co-ε-caprolattone) 50/50.

E' stata impiegata una mascherina di acciaio di 10 x 10 cm collocata tra due fogli di Mylar, in cui sono stati posti 8 g di poli (L-lattide-co-ε-caprolattone) 50/50 in peso.

Si eseguì lo stampaggio con 3 minuti di preriscaldamento e 2 minuti di compressione a 50 Kg/cm² alla temperatura di 160°C. Si sono così preparati fogli in copolimero aventi 500 μm di spessore, da cui sono stati ricavati tramite fustellatura dischetti di 22 mm di diametro. Questi dischetti presentano un angolo di contatto con acqua, misurato a 23°C in aria, di 82°. La viscosità inerente del materiale, determinata in cloroformio a 25°C, ad una concentrazione di 0





g/dl, tramite viscosimetro a capillare di Ubbelohde, era di 3,04 dl/g.

La Figura 1a è una microfotografia ottenuta al microscopio elettronico a scansione (SEM) a 1500 ingrandimenti, che illustra la morfologia di superficie di un dischetto in poli (L-lattide-co- ϵ -caprolattone) non funzionalizzato preparato come sopra specificato.

Esempio 3

Funzionalizzazione mediante idrolisi basica a 40°C.

In un pallone da 100 ml sono stati posti 80 ml di soluzione acquosa di NaOH al 5% e si preparò un dischetto di poli (L-lattide-co- ϵ -caprolattone) 50/50, avente lo spessore di 500 μm ed il diametro di 22 mm, come descritto nell'Esempio 1. Il pallone venne immerso in un bagno ad acqua termostattizzato a 40°C, agitando lentamente il contenuto tramite un elettromagnete.

Queste condizioni sono state mantenute per 18 ore, poi si allontanò la soluzione alcalina e si effettuarono numerosi lavaggi con acqua distillata, protratti per 4 ore. I dischetti di materiale così funzionalizzato presentavano un angolo di contatto con acqua, misurato a 23°C in aria, di 30°. La viscosità inerente del materiale, determinata in





cloroformio a 25°C, ad una concentrazione di 0,2 g/dl risultò di 3,00 dl/g.

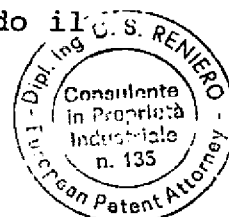
Esempio 4

Funzionalizzazione mediante idrolisi basica a 20°C.

In un pallone da 100 ml sono stati posti 80 ml di soluzione acquosa di NaOH al 5% e si preparò un dischetto di poli (L-lattide-co-ε-caprolattone) 50/50, avente lo spessore di 500 μm ed il diametro di 22 mm, come descritto nell'Esempio 1. Il pallone venne mantenuto alla temperatura di 20°C, agitando lentamente il contenuto tramite un elettromagnete. Queste condizioni furono mantenute per 18 ore, poi si allontanò la soluzione alcalina e si effettuarono numerosi lavaggi con acqua distillata, protratti per 4 ore.

I dischetti di materiale così funzionalizzato presentavano un angolo di contatto con acqua, misurato a 23°C in aria, di 48°. La viscosità inerente del materiale, determinata in cloroformio a 25°C, ad una concentrazione di 0,2 g/dl era di 3,02 dl/g.

La Figura 1b è una microfotografia SEM x 1500 che illustra la morfologia di superficie di un dischetto in poli (L-lattide-co-ε-caprolattone) preparato secondo l'Esempio 2 e funzionalizzato mediante idrolisi basica con NaOH secondo il





presente Esempio.

Esempio 5

Conversione dei gruppi superficiali -COONa in gruppi -COOH.

In un pallone da 100 ml si posero 80 ml di soluzione di HCl al 3% ed un dischetto di poli (L-lattide-co- ϵ -caprolattone) 50/50 funzionalizzato come descritto nell'Esempio 3. Il pallone fu mantenuto alla temperatura di 20°C, agitando lentamente il contenuto tramite un elettromagnete per 1 ora, poi si allontanò la soluzione acida e si effettuarono numerosi lavaggi con acqua distillata, protratti per 4 ore.

I dischetti di materiale così funzionalizzato presentavano un angolo di contatto con acqua, misurato a 23°C in aria, di 47°.

La Figura 1c è una microfotografia SEM x 1500 che illustra la morfologia di superficie di un dischetto in poli (L-lattide-co- ϵ -caprolattone) preparato secondo l'Esempio 2 e funzionalizzato mediante idrolisi basica con NaOH ed acida con HCl.

Esempio 6

Conversione dei gruppi superficiali -COONa in gruppi





-COOH.

In un pallone da 100 ml sono stati posti 80 ml di soluzione acquosa di HCl al 3% ed un dischetto di poli (L-lattide-co- ϵ -caprolattone) 50/50 funzionalizzato come descritto nell'Esempio 4. Il pallone venne immerso in un bagno ad acqua termostattizzato a 20°C, agitando lentamente il contenuto tramite un elettromagnete per 1 ora, poi si allontanò la soluzione acida e si effettuarono numerosi lavaggi con acqua distillata, protratti per 4 ore.

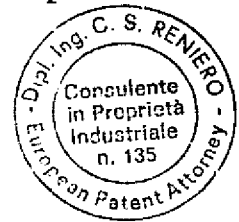
I dischetti di materiale così funzionalizzato presentavano un angolo di contatto con acqua, misurato a 23°C in aria, di 70°.

ESEMPIO 7

Funzionalizzazione mediante plasma freddo.

E' stato impiegato un reattore per trattamento al plasma Gambetti a piatti piani paralleli con accoppiamento capacitativo. La radiofrequenza a cui lavorava la macchina era di 13,6 MHz.

L'attivazione è stata eseguita su dischetti di poli (L-lattide-co- ϵ -caprolattone) 50/50, aventi spessore di 500 μ m e diametro di 22 mm, preparati come descritto nell'Esempio 1.



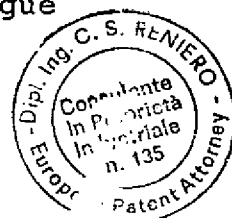


A questi dischetti sono stati applicati plasmi di aria, ossigeno ed argon, alla temperatura di 20°C, con potenze di 20 e 50 W, per tempi di 30 e 60 secondi. I dischetti di copolimero così funzionalizzati presentavano angoli di contatto di acqua distillata in aria compresi tra 31° e 55°, come riportato in Tabella 1 qui di seguito.

E' possibile osservare che la variazione dei tempi di trattamento, da 30 secondi ad un minuto, ha comportato un effetto rilevante solo nel caso dei plasmi a più bassa potenza (20 W), mentre con la potenza di 50 W l'attivazione superficiale con i plasmi utilizzati sembra raggiungere un livello limite già con 30 secondi di trattamento.

Nel caso dell'aria, il plasma con potenza di 50 W ha attivato la superficie del materiale in maggior misura (32°-31°) rispetto al plasma di 20 W (54,5°-47°). Nel caso dei plasmi ad ossigeno e ad argon non si sono invece osservate differenze significative tra le diverse potenze.

Tra le condizioni sperimentali adottate, quindi, un plasma ad aria con potenza di 50 W è quello che ha fornito l'attivazione maggiore. Ciò è spiegabile in base al fatto che la parte inerte dell'aria, in particolare l'azoto, genera numerosi radicali in superficie al materiale, a cui segue





la reazione con molecole di ossigeno e la formazione di gruppi funzionali di tipo ossigenato, quali -OH, -CHO, -COOH.

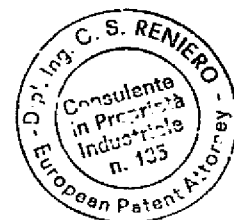




TABELLA 1

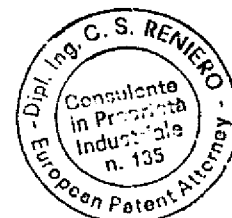
Funzionalizzazione superficiale con plasma freddo di dischetti in poli (L-lattide-co- ϵ -caprolattone) 50/50.

CAMPIONE	GAS PLASMA	POTENZA(W)	TEMPO(SEC.)	ANGOLO DI CONT.(
1	aria	20	30	54,5
2	aria	20	60	47
3	aria	50	30	32
4	aria	50	60	31
5	ossigeno	20	30	52
6	ossigeno	20	60	44,5
7	ossigeno	50	30	47
8	ossigeno	50	60	55
9	argon	20	30	55
10	argon	20	60	46
11	argon	50	30	47
12	argon	50	60	47

Esempio 8

Misure di autoadesione del materiale

Si è proceduto come negli Esempi da 3 a 7 ed il copoli-





mero è stato successivamente stampato a compressione utilizzando una mascherina di acciaio di 5x5 cm, avente lo spessore di 1 mm, collocata tra due fogli di Mylar, in cui sono stati posti 3 g di poli (L-lattide-co-ε-caprolattone) 50/50 in peso.

Lo stampaggio fu eseguito con 3 minuti di preriscaldamento e 2 minuti di compressione a 50 Kg/cm² alla temperatura di 160°C. Sono stati così preparati fogli di copolimero aventi 1 mm di spessore, da cui sono state fustellate strisce di 50x10x1 mm.

I provini per la misura di autoadesione sono stati ricavati sovrapponendo per 10 mm le estremità di due strisce di copolimero. La misura della forza di distacco è stata effettuata subito dopo lo stampaggio impiegando un dinamometro Instron. mod. 4501 alla temperatura di 23°C e con il 50% di umidità relativa. La determinazione, effettuata alla velocità di 200 mm/min., ha fornito la forza necessaria al distacco per scorrimento delle due superfici, pari a 10 Kg/cm² per il copolimero non modificato.

Le strisce di poli (L-lattide-co-ε-caprolattone) funzionalizzate superficialmente non hanno dato luogo ad alcuna adesione nelle condizioni sopra riportate.





La Figura 2 è una microfotografia SEM X 100 che illustra la morfologia di superficie di un dischetto in poli (L-lattide-co- ϵ -caprolattone) non funzionalizzato e seminato con cellule endoteliali da microcircolo di tessuto adiposo umano: 4 giorni di coltura.

Si noterà la presenza di poche cellule a prevalente forma rotondeggiante (alcune delle quali sono indicate con frecce).

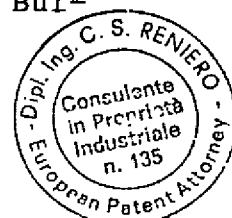
Esempio 9

Coltura cellulare su dischetti non funzionalizzati.

Dischetti in poli (L-lattide-co- ϵ -caprolattone) di 22 mm di diametro e spessore di 500 μm sono stati sottoposti a sterilizzazione con ossido di etilene e mantenuti in contenitori sterili fino al momento della semina cellulare.

A questo scopo sono state utilizzate cellule endoteliali umane isolate dal microcircolo di tessuto adiposo umano, rimosso dalla parete addominale di pazienti sottoposti ad intervento chirurgico per aneurisma addominale.

Quantità variabili (10-20 g) di tessuto adiposo sono state sminuzzate utilizzando piccole forbici e trasferite in una beuta di Erlenmayer contenente Collagenase Type 1 0,2% (SIGMA - St. Louis, Missouri - USA) in PBS (Phosphate Buf-



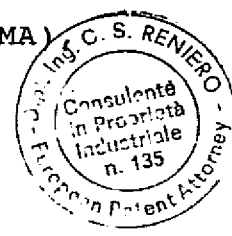


fer Saline pH 7,4).

Dopo un'incubazione di 30 minuti a 37°C in costante agitazione, sono stati eliminati gli adipociti flottanti e la sospensione cellulare residua è stata centrifugata per 10 minuti a 200xg.

Il pellet risultante è stato risospeso in PBS (Phosphate Buffer Saline pH 7,4) contenente 0,1% di BSA (Bovine Serum Albumin fraction V IgG free, Low endotoxin) (SIGMA) e la sospensione cellulare ottenuta è stata sottoposta a filtrazione attraverso un filtro di nylon con porosità di circa 200 μ m. Dopo un ulteriore lavaggio e centrifugazione il pellet è stato risospeso in 2 ml di PBS/BSA e stratificato delicatamente su 8 ml di Percoll 45% (marchio DELLA DITTA sigma) in PBS (280 mOsm) e centrifugato a 1500xg per 20 minuti.

Le cellule endoteliali microvascolari sono state recuperate in uno strato lattiginoso sulla superficie del Percoll (SIGMA). Dopo lavaggi addizionali, le cellule microvascolari sono state risospese in Medium 199 25 MM HEPES (GIBCO BRL, Paisley, Scozia) contenente il 20% di FCS (Foetal Calf Serum) (GIBCO BRL), 50 μ g/ml di ECGF (Endotelial Cell Growth Factor) (SIGMA), 100 U/ml di eparina (SIGMA)



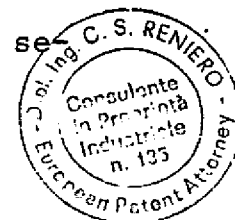


100 U/ml di penicillina (GIBCO BRL) e 100 µg/ml di streptomicina (GIBCO BRL) e sottoposte a conta in un emocitometro e a test di esclusione del Trypan Blue Stain (Flow Laboratories, Irvine, Scozia) per la valutazione della vitalità cellulare.

Tutte le operazioni descritte sono state eseguite in condizioni di assoluta sterilità sotto una cappa a flusso laminare, e utilizzando vetreria e materiale plastico monouso sterile. I dischetti in poli (L-lattide-co-ε-caprolattone) sono stati trasferiti, dopo ripetuti lavaggi in PBS (Phosphate Buffer Saline pH 7,4) sterile, in pozzetti di misura adeguata di piastre da coltura in polistirene sterile (Cell Wells 12 well plate, well diameter 22 mm - CORNING, New York, USA). Su ogni dischetto, adagiato sul fondo del pozzetto, sono state seminate da 1 a 2 x 10 cellule su cm² in circa 3 ml di Medium 199 (SIGMA) completo.

La coltura è stata protratta per 4-6 giorni in incubatore a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂ .

I dischetti furono tenuti in coltura 4 giorni e quindi fissati in glutaraldeide 2,5% (BAKER, Deventer, Olanda) in tampone cacodilato (CARLO ERBA, Milano) e tetrossido di osmio 1% (BAKER) nello stesso tampone, disidratati in una se-





rie crescente di etanolo (Carlo Erba) ed essiccati all'aria. Gli stessi sono stati sottoposti ad analisi mediante un microscopio elettronico a scansione.

Sui dischetti di copolimero dell'acido lattico non funzionalizzato erano reperibili solo rare cellule, non valutabili numericamente, e con prevalenza di forme rotonde (indice di scarsa aderenza al substrato).

Esempio 10

Coltura cellulare su dischetti funzionalizzati con NaOH.

L'isolamento delle cellule endoteliali e la coltura cellulare sono state eseguite con le modalità descritte nell'Esempio 9.

L'analisi al SEM dei dischetti di copolimero dell'acido lattico sottoposto ad idrolisi basica, ha permesso di constatare l'adesione di un certo numero di cellule endoteliali, non esattamente quantificabili, che, tuttavia, presentavano aspetti di migliore adesione al substrato (cellule appiattite).

La Figura 3 è una microfotografia SEM X 100 che illustra la morfologia di superficie di un dischetto in poli (L-lattide-co- ϵ -caprolattone) funzionalizzato con NaOH e seminato con cellule endoteliali da microcircolo di tessuto a-





diposo umano: 4 giorni di coltura.

La microfotografia mette in evidenza come siano presenti cellule con morfologia appiattita (indicate con frecce sulla Figura 3).

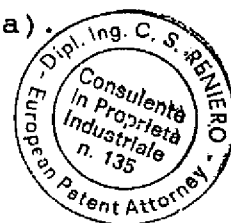
Esempio 11

Coltura cellulare su dischetti funzionalizzati con NaOH/HCl.

L'isolamento delle cellule endoteliali e la coltura cellulare sono state eseguite con le modalità descritte nell'Esempio 9. L'analisi al SEM dei dischetti sottoposti ad idrolisi basica ed ulteriormente funzionalizzati con HCl, ha permesso di evidenziare un numero rilevante di cellule endoteliali (approssimativamente $8 \times 10^3/\text{cm}^2$) con morfologia appiattita ed allungata, dimostrazione di una tenace adesione al substrato.

La Figura 4 è una microfotografia SEM X 100 che illustra la morfologia di superficie di un dischetto in poli (L-lattide-co-ε-caprolattone) funzionalizzato con NaOH ed HCl e seminato con cellule endoteliali da microcircolo di tessuto adiposo umano: 4 giorni di coltura.

Si osserverà come siano presenti numerose cellule con morfologia appiattita (indicate con frecce sulla Figura).





I risultati della funzionalizzazione superficiale di dischetti in p(LLA-CL) 50/50 sono riportati nella seguente Tabella 2.

TABELLA 2

Campione	reattivo basico	reattivo acido	temperat. di tratt.(°C)	angolo contatto(°)	viscos. iner. (dl/g)
I	-	-	-	82	3,04
II	NaOH 5 %	-	40	30	3,00
III	NaOH 5 %	HCl 3%	20	47	-
IV	NaOH 5 %	-	20	48	3,02
V	NaOH 5 %	HCl 3%	20	70	-

ESEMPIO 12

Coltura cellulare su dischetti funzionalizzati al plasma: aria, 50 W, 1'

L'isolamento delle cellule endoteliali e la coltura cellulare sono state eseguite con le modalità descritte nell'Esempio 6.

L'analisi al SEM dei dischetti di copolimero dell'acido lattico sottoposti a funzionalizzazione mediante aria a 50 W per 1', ha permesso di evidenziare un monostrato semi-con-





fluente di cellule con morfologia prevalentemente allungata. Le cellule appaiono particolarmente appiattite, caratteristica che permette di apprezzare, in trasparenza, sia gli organuli citoplasmatici che il nucleo e talora anche il nucleolo - vedere riproduzione fotografica di Fig.5.

ESEMPIO 13

Coltura cellulare su dischetti funzionalizzati al plasma: O2, 50 W, 30"

L'isolamento delle cellule endoteliali e la coltura cellulare sono state eseguite con le modalità descritte nell'Esempio 6.

L'analisi al SEM dei dischetti di copolimero dell'acido lattico sottoposti a funzionalizzazione mediante ossigeno a 50 W per 30", ha permesso di evidenziare un monostrato semi-confluente di cellule con morfologia prevalentemente allungata ed appiattita. In alcune zone le cellule appaiono più rade e lasciano scoperte aree relativamente estese di polimero - vedere riproduzione fotografica di Fig.6.

ESEMPIO 14

Coltura cellulare su dischetti funzionalizzati al plasma: Ar, 50 W, 1'

L'isolamento delle cellule endoteliali e la coltura

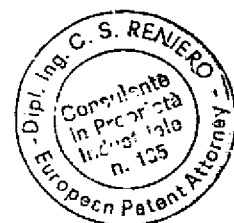




cellulare sono state eseguite con le modalità descritte nell'Esempio 6.

L'analisi al SEM dei dischetti di copolimero dell'acido lattico sottoposti a funzionalizzazione con argon a 50 W per l', ha permesso di evidenziare un monostrato semi-confluente di cellule con morfologia allungata e particolarmente appiattita - vedere riproduzione fotografica di Figura 7. Quest'ultima caratteristica rappresenta verosimilmente l'equivalente morfologico di una più tenace adesione cellulare al substrato non funzionalizzato.

L'invenzione come sopra esemplificata è suscettibile di numerose modifiche e varianti entro l'ambito protettivo definito dal tenore delle rivendicazioni.





RIVENDICAZIONI

1. Procedimento di attivazione o funzionalizzazione superficiale di manufatti per impiego biomedico a base di poliesteri alifatici biocompatibili e bioassorbibili scelti dal gruppo formato da omo e copolimeri derivati da L-lattide, D-lattide, D,L-lattide racemo, meso D,L-lattide, ϵ -caprolattone, glicolide, δ -valerolattone, di preferenza copolimeri di L-lattide, D-lattide, D,L-lattide racemo, meso D,L-lattide con ϵ -caprolattone, il quale consiste nell'effettuare almeno uno dei seguenti trattamenti: idrolisi acida o basica, trattamento tramite plasma freddo, o tramite reazioni chimiche o con radiazioni elettromagnetiche.
2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che la funzionalizzazione superficiale mediante idrolisi può essere condotta a temperature preferibilmente comprese tra 0°C e la temperatura di rammollimento del materiale.
3. Procedimento secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che detti poliesteri alifatici comprendono poli (L-lattide-co- ϵ -caprolattone) 50/50 e l'idrolisi viene condotta a temperature comprese tra 5°C ed 80°C, preferibilmente tra 30°C e 50°C.





4. Procedimento secondo una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 3, caratterizzato dal fatto che detto trattamento di idrolisi viene condotto in presenza di una soluzione acquosa di una base.
5. Procedimento secondo la rivendicazione 4, caratterizzato dal fatto che detta base è un alcali forte.
6. Procedimento secondo la rivendicazione 5, caratterizzato dal fatto che detto alcali forte è scelto nel gruppo formato da NaOH, KOH, Na₂CO₃, LiOH, Ca(OH)₂.
7. Procedimento secondo la rivendicazione 4, caratterizzato dal fatto che detta base è una base debole.
8. Procedimento secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto che detta base debole è NH₄OH.
9. Procedimento secondo la rivendicazione 7 od 8, caratterizzato dal fatto che detta base debole comprende almeno un'ammina.
10. Procedimento secondo la rivendicazione 9, caratterizzato dal fatto che detta ammina comprende almeno un'ammina scelta dal gruppo formato da metilammina, etilammina, dietilammina e dimetilammina.
11. Procedimento secondo una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 3, caratterizzato dal fatto che detto trattamento





di idrolisi viene condotto in presenza di una soluzione acquosa di un acido.

12. Procedimento secondo la rivendicazione 11, caratterizzato dal fatto che detto acido è scelto dal gruppo formato da HCl, HClO₃, HClO₄, H₂SO₃, H₂SO₄, H₃PO₃, H₃PO₄, HI, HIO₃, HBr, acido lattico.

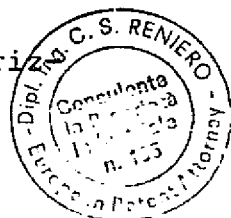
13. Procedimento secondo una qualunque delle rivendicazioni da 2 a 12, caratterizzato dal fatto che l'idrolisi superficiale viene fatta seguire da lavaggio per allontanare ogni traccia di acido o base.

14. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detto trattamento al plasma è eseguito in presenza di un gas reattivo con la formazione di funzionalità superficiali di tipo ossigenato.

15. Procedimento secondo la rivendicazione 10, caratterizzato dal fatto che detto gas reattivo è aria e dette funzionalità superficiali di tipo ossigenato sono -OH, -CHO, -COOH e simili.

16. Procedimento secondo la rivendicazione 14, caratterizzato dal fatto che detto trattamento al plasma viene eseguito in presenza di argon.

17. Procedimento secondo la rivendicazione 14, caratteri





zato dal fatto che detto trattamento al plasma viene eseguito con ossigeno.

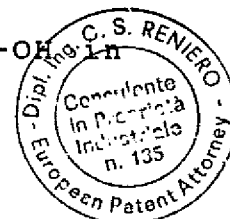
18. Procedimento secondo la rivendicazione 17, caratterizzato dal fatto che detto trattamento al plasma viene eseguito con aria.

19. Procedimento secondo una qualunque delle rivendicazioni da 2 a 18, caratterizzato dal fatto che l'idrolisi od il trattamento al plasma è seguito da una fase di induzione di ulteriori modifiche chimiche.

20. Procedimento secondo la rivendicazione 19, caratterizzato dal fatto che gruppi $-COONa$ generati da un'idrolisi basica sono convertiti in gruppi $-COOH$ mediante trattamento con acidi minerali forti.

21. Procedimento secondo la rivendicazione 19, caratterizzato dal fatto che la liberazione superficiale di gruppi alcolici ad opera di un procedimento di idrolisi è seguita da reazione chimica mediante aggiunta di un composto dotato di gruppo o gruppi funzionali in grado di reagire con gruppi alcolici superficiali.

22. Procedimento secondo la rivendicazione 21, caratterizzato dal fatto che detto composto comprende l'anidride succinica, che provoca la conversione dei gruppi $-OH$ in





-O-CO-CH₂-CH₂-COOH.

23. Procedimento di funzionalizzazione superficiale di poliesteri alifatici biocompatibili e bioassorbibili sostanzialmente come sopra descritto con riferimento agli Esempi riportati.

24. Manufatto ad uso biomedico a base di poliestere alifatico biocompatibile e bioassorbibile superficialmente funzionalizzabile scelto dal gruppo formato da omo e copolimeri derivati da L-lattide, D-lattide, D,L-lattide racemo, meso D,L-lattide, ϵ -caprolattone, glicolide, δ -valerolattone, di preferenza copolimeri di L-lattide, D-lattide, D,L-lattide racemo, meso D,L-lattide con ϵ -caprolattone per l'ottenimento di protesi.

25. Manufatto ad uso biomedico secondo la rivendicazione 24, caratterizzato dal fatto che detto poliestere alifatico comprende omo e copolimeri dell'acido lattico.

26. Manufatto ad uso biomedico secondo la rivendicazione 24, caratterizzato dal fatto che detto poliestere alifatico comprende copolimeri di L-lattide, D-lattide, D,L-lattide con ϵ -caprolattone funzionalizzati superficialmente con gruppi COONa, -COOH, OH.



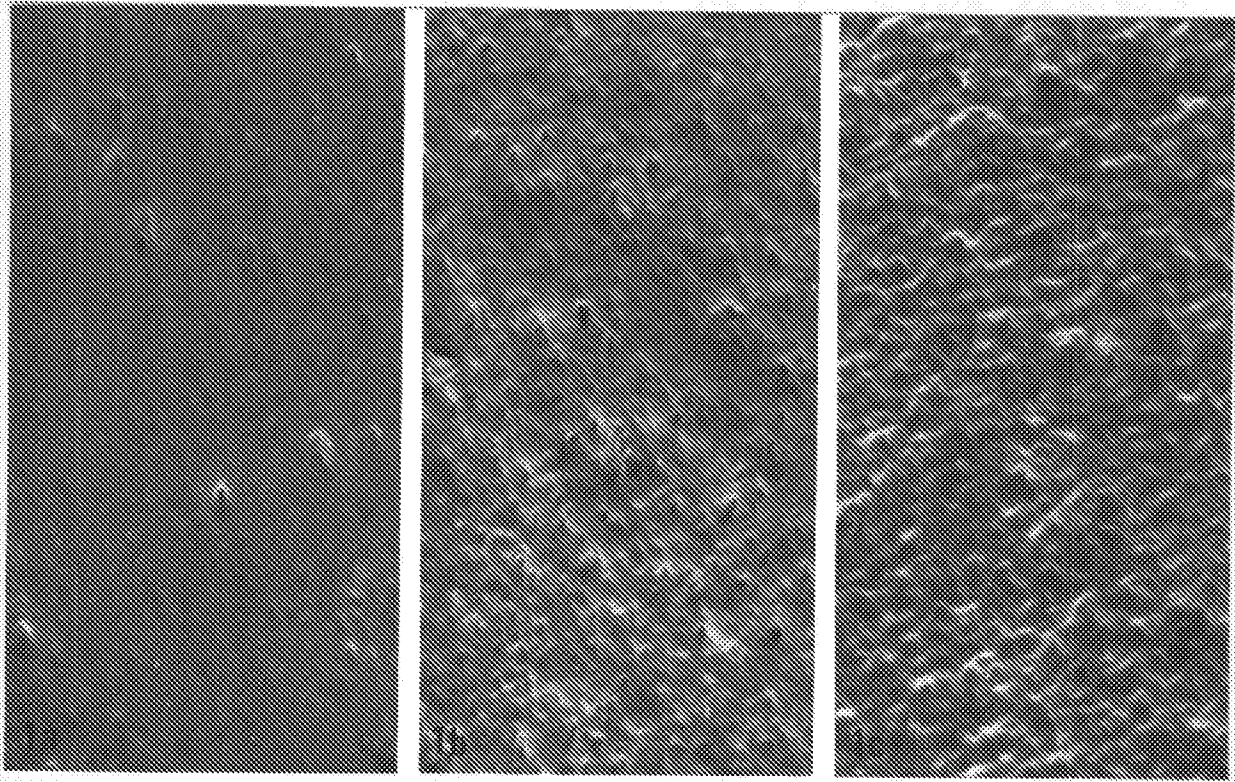


FIG. 1A

FIG. 1B

FIG. 1C

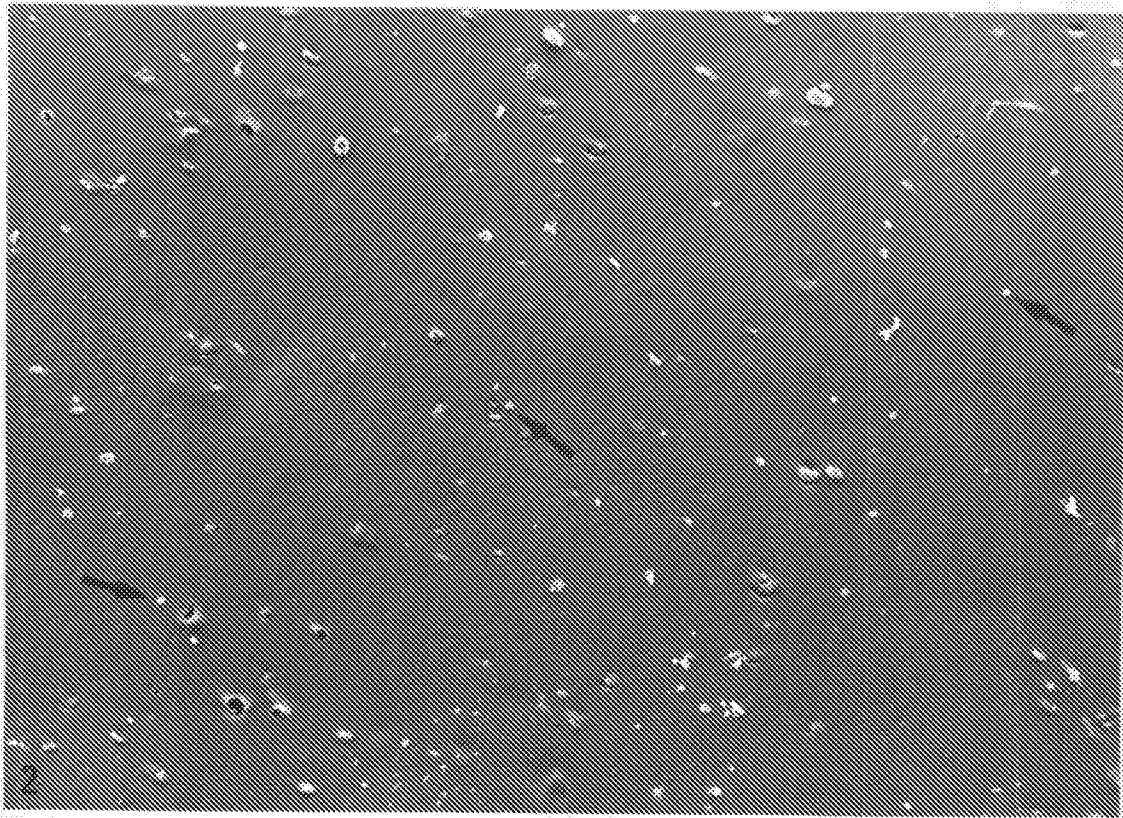


FIG. 2

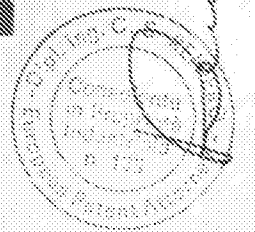
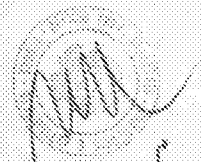


Fig. 3

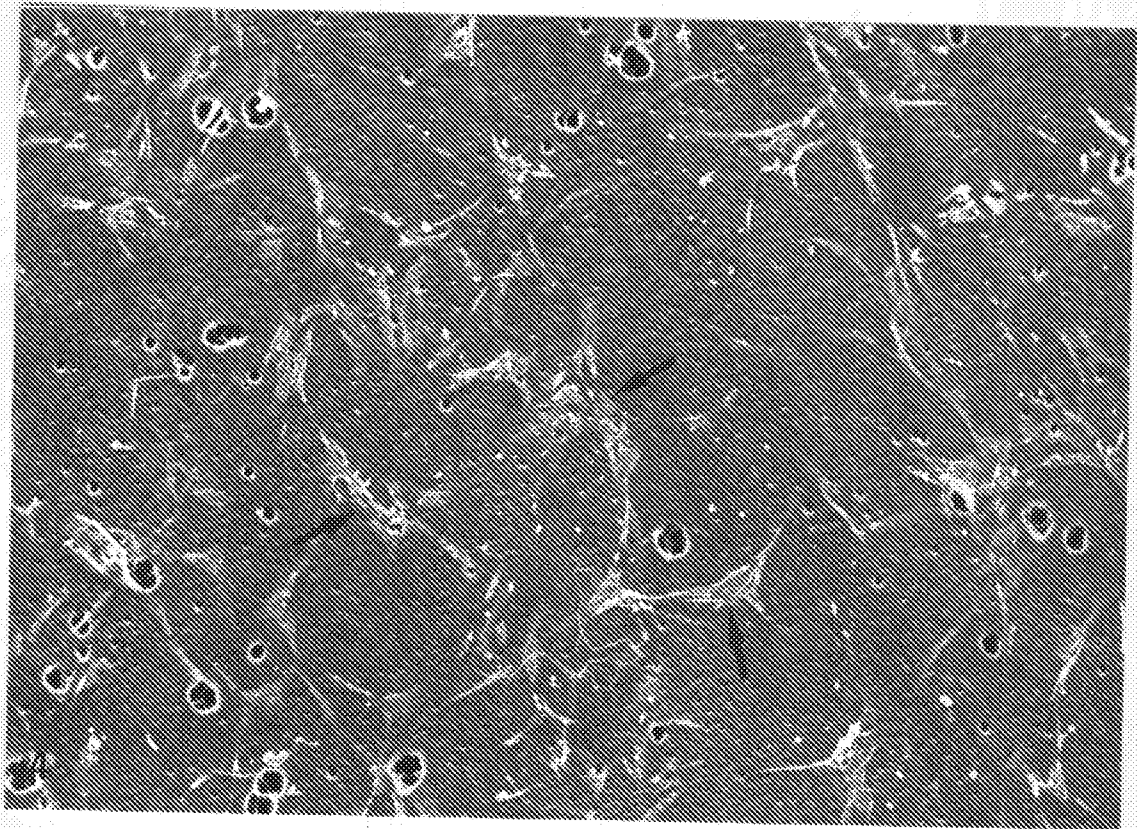
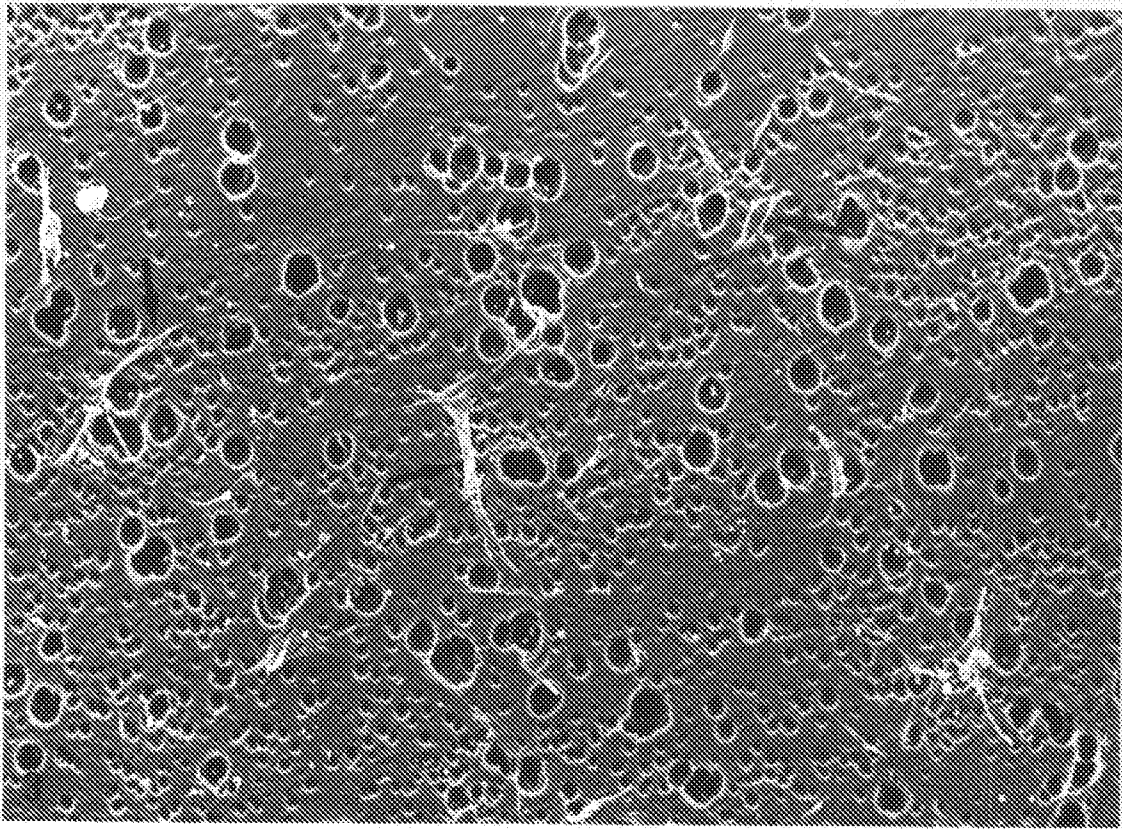


Fig. 4

Handwritten signature: *M. L. ...*

Stamp: *COMMISSION FOR THE PROTECTION OF THE INTERESTS OF THE CONSUMER*

VR95ADD 00 68

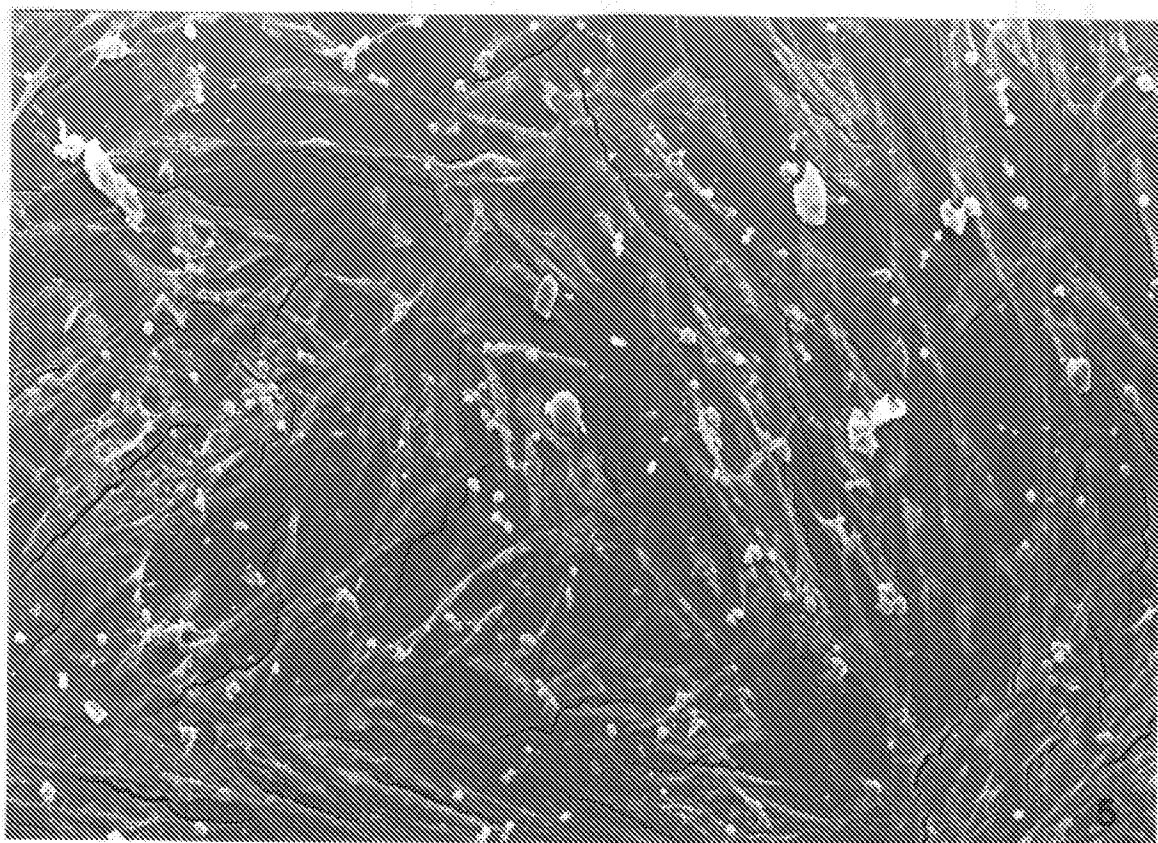


Fig. 5

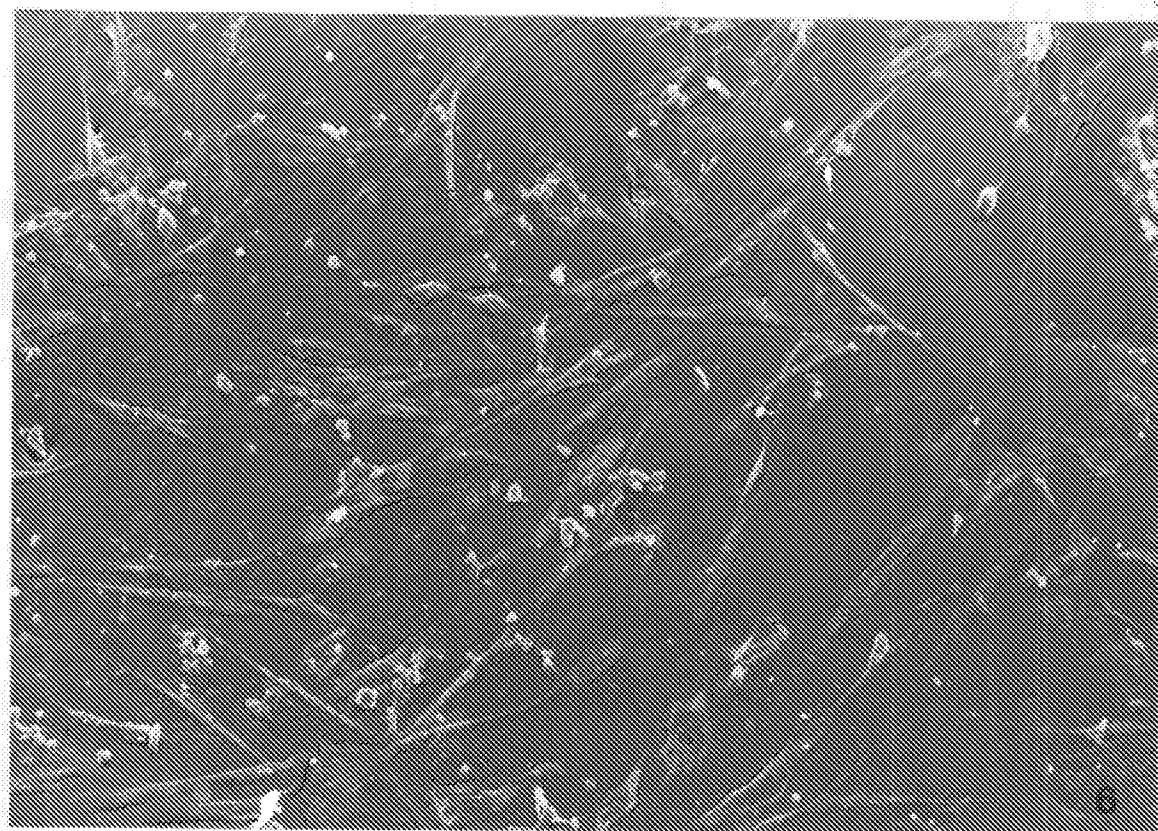
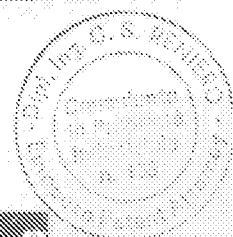
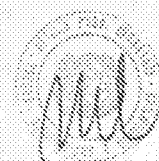


Fig. 6



Carroll

