



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

DOMANDA NUMERO	101999900750555
Data Deposito	08/04/1999
Data Pubblicazione	08/10/2000

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	08	B		

Titolo

STRUTTURE TRIDIMENSIONALI COMPREDENTI DERIVATI DELL'ACIDO IALURONICO  
OTTENIBILI MEDIANTE LA TECNICA ANTISOLVENTE SUPERCRITICO.

Descrizione di una domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo  
"Strutture tridimensionali comprendenti derivati dell'acido ialuronico ottenibili  
mediante la tecnica antisolvente supercritico", della Fidia Advanced  
Biopolymers S.r.l. con sede in Via De' Carpenteri 3, 72100 - Brindisi, Italia,  
nella persona del suo Presidente, Dott. Emilio Mauri.

Inventori: Paolo PALLADO

Marco BAGGIO

Maurizio DALLE CARBONARE

Lanfranco CALLEGARO

Depositata il ..... con N. ....

**PD 99 A 0 0 0 0 7 1**

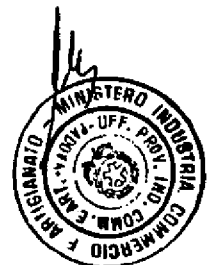
\*\*\*\* \*

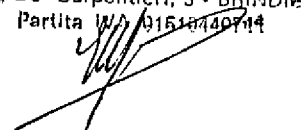
### OGGETTO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione descrive strutture tridimensionali biocompatibili e biodegradabili comprendenti i derivati dell'acido ialuronico ottenibili mediante la tecnica della precipitazione indotta mediante antisolvente supercritico (SAS : Supercritical Anti Solvent) e il loro uso in campo medico e chirurgico.

### CAMPO DELL'INVENZIONE

L'acido ialuronico è un etero polisaccaride composto da residui alternati di acido D-glucuronico e N-acetil-D-glicosammina. E' un polimero a catena lineare con peso molecolare che può variare tra 50.000 e 13.000.0000 Da a seconda della fonte dalla quale viene ottenuto e dai metodi di preparazione e di determinazione impiegati. E' presente in natura nei gel pericellulari, nella sostanza fondamentale del tessuto connettivo degli organismi vertebrati dei





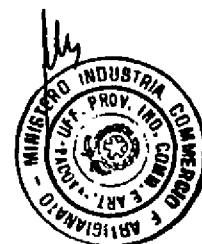
quali rappresenta uno dei componenti principali, nel fluido sinoviale delle giunture, nell'umor vitreo, nei tessuti del cordone ombelicale umano e nelle creste di gallo.

L'acido ialuronico esplica un ruolo vitale in molti processi biologici come, ad esempio, l'idratazione dei tessuti, l'organizzazione dei proteoglicani, la differenziazione cellulare, la proliferazione e l'angiogenesi (J. Aigner et al., L. Biomed. Mater. Res., 1998, 42, 172-181).

E' noto che frazioni di acido ialuronico possono essere utilizzate per facilitare la riparazione dei tessuti, come sostituenti del liquido endobulbare, o somministrate per via intra-articolare nelle patologie delle giunzioni, come descritto nei brevetti europei No. 0138572 e No. 0535200.

L'acido ialuronico ha un ruolo fondamentale nel processo di riparazione dei tessuti, soprattutto nei primi stadi della granulazione, stabilizzando la matrice di coagulazione e controllando la sua degradazione, favorendo il reclutamento di cellule infiammatorie come, ad esempio, leucociti polimorfonucleati e monociti, di cellule mesenchimali come, ad esempio, fibroblasti e cellule endoteliali ed, infine, orientando la successiva migrazione delle cellule epiteliali.

E' noto che l'applicazione di soluzioni di acido ialuronico può accelerare la guarigione di pazienti affetti da piaghe, ferite ed ustioni. Il ruolo dell'acido ialuronico nelle varie fasi del processo riparativo dei tessuti è stato descritto, attraverso la costruzione di un modello teorico, da Weigel P. H. et al.: "A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the early events during the





inflammatory response and wound healing", *J. Theor. Biol.*, 119: 219, 1986.

E' noto altresì l'utilizzo di frazioni di acido ialuronico a basso peso molecolare per la preparazione di composizioni farmaceutiche aventi proprietà osteoinduttiva (US N. 5,646,129).

I derivati dell'acido ialuronico mantengono tutte le proprietà del suddetto glicosamminoglicano con il vantaggio di poter essere processati in forme diverse e di poter variare la loro solubilità e i tempi di degradazione in base al tipo e alla percentuale di derivatizzazione (EP 0216453 B1).

Inoltre, i derivati dell'acido ialuronico possono vantare anche nuove proprietà dovute all'inserimento di specifiche molecole nella struttura dell'acido ialuronico. Ad esempio, i derivati solfatati dell'acido ialuronico mostrano proprietà anticoagulanti e sono resistenti alla ialuronidasi (WO 95/25751).

Sono noti, inoltre, gli esteri totali o parziali dell'acido ialuronico e i derivati autoreticolati dell'acido ialuronico, il loro uso in campo farmaceutico, cosmetico e nelle aree dei materiali biodegradabili (brevetti US N. 4,851,521; 4,965,353; 5,676,964).

Come detto sopra, i derivati dell'acido ialuronico possono essere processati in forme diverse, quali ad esempio, film, fili, spugne, microsfere e nanosfere.

I processi noti per ottenere le suddette forme prevedono l'utilizzo di solventi la cui rimozione totale dal prodotto finale, essenziale per i materiali da utilizzare in campo farmaceutico, risulta difficile da raggiungere e richiede numerosi lavaggi.

Come descritto, infatti, nel brevetto EP 0216453 B1 della Richiedente, il



derivato dell'acido ialuronico viene disciolto in un solvente quale, ad esempio, il dimetilsolfossido e la soluzione ottenuta viene distribuita uniformemente su un foglio di vetro o fatta passare attraverso una filiera per ottenere rispettivamente un film o dei fili. Questi ultimi vengono successivamente immersi in un antisolvente, quale, ad esempio, l'etanolo in modo tale da allontanare il dimetilsolfossido e lavati ripetutamente con l'antisolvente utilizzato.

Il processo per la preparazione delle spugne, invece, prevede l'aggiunta nella soluzione del derivato dell'acido ialuronico di una miscela costituita da sali quali, ad esempio, cloruro di sodio con opportuna granulometria, e di una coppia di composti quali, ad esempio, bicarbonato di sodio e acido citrico, in grado di liberare gas come, ad esempio, l'anidride carbonica, quando vengono in contatto con il solvente per il derivato dell'acido ialuronico.

La pasta che si ottiene viene fatta passare attraverso dei rulli in modo tale da ottenere uno strato avente un certo spessore ed, infine, quest'ultimo viene immerso e ripetutamente lavato con un opportuno antisolvente quale, ad esempio, l'acqua.

Ricorrendo ad una tecnologia innovativa, che definiamo per ragioni storiche supercritica, è possibile limitare l'impiego di solventi organici, contenere le fasi richieste dal processo per il raggiungimento del prodotto finito o semilavorato, e abbassare il contenuto di solvente organico residuo a livelli molto bassi.

Nell'ambito delle tecnologie supercritiche, è noto che l'effetto antisolvente per





ottenere la segregazione di un soluto in seno ad una soluzione può essere innescato mediante l'insufflazione di un antisolvente che, in condizioni normali, si presenta allo stato gassoso o di vapore ma non liquido.

Il processo, denominato SAS, prevede la compressione dell'antisolvente in seno alla soluzione liquida, la quale si espande per effetto di solubilizzazione dell'antisolvente in fase liquida. La tecnica SAS è stata sviluppata secondo diverse metodologie, tra cui distinguiamo per importanza il processo discontinuo, o batch, e quello continuo.

#### SAS discontinua

La tecnica SAS discontinua consiste nel porre a contatto una soluzione contenente il soluto che si vuole precipitare con l'antisolvente compresso, liquido, vapore o gas. Per fare questo la soluzione viene caricata in un recipiente resistente a pressione ed il gas viene inviato in pressione nello stesso, fino a provocare la separazione del soluto dalla fase liquida. Lo stesso fluido antisolvente viene poi utilizzato in flusso per eliminare il solvente ed ottenere il precipitato puro.

I primi tentativi di applicazione del processo SAS discontinuo di cui si ha notizia nella letteratura aperta furono condotti da Gallagher P.M. et al. (Johnston K.P., Penninger J.M.L., Supercritical fluids science and technology, ACS Symp. Ser. 406, Chap. 22, 1989) per la cristallizzazione di sostanze esplosive, quali la nitroguanidina per i quali la frantumazione non era chiaramente applicabile e la cristallizzazione portava all'inglobamento di elevate quantità di solvente. In questa prima applicazione già si osservò che la





tecnica consentiva di ottenere polveri più fini rispetto ai metodi tradizionali, con una distribuzione granulometrica piuttosto ristretta. Gli antisolventi usati furono anidride carbonica e clorofluorocarburi.

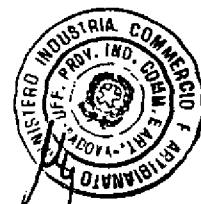
Benedetti et al. (Biotech. Bioeng., 53, 232-237, 1997) condussero una ricerca sull'applicazione della tecnica SAS continua e discontinua su polisaccaridi, in particolare HYAFF-11, e riuscirono ad ottenere con ottima riproducibilità particelle sferiche di dimensioni submicroniche del polimero a partire da una soluzione diluita in dimetilsolfossido. Viene presentata una prima analisi dell'influenza delle condizioni operative sulla morfologia del precipitato e sulla ritenzione di solvente.

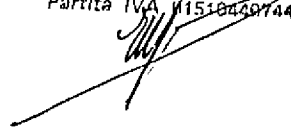
La proprietà dei soluti di precipitare a diverse pressioni nella tecnica SAS è stata sfruttata per effettuare separazioni selettive di composti altrimenti difficilmente separabili con i metodi tradizionali.

Catchpole e Hachmann (High Pressure Chemical Engineering 309-314, 1996) realizzarono una precipitazione frazionata da una soluzione in esano di lecitine e olio di soya, White e Knutson (Aiche Annual Meeting, Paper 109 d, Los Angeles, 1997) effettuarono il frazionamento di poliacidi.

Bertucco et al. (Proceedings of 4<sup>th</sup> Italian Conference on Supercritical Fluids and their Application, Capri, Italy, 327-334, 1997) hanno condotto uno studio sul rivestimento di un farmaco con diversi polimeri biocompatibili.

Infine, la tecnica SAS discontinua è stata applicata per la preparazione di nanosfere costituite dai derivati dell'acido ialuronico e aventi un diametro medio minore di 1 micron (WO96/29998).





### SAS continua

Nella modalità continua la soluzione viene iniettata in continuo con l'antisolvente nel precipitatore in pressione. L'iniezione avviene attraverso un foro calibrato mediante l'utilizzo di una pompa volumetrica. La modalità continua presenta interessanti vantaggi rispetto al processo discontinuo, sia come ottimizzazione delle condizioni operative sia per la possibilità di ovviare a limitazioni insite nel processo discontinuo.

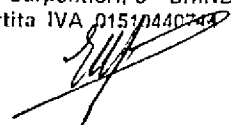
La prima pubblicazione riguardante la tecnica SAS in modalità continua è dovuta a Yeo et al. (Biotechnology and Bioengineering, 41, 341-346, 1993) i quali realizzarono la precipitazione di insulina e confrontarono i risultati con quanto ottenuto trattando lo stesso sistema con la SAS batch. Si osservò in questa analisi che il precipitato ottenuto era costituito da fibre.

Tom et al. (Application of Supercritical Fluids in the controlled release of drugs, chapter 19, 1993) utilizzarono la SAS continua per produrre la precipitazione di due diverse proteine, la catalasi e l'insulina a partire da una soluzione al 90% di etanolo ed al 10% di acqua.

Randolph et al. (Biotechnology Progress, 9, 429-435, 1993) condussero uno studio il cui fine era quello di valutare l'influenza dell'idrodinamica di iniezione sulla morfologia del precipitato.

Come nel caso della SAS discontinua, anche la modalità continua è stata indagata quale possibile tecnica di separazione. In questo ambito, un interessante lavoro è quello di Foster et al. (The 4<sup>th</sup> International symposium on supercritical fluids, Sendai, Japan, 27-29, 1997): essi realizzarono la





separazione di due isomeri orto e para dell'acido idrossibenzoico (*o*-HBA e *p*-HBA) in metanolo.

La tecnica SAS continua è stata applicata con successo nell'ambito della coprecipitazione di farmaci e polimeri allo scopo di ottenere sistemi a rilascio controllato. Le differenti pressioni a cui precipitano il farmaco ed il polimero, infatti, rendono inutilizzabile la tecnica discontinua se non operando in fase eterogenea. Tomasko e Chou (The 4<sup>th</sup> International symposium on supercritical fluids, Sendai, Japan, 55-57, 1997) realizzarono la coprecipitazione di nanoproxene e poliacido L-lattico a partire da una loro soluzione in acetone.

Subramaniam et al. (Aiche Annual Meeting, Miami, USA, Session 115, 1998) presentarono un lavoro innovativo nel campo del ricoprimento di substrati di diversa natura con polimeri e farmaci diversi.

Il Richiedente ha sorprendentemente trovato che tramite la tecnica SAS, discontinua o continua, è possibile processare i derivati dell'acido ialuronico in forme diverse quali, ad esempio, film, spugne, fili e risolvere il problema dell'eliminazione dei residui di solventi organici che si verifica con i processi noti fino ad ora.

L'assenza di solventi nei prodotti finali rappresenta un notevole vantaggio per i biomateriali da utilizzare in campo medico e chirurgico in quanto si ottiene una drastica diminuzione della tossicità rispetto agli stessi ottenuti con le tecniche classiche, ed, inoltre, un notevole miglioramento della crescita cellulare su detti biomateriali utilizzati come supporti.

Inoltre, è stato sorprendentemente trovato che le spugne ottenibili tramite il



processo SAS discontinuo presentano una struttura morfologica molto simile alla struttura ossea e che quindi può essere utilizzata per se o in associazioni con una adatta coltura cellulare per la rigenerazione dell'osso o nel trattamento dei difetti osteocondrali.

Infine, tramite la tecnica SAS è stato sorprendentemente trovato che è possibile ottenere fili costituiti anche da esteri parziali dell'acido ialuronico solubili in acqua, non ottenibili tramite le tecniche classiche che, a causa della solubilità del derivato, portano all'ottenimento di strutture non continue, agglomerate, senza riproducibilità e in condizioni non sfruttabili in scala industriale.

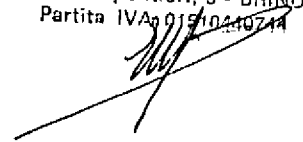
#### DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La presente invenzione descrive strutture tridimensionali biocompatibili e biodegradabili comprendenti i derivati dell'acido ialuronico, ottenibili mediante la tecnica dell'antisolvente supercritico, eventualmente in associazione con sostanze farmacologicamente o biologicamente attive e con altri polimeri naturali, semisintetici e sintetici, e il loro uso in campo medico e chirurgico.

Tra i derivati dell'acido ialuronico sono da preferire i seguenti:

- gli esteri dell'acido ialuronico in cui una parte o tutte le funzioni carbossiliche sono esterificate con alcoli della serie alifatica, aromatica, arilalifatica, cicloalifatica, eterociclica (EP 0216453 B1);
- gli esteri dell'acido ialuronico, in cui la prima parte delle funzioni carbossiliche è esterificata con alcool aralifatico e la seconda parte con alcoli alifatici lineari a catena lunga con un numero di atomi di carbonio da 10 a 22 (WO98/08876);





- gli esteri autoreticolati dell'acido ialuronico in cui una parte o la totalità dei gruppi carbossilici sono esterificate con le funzioni alcoliche della stessa catena polisaccaridica o di altre catene (EP 0341745 B1);
- i composti reticolati dell'acido ialuronico in cui una parte o la totalità dei gruppi carbossilici sono esterificate con polialcoli della serie alifatica, aromatica, arilalifatica, cicloalifatica, eterociclica, generando delle reticolazioni mediante catene spaziatrici (EP 0265116 B1);
- gli emiesteri dell'acido succinico o sali di metalli pesanti dell'emiestere dell'acido succinico con acido ialuronico o con esteri parziali o totali dell'acido ialuronico (WO 96/357207);
- i derivati solfatati (WO 95/25751) o N-solfatati (WO98/45335);
- i derivati ammidici dell'acido ialuronico.

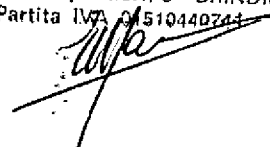
Tra i derivati esterei parziali dell'acido ialuronico sono da preferire quelli aventi una percentuale di esterificazione minore del 90%, in particolare quelli con intervallo di esterificazione tra il 45 e il 75%, e ancora più preferibilmente tra il 60 e il 70%.

Sono, inoltre, da preferire i derivati dell'acido ialuronico esterificati con alcool benzilico.

I suddetti derivati dell'acido ialuronico possono essere inoltre utilizzati da soli, in associazione tra loro o con polimeri naturali, semisintetici, sintetici.

Tra i polimeri naturali si possono usare, ad esempio, collagene, coprecipitati di collagene e glicosamminoglicani, cellulosa, polisaccaridi in forma di gel quali la chitina, il chitosano, la pectina o l'acido pectico, l'agar, l'agarosio, lo





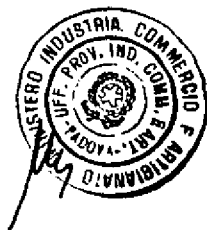
xantano, il gellano, l'acido alginico o gli alginati, polimannani o poliglicani, amido, gomme naturali. I polimeri semisintetici, ad esempio, possono essere scelti dal gruppo consistente in collagene reticolato con agenti quali aldeidi o precursori delle stesse, acidi dicarbossilici o loro alogenuri, diammine, derivati della cellulosa, dell'acido ialuronico, della chitina o del chitosano, del gellano, dello xantano, della pectina o dell'acido pectico, dei poliglicani, del polimannano, dell'agar, dell'agarosio, della gomma naturale, dei glicosamminoglicani. Infine, tra i polimeri sintetici possono essere usati, ad esempio, l'acido polilattico, acido poliglicolico o copolimeri degli stessi o dei loro derivati, polidiossani, polifosfazeni, resine polisulfoniche, poliuretani, PTFE.

Le strutture tridimensionali secondo la presente invenzione possono contenere sostanze farmacologicamente o biologicamente attive quali, ad esempio, antiinfiammatori, antibiotici, fattori di crescita, quali, ad esempio, bone morphogenic protein (BMP), Fattore di Crescita del Nervo (h-NGF), Fattore di Crescita Neuronotrofico Ciliare.

Le strutture tridimensionali ottenibili sono, ad esempio, gel, spugne, fibre, fili, film.

I derivati dell'acido ialuronico in forma di fibre o fili possono essere ulteriormente processati in forma di tessuto non-tessuto, corde, reti.

I suddetti biomateriali possono essere vantaggiosamente impiegati come supporto per colture cellulari, in chirurgia plastica ed estetica, in ortopedia, in odontoiatria, nella chirurgia nervosa, nella chirurgia cardiovascolare, nella





prevenzione delle aderenze post-chirurgiche, per la rigenerazione dei tessuti quali, ad esempio, quelli epidermici, dermici, ossei, cartilaginei, nervosi, cardiovascolari, adiposi, epatici, muscolari, ghiandolari ed in generale come riempimento di tessuti soffici in caso di perdita di sostanza.

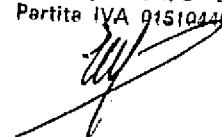
In particolare, le spugne ottenibili tramite il processo SAS discontinuo presentano una struttura morfologica molto simile alla struttura ossea e quindi possono essere utilizzate per se o in associazioni con una adatta coltura cellulare per la rigenerazione dell'osso o nel trattamento dei difetti osteocondrali.

Di seguito sono riportati esempi sulla preparazione di spugne e di fili rispettivamente preparati con la tecnica SAS in discontinuo e in continuo.

Il processo di preparazione delle spugne mediante SAS in discontinuo può essere riassunto nei seguenti passaggi:

- a) disciogliere il derivato dell'acido ialuronico in un solvente aprotico ad una concentrazione compresa tra il 2% p/p al valore di saturazione alla temperatura di 40 °C;
- b) caricare la soluzione del passaggio a) in un recipiente resistente a pressione;
- c) caricare l'antisolvente fino a raggiungere una pressione maggiore della pressione di precipitazione (funzione del solvente organico impiegato e della temperatura) e una temperatura compresa tra 10 e 70°C;
- d) rimuovere il solvente aprotico attraverso il flusso di antisolvente;
- e) depressurizzare il recipiente e recuperare il precipitato.





Per quanto riguarda il processo di preparazione dei fili, viene utilizzata la tecnica SAS in continuo di seguito riassunto:

- a) disciogliere il derivato dell'acido ialuronico in un solvente aprotico ad una concentrazione compresa tra il 2% p/p al valore di saturazione alla temperatura di 40 °C;
- b) caricare la soluzione nel recipiente termostato resistente alla pressione;
- c) caricare l'antisolvente fino a una pressione maggiore della pressione di precipitazione (funzione del solvente organico impiegato e della temperatura), a una temperatura compresa tra 10 e 70°C e stabilizzare il flusso dell'antisolvente;
- d) iniettare in modo continuo la soluzione del derivato dell'acido ialuronico nel precipitatore attraverso un foro calibrato avente un orifizio del diametro compreso tra 40 e 400 micron;
- e) interrompere l'iniezione della soluzione;
- f) rimuovere i residui di solvente mediante il flusso di antisolvente;
- g) depressurizzare il precipitatore e recuperare il precipitato.

### **Esempio 1**

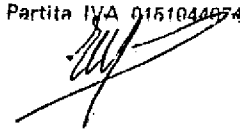
**Preparazione di spugne costituite dall'estere benzilico totale dell'acido ialuronico (HYAFF11).**

### **Considerazioni preliminari**

La consistenza e la forma fisica del precipitato nella tecnica SAS dipende e rispecchia la conformazione di partenza del polimero entro la soluzione.

Il fenomeno della precipitazione, infatti, avviene molto velocemente e





“congela” il soluto nella configurazione in cui esso si trova prima di precipitare entro la fase liquida.

La disposizione delle catene polimeriche nella soluzione dipende fortemente dalla concentrazione con cui il polimero è presente.

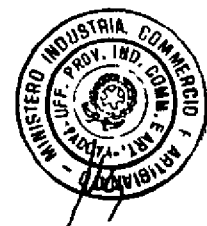
In soluzioni diluite esse tendono ad avvolgersi su se stesse a dare delle strutture a gomitolo (*coils*), indipendenti le une dalle altre e disperse entro il solvente.

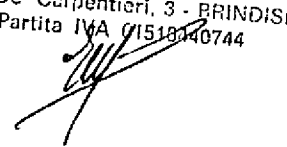
La viscosità della soluzione in questo caso è la stessa del solvente puro.

Come dimostrato da Flory P., (Principle of Polymer Chemistry, cap. XII, Cornell University Press, Ithaca, New York, 1971) tali gomitoli si comportano come delle sfere rigide e tendono a respingersi tra di loro, in quanto la compenetrazione di due avvolgimenti è entropicamente sfavorita a causa dei numerosi contatti che interverrebbero tra due catene.

Innescando, quindi, la precipitazione a partire da soluzioni diluite si ottiene il polimero in forma di polvere molto fine, spesso costituita da microsferiche o nanosferiche, salvo intervento di fattori diversi da quelli considerati. Nel caso di soluzioni concentrate, invece, le catene polimeriche sono fortemente intrecciate a formare una rete molto fitta, difficilmente sbrigliabile, dove il solvente rimane “ingabbiato” (*entangled solution*).

Se si applica il processo SAS a questo tipo di soluzioni, il fluido supercritico si posiziona come il solvente entro le maglie della rete formata dalle catene polimeriche, tende ad allargare le struttura senza peraltro riuscire a disgregarne l'intreccio; una volta raggiunte le condizioni di precipitazione il soluto si separa dalla fase liquida non più sotto forma di microparticelle ma di un solido





compatto e poroso. La porosità dipende, ovviamente, dall'azione esercitata dall'antisolvente sulla struttura a network appena prima che questa precipiti; tale azione è legata a parametri di interazione polimero-polimero e polimero-antisolvente che non sono facilmente determinabili.

Queste osservazioni hanno trovato una conferma parziale nelle prove di precipitazione eseguite a partire da soluzioni concentrate di Hyaff-11 in quanto l'influenza della concentrazione iniziale sulla morfologia del prodotto viene alterata dalle condizioni di processo, cosa non prevista dalla teoria..

Lo schema di impianto utilizzato viene riportato in figura 1.

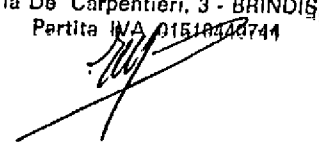
Il vaso di precipitazione P utilizzato è collegato all'impianto in modo che il flusso di CO<sub>2</sub> possa avvenire sia dall'alto verso il basso che viceversa, attraverso la manipolazione delle valvole a tre vie VT1 e VT2.

Alle due estremità del fasciame vengono alloggiati due filtri/distributori costituiti da setti metallici porosi (fritte), con diametro medio dei pori di 5 µm, il cui fissaggio è realizzato con due ghiera in acciaio che le spingono, in battuta, su due anellini in teflon. In questo modo il flusso di CO<sub>2</sub> viene ad interessare omogeneamente tutto il volume del vaso e si distribuisce uniformemente su tutta la massa presente.

### **Procedura operativa**

Viene preparata una soluzione molto concentrata di Hyaff-11 esterificato totale in DMSO. L'elevata concentrazione delle soluzioni di partenza richiede di aggiungere il polimero al solvente in modo molto lento, sotto agitazione e riscaldamento. La soluzione ottenuta risulta molto viscosa e viene lasciata in





agitazione senza riscaldare per 12 ore.

Il liquido viene quindi versato nel precipitatore, che viene poi chiuso. La temperatura viene fissata, agendo sul regolatore del termostato (TG).

Raggiunta la temperatura di esercizio, inizia la fase di pressurizzazione del recipiente. Il gradiente di pressione viene mantenuto al valore desiderato agendo sulla valvola millimetrica VM1. Nella fase di carica le valvole a tre vie VT1 e VT2 sono disposte in modo tale che il flusso avvenga dal basso verso l'alto permettendo alla CO<sub>2</sub> di gorgogliare entro la soluzione.

Il caricamento del vaso termina ad un valore di pressione superiore a quello di precipitazione, dipendente dal solvente e dalla T. A questo punto, il verso del flusso viene invertito agendo sulle valvole a tre vie VT1 e VT2, e viene aperta la valvola millimetrica VM2 scaricando per sifonamento il solvente presente nel precipitatore; la fase di purificazione viene così velocizzata riducendo il volume di DMSO da strappare in flusso di CO<sub>2</sub>.

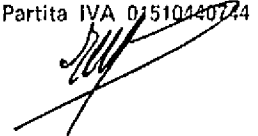
Alla fase di sifonamento, segue una seconda fase di pressurizzazione per aumentare la solubilità del solvente organico nella fase supercritica.

Si procede quindi alla purificazione del precipitato, alimentando la CO<sub>2</sub> secondo valori di portata e per un intervallo di tempo dipendenti dal volume del sistema e dalla quantità di soluzione impiegata.

La seconda pressurizzazione e la purificazione avvengono nuovamente con la CO<sub>2</sub> in flusso dal basso verso l'alto.

Trascorso il tempo necessario all'allontamento del solvente, la pompa P viene arrestata ed il precipitatore portato alla pressione atmosferica. A questo punto è





possibile scollegarlo dalla linea aprirlo e recuperare il precipitato.

## Risultati

Sono state effettuate delle prove preliminari a partire da soluzioni di diversa concentrazione per determinare le condizioni di passaggio da una soluzione in cui il polimero è presente sotto forma di gomitoli a quella in cui le catene polimeriche sono intrecciate a dare una struttura a network (soglia di precipitazione).

Dall'analisi sperimentale si è concluso che, per l'ottenimento di una struttura spugnosa con buone caratteristiche meccaniche di resistenza alla compressione e alla trazione, era necessario operare a concentrazioni superiori alla soglia di sovrapposizione.

In tabella 1 si riportano le condizioni operative osservate nel corso delle prove preliminari.

*Tabella 1: condizioni operative nel processo di produzione di spugne a partire da derivati dell'acido ialuronico (HYAFF11 in DMSO) mediante la tecnica SAS.*

Prove	Temperatura (°C)	Pressione (bar)	Concentrazione iniziale (% p/p)	Risultato
1	40	90	5	polvere
2	40	90	8	Network non compatto
3	40	90	10	spugna
4	40	90	12	spugna



Nelle Figure 2 e 3 vengono riportate le fotografie al SEM di un campione della spugna ottenuta nella prova 4.

Si può apprezzare nella foto di Figura 2, caratterizzata da un basso valore dell'ingrandimento, la compattezza e l'omogeneità della struttura prodotta.

La foto di Figura 3, invece, mette in risalto la porosità della spugna la quale presenta dimensioni medie dell'ordine di qualche micron.

E' stato dunque dimostrato che è possibile produrre strutture a network di Hyaff-11 sfruttando la tecnica SAS batch partendo da soluzioni concentrate, compatibilmente con i limiti di solubilità del sistema.

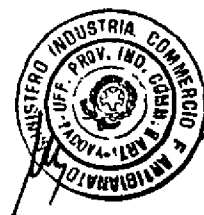
## **Esempio 2**

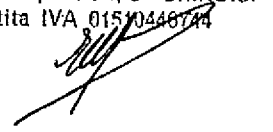
### **Preparazione di fili costituiti dall'estere benzilico dell'acido ialuronico con percentuale di esterificazione 50% (HYAFF11p50)**

L'impianto, illustrato nello schema in figura 4, è costituito da una sezione di alimentazione (F), da una pompa a pistone tuffante (P) con testa raffreddata a mezzo di glicole, e da una sezione di post-espansione e scarico (PE e W) che consentono di separare la CO<sub>2</sub> dal solvente solubilizzato, di recuperare quest'ultimo e di scaricare il gas in atmosfera non prima di averne misurato il flusso attraverso il rotametro (R).

Il vaso di precipitazione K è provvisto di una finestra ottica che permette di osservare il processo.

La linea di iniezione del liquido è composta da due recipienti contenenti la soluzione (S1) e l'altro il solvente puro (S2). Le linee in uscita vengono





collegate ad una valvola a tre vie (VT) che consente di deviare l'aspirazione della pompa da un recipiente all'altro.

Pr l'iniezione della soluzione si è impiegata una pompa a siringa massa ad aria, per garantire una spinta uniforme ed assicurare la continuità del filo.

La linea è corredata di un manometro col quale è possibile valutare le perdite di carico attraverso l'ugello, confrontando la pressione letta con quella indicata dal manometro collegato al vaso di precipitazione.

La valvola millimetrica VM3 (Hoke, mod. 1316G4Y) mette la tubazione in comunicazione con un recipiente di raccolta (S3) in fase di depressurizzazione e lavaggio della linea.

La temperatura del vaso viene regolata osservando il segnale nel flusso in uscita.

### **Procedura operativa**

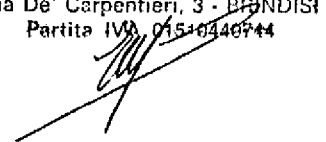
Un derivato dell'acido ialuronico viene disciolto in un solvente aprotico, preferibilmente DMSO, ad una concentrazione variabile tra il 5% p/p e la concentrazione di saturazione alla temperatura di 40 °C, preferibilmente 10% p/p.

La soluzione viene quindi caricata nel recipiente S1, mantenuto a temperature comprese tra 20 e 60 °C, preferibilmente 40 °C. Il recipiente S2 viene riempito con DMSO puro.

L'iniezione del solo solvente nella camera di precipitazione evita l'occlusione della linea per effetto antisolvente.

Agendo sulla valvola a tre vie, sarà poi possibile passare all'iniezione della





soluzione con il polimero nel vaso di precipitazione.

Il vaso di precipitazione viene pressurizzato aprendo prima la valvola millimetrica VM1 ed, in seguito avviando la pompa a pistone tuffante, fino al valore finale di pressione compreso tra 60 e 150 bar, preferibilmente 100 bar.

Raggiunta la pressione di esercizio, viene aperta la valvola VM2 ed inizia la fase di stabilizzazione del flusso della CO<sub>2</sub>.

Si provvede quindi alla compressione del liquido per mezzo della pompa guidata ad aria, fino a raggiungere una pressione superiore a quella della CO<sub>2</sub> presente nella camera di precipitazione.

L'iniezione inizia aprendo la valvola on/off V1 che permette al liquido di entrare nella cella attraverso il foro calibrato, avente un orificio compreso tra 40 e 400 micron, preferibilmente 100 micron. La pressione del liquido si attesta ad un preciso valore che supera quello della CO<sub>2</sub> delle perdite di carico attraverso la tubazione e l'ugello.

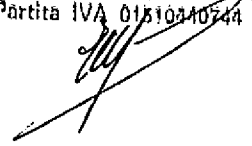
Terminata l'iniezione della soluzione, si provvede ad isolare la linea del liquido intercettando la valvola V1, quindi si continua ad alimentare la CO<sub>2</sub> in flusso per allontanare i residui di solvente.

Il processo si conclude con la fase di depressurizzazione del precipitatore, dopodiché è possibile scollegare il vaso dalla linea e recuperare il precipitato.

\*\*\* \*\*

Essendo l'invenzione così descritta, è chiaro che questi metodi possono essere modificati in vari modi. Tali modifiche non sono da considerarsi come divergenze dallo spirito e dalle prospettive dell'invenzione e tutte quelle



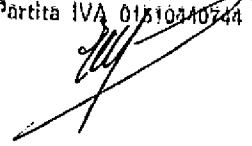


modifiche che apparirebbero evidenti ad un esperto nel campo sono comprese nell'ambito delle seguenti rivendicazioni:

### **RIVENDICAZIONI**

- 1) Strutture tridimensionali biocompatibili e biodegradabili comprendenti almeno un derivato dell'acido ialuronico, ottenibili mediante la tecnica della precipitazione indotta mediante antisolvente supercritico, eventualmente in associazione con sostanze farmacologicamente o biologicamente attive e/o con altri polimeri naturali, semisintetici e sintetici.
- 2) Strutture tridimensionali in accordo alla rivendicazione 1, in cui per derivato dell'acido ialuronico si intendono gli esteri dell'acido ialuronico in cui una parte o tutte le funzioni carbossiliche sono esterificate con alcoli della serie alifatica, aromatica, arilalifatica, cicloalifatica, eterociclica.
- 3) Strutture tridimensionali in accordo alla rivendicazione 1, in cui per derivato dell'acido ialuronico si intendono gli esteri dell'acido ialuronico in cui la prima parte delle funzioni carbossiliche è esterificata con alcool aralifatico e la seconda parte con alcoli alifatici lineari a catena lunga con un numero di atomi di carbonio da 10 a 22.
- 4) Strutture tridimensionali in accordo alla rivendicazione 1, in cui per derivato dell'acido ialuronico si intendono gli esteri autoreticolati dell'acido ialuronico in cui una parte o la totalità dei gruppi carbossilici





modifiche che apparirebbero evidenti ad un esperto nel campo sono comprese nell'ambito delle seguenti rivendicazioni:

### **RIVENDICAZIONI**

- 1) Strutture tridimensionali biocompatibili e biodegradabili comprendenti almeno un derivato dell'acido ialuronico, ottenibili mediante la tecnica della precipitazione indotta mediante antisolvente supercritico, eventualmente in associazione con sostanze farmacologicamente o biologicamente attive e/o con altri polimeri naturali, semisintetici e sintetici.
- 2) Strutture tridimensionali in accordo alla rivendicazione 1, in cui per derivato dell'acido ialuronico si intendono gli esteri dell'acido ialuronico in cui una parte o tutte le funzioni carbossiliche sono esterificate con alcoli della serie alifatica, aromatica, arilalifatica, cicloalifatica, eterociclica.
- 3) Strutture tridimensionali in accordo alla rivendicazione 1, in cui per derivato dell'acido ialuronico si intendono gli esteri dell'acido ialuronico in cui la prima parte delle funzioni carbossiliche è esterificata con alcool aralifatico e la seconda parte con alcoli alifatici lineari a catena lunga con un numero di atomi di carbonio da 10 a 22.
- 4) Strutture tridimensionali in accordo alla rivendicazione 1, in cui per derivato dell'acido ialuronico si intendono gli esteri autoreticolati dell'acido ialuronico in cui una parte o la totalità dei gruppi carbossilici

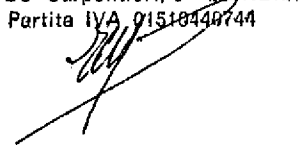


- sono esterificate con le funzioni alcoliche della stessa catena polisaccaridica o di altre catene.
- 5) Strutture tridimensionali in accordo alla rivendicazione 1, in cui per derivato dell'acido ialuronico si intendono i composti reticolati dell'acido ialuronico in cui una parte o la totalità dei gruppi carbossilici sono esterificate con polialcoli della serie alifatica, aromatica, arilalifatica, cicloalifatica, eterociclica, generando delle reticolazioni mediante catene spaziatrici.
  - 6) Strutture tridimensionali in accordo alla rivendicazione 1, in cui per derivato dell'acido ialuronico si intendono gli emiesteri dell'acido succinico o sali di metalli pesanti dell'emiestere dell'acido succinico con acido ialuronico o con esteri parziali o totali dell'acido ialuronico.
  - 7) Strutture tridimensionali in accordo alla rivendicazione 1, in cui per derivato dell'acido ialuronico si intendono i derivati solfati o N-solfati.
  - 8) Strutture tridimensionali in accordo alla rivendicazione 1, in cui per derivato dell'acido ialuronico si intendono i derivati ammidici dell'acido ialuronico.
  - 9) Strutture tridimensionali in accordo alle rivendicazioni 1-2, in cui i derivati esterei parziali dell'acido ialuronico hanno una percentuale di esterificazione minore del 90%, preferibilmente tra il 45 e il 75%, e ancora più preferibilmente tra il 60 e il 70%.



- 10) Strutture tridimensionali in accordo alle rivendicazioni 1-2, 9, in cui i derivati dell'acido ialuronico sono esterificati con alcool benzilico.
- 11) Strutture tridimensionali in accordo alla rivendicazione 1, in cui i polimeri naturali sono scelti dal gruppo che consiste in collagene, coprecipitati di collagene e glicosamminoglicani, cellulosa, polisaccaridi in forma di gel quali la chitina, il chitosano, la pectina o l'acido pectico, l'agar, l'agarosio, lo xantano, il gellano, l'acido alginico o gli alginati, polimannani o poliglicani, amido, gomme naturali.
- 12) Strutture tridimensionali in accordo alla rivendicazione 1, in cui i polimeri semisintetici sono scelti dal gruppo consistente in collagene reticolato con agenti quali aldeidi o precursori delle stesse, acidi dicarbossilici o loro alogenuri, diammine, derivati della cellulosa, dell'acido ialuronico, della chitina o del chitosano, del gellano, dello xantano, della pectina o dell'acido pectico, dei poliglicani, del polimannano, dell'agar, dell'agarosio, della gomma naturale, dei glicosamminoglicani.
- 13) Strutture tridimensionali in accordo alla rivendicazione 1, in cui i polimeri sintetici sono scelti dal gruppo che consiste in acido polilattico, acido poliglicolico o copolimeri degli stessi o dei loro derivati, polidiossani, polifosfazeni, resine polisulfoniche, poliuretani, PTFE.
- 14) Strutture tridimensionali in accordo alla rivendicazione 1, in cui le sostanze farmaceuticamente o biologicamente attive sono scelte dal

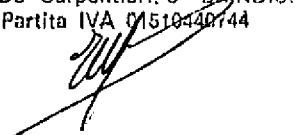




gruppo che consiste in antiinfiammatori, antibiotici, fattori di crescita, quali, ad esempio, BMP, Fattore di Crescita del Nervo umano (h-NGF), Fattore di Crescita Neuronotrofico Ciliare (CNTF).

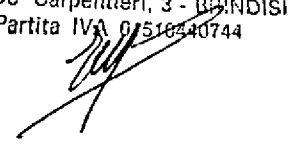
- 15) Strutture tridimensionali in accordo alle rivendicazioni 1-13, in forma di spugne, gel, fibre, fili, tubi, non-tessuto, corde, reti.
- 16) Uso di strutture tridimensionali in accordo alle rivendicazioni precedenti, per il supporto per colture cellulari, in chirurgia plastica ed estetica, in ortopedia, in odontoiatria, in neurochirurgia ed in chirurgia cardiovascolare, nella prevenzione delle aderenze post-chirurgiche, per la rigenerazione dei tessuti epidermici, dermici, ossei, cartilaginei, nervosi, cardiovascolari, adiposi, epatici, muscolari, ghiandolari e come riempimento di tessuti soffici in caso di perdita di sostanza.
- 17) Processo discontinuo per la preparazione di spugne comprendenti almeno un derivato dell'acido ialuronico, detto processo comprendente i seguenti passaggi:
  - a) disciogliere il derivato dell'acido ialuronico in un solvente aprotico ad una concentrazione compresa tra il 2% p/p al valore di saturazione alla temperatura di 40 °C;
  - b) caricare la soluzione del passaggio a) in un recipiente resistente a pressione;
  - c) caricare l'antisolvente fino a raggiungere una pressione maggiore della pressione di precipitazione e una temperatura compresa tra 10 e 70°C;





- d) rimuovere il solvente aprotico attraverso il flusso di antisolvente;
  - e) depressurizzare il recipiente e recuperare il precipitato.
- 18) Processo in accordo alla rivendicazione 17, dove l'antisolvente è selezionato dal gruppo che consiste in anidride carbonica, idrocarburi, idrofluorcarburi, protossido di azoto.
- 19) Processo in accordo alla rivendicazione 18, dove l'antisolvente viene caricato ad una velocità o gradiente di pressione da 0,1 a 20 bar/min fino a raggiungere una pressione da 40 a 150 bar.
- 20) Processo in accordo alle rivendicazioni 18-19, in cui il solvente aprotico utilizzato nel passaggio a) per disciogliere il derivato dell'acido ialuronico è selezionato dal gruppo che consiste in dimetilsolfossido, N-metilpirrolidone, dimetilformammide.
- 21) Processo in accordo alle rivendicazioni 17, in cui il derivato dell'acido ialuronico viene selezionato dal gruppo che consiste in esteri dell'acido ialuronico, derivati dell'acido ialuronico autoreticolati o reticolati mediante catene spaziatrici, emiesteri dell'acido succinico o sali di metalli pesanti dell'emiesteri dell'acido succinico con acido ialuronico o con esteri parziali o totali dell'acido ialuronico, derivati solfatati o N-solfatati, derivati ammidici dell'acido ialuronico.
- 22) Processo in accordo alle rivendicazioni 17-21, per preparare le spugne contenenti composti farmacologicamente e biologicamente attivi dove tali composti vengono aggiunti nel passaggio a) dopo la dissoluzione del derivato dell'acido ialuronico nel solvente aprotico.





- 23) Processo continuo per la preparazione dei fili comprendenti almeno un derivato dell'acido ialuronico, detto processo comprendente i seguenti passaggi:
- a) disciogliere il derivato dell'acido ialuronico in un solvente aprotico ad una concentrazione compresa tra il 2% p/p al valore di saturazione alla temperatura di 40 ° C;
  - b) caricare la soluzione nel recipiente termostato resistente alla pressione;
  - c) caricare l'antisolvente fino a una pressione maggiore della pressione di precipitazione (funzione del solvente organico impiegato e della temperatura), a una temperatura compresa tra 10 e 70°C e stabilizzare il flusso dell'antisolvente;
  - d) iniettare in modo continuo la soluzione del derivato dell'acido ialuronico nel precipitatore attraverso un foro calibrato avente un orifizio dal diametro compreso tra 40 e 400 micron;
  - e) interrompere l'iniezione della soluzione;
  - f) rimuovere i residui di solvente mediante il flusso di antisolvente;
  - g) depressurizzare il precipitatore e recuperare il precipitato.
- 24) Processo in accordo alla rivendicazione 23 dove l'antisolvente è selezionato dal gruppo che consiste in anidride carbonica, idrocarburi, idrofluorcarburi, protossido di azoto.
- 25) Processo in accordo alle rivendicazioni 23 in cui il solvente aprotico utilizzato nel passaggio a) per disciogliere il derivato dell'acido



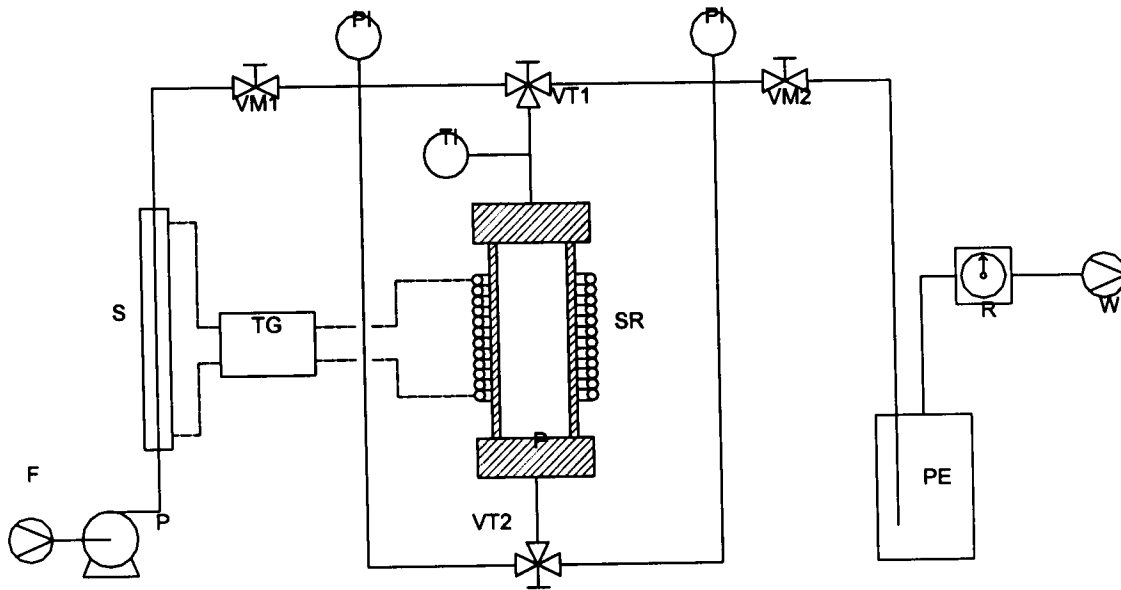
- ialuronico è selezionato dal gruppo che consiste in dimetilsolfossido, N-metilpirrolidone, dimetilformammide.
- 26) Processo in accordo alle rivendicazioni 23-26, in cui il derivato dell'acido ialuronico viene selezionato dal gruppo che consiste in esteri dell'acido ialuronico, derivati dell'acido ialuronico autoreticolati o reticolati mediante catene spaziatrici, emiesteri dell'acido succinico o sali di metalli pesanti dell'emiestero dell'acido succinico con acido ialuronico o con esteri parziali o totali dell'acido ialuronico, derivati solfatati o N-solfatati, derivati ammidici dell'acido ialuronico.
- 27) Processo in accordo alle rivendicazioni 23-26 per preparare i fili contenenti sostanze farmacologicamente e biologicamente attive che vengono aggiunte nel passaggio a) dopo la dissoluzione del derivato dell'acido ialuronico nel solvente aprotico.

**fb**

FIDIA ADVANCED BIOPOLYMERS s.r.l.

Emilio Maresca



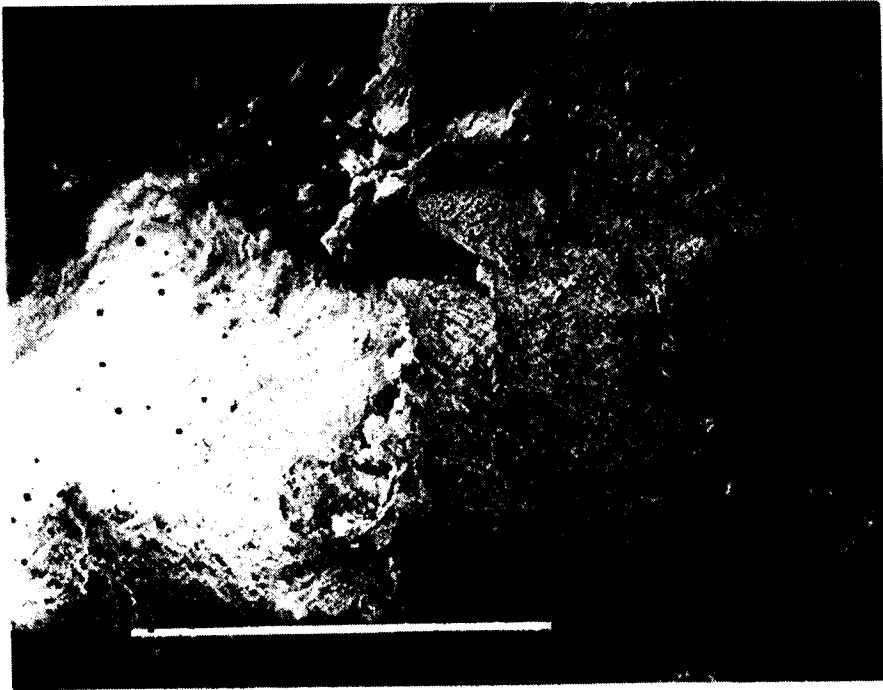


**Figura 1** Schema di impianto della linea per la conduzione della tecnica SAS batch nelle prove di produzione delle strutture a network. F alimentazione CO<sub>2</sub>; P pompa a pistoni tuffanti; S surriscaldatore; TG termostato del glicole di riscaldamento; VM1, VM2 valvole millimetriche di regolazione; VT1, VT2 valvole a tre vie; P precipitatore; SR serpentino di riscaldamento; PE vaso di post-espansione; R rotometro; W scarico.

PD99A000071



Handwritten signature or initials in the top right corner.

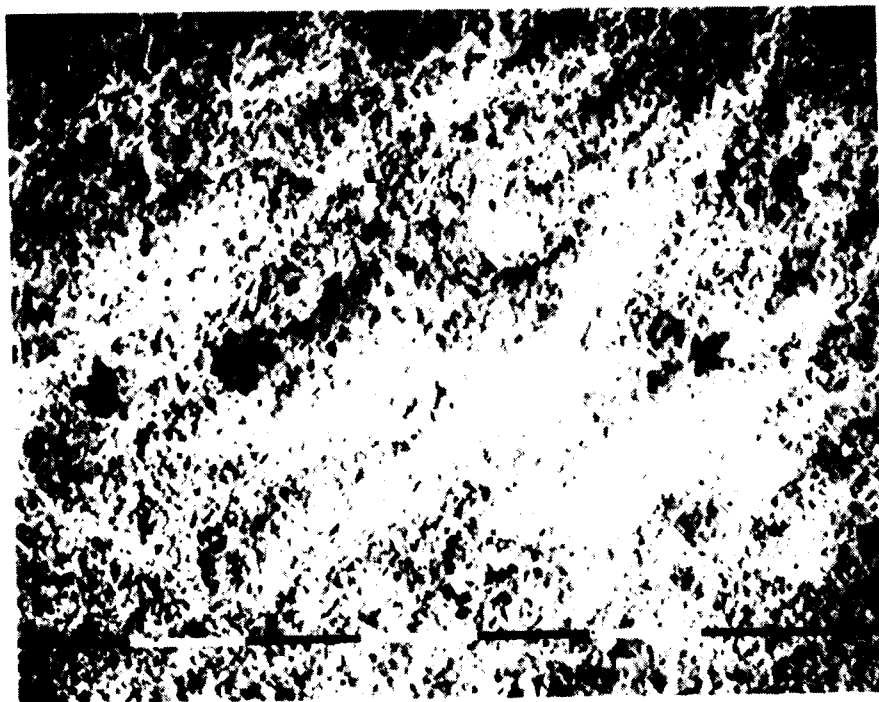
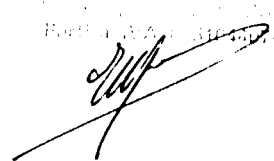


**Figura 2** Foto al SEM di un campione di Hyaff-11 ottenuto nella prova 4 con la tecnica SAS batch condotta a 40°C a partire da una soluzione al 10% ponderale in DMSO. (bar=1 mm, x55).

PD 99 A 0 0 0 0 7 1



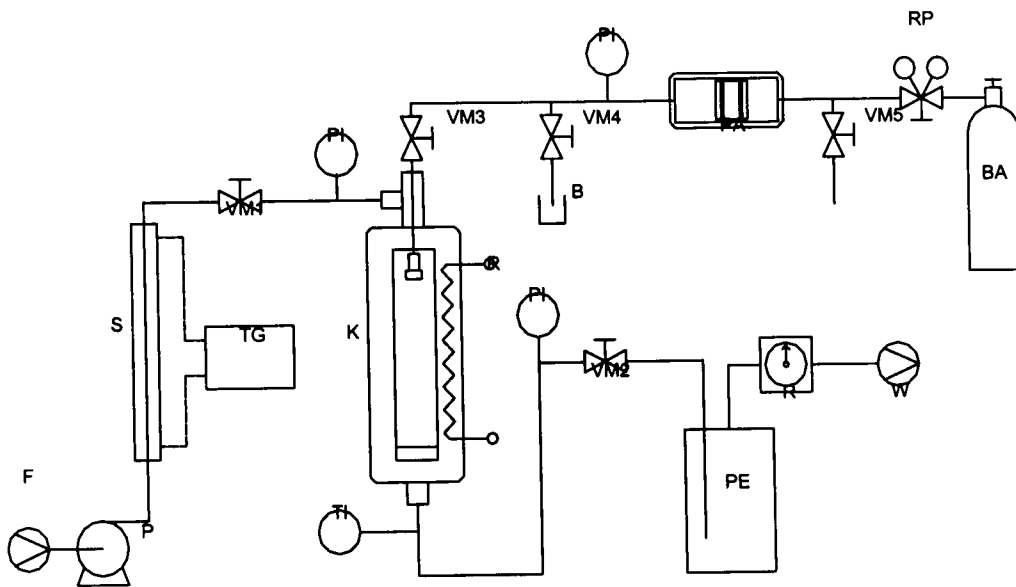
MINISTERO INDUSTRIA, COMMERCIO  
E ATTIVITÀ ARTIGIANE  
R.D. 11/11/1974 (N. 1144)



**Figura 3** Foto al SEM di un campione di Hyaff-11 ottenuto nella prova 4 con la tecnica SAS batch condotta a 40°C a partire da una soluzione al 10% ponderale in DMSO. (bar=100  $\mu$ m, x1490)

PD99A000071





**Figura 4** Schema dell'impianto di produzione di fili di Hyaff mediante l'utilizzo della tecnica SAS continua nella cella con finestra. F alimentazione; P pompa a pistone tuffante; S surriscaldatore; TG termostato del glicole di riscaldamento; VM1, VM2, VM3, VM4, VM5 valvole millimetriche di regolazione; K cella con finestra; RH resistenza di riscaldamento; BA bombola di Aria compressa a 200 bar; RP riduttore di pressione; PA sistema di iniezione continua a spinta idraulica; B recipiente di raccolta della soluzione; PE vasi di post-espansione; R rotametro; W scarico.

PD99A000071

