



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

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102010901807547
Data Deposito	09/02/2010
Data Pubblicazione	09/08/2011

Classifiche IPC

Titolo

MEMBRANA ZEOLITICA PER ADESIONI E COLTURE DI CELLULE, PROCEDIMENTO PER LA PREPARAZIONE ED APPLICAZIONE.

MEMBRANA ZEOLITICA PER ADESIONI E COLTURE DI CELLULE, PROCEDIMENTO PER LA PREPARAZIONE ED APPLICAZIONE.

CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente invenzione riguarda una nuova membrana zeolitica a struttura cristallina silicoalluminatica contenente metalli alcalini e/o alcalino-terrosi caratterizzata dal fatto che possiede una struttura autosupportata, spazi intercristallini, pori e cavità compresi tra 20 Å e 10 µm. I cristalli di zeolite di cui è composta detta membrana hanno dimensioni inferiori a 100 µm e sono privi di template oppure con template oppure calcinati. Le caratteristiche chimico-fisiche superficiali ed interne di detta membrana, con particolare riferimento al punto di carica zero (PZC), sono peculiari e modulabili, per trattamento con soluzioni acide o basiche, ioniche e/o organometalliche e/o specie funzionalizzanti, e la rendono ideale per l'applicazione oggetto dell'invenzione.

La presente invenzione riguarda inoltre il procedimento per la preparazione di tale membrana che si caratterizza per il fatto che i cristalli zeolitici (tal quali e/o ozonizzati e/o calcinati, puri e/o in miscela solida e/o pretrattati con opportuni reattivi e solventi e/o miscelati con specie organometalliche e/o inorganiche) sono disposti in modo da formare uno strato e sono sottoposti ad una pressione maggiore almeno di 2 Kg/cm² e ad un vuoto inferiore a 20 mm Hg. Il procedimento può comportare la ripetizione dello stadio di preparazione al fine di ottenere una membrana di buona qualità.

La membrana zeolitica è indissolubile e non disaggregabile per contatto od immersione in solventi polari o non polari, nonché in soluzioni tampone.

La membrana oggetto della presente invenzione, per le sue caratteristiche antimicrobiche e/o antimicotiche, è adatta ad essere impiegata quale eccellente supporto per la coltura di un singolo tipo o di varietà di tipi di cellule procariotiche e/o eucariotiche, animali e/o vegetali, aerobiche e/o anaerobiche, differenziate e/o indifferenziate e/o modificate.

Essa è adatta ad essere usata in separazioni cellulari e/o in applicazioni speciali che riguardano l'impiego di membrane o film come biomateriali da innesto per tessuti, organi e apparati e/o carrier per l'introduzione di cellule particolari all'interno

dell'organismo. Questa membrana zeolitica è inoltre utilizzabile nei bioreattori ed in tutti i processi di trasformazione in continuo e/o ciclici per una durata praticamente illimitata.

Ancora più in particolare il campo della presente invenzione riguarda membrane zeolitiche per colture cellulari concernenti membrane zeolitiche cristalline del tipo MFI, FAU, BEA, LTA, MEL e MOR.

Quanto sopra rappresenta sommariamente il campo di utilizzazione industriale dell'invenzione, campo che però non costituisce limitazione dell'ambito della stessa, in quanto la membrana zeolitica ed il procedimento in oggetto, in particolare come in seguito descritti e rivendicati, possono essere vantaggiosamente impiegati in qualsiasi altro campo equivalente, nel quale si usi una membrana zeolitica per far aderire, crescere, differenziare e separare cellule somministrando, eventualmente, molecole biologicamente attive quali acidi nucleici e/o aminoacidi e/o proteine e/o enzimi e/o farmaci e/o fattori di accrescimento e/o vitamine e/o ormoni e/o acidi grassi o fosfolipidi, singolarmente o in miscela e/o ioni nella fase di ancoraggio o nelle fasi successive e/o per consentire la rimozione di farmaci e/o molecole indesiderate e/o ioni e/o inquinanti per mezzo della membrana realizzata in qualsiasi forma.

STATO DELL'ARTE

Le membrane zeolitiche sono formate da cristalli intercresciuti di dimensioni comprese nell'intervallo di qualche nanometro fino ad alcune centinaia di micron, ottenuti a partire da materiali commerciali ed un supporto permanente, generalmente inorganico, che serve a tenere insieme i piccoli cristalli permettendogli di svilupparsi vicini.

Le zeoliti sono silico-alluminati idrati contenenti generalmente metalli alcalini o alcalino-terrosi, quali sodio, potassio o calcio. Tali materiali sono caratterizzati dall'avere un reticolo contenente pori e canali all'interno dei quali i cationi (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , ecc.) sono debolmente legati alla struttura cristallina per mezzo di interazioni elettrostatiche e quindi facilmente scambiabili con altri ioni positivi, presenti in soluzione. Le peculiari caratteristiche delle zeoliti sono alla base del loro largo impiego come setacci molecolari, come catalizzatori industriali per conversioni di idrocarburi, come scambiatori ionici e come adsorbenti di impurezze ed inquinanti. Le zeoliti sintetiche ricoprono un ruolo di primaria importanza perché sintetizzate in strutture altamente pure e dotate di grande stabilità che le rendono idonee ad applicazioni in

processi che prevedono temperature elevate non adatte a materiali quali, per esempio i materiali polimerici.

Le zeoliti includono strutture con una composizione chimica variabile per la possibile inclusione di alluminio o etero-atomi quali boro, germanio, gallio, ecc. Zeoliti di tipo MFI, o denominate ZSM-5 (se preparate in presenza di alluminio coordinato all'intelaiatura cristallina) sono ad esempio descritte nei brevetti USA 3.702.886 e 3.790.471 e possono essere facilmente identificate per mezzo di diffrazione a raggi X. Uno spettro caratteristico è mostrato per esempio nel brevetto 3.790.471 alla fine della colonna 2 ed all'inizio della colonna 3.

Le membrane zeolitiche sono definite come membrane la cui selettività è attribuibile alla struttura zeolitica microporosa. Le membrane zeolitiche rappresentano materiali nei quali le sovraespresse caratteristiche delle strutture zeolitiche sono rafforzate da una configurazione a membrana rendendoli meglio adatti a processi di trasformazione da realizzare in continuo o a separazioni di miscele fluide.

La preparazione di membrane zeolitiche, è descritta in numerosi brevetti (come per esempio US 4.699.892, US 5.100.596, US 2008/0216650, US 2009/0029845, EP 041658, EP 041659, EP 0416660, WO 92/13631, WO 93/00155, WO 94/01209, US 7.119.245). Secondo la classificazione esposta nella review di Tavolaro e Drioli (A. Tavolaro and Drioli, Adv. Mater., 1999) esse possono essere raggruppate in auto-supportate, composite ed ibride (mixed matrix). I metodi di preparazione finora disponibili sono: idrotermale, VPT e per conversione dallo stato solido. Esistono poi sottoclassificazioni metodologiche come la cristallizzazione secondaria, il pore-plugging, la cristallizzazione in situ ed a microonde.

E' bene sottolineare che disporre di nuove membrane zeolitiche preparate con sistemi innovativi ed economici rivestirà importanza sempre crescente, considerando che la richiesta mondiale di membrane aumenterà dell'8,6 per anno e che il mercato commerciale per le membrane industriali raggiungerà i 10 bilioni di dollari nel 2012 (World Membrane Separation Technologies Market to 2012, Freedonia).

Inoltre, uno straordinario contributo allo sviluppo della ricerca biomedica è rappresentato da sistemi sperimentali semplificati di modelli biologici cellulari e subcellulari. Questi strumenti cellulari risultano attualmente insostituibili nel campo della ricerca di base ed applicata grazie al ruolo cruciale che essi rivestono; infatti,

vengono impegnati, da una parte, nella messa a punto delle procedure sperimentali per la rigenerazione di tessuti danneggiati e dall'altra nelle procedure dedicate alla manipolazione e allo sviluppo di nuove molecole terapeutiche permettendo la crescente sostituzione della costosa ed obsoleta sperimentazione su animali in vivo.

La coltura di cellule e tessuti di mammifero è ormai una tecnica assai utilizzata nella citologia, nella fisiopatologia e nella manipolazione genetica. La gamma dei tipi cellulari che oggi si possono far crescere in coltura, già molto ampia e comunque in rapida espansione, comprende cellule derivate da numerosi organi e tessuti - osso, cartilagine, fegato, polmoni, mammella, epidermide, vescica, rene, sistema nervoso, ipofisi - cellule staminali da embrioni e da tessuti adulti e da vari tipi di linee cellulari tumorali. Soltanto alcuni tipi di cellule, come i linfociti, possono crescere in sospensione, gli altri, detti "anchorage-dependent" hanno necessità di attaccarsi ad una superficie per crescere, come i fibroblasti, le cellule endoteliali e quelle epiteliali.

Le colture cellulari realizzate con l'uso di supporti sintetici sono forse il più promettente tra i modelli biologici, in quanto semplificati rispetto all'organismo in toto, ma in grado di simulare le funzioni che si riscontrano nell'organo in vivo. Questi sistemi sono altamente riproducibili, economicamente vantaggiosi ed oggetto di sperimentazioni sempre più numerose poiché offrono la possibilità di rigenerare tessuti differenti riducendo al tempo stesso la percentuale di rigetto ed aumentando la quantità di tessuto disponibile.

E' noto che sono oggi utilizzate membrane commerciali polimeriche piane per le colture cellulari e per l'ingegneria tissutale [J. Gerlach, K. Klopfer, H.H. Schauwecher, R. Tauber, C.H. Muller and E.S. Bucherl, Int. J. Art. Organs, 12, 788 (1989)].

E' noto inoltre che le proprietà chimico-fisiche e morfologiche della superficie del polimero (come l'idrofilicità, la composizione chimica, la carica superficiale, la porosità, la rigidità e la rugosità) influenzano fortemente l'ancoraggio delle cellule di mammifero e le loro funzioni [R. Singhwi, A. Kumar, G.P. Lopez, G.N. Stephanopoulos, D.I. Wang, D.I. Whitesides, D.E. Ingber, Science, 264, 696 (1994)]. L'adesione delle cellule alla superficie è un processo che si verifica secondo due stadi successivi e consiste nell'ancoraggio iniziale seguito dallo spreading delle cellule [F.Grinnell, "Cellular adhesiveness and extracellular substrata", Int. Rev. Cytology, 53, 65 (1978)]. Il primo stadio è caratterizzato da interazioni deboli che provocano piccole

variazioni della morfologia cellulare, mentre forti interazioni si verificano nel secondo stadio. I movimenti delle cellule e dei loro componenti cellulari che si verificano dopo l'adesione dipendono dall'ambiente cellulare e ricordano quelli delle amebe con formazione di pseudopodi.

Polimeri come il polistirene, il polipropilene, il polisulfone, l'acido polilattico, il caprolattone sono stati largamente utilizzati cercando di sviluppare materiali caratterizzati da una grande area superficiale e da un possibile controllo dell'ambiente di crescita allo scopo di sviluppare nuovi sistemi per produzione su larga scala [US 5.512.474]. Tra i sistemi riportati nella più recente letteratura ci sono fibre di non-tessuto [come descritto da J. Aigner et al., "Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester", J. Biomed. Mater. Res., 42, 172 (1998); G.S. Bhat, "Nonwovens as three-dimensional textiles for composites", Mater. Manuf. Process, 10, 67 (1995); S.R. Bhatarai et al. "Novel biodegradable electrospun membrane: scaffold for tissue engineering", Biomaterials, 25, 2595 (2004)] o microfibrille piane polimeriche [US 2007/0238167] e supporti tridimensionali per migliorare il differenziamento cellulare [Gong et al., US 2009/0068739 A1]. L'idea di poter utilizzare superfici zeolitiche per supporto di colture cellulari è stata suggerita nel WO 2009/005745. E' bene sottolineare, tuttavia, che in tale brevetto: a) la membrana preparata è una membrana composita quindi non autosupportata; b) la membrana zeolitica è realizzata con sintesi idrotermale.

Le caratteristiche chimico-fisiche delle membrane, usate come supporto per la coltura di cellule anchorage-dependent, sono di estrema importanza poiché esse influiscono direttamente sull'interazione che si può instaurare tra la fase solida e la cellula. In particolare, la reattività chimica dei gruppi ossidrilici superficiali (acidità di Bronsted), la co-presenza di gruppi vicinali acidi e basici (acidità di Bronsted e di Lewis), la reattività di gruppi bifunzionali, la distribuzione delle cariche elettriche, il PZC, l'idrofilicità, la distribuzione dei pori, la permeabilità all'ossigeno, le proprietà adsorbimenti e desorbenti nonché la geometria della membrana svolgono un ruolo di fondamentale importanza nel determinare la biocompatibilità e la funzionalità di una membrana.

Le membrane e gli scaffold usati per le colture cellulari, note dalla letteratura libera e brevettuale, sono in gran parte membrane polimeriche e presentano numerosi problemi

applicativi. In particolare, la natura chimica dei materiali risulta poco adatta a trattamenti lunghi o ripetuti poiché le condizioni chimico-fisiche utilizzate per le colture cellulari ne provocano la rapida degradazione e/o trasformazione rendendoli così non più riutilizzabili.

Inoltre, i materiali polimerici usati sono notoriamente molto sensibili, sia alla presenza di batteri, sia di funghi che generalmente aderiscono ad essi e si sviluppano più velocemente delle cellule della coltura. Tali colture necessitano, pertanto, oltre che dell'aggiunta di opportune sostanze chimiche (come ad esempio antibiotici ed antimicotici), di trattamenti molto complessi e costosi e di ambienti chimici controllati al fine di garantirne la sterilità. E' noto, infine, che le membrane polimeriche piane simmetriche presentano una scarsa porosità quindi una piccola superficie disponibile per l'attacco cellulare.

Benché oggi siano note membrane polimeriche piane o tubolari asimmetriche che presentano una maggiore porosità ed un'alta area superficiale, esse sono sempre preparate a partire da una soluzione polimerica posta in contatto con un sistema liquido non-solvente per il polimero, ma miscibile con il solvente usato a formare la soluzione polimerica. Tutte le strutture di queste membrane sono quindi prodotte da trattamenti diffusivi di tipo fisico e presentano una superficie disponibile all'adesione delle cellule caratterizzata da una scarsa variabilità chimica e quindi da un'omogeneità di reattività nelle tre dimensioni. Infatti, il procedimento di preparazione comporta l'estrazione del solvente da parte del non-solvente che diffonde dal basso verso l'alto fino a raggiungere lo strato superiore della membrana. Tale procedimento comporta la formazione di strati a concentrazione gradualmente variabili fino al raggiungimento di un valore critico che provoca lo smiscelamento delle due soluzioni liquide: una che attraverso un meccanismo di gelificazione provoca la formazione dello strato poroso ed un'altra, a bassa concentrazione di polimero, che origina le cavità presenti nella struttura interna della membrana.

Al contrario, le membrane zeolitiche, pur avendo caratteristiche chimico-fisiche superficiali quali l'idrofilicità ed il PZC, che sono peculiari e modulabili al momento della sintesi, non sono state finora valorizzate in colture cellulari. Infatti, l'applicabilità di tali membrane, sfruttata soprattutto per separazioni gassose, liquide o vapori e per

reazioni chimiche, è stata sempre individuata nella selettività dovuta alle caratteristiche proprie del sistema di canali zeolitici, più che nelle sue proprietà di superficie.

Inoltre, tutti gli esempi di membrane zeolitiche auto-supportate sono estremamente fragili ed inadatte alle applicazioni di laboratorio e/o industriali. Esse hanno spessori cristallini disomogenei e sono sempre preparate per mezzo di metodi idrotermali.

I metodi di preparazione delle membrane zeolitiche, finora riportati, comportano costi elevati causati dalla necessità di sintesi ad alta temperatura, di lunghi tempi di preparazione, di costosi templanti e/o di reattivi per la funzionalizzazione dei semi cristallini e/o di supporti a porosità controllata. Tali svantaggi di preparazione sono aggravati dalle inevitabili ripetizioni cicliche delle reazioni o dai pre-trattamenti o dai post-trattamenti per l'eliminazione di difetti di formazione.

E' noto, infine, che fra i problemi principali che ancora ostacolano la coltivazione massiva di cellule di mammifero su scaffold e membrane vi sono gli elevati costi, dovuti agli indispensabili e continui controlli di qualità, causati dall'estrema sensibilità di queste cellule alle impurezze dell'acqua.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

La presente invenzione ha lo scopo di fornire una nuova membrana zeolitica a struttura cristallina silicoalluminatica contenente metalli alcalini e/o alcalino-terrosi adatta ad essere impiegata per colture cellulari. La presente invenzione riguarda inoltre il procedimento per la preparazione di tale membrana e la sua applicazione nelle colture cellulari. Questa nuova membrana zeolitica supera gli svantaggi, già menzionati, delle membrane finora utilizzate, realizzando una membrana zeolitica che, non solo mantiene un costo limitato, ma, allo stesso tempo, esalta e migliora le prestazioni chimiche e fisiologiche delle membrane già descritte nello stato dell'arte. I controlli effettuati sulla vitalità delle cellule adese al materiale oggetto del brevetto hanno evidenziato un'eccellente vitalità, nonché la capacità di offrire ottimi e numerosi siti di attacco e di penetrazione cellulare all'interno della membrana solida.

Questa membrana zeolitica è utilizzabile nei bioreattori ed in tutti i processi di trasformazione in continuo e/o ciclici per una durata praticamente illimitata. Inoltre gli eventuali difetti di formazione o l'eventuale creazione di mesopori, macropori o fessurazioni all'atto della preparazione e/o in un tempo successivo non provocano una

brusca diminuzione dell'applicabilità delle membrane, ma, al contrario, sono stati appositamente realizzati per aumentare i siti di interazione con il materiale biologico.

Un ulteriore scopo di detta invenzione è quello di ottenere scaffold a membrana inorganica cristallina per colture cellulari e separazioni così da ottenere un maggiore controllo delle interazioni ed una maggiore efficienza di lavoro.

La membrana zeolitica qui realizzata consente, inoltre, l'estrazione selettiva di sostanze indesiderate (come ioni e molecole inquinanti, tossiche e velenose) ed è largamente applicabile all'allontanamento di cataboliti e/o di sostanze prodotte in reazioni di equilibrio favorendo il metabolismo cellulare. Inoltre esse sono selettive al passaggio di molecole caratterizzate da piccoli valori di diametro cinetico quale, ad esempio, l'ammoniaca, l'urea o la creatinina prodotta nei processi metabolici.

La membrana zeolitica oggetto di tale brevetto è, inoltre, facilmente trasformabile in un supporto solido dalle eccellenti caratteristiche antimicrobiche e/o antimicotiche per semplice trattamento con rame o argento, per esempio. Essa inoltre reagisce facilmente con sostanze usate comunemente quali farmaci nel trattamento di tumori (come i composti organometallici di platino o palladio, ad esempio, o i sali di metalli di transizione) permettendo una diretta somministrazione alle cellule in coltura.

La funzionalizzazione dei materiali preparati, cioè la reazione con opportuni reattivi, permette inoltre di variare e di aumentare il grado ed il tipo di interazione con le molecole di interesse biologico, utili per migliorare la selettività di adesione, di crescita, di differenziamento e di separazione.

Questi ed altri scopi sono raggiunti, secondo l'invenzione, dalla membrana zeolitica che é caratterizzata dall'avere una superficie cristallina porosa, di essere silicoalluminatica e di avere una carico di rottura maggiore di $4,75 \text{ Kg/cm}^2$ per spessori di membrana maggiori di 50 micron. Al tempo stesso, il procedimento qui descritto migliora largamente le complesse metodologie utilizzate per preparare le membrane zeolitiche autosupportate.

Riassumendo, in particolare tale membrana zeolitica è dotata di:

grande stabilità all'ambiente acquoso, indipendentemente dalla forza ionica e dal pH;

capacità di adsorbire gli inquinanti del mezzo utilizzato per la coltura;

capacità di scambio ionico utile per sequestrare ioni tossici e/ molecole indesiderate;

proprietà antimicrobiche ed antimicotiche;

capacità di immobilizzazione e rilascio di molecole necessarie all'adesione e/o alla crescita e/o al differenziamento, nonché di farmaci;

proprietà morfologiche, strutturali e chimico-fisiche che promuovono l'adesione, la crescita ed il differenziamento cellulare e permettono la modulazione di fattori di crescita, citochine e metaboliti per dirigere il differenziamento di cellule capostipite;

facile preparazione dei manufatti secondo dimensioni e spessori maneggevoli per i controlli di laboratorio necessari.

In considerazione dell'importanza che rivestono tali materiali è evidente la necessità di sviluppare una membrana zeolitica utile a tale scopo. Naturalmente, affinché la membrana zeolitica qui descritta possa essere facilmente commercializzata, occorre che sia preparata a partire da prodotti commerciali puri, per mezzo di una facile procedura di preparazione caratterizzata da una facile processabilità a livello industriale e da una bassa spesa di produzione.

DESCRIZIONE ALCUNE FORME DI ATTUAZIONE DELL'INVENZIONE

La membrana zeolitica, a struttura cristallina silicoalluminatica contenente metalli alcalini e/o alcalino-terrosi, oggetto dell'invenzione, è preparata con cristalli zeolitici di dimensioni inferiori a 100 μm , privi di template oppure con template oppure calcinati. Essa è caratterizzata dal fatto che possiede una struttura autosupportata, spazi intercristallini, pori e cavità compresi tra 20 Å e 10 μm ed è realizzata in differenti morfologie (piane, tubolari e multiformi) aventi superfici e volumi a partire da alcuni millimetri. Tale materiale, inoltre, può essere preparato così da ottenere caratteristiche chimico-fisiche adatte al tipo di cellule utilizzato. In particolare, è possibile produrre una membrana dotata di un'area superficiale totale estremamente elevata, di un opportuno carattere idrofilico o idrofobico, PZC e di un'adatta carica superficiale al fine di esaltarne le capacità interattive.

La presente invenzione riguarda una membrana zeolitica ottenuta a partire da nanocristalli o microcristalli sintetici calcinati, a struttura zeolitica pura MFI, MOR, MEL, LTA, BEA e FAU. Tali strutture potranno essere isomorficamente sostituite per mezzo di B, V, Fe, Ti, In, Ge, Ga, Cr, Co, Cu, Mn, Sn, P, Se, e W, singolarmente o in miscela tra loro. Inoltre i cristalli potranno essere tal quali (cioè ottenuti da sintesi diretta con molecole organiche templanti) o calcinati o macinati o contenuti metalli di transizione come Ag, Au, Cu, Rh, Ru, Ir, Fe, Co, Cr, Cd, Zn e Sc, introdotti per scambio

ionico. Infine, i cristalli e la membrana potranno essere impregnati o adsorbiti o scambiati ionicamente o legati a complessi di metalli di transizione e/o composti organometallici, mercaptani, polialcoli, fosfati, acido boronico, molecole funzionalizzanti, nonché molecole biologicamente attive quali acidi nucleici, aminoacidi, proteine, enzimi, farmaci, fattori di accrescimento, vitamine, ormoni, acidi grassi o fosfolipidi, singolarmente o in miscela, oltre che cellule isolate, microorganismi, batteri, funghi e liposomi.

La presente invenzione sarà ora meglio illustrata sulla base di esempi.

Esempio 1: La membrana zeolitica oggetto della presente invenzione viene preparata a partire da cristalli a struttura MEL ottenuti da sintesi idrotermale in ambiente alcalino. I cristalli di zeolite a struttura MEL sono disposti a formare uno strato omogeneo che viene sottoposto ad una pressione di formatura di circa 25 Kg/cm^2 in un adatto dispositivo. Nello stesso tempo è applicato un vuoto per un tempo maggiore di 3 minuti. La membrana così ottenuta appare integra, priva di fessurazioni e maneggiabile. L'analisi spettroscopica a Raggi X su polveri consente di evidenziare la presenza di una membrana zeolitica a struttura pura.

Esempio 2: La membrana zeolitica oggetto della presente invenzione viene preparata a partire da nanocristalli a struttura MEL ottenuti da sintesi idrotermale in ambiente alcalino. I cristalli di zeolite a struttura MEL vengono macinati fino ad ottenere un miscuglio omogeneo che viene sottoposto ad una pressione di formatura di circa 25 Kg/cm^2 in un adatto dispositivo. A trattamento compiuto la membrana appare integra, priva di fessurazioni e maneggiabile. L'analisi spettroscopica a Raggi X su polveri consente di evidenziare la presenza di una membrana zeolitica a struttura pura.

Esempio 3: Cristalli zeolitici a struttura MOR vengono macinati fino ad ottenere un miscuglio omogeneo che viene sottoposto ad una pressione di formatura di circa 2 Kg/cm^2 in un adatto dispositivo. A trattamento compiuto la membrana zeolitica appare integra, priva di fessurazioni e maneggiabile. L'analisi spettroscopica a Raggi X su polveri consente di evidenziare la presenza di un film a struttura pura.

Esempio 4: I cristalli zeolitici a struttura MOR sono trattati secondo l'esempio 1 e ridotti in forma di membrana sottile. Successivamente, tale membrana viene ricoperta con cristalli di struttura MFI e sottoposta ad una pressione di 10 Kg/cm^2 ottenendo una membrana a struttura zeolitica composta dovuta alla sovrapposizione di strati puri

evidenziati dalla diffrazione a raggi X.

Esempio 5: Una membrana polimerica densa e piana di acido polilattico (indicato come PLA) viene inserita in un dispositivo in acciaio e viene ricoperta con una miscela cristallina zeolitica contenente silice amorfa. Si applica una pressione di 25 Kg/cm² quindi la membrana viene posta all'interno di un'autoclave di tipo Morey-modificata per una sintesi idrotermale di tipo a trasferimento di vapore per quattro giorni compresa tra 120 e 170 °C in atmosfera satura di vapore.

Esempio 6: La membrana zeolitica in configurazione di membrana piana viene realizzata secondo l'esempio 1, ma sovrapponendo due strati di cristalli di struttura MFI e/o MOR e/o LTA e/o FAU.

Esempio 7: La membrana zeolitica in configurazione di membrana piana viene realizzato secondo l'esempio 1, ma sovrapponendo molteplici strati di cristalli di struttura MFI e/o MOR e/o LTA e/o FAU.

Esempio 8: La membrana zeolitica in configurazione di membrana piana viene realizzata secondo l'esempio 1, utilizzando miscele cristalline zeolitiche e/o miscela di reazione disidratata e/o sali di metalli di transizione e/o lantanidi e/o attinidi e/o elementi del I° e II° gruppo, nonché silice amorfa e composti contenenti alogenuri e si applica una pressione di 25 Kg/cm²;

Esempio 9: La membrana zeolitica piana viene realizzata secondo l'esempio 1, utilizzando cristalli già sottoposti a trattamenti chimici quali scambio (con ioni metallici e/o anioni), riduzione in presenza di agenti riducenti (allo stato gassoso e/o in soluzione), impregnazione con soluzioni contenenti specie metalliche e/o specie organiche funzionalizzanti la superficie zeolitica, e/o proteine (per esempio, albumina), enzimi, farmaci, aminoacidi, molecole bifunzionali (idrofile/idrofobe);

Esempio 10: La membrana zeolitica piana è realizzata secondo l'esempio 1, utilizzando uno strato di polvere inorganica che è successivamente ricoperta con uno o più strati di cristalli zeolitici puri e/o in miscela secondo l'esempio 6 e 7.

La membrana zeolitica così ottenuta secondo la descrizione fatta in tutti gli esempi e soprattutto nell'esempio 2 si è rivelata un ambiente ottimale per le cellule isolate tale da garantirne l'ancoraggio, la crescita, il mantenimento della vitalità cellulare e la funzionalità metabolica. Infatti, il confronto dei parametri di controllo biologici tra la membrana oggetto dell'invenzione ed i supporti commerciali, generalmente utilizzati

per le colture cellulari, hanno evidenziato che la membrana zeolitica costituisce il miglior supporto biocompatibile al momento disponibile.

Le specifiche tecniche della presente invenzione sono qui descritte, fermo restando che esse non si limitano alle sottostanti descrizioni.

Secondo una forma di realizzazione preferita dell'invenzione, la membrana è formata di cristalli di Silicalite-2, e ancora più preferibilmente è una membrana piana di Silicalite-2 sostanzialmente pura in forma di disco dal diametro di 13 mm, spessore pari a 3 mm e porosità superiore al 50%.

I pori interni della membrana secondo l'invenzione hanno un diametro medio interno di qualche Å, mentre gli spazi, i pori e le cavità intercristalline hanno una dimensione compresa tra 20 Å e 10 micron. Tale membrana è caratterizzata da un SAR (rapporto silicio/alluminio) infinito, essendo una membrana di tipo silicico a struttura MEL.

La membrana conserva la struttura zeolitica propria dei cristalli di origine con un leggero aumento del point of zero charge (PZC) fino a 8,7 che viene determinato utilizzando sospensioni cristalline acquose contenenti percentuali in peso differenti (1%, 5%, 10% e 50%). La determinazione dell'acidità è sempre ripetuta dopo 24 ore al fine di controllare il pH delle sospensioni in condizioni di equilibrio. Il PZC di ogni membrana viene rigorosamente misurato al fine di controllare che non si siano create condizioni di acidità indesiderate e controproducenti per la crescita cellulare.

In particolare tale membrana, caratterizzata per mezzo della diffrazione a raggi X (XRD, Philips PW 1730/10 X-ray diffractometer using CuK α radiation), evidenzia un'elevata cristallinità, non inferiore al 95% della cristallinità dei cristalli utilizzati, ed una conservazione della struttura zeolitica senza alcuna evidenza di formazione di fasi amorfe o altre strutture cristalline.

I rapporti atomici, controllati per mezzo della microanalisi (EDX), evidenziano invarianza rispetto ai cristalli originali con un rapporto Si/Na pari a 4,66. L'analisi effettuata al microscopio ottico rivela una superficie nanocristallina uniforme che è confermata dall'analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM, Cambridge Instrument 360). Nanocristalli, dalla morfologia uniforme e dalle dimensioni di pochi nanometri sono interconnessi a formare una superficie omogenea. Le misure di permeabilità gassosa, effettuata utilizzando gas puri, hanno evidenziato l'avvenuta formazione di una membrana zeolitica ad alto flusso e permeabilità costante nel tempo.

Secondo una forma di realizzazione preferita dell'invenzione, la preparazione della membrana zeolitica viene preferibilmente eseguita a partire da cristalli zeolitici sintetici. In particolare il procedimento si caratterizza per il fatto che i cristalli zeolitici calcinati, puri aventi dimensioni nanometriche, struttura pura, framework microporoso, sono sottoposti ad una pressione maggiore di 1 atm, cosicché sono posti ad intimo contatto tra loro. Alla fine di tale procedimento i cristalli zeolitici sono uniti a formare una membrana dalla costituzione chimica omogenea, di spessore e forma desiderata, facilmente maneggiabile, indissolubile e non disgregabile per contatto od immersione in solventi polari o non polari, puri o contenuti ioni, nonché in soluzioni tampone.

L'applicazione della membrana oggetto dell'invenzione riguarda il suo impiego per la coltura di cellule differenziate e/o indifferenziate e/o modificate e/o utilizzate in separazioni cellulari e/o in bioreattori e/o come biomateriali da innesto. In particolare, l'applicazione viene descritta per fibroblasti umani e per cellule endoteliali umane fetali. Il ceppo di fibroblasti utilizzato è l'NHDF proveniente da feto umano e acquistato dalla I.C.T.C. di Genova. Le cellule sono mantenute nel terreno completo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) arricchito al 10% (v/v) di FCS (fetal calf serum), penicillina (50 UI/mL), streptomycin (50 mg/mL), L-glutamina (2 mM) e piruvato di sodio (1 mM). Le cellule sono state coltivate in un incubatore ad atmosfera di aria umidificata a 37°C, e con il 5% di CO₂.

Le cellule sono state contate (camera contaglobuli o cell counter) e piastrate ad una concentrazione finale di 4×10^3 cellule/mm² sugli scaffold zeolitici. Il materiale è stato mantenuto in piastre multiwell da quattro alloggiamenti per utilizzarli al tempo stesso per il controllo, per le osservazioni della morfologia e della vitalità al microscopio ottico a fluorescenza e per lo studio al SEM.

Ogni 48 ore è stata controllata la vitalità cellulare.

Il mezzo di coltura è stato eliminato e sostituito con mezzo fresco ogni volta che l'indicatore ne segnalava il consumo. L'indicatore è stato usato o meno a seconda del metodo ottico usato successivamente per i dosaggi.

Le linee primarie di cellule endoteliali HUVEC, (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) che abbiamo utilizzato sono prodotte dalla collaborazione di tre entità genovesi: (1) il reparto di Ostetricia e Ginecologia di San Martino, (2) la struttura complessa di Oncologia Molecolare dell'IST (3) la Banca Cellule IST, *core facility*.

Le colture primarie di cellule endoteliali sono state saggiate fino al 7° passaggio di coltura per essere certi che la senescenza cellulare non possa interferire con i risultati della ricerca e che sia garantita la riproducibilità dei risultati. Le cellule sono state espanse con divisioni 1:2 o 1:3 quando raggiungevano almeno l'80% di confluenza. Le cellule sono state coltivate in un incubatore umidificato a 37°C, e con il 5% di CO₂.

Ad ogni millilitro di sospensione sono state aggiunti 5 ml di terreno di coltura completo e con indicatore. La sospensione cellulare è stata centrifugata e il pellet è stato nuovamente sospeso nello stesso terreno. Le cellule sono state contate (camera contaglobuli o cell counter) e piastrate ad una concentrazione finale di 150.000 cellule/3 ml terreno sugli scaffold zeolitici.

Valutazione della densità di popolazione cellulare attraverso la microscopia a fluorescenza (test dell'arancio di acridina).

Tutte le cellule in coltura sono state colorate con l'arancio di acridina in PBS per valutarne la vitalità cellulare. La conta è stata realizzata su una media di nove quadrati della camera di Bürker. Le cellule di colore verde, in cui il colorante non è riuscito a legarsi agli acidi nucleici danneggiati conferendo ai nuclei e/o al citoplasma il colore arancione, sono quelle vive e con il DNA integro.

Determinazione della vitalità cellulare valutata come attività mitocondriale mediante analisi spettrofotometrica (MTT test).

La vitalità cellulare valutata come attività mitocondriale è stata quantificata misurando l'attività deidrogenasica delle cellule in coltura, utilizzando il saggio dell'1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan (MTT). Il saggio è basato sulla capacità delle cellule vive di convertire il composto MTT solubile nel sale insolubile formazano. La quantità di formazano prodotto è stata considerata proporzionale al numero di cellule vive.

In particolare per ogni campione di cellule seminate su materiale zeolitico le cellule sono state incubate in 1 mL di soluzione di MTT (0.5 mg/mL) per 1 ora. In seguito, il mezzo è stato rimosso e le cellule sono state trattate con 1 mL di dimetilsolfossido (DMSO) per solubilizzare il sale di formazano. L'analisi spettrofotometrica è stata effettuata a 540 nm allo scopo di evidenziare la banda di assorbimento caratteristica.

Osservazione dei campioni.

Le osservazioni morfologiche, istologiche e strutturali di tutti i campioni zeolitici e cellulari, sono state effettuate prima delle semine e dopo la crescita ai tempi stabiliti. Sono stati utilizzati un fotomicroscopio Zeiss a contrasto di fase e con polarizzatore e, un fotomicroscopio rovesciato a fluorescenza Olympus e un microscopio FESEM.

I campioni preparati per l'osservazione al SEM sono stati fissati in una soluzione al 3% di gluteraldeide in tampone cacodilato a pH 7,4, post-fissati in una soluzione all'1% di tetrossido di osmio, progressivamente disidratati in etanolo, essiccati in Critycal point dryer e ricoperti con un sottile strato di oro.

La membrana zeolitica a struttura cristallina silicoalluminatica contenente metalli alcalini e/o alcalino-terrosi, biocompatibile e realizzabile in svariate forme e spessori, qui descritta, si è dimostrata un ottimo supporto inorganico per l'adesione e la crescita di svariati tipi cellulari così da costituire un'opportunità unica, non solo nel campo relativo alla medicina dei trapianti, alla ricerca biotecnologica ed alla patofisiologia, ma anche in quello relativo alla comprensione dei normali processi fisiologici. Il procedimento oggetto dell'invenzione è semplice, economico ed innovativo. Infatti, le membrane zeolitiche finora riportate sono strutture cristalline formate da cristalli intercresciuti di dimensioni comprese da qualche nanometro fino ad alcune centinaia di micron. Esse sono ottenute a partire da materiali commerciali e da un supporto, generalmente inorganico, che serve a tenere insieme i piccoli cristalli permettendogli di svilupparsi e cristallizzare vicini. La loro preparazione, spesso idrotermale, è lunga e complessa e può richiedere l'uso di molecole costose come templanti o molecole bifunzionali (per la sintesi secondaria), nonché lunghi tempi di reazione o il riscaldamento ad alte temperature (per la sintesi in situ). Le alte prestazioni possibili sono poi facilmente annullate dalla presenza di difetti di formazione e costose preparazioni e pre-trattamenti o post-trattamenti le rendono, di fatto, scarsamente applicabili a processi industriali su larga scala.

Al contrario, nel rapido ed economico procedimento qui descritto, i difetti di formazione e la creazione di mesopori, macropori o fessurazioni all'atto della preparazione e/o in un tempo successivo non provocano una brusca diminuzione dell'applicabilità delle membrane, ma sono stati appositamente realizzati per aumentare i siti di interazione con il materiale biologico.

La membrana zeolitica oggetto dell'invenzione, dalle peculiari caratteristiche chimico-fisiche, offre l'opportunità di somministrare direttamente molecole reattive (quali proteine, enzimi e/o farmaci) alle cellule in coltura garantendone la biostabilità e l'integrità.

In tale invenzione sono sfruttate le peculiari caratteristiche di scambio-ionico delle zeoliti, che includono strutture con una composizione chimica variabile per la possibile inclusione di alluminio o etero-atomi (quali boro, germanio, gallio, etc.), alla base del loro largo impiego come setacci molecolari, come catalizzatori industriali per conversioni di idrocarburi, come scambiatori ionici, come adsorbenti di impurezze ed inquinanti.

I controlli effettuati sulla morfologia, sull'integrità e sull'ancoraggio delle cellule adese al materiale oggetto del brevetto hanno evidenziato un eccellente sviluppo cellulare, nonché un'eccellente vitalità cellulare dimostrando che la nuova membrana ha la capacità, non solo di promuovere la crescita cellulare, ma di migliorare la biocompatibilità del sistema.

Questa membrana zeolitica, dalle caratteristiche antimicrobiche e/o antimicotiche, per semplice trattamento con rame o argento, è utilizzabile nei bioreattori ed in tutti i processi di trasformazione in continuo e/o ciclici per una durata praticamente illimitata. Essa inoltre adsorbe facilmente sostanze usate comunemente quali farmaci nel trattamento di tumori (come i composti organometallici di platino o palladio, ad esempio, o i sali di metalli di transizione) permettendo una diretta somministrazione alle cellule in coltura.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1. Microfotografia ottenute al microscopio elettronico a scansione relative alla superficie zeolitica a struttura MOR.

Figura 2. Microfotografia ottenute al microscopio elettronico a scansione ad effetto di campo relative alla superficie zeolitica a struttura MEL.

Figura 3. Microfotografia ottenute al microscopio elettronico a scansione relative alla sezione zeolitica a struttura MFI.

Figura 4. Microfotografia ottenute al microscopio elettronico a scansione relative alla sezione zeolitica a struttura MEL.

Figura 5. Diffrattogramma a raggi X relativo alla membrana zeolitica a struttura FAU preparata.

Figura 6. Microfotografia ottenute al microscopio elettronico a scansione relative alla superficie zeolitica a struttura FAU con fibroblasti in coltura adesi.

Figura 7. Microfotografia ottenute al microscopio elettronico a scansione relative alla sezione della membrana zeolitica a struttura MEL con fibroblasti in coltura adesi.

Figura 8. Microfotografia ottenute al microscopio elettronico a scansione relative alla superficie zeolitica a struttura MEL con fibroblasti in coltura adesi.

Figura 9. Microfotografia ottenute al microscopio elettronico a scansione relative alla sezione della membrana zeolitica a struttura MFI con fibroblasti in coltura adesi.

Figura 10. Microfotografia ottenute al microscopio elettronico a scansione relative alla superficie zeolitica a struttura MEL con cellule HUVEC adese.

Figura 11. Microfotografia a fluorescenza di fibroblasti con arancio di acridina dopo 5 giorni di coltura su Sil-2. (Magnification 40x).

Figura 12. Microfotografia a fluorescenza di fibroblasti con arancio di acridina dopo 3 giorni di coltura su mordenite. (Magnification 20x).

Figura 13. Analisi della vitalità cellulare in funzione del tempo di coltura.

Figura 14. Densità cellulare in funzione del tempo di coltura.

RIVENDICAZIONI

1. Membrana zeolitica per adesioni e colture di cellule contenente almeno uno strato zeolitico a struttura cristallina silicoalluminatica e metalli alcalini e/o alcalino-terrosi caratterizzata dal fatto che possiede una struttura autosupportata, spazi intercristallini, pori e cavità compresi tra 20 Å e 10 µm.
2. Procedimento per la preparazione di una membrana zeolitica per adesioni e colture di cellule secondo la rivendicazione precedente caratterizzato dal fatto che lo strato zeolitico a struttura cristallina silicoalluminatica è sottoposto ad una pressione maggiore di 2 Kg/cm².
3. Procedimento per la preparazione di una membrana zeolitica per adesioni e colture di cellule secondo la rivendicazione precedente caratterizzato dal fatto che lo strato zeolitico a struttura cristallina silicoalluminatica è sottoposto ad un vuoto inferiore a 20 mm Hg.
4. Procedimento per la preparazione di una membrana secondo la rivendicazione 2 o 3 caratterizzato dal fatto che i cristalli usati per formare lo strato zeolitico a struttura cristallina silicoalluminatica contengono templete e che sono ozonizzati o calcinati fino alla temperatura di 800 °C.
5. Uso della membrana zeolitica per adesioni e colture di cellule prodotta secondo un procedimento delle rivendicazioni da 2 a 4 caratterizzata dal fatto di consentire la coltura di un singolo tipo o di varietà di tipi di cellule procariotiche e/o eucariotiche, animali e/o vegetali, aerobiche e/o anaerobiche, differenziate e/o indifferenziate e/o modificate.

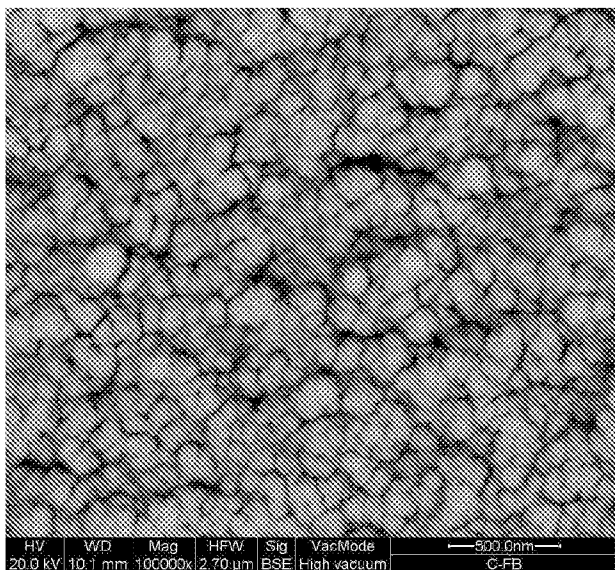


Figura 1.

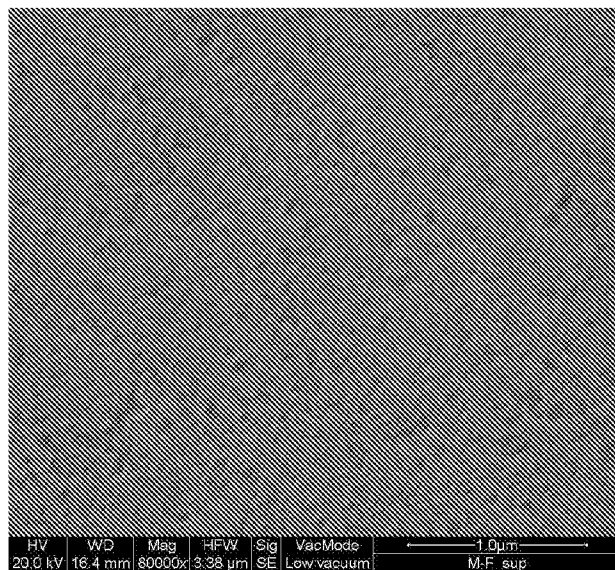


Figura 2.

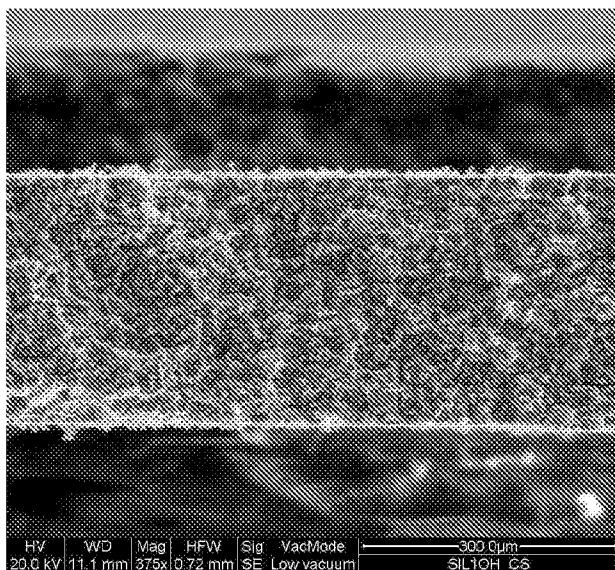


Figura 3.

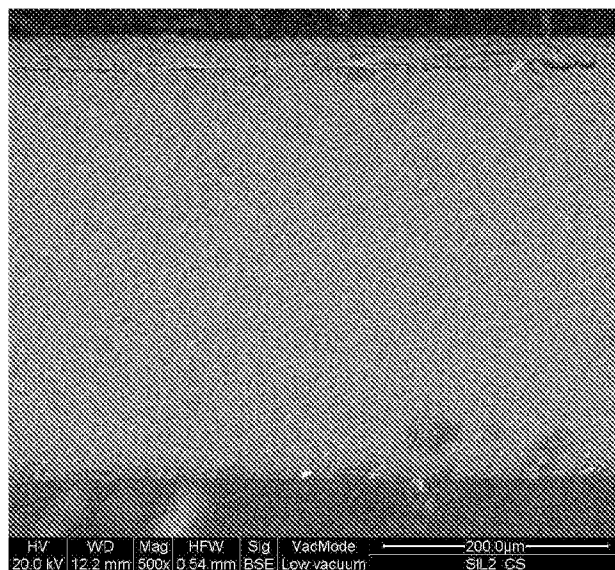


Figura 4.

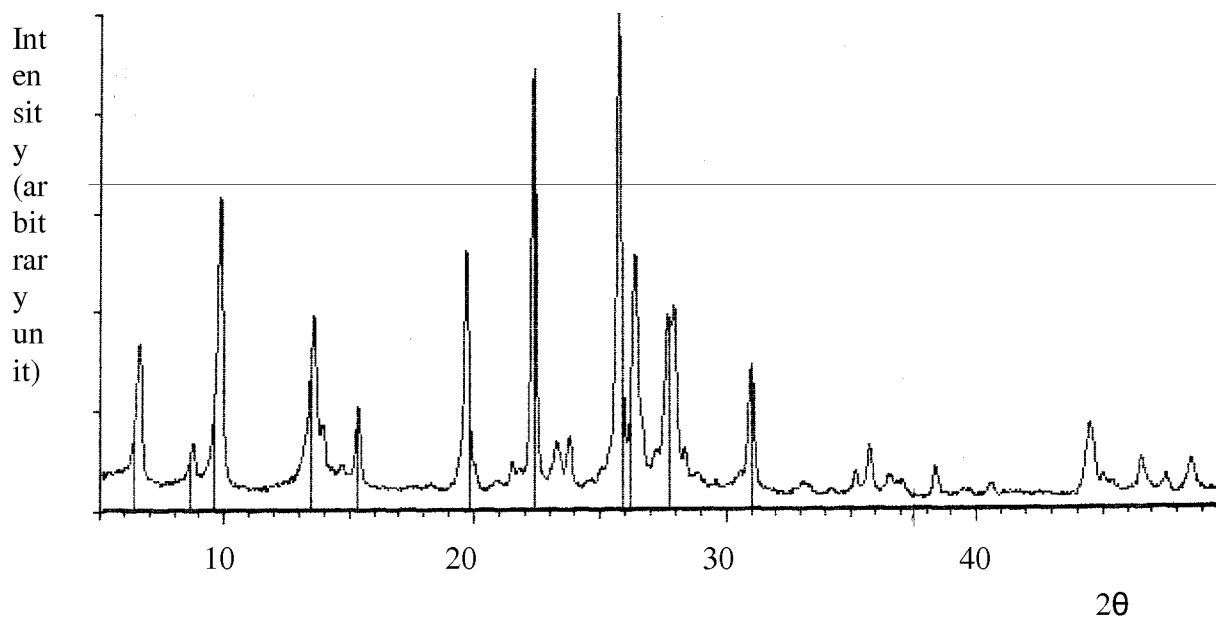


Figura 5.

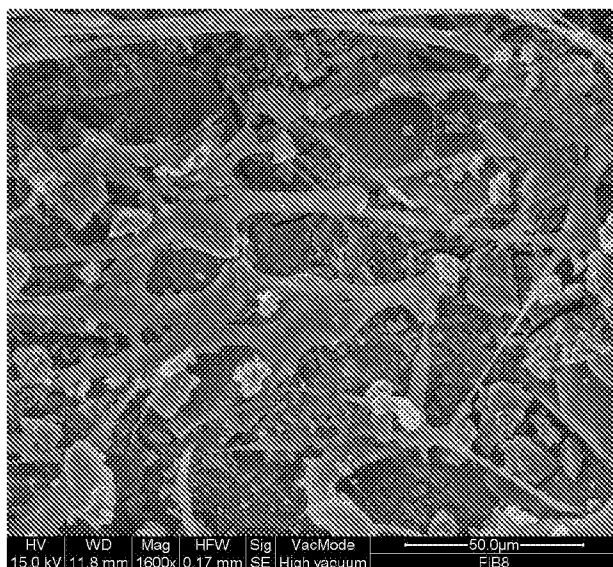


Figura 6

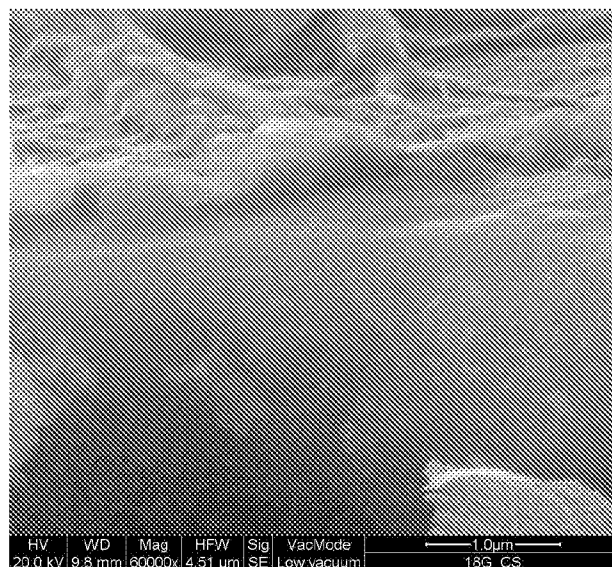


Figura 7.

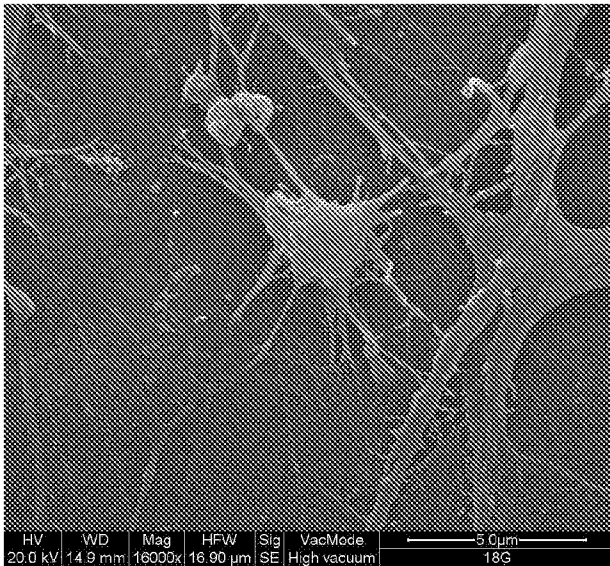


Figura 8

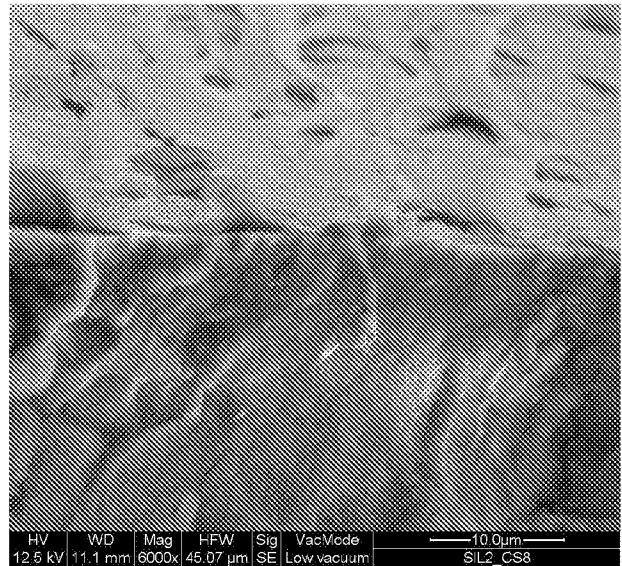


Figura 9.

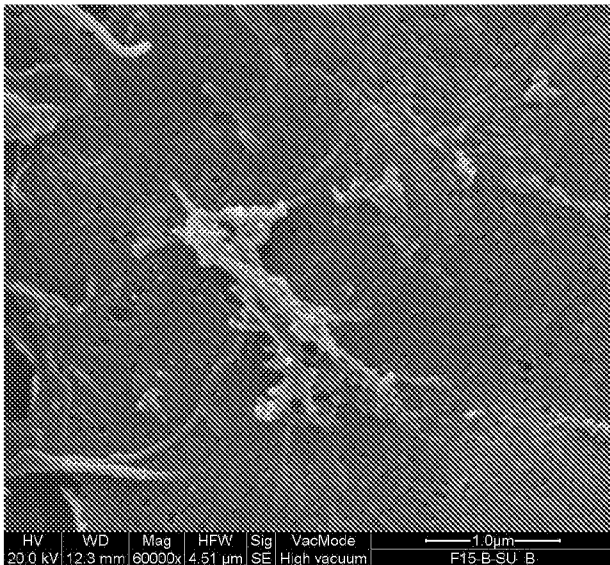


Figura 10.

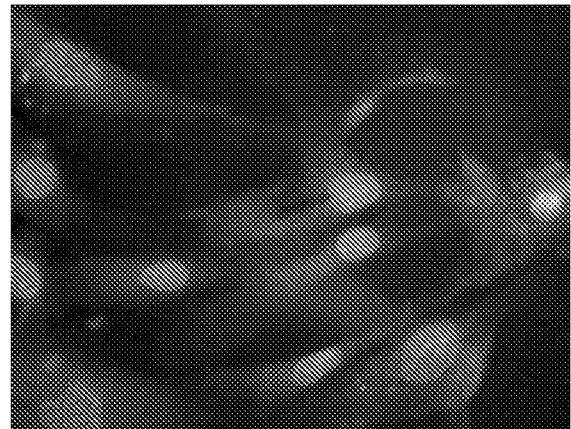


Figura 11.

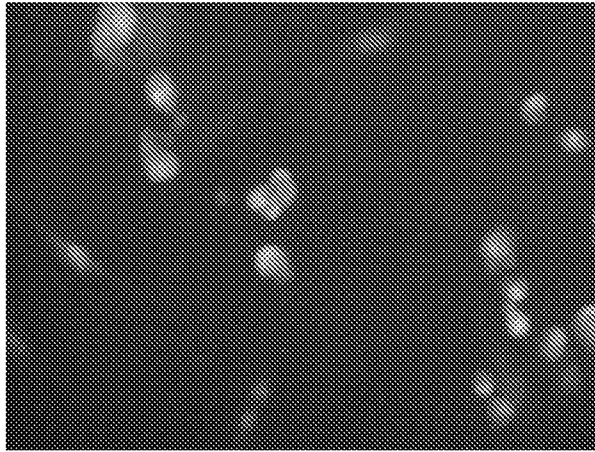


Figura 12

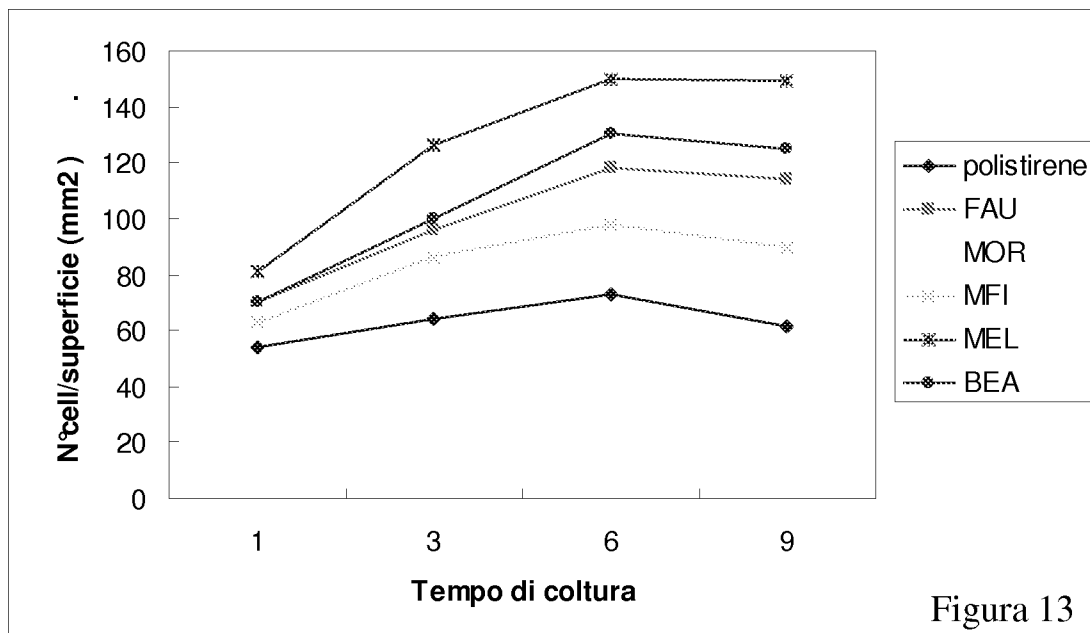


Figura 13

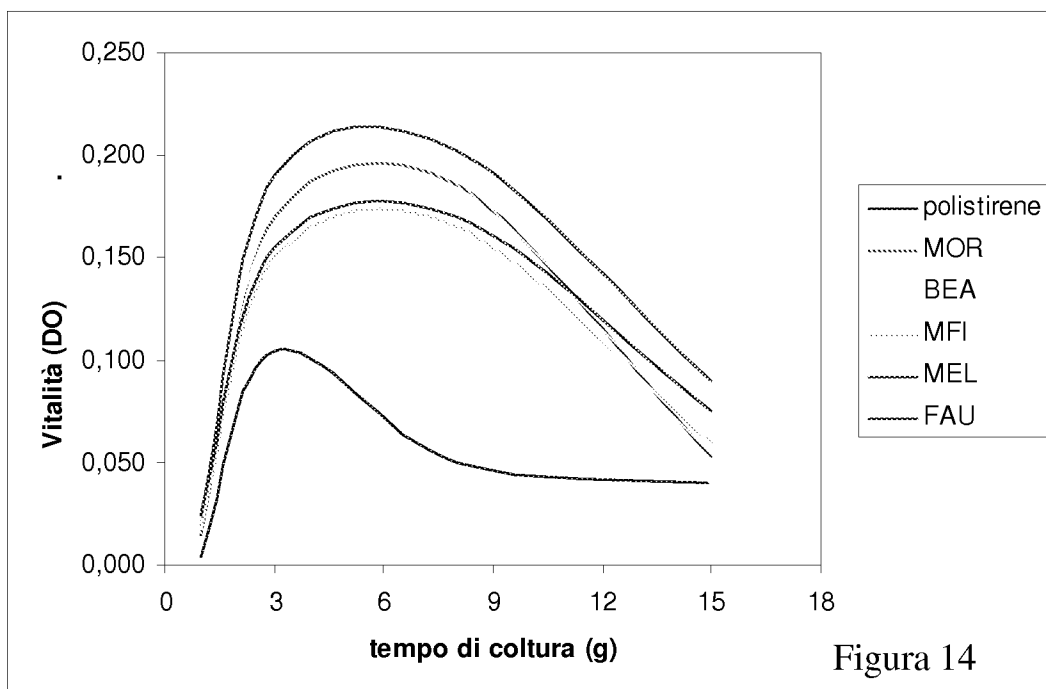


Figura 14