

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 791**

51 Int. Cl.:
A01N 33/12 (2006.01)
A01N 43/16 (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08747314 .6**
96 Fecha de presentación: **01.05.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2141988**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.01.2010**

54 Título: **Polímeros que tienen agentes antibióticos unidos covalentemente**

30 Prioridad:
03.05.2007 US 743815

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2012

73 Titular/es:
ETHICON, INC
U.S. ROUTE 22
SOMERVILLE, NJ 08876-0151, US

72 Inventor/es:
LIU, Hongbo y
MING, Xintian

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 376 791 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polímeros que tienen agentes antibióticos unidos covalentemente

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una composición antimicrobiana que comprende celulosa oxidada regenerada (ORC) que tiene gentamicina unida covalentemente, que puede usarse en solitario o en combinación con dispositivos médicos.

Antecedentes de la invención

10 Cuando se usa un dispositivo médico en un entorno quirúrgico, se crea un riesgo de infección. El riesgo de infección aumenta espectacularmente para dispositivos médicos invasivos o implantables, tales como catéteres intravenosos, injertos arteriales, derivaciones intratecales o intracerebrales y dispositivos protésicos, que crean un portal de entrada para patógenos mientras están en íntimo contacto con tejidos y fluidos corporales. La aparición de infecciones del sitio quirúrgico está asociada con frecuencia con bacterias que colonizan el dispositivo médico. Por ejemplo, durante un procedimiento quirúrgico, las bacterias de la atmósfera circundante pueden entrar en el sitio quirúrgico y unirse al dispositivo médico. Las bacterias pueden usar el dispositivo médico implantado como vía hacia el tejido circundante. Dicha colonización bacteriana en el dispositivo médico puede conducir a infección y morbilidad y mortalidad en el paciente.

15 Se han desarrollado varios procedimientos para reducir el riesgo de infección asociado con dispositivos médicos invasivos o implantables, que incorporan agentes antimicrobianos en los dispositivos médicos. Dichos dispositivos proporcionan de forma deseable niveles eficaces de agente antimicrobiano mientras se está usando el dispositivo. Por ejemplo, los dispositivos médicos pueden contener antibióticos tales como antibióticos β -lactámicos, polipéptidos y quinolonas. Sin embargo, los dispositivos médicos que contienen un antibiótico pueden experimentar una pérdida de eficacia como resultado de la liberación gradual del antibiótico y, por consiguiente, producir una concentración subletal de dicho antibiótico. Esta concentración subletal de antibiótico seleccionaría bacterias resistentes a antibióticos. Por ejemplo, aunque se sabe que los antibióticos β -lactámicos son eficaces frente a *S. aureus*, la especie bacteriana que se cree que es la causa más común de infecciones quirúrgicas, estos antibióticos son ineficaces frente a bacterias resistentes a antibióticos tales como MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a metilicina) y MRSE (*Staphylococcus epidermidis* resistente a metilicina).

20 Una solución potencial a este problema es usar una combinación de antibióticos y sustrato polimérico para inmovilizar los antibióticos. En particular, es beneficioso si el sustrato polimérico está unido covalentemente con el agente antibiótico.

25 El documento US20050192547A1 desveló una estrategia para preparar artículos médicos que contienen un polímero antiinfeccioso por tratamiento de los artículos médicos con una solución mixta de antibióticos y antisépticos. Las actividades antimicrobianas se demostraron por experimentos de zona de inhibición (ZOI). Por combinación de diversos antibióticos y antisépticos puede conseguirse la inhibición de una variedad de bacterias. Sin embargo, la estrategia desvelada se basa únicamente en la absorción o deposición física de los agentes sobre los artículos médicos. Es evidente que la actividad proporcionada es a corto plazo debido a la ausencia del enlace covalente entre el dispositivo y los antibióticos. Además, esta estrategia puede registrar el riesgo potencial de seleccionar bacterias resistentes a antibióticos.

30 El documento WO2005016972 A1 describe materiales poliméricos antimicrobianos que comprenden un polímero unido a un resto cargado positivamente mediante un grupo carboxilo, y los procedimientos para la producción de dichos compuestos antimicrobianos y usos de los mismos. De nuevo, la liberación de antibióticos no está inmovilizada debido a la ausencia de enlace covalente.

35 El documento US-A-4810567 describe una amplia clase de telas antimicrobianas producidas por copolimerización de injertos de un monómero de vinilo funcionalizado sobre una tela de base, seguida de la reacción del grupo funcional del copolímero de injerto, o algún derivado del mismo, con otro grupo funcional de un reactivo antimicrobiano con formación de un enlace covalente. El D1 no desvela ni ORC ni gentamicina.

El documento FR-A-2342740 muestra una variedad de materiales poliméricos injertados con antimicrobianos. Sin embargo, no desvela ORC como sustrato ni gentamicina como antimicrobiano.

40 El documento WO2007/014087 describe composiciones antimicrobianas que comprenden (a) un compuesto de amonio policuaternario polimérico antimicrobiano; y (b) un metal antimicrobiano, tal como plata.

El documento GB-A-2404920 describe una variedad de compuestos poliméricos antimicrobianos que comprenden un compuesto antimicrobiano de amonio cuaternario unido covalentemente a un soporte polimérico.

El documento EP-A-1424086 describe vendajes de heridas hemostáticos que contienen un polisacárido modificado con aldehído y agentes hemostáticos.

El documento WO-A-9015628 describe una amplia variedad de conjugados de polímero-antibiótico en los que el polímero está unido covalentemente al antibiótico. Los conjugados son composiciones solubles inyectables producidas por conjugación del antibiótico con un polímero soluble tal como polialcalenglicol.

5 C. Cera y col. en International Journal of Biological Macromolecules vol. 10(2), 1988, páginas 66-74 describen conjugados de polisacáridos solubles con antibióticos de antraciclina para investigar la acción de las antraciclinas como fármacos anticancerosos.

10 Deng y col. en Journal of West China University of Medical Sciences Vol. 24(1), 1993, páginas 101-103 describen un procedimiento de inmunoensayo. En una etapa del procedimiento el analito (gentamicina) se inmoviliza sobre celulosa microcristalina por reacción con 1,1'-carbonyldiimidazol (CDI) para formar un enlace de uretano entre la celulosa y la gentamicina.

Existe la necesidad de polisacáridos que tengan agentes antibióticos unidos covalentemente que presenten una eficacia antimicrobiana mantenida y a largo plazo.

Sumario de la invención

15 La presente invención proporciona una composición antimicrobiana que comprende: una celulosa oxidada regenerada (ORC) unida covalentemente con gentamicina por medio de un enlace amida formado entre una funcionalidad ácido carboxílico de la ORC y una funcionalidad amina de la gentamicina.

Breve descripción de las figuras

- 20 Figura 1. Estructura de la gentamicina.
 Figura 2. Unión covalente de la gentamicina a ORC.
 Figura 3. Comparación de FT-IR de ORC tratada y sin tratar y gentamicina.
 Figura 4. Unión covalente de ONAMER® M a ORC.
 Figura 5. Comparación de FT-IR de ORC tratada y sin tratar con ONAMER® M.

Descripción detallada

25 La presente invención proporciona una composición antimicrobiana que comprende un polisacárido unido covalentemente con gentamicina, en la que el polisacárido es celulosa oxidada regenerada (ORC). El complejo comprende típicamente del 0,1% en peso al 20% en peso de la gentamicina

La invención proporciona una forma de inmovilización de antibióticos eficaz para prevenir la colonización de microorganismos en dispositivos médicos. En el caso de la ORC con gentamicina inmovilizada covalentemente, puede prepararse un material altamente bactericida.

30 La celulosa oxidada se produce por la oxidación de celulosa, por ejemplo, con tetraóxido de dinitrógeno. Este procedimiento convierte grupos alcohol primarios en los restos de sacáridos en un grupo ácido carboxílico, formando restos de ácido urónico dentro de la cadena de celulosa. La celulosa oxidada preferida, la celulosa oxidada regenerada (ORC) se prepara por oxidación de una celulosa regenerada, tal como rayón. Durante cierto tiempo se ha sabido que la ORC tiene propiedades hemostáticas. La ORC ha estado disponible como un producto hemostático
 35 denominado SURGICEL (Marca comercial registrada de Johnson & Johnson Medical, Inc.) desde 1950. Este producto se produce por la oxidación de un material de rayón tejido.

De acuerdo con la presente invención, la gentamicina se va a inmovilizar por formación de un enlace químico covalente sobre un dispositivo para conseguir actividad antimicrobiana de una forma bien definida como se muestra en la Figura 2.

40 La unión covalente se realiza de forma que las actividades antimicrobianas de la gentamicina se mantengan eficaces a pesar de la formación de un enlace químico. La eficacia de esta estrategia se demostró por unión covalente de gentamicina sobre celulosa oxidada regenerada (ORC). Se confirmó la actividad antimicrobiana de dicha ORC modificada. La inmovilización covalente de antibiótico proporciona una forma de minimizar la resistencia de bacterias frente al agente y una actividad más duradera en comparación con sus formas libres.

45 La ORC con gentamicina unida covalentemente ha demostrado actividades antimicrobianas significativamente mejoradas frente a una amplia variedad de bacterias. La gentamicina se unió covalentemente al ácido carboxílico de la ORC por reacción de acoplamiento de carbodiimida. Se observó que las actividades antimicrobianas de dicha ORC tratada eran mayores y más duraderas en comparación con la ORC tratada solamente con una solución de gentamicina sin reacción química.

50 La gentamicina se unió covalentemente a la ORC a través de una reacción de acoplamiento de carbodiimida. El producto se lavó exhaustivamente antes de someterse a ensayos de actividad antimicrobiana. La carga de gentamicina sobre la ORC se estimó a ~12%. La ORC tratada mostró la pérdida de funcionalidad ácido carboxílico y una funcionalidad amida recién formada como se puso de manifiesto por análisis de FT-IR.

La ORC-gentamicina unida covalentemente inmovilizada recién formada (ORC-GM-CVB) demuestra una eficacia antimicrobiana *in vitro* significativa. Como se describe en los ejemplos a continuación, el ensayo de reducción logarítmica mostró de 2 a 5 órdenes de magnitud de reducción en los recuentos bacterianos. La ORC sin tratar no mostró ninguna reducción en los recuentos bacterianos en la misma condición.

- 5 La composición antimicrobiana puede usarse para formar un artículo o una porción del artículo, por ejemplo, por centrifugación, moldeo, fundido o extrusión.

La composición antimicrobiana puede utilizarse para fabricar un dispositivo médico incluyendo, pero sin limitación, una fibra, malla, polvo, microesferas, escamas, esponja, espuma, tela, no tejida, esterilla tejida, una película, dispositivo de anclaje de sutura, sutura, grapa, tachuelas quirúrgicas, pinzas, placas y tornillos, dispositivo de administración de fármacos, barrera de prevención de la adhesión y adhesivo tisular.

10 El dispositivo médico puede estar compuesto por la composición antimicrobiana de la presente invención, en solitario o en la combinación con otros componentes poliméricos.

Aunque los ejemplos siguientes demuestran ciertas realizaciones de la invención, no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención, sino más bien como contribuyentes a una descripción completa de la invención.

15

Ejemplo 1 (Inventivo) Preparación de compuesto de ORC-Gentamicina (ORC-GM-CVB)

Materiales

Todos los materiales se adquirieron en Sigma-Aldrich y se usaron como se recibieron con la excepción de una tela de celulosa oxidada regenerada (ORC), que está disponible en Ethicon, Inc., bajo el nombre comercial Interceed®. La gentamicina se adquirió en forma de sulfato en Sigma-Aldrich como mezclas de análogos, como se muestra en la Figura 1.

20

Procedimiento

La síntesis se resume en la Figura 2.

La tela de ORC se cortó en tiras de 2,54 cm (1") que pesaban 0,25 g. La tira de ORC cortada se secó al vacío a temperatura ambiente durante una noche. La tira de ORC seca se puso en una solución de gentamicina (5 ml) en un vial de 20 ml. Se añadieron 0,080 g de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y el vial de reacción se selló en atmósfera de N₂. El vial de reacción se dejó en un agitador a temperatura ambiente durante una noche.

25

La tela de ORC se recuperó de la mezcla de reacción, se aclaró con agua desionizada (DI) corriente abundante, se sumergió en 50 ml de agua DI durante 30 min y 50 ml de metanol durante 30 min en un agitador. La tela de ORC tratada se secó al vacío durante 2 h. Se obtuvieron 0,28 g de tela de ORC tratada coloreada ligeramente amarilla. Se usó FT-IR para comparar las muestras de ORC tratada y sin tratar.

30

En la Figura 3, las señales de FT-IR a 3383 cm⁻¹ (protón de ácido carboxílico) y 1728 cm⁻¹ (carbonilo de ácido carboxílico) para la ORC sin tratar indicaban la presencia de funcionalidades ácido carboxílico libres. Después de la reacción química de la ORC con gentamicina las señales a 3383 cm⁻¹ y 1728 cm⁻¹ desaparecían, mientras que aparecía una nueva señal a 1595 cm⁻¹ que es un indicio del enlace amida recién formado entre la funcionalidad ácido carboxílico de la ORC y la funcionalidad amina de la gentamicina.

35

La observación anterior verificó la unión covalente con éxito de la gentamicina a la ORC.

Ejemplo 2 (Inventivo)

El estudio siguiente se realizó para demostrar que la gentamicina unida covalentemente mantenía la eficacia antibacteriana (tabla 1).

40

Se usaron dos muestras para el estudio, de la forma siguiente:

1. Tela de ORC sin tratar.
2. ORC-GM-CVB: Tela de ORC con gentamicina unida covalentemente preparada de acuerdo con el ejemplo 1.

Para el resultado de la tabla 1, los artículos de ensayo se ensayaron para determinar su eficacia *in vitro* por ensayo de reducción logarítmica. Para demostrar la eficacia de la GM unida covalentemente, los artículos de ensayo se extrajeron en solución salina para eliminar la gentamicina libre antes del uso. Los artículos de ensayo eran cuadrados de aproximadamente 4,0 mg/trozo y se extrajeron en 40 ml/artículo de solución salina estéril a 37°C con agitación (100 rpm) durante 1 hora dos veces consecutivas. La eficacia de los artículos de ensayo después de las extracciones se evaluó por ensayo de reducción logarítmica.

45

En el ensayo de reducción logarítmica, los artículos de ensayo se expusieron a aproximadamente 1-2 x 10⁴ UFC

50

de bacterias en la superficie de los artículos de ensayo durante una hora. Para facilitar el ensayo de eficacia en la superficie de los artículos de ensayo con gentamicina unida covalentemente, el inóculo se administró en 10 ul/artículo, el pequeño volumen respecto a los artículos de ensayo permitió una absorción completa del inóculo por los artículos de ensayo, de modo que el inóculo se localizó en las superficies de los artículos de ensayo. El inóculo se preparó en tampón fosfato potásico 20x, que mantenía el pH de los artículos de ensayo próximo al neutro. La eficacia antimicrobiana de la ORC se minimizará a pH neutro, de modo que la reducción logarítmica indicaría la eficacia antibacteriana de la gentamicina más que de la ORC. Después de la exposición, el artículo de ensayo se sumergió en solución salina con agitación para retirar las bacterias supervivientes, y las bacterias supervivientes se midieron por recuento en placa. Los recuentos en placa se realizaron con agar tripticasa soja y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Los datos de la Tabla 1 mostraban que la ORC con gentamicina unida covalentemente (ORC-GM-CVB) demostraba una buena eficacia *in vitro* de reducción logarítmica de 2,8 después de dos extracciones consecutivas, mientras que la tela de ORC sin tratar no mostraba reducción logarítmica en la misma condición de ensayo. Este resultado indicaba que la gentamicina estaba unida covalentemente a tela de ORC y mantiene su eficacia antibacteriana.

Tabla 1. Eficacia de ORC con gentamicina unida covalentemente (ORC-GM-CVB)

Muestra	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	log UFC	reducción logarítmica*	log UFC	reducción logarítmica*
Inóculo	4,1	n/a	4,2	n/a
Control de ORC	4,1	0	4,2	0
ORC-GM-CVB	1,8	2,3	1,4	2,8

* reducción logarítmica = log UFC inóculo - log UFC muestra tratada

Ejemplo 3 (Comparativo) Unión covalente de ONAMER® M a ORC

Materiales

Todos los materiales a menos que se especifique otra cosa se adquirieron en Sigma-Aldrich y se usaron como se recibieron. El ONAMER® M (POLYQUATERNIUM 1) se adquirió en Stephen Company, Maywood, NJ (lote nº 5572-c) como una solución acuosa al 32% y se usó como se recibió. La tela de celulosa oxidada regenerada (ORC) se obtuvo en Ethicon, Inc., bajo el nombre comercial Interceed®.

Procedimiento

La síntesis se resume en la Figura 4.

La tela de ORC se cortó en tiras de 2,54 cm (1") que pesaban 0,25 g. La tira de ORC cortada se secó al vacío a temperatura ambiente durante una noche.

La tira de ORC seca se puso en una solución de ONAMER® M (40 ml) en 100 ml de RBF. Se mezclaron 0,32g de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) con 5 ml de agua y se añadieron gota a gota a la mezcla de reacción mediante una pipeta de vidrio. La mezcla de reacción se protegió con N₂ y se dejó en un agitador a temperatura ambiente durante una noche.

El trozo de ORC se recuperó de la mezcla de reacción, se aclaró con agua DI corriente abundante, se sumergió en 150 ml de agua en un vaso de precipitados durante 30 min y 100 ml de metanol durante 30 min con agitación. La tela de ORC tratada se secó al vacío durante 2 h.

Se obtuvieron 1,07 g de ORC tratada coloreada ligeramente amarilla después del secado. La cantidad de ONAMER® M (ONM) unido covalentemente a la ORC es de aproximadamente el 7%. Se usó FT-IR para comparar muestras de ORC tratada y sin tratar.

En la Figura 5, los datos de FT-IR confirmaron la formación del enlace covalente entre la ORC y el ONM según se indicó por la señal a 1603 cm⁻¹.

Ejemplo 4 (Comparativo)

El estudio siguiente demuestra que el ONAMER® M (ONM) unido covalentemente a ORC perdía la eficacia antibacteriana (Tabla 2). La muestra de ONM unido covalentemente a ORC (ORC-ONM-CV) del ejemplo 3 se ensayó para determinar su eficacia *in vitro* mediante ensayo de reducción logarítmica. En el ensayo de reducción logarítmica, los artículos de ensayo (cuadrados de aproximadamente 4,0 mg/trozo) se expusieron a

aproximadamente $1-2 \times 10^4$ UFC de bacterias en la superficie de los artículos de ensayo durante una hora. Para facilitar el ensayo de eficacia en la superficie de los artículos de ensayo con ONM unido covalentemente, el inóculo se administró en $10 \mu\text{l}$ /artículo, el pequeño volumen respecto a los artículos de ensayo permitió una absorción completa del inóculo por los artículos de ensayo, de modo que el inóculo se localizó en las superficies de los artículos de ensayo. El inóculo se preparó en tampón fosfato potásico 20x, que mantenía el pH de los artículos de ensayo próximo al neutro. La eficacia antimicrobiana de la ORC se minimizará a pH neutro, de modo que la reducción logarítmica indicaría la eficacia antibacteriana del ONM más que de la ORC. Después de la exposición, el artículo de ensayo se sumergió en solución salina con agitación para retirar las bacterias supervivientes, y las bacterias supervivientes se midieron por recuento en placa. Los recuentos en placa se realizaron con agar tripticasa soja y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se incluyó un control positivo de ONM en este ensayo para demostrar que el ONM en forma libre tiene eficacia frente a las bacterias de exposición.

Tabla 2. Eficacia de la ORC con ONAMER® M (ONM) unido covalentemente

Muestra	S. aureus ATCC 6538	
	log UFC	reducción logarítmica*
Inóculo	4,5	n/a
ORC	4,5	0
ORC-ONM-CV (560 ug de ONM unido a ORC)	4,5	0
Control de ONM (100 ug de ONM en forma libre en disco de papel)	0,3	4,2

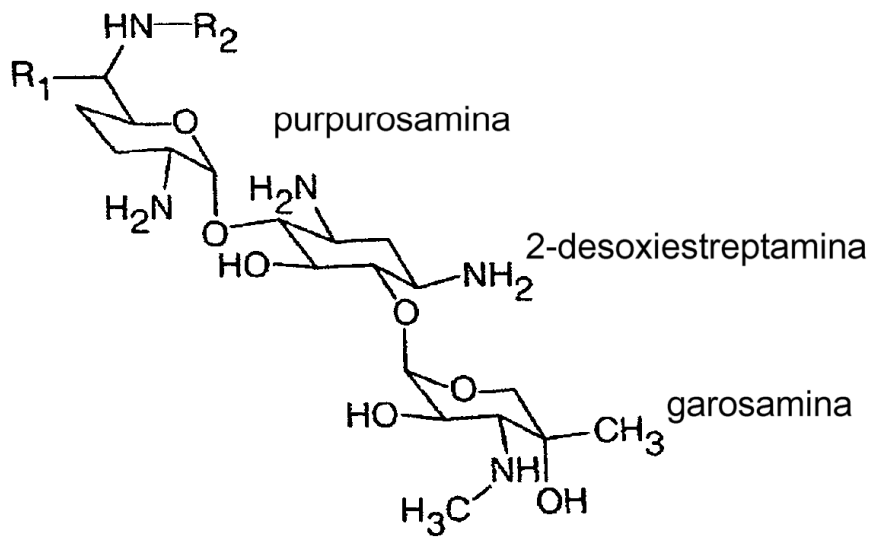
* reducción logarítmica = log UFC de inóculo - log UFC de tratada (las tres muestras debajo del inóculo)

REIVINDICACIONES

1. Una composición antimicrobiana que comprende: una celulosa oxidada regenerada (ORC) unida covalentemente con gentamicina por medio de un enlace amida formado entre una funcionalidad ácido carboxílico de la ORC y una funcionalidad amina de la gentamicina.

FIG. 1

Estructura de gentamicina



Gentamicina	C_1	$R_1 = R_2 = \text{CH}_3$
Gentamicina	C_2	$R_1 = \text{CH}_3, R_2 = \text{H}$
Gentamicina	C_{1a}	$R_1 = R_2 = \text{H}$

FIG. 2

Unión covalente de gentamicina a ORC

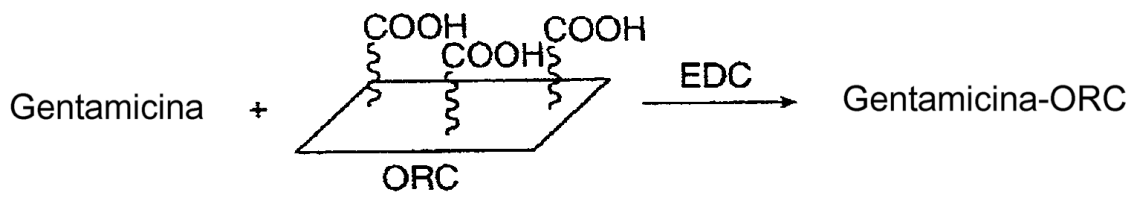


FIG. 3

Comparación de FT-IR de ORC tratada y sin tratar y gentamicina

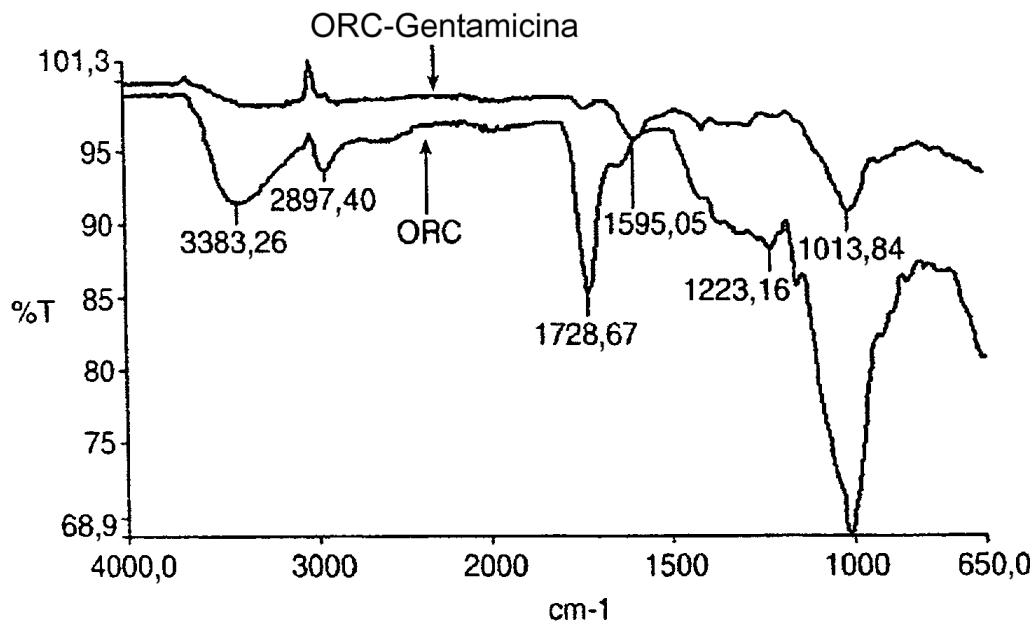


FIG. 4

Unión covalente de ONAMER® M a ORC

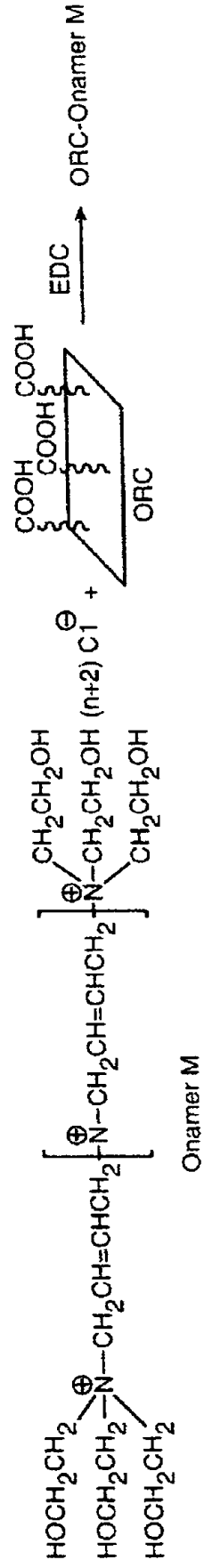


FIG. 5

Comparación de FT-IR de ORC tratada y sin tratar con ONAMER® M

