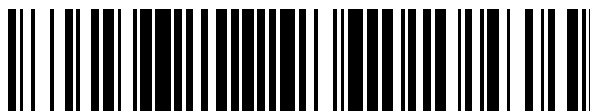


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 619**

51 Int. Cl.:
A61L 15/32 (2006.01)
A61L 15/28 (2006.01)
A61L 15/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **10171066 .3**
96 Fecha de presentación: **28.07.2010**
97 Número de publicación de la solicitud: **2279762**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.02.2011**

54 Título: **Aminoglucósidos pregelatinizados conjugados, de manera covalente, con algodón**

30 Prioridad:
30.07.2009 IT MI20091380

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.10.2012

73 Titular/es:
FRANZONI FILATI S.P.A. (100.0%)
Piazza Vittoria 9
25122 Brescia, IT

72 Inventor/es:
FRANZONI, MARIA GRAZIA;
VOLPATO, IVO y
BIZZINI, BERNARD

74 Agente/Representante:
RUO, Alessandro

ES 2 389 619 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

Aminoglucósidos pregelatinizados conjugados, de manera covalente, con algodón

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a fibras, hilos o tejidos de algodón, cuya superficie se conjuga, de manera covalente, con aminoglucósidos pregelatinizados, para su uso en el vendaje de lesiones en la piel.

10 Técnica anterior

[0002] Las lesiones en la piel son alteraciones en el exterior del cuerpo humano o animal, y pueden ser de diferentes tipos. El primer tipo son las heridas, un término que generalmente significa laceraciones de la piel producidas por factores externos, tales como, traumatismo o cirugía. Incluso las quemaduras, aunque no necesariamente incurriendo en laceraciones en la piel, están producidas por sucesos externos. Por otra parte, las heridas crónicas son el resultado del funcionamiento alterado de la piel o de partes internas del cuerpo. Estas incluyen, por ejemplo, estasis o úlceras decúbito, úlceras, úlceras diabéticas, flebitis, flebitis varicosa y trombosis periférica. En este texto, la expresión "lesiones en la piel" significa todos los tipos de alteraciones mencionados anteriormente.

[0003] Las posibles enfermedades y los mecanismos de restauración relacionados con estas alteraciones varía de acuerdo con el tipo de lesión.

[0004] Las heridas se caracterizan por procesos inmunodefensivos, coagulativos y restauradores con funcionalidad normal, tiempos de restauración del daño relativamente cortos y un riesgo de medio a alto de contaminación microbiana. Las lesiones crónicas y las quemaduras se caracterizan generalmente por una mala oxigenación del área perjudicada, por problemas circulatorios y vasculares, por la presencia de necrosis tisular y de depósitos fibróticos-queratinocíticos y, en úlceras diabéticas, por un metabolismo reparador disfuncional, alteraciones del tejido nervioso periférico y un riesgo muy elevado de infecciones complicadas por la posible formación de focos anaerobios. En el tratamiento de enfermedades relacionadas con lesiones en la piel deben tenerse en cuenta los problemas mencionados anteriormente y por tanto los medios de tratamiento deben ser capaces de realizar una diversidad de funciones, incluyendo proporcionar una barrera protectora adecuada contra infecciones, permitiendo una oxigenación adecuada de los tejidos implicados y dando soporte al vendaje con medios terapéuticos apropiados y eficaces (es decir normocoagulantes o factores que promueven la revascularización del área tratada, conocidos en el campo médico como compuestos neoangiogénicos, etc.).

[0005] Algunos medios de tratamiento de heridas conocidos conducen a problemas o pueden ser incluso contraproducentes.

[0006] Por ejemplo, el uso de geles y pomadas debe observarse como un paliativo, ya que la típica capa lipídica de estas formas farmacéuticas, además de reducir significativamente la oxigenación del sitio, pueden contribuir a la formación de focos anaerobios con un riesgo de infecciones graves.

[0007] El uso tópico de antibióticos, para la prevención de infecciones, puede reducir el funcionamiento del sistema reticuloendotelial subcutáneo y por tanto deteriorar la capacidad de defensa inmunitaria.

[0008] El uso de fármacos antiinflamatorios, particularmente esteroides, también se usa para mitigar el dolor durante la aplicación del vendaje, contrarrestando el proceso restaurador (neoangiogénesis reducida).

[0009] Debido a sus efectos citotóxicos, el uso frecuente de antisépticos, potencia el proceso necrotizante y antagoniza la actividad de macrófagos.

[0010] En el tratamiento de lesiones en la piel también se usan ampliamente medios protectores, tales como gasas, compresas, apósitos o tiritas formados por algodón natural y sustitutos o similares, posiblemente previamente esterilizados, siendo su principal fin proteger mecánicamente el área de la lesión y formar una barrera protectora contra infecciones.

[0011] Estos medios tampoco carecen de problemas potenciales.

[0012] En el primer caso, estos pueden actuar como un receptáculo para microorganismos que pueden transferirse fácilmente a la lesión mediante el exudado y cualquier sangre incompletamente coagulada. Mediante experimentación, se ha observado incluso (exponiéndolos a sitios contaminados, después de aplicación en placas de cultivo con agar) que estos medios pueden actuar como caldo de cultivo para los microorganismos.

[0013] Esto hace que sea necesario su cambio frecuente, que, debido a su capacidad para actuar como sustratos para la adhesión celular, los convierte en un medio capaz de promover la deposición de tejido necrótico. De nuevo, como resultado de su cambio frecuente, con la retirada simultánea de células que experimentan la restauración, hay

una sobreproducción de exudados que causan una reducción en la tensión transcutánea de oxígeno (PtcO₂) y disminución adicional de los mecanismos de restauración, aunque farmacológicamente promovidos.

5 **[0014]** Las consecuencias finales de estos procesos son un aumento en los fenómenos necrotizantes y/o defensas inmunitarias alteradas (debido al uso frecuente de antisépticos o antibióticos necesarios para la desinfección), producción de exudado aumentada y neoangiogénesis reducida.

10 **[0015]** Como conclusión, puede afirmarse que la frecuencia del cambio de vendaje, que en gran medida puede imputarse a las características de los medios de protección, incluso si se pre-esteriliza, no sólo supone una molestia considerable para el paciente sino que también es responsable de prolongar realmente el tiempo de curación.

[0016] Para superar estos problemas, se han propuesto protecciones "medicadas" es decir en forma de apósitos, gasas, compresas y similares, cuya superficie está funcionalizada con moléculas con actividad farmacológica.

15 **[0017]** La Solicitud de Patente EP 611,573 A2 describe la funcionalización de polímeros que contienen numerosos grupos hidroxilo libres, tales como celulosa, agarosa o alcohol polivinílico, con proteínas generalmente representadas por enzimas proteolíticas, tales como tripsina, quimotripsina, lisozima, colagenasa, albúmina e hialuronidasa, usadas para retirar pus y material necrótico (quimotripsina), para reducir la presencia de patógenos (lisozima) y para degradar colágeno para impedir la cicatrización irregular (colagenasa). Los polímeros, cuya
20 celulosa se prefiere, pueden estar en forma de polvo pero también de tejido adecuado para su uso como vendaje o similar para la protección de lesiones; la funcionalización tiene lugar después del tratamiento con compuestos N-heterocíclicos, para separar las cadenas poliméricas y facilitar la reacción entre los grupos amino proteína y grupos funcionales de la superficie de dichas cadenas.

25 **[0018]** La conjugación de polisacáridos con enzimas proteolíticas también se describe en la Solicitud de Patente CA 1217134 A1. De acuerdo con las enseñanzas de este documento, con la enzima se funcionalizan derivados de aldehído de dextrano o celulosa, en forma de esférulas más pequeñas que la mitad de un milímetro para poner a la enzima en contacto con la lesión y con los fluidos presentes en ella, evitando que penetre en la circulación impidiendo así efectos secundarios resultantes de las características antigénicas y pirogénicas de estas enzimas.
30 Adicionalmente, este procedimiento aumenta la estabilidad de las enzimas en presencia de líquidos.

[0019] Las sustancias capaces de proporcionar un sustrato para los procesos de neoangiogénesis incluyen proteínas y/o sus fragmentos peptídicos (véase, por ejemplo, el artículo de M.D. Caldwell et al., Progr. in Clin. and Biol. Res., 1991, 365, 205).
35

[0020] Un método para funcionalizar polímeros de tipo celulosa con proteínas es transformar parte de los grupos hidroxilo del polímero en grupos aldehído, y después utilizar la reacción de condensación entre grupos amino de la proteína y grupos carbonilo en el polímero, con la formación de grupos imina (conocidos también como bases de Schiff).
40

[0021] Sin embargo, la funcionalización de polímeros de polialdehído con proteínas se describe como (típicamente) incompleta por Margel et al. (J. Polym. Sci Chem., 1984, vigésimo segunda edición, 145) de acuerdo con lo cual, solo aproximadamente una fracción entre el 0,5% y el 10% de los grupos aldehído libres están implicados en la reacción. Los grupos aldehído residuales pueden reaccionar intramolecularmente con grupos amino de la proteína unida, reduciendo por tanto significativamente su actividad, como se describe en "Affinity separation with polyaldehyde microsphere beads", S. Margel, J. of Chromatography (1989) 462, páginas 177-189.
45

[0022] Una posible forma de bloquear grupos aldehído residuales, estabilizando al mismo tiempo dichas iminas, es mediante un tratamiento reductor. Sin embargo, los polímeros reducidos presentan una reducción significativa en cuanto a resistencia mecánica, mayor solubilidad en agua y, frecuentemente, una reducción significativa en cuanto a actividad de proteína, probablemente debido a la reducción de enlaces, tales como enlaces disulfuro, necesarios para la actividad natural de la proteína. (L. Peng et al., Appl. Biochem. Biotechnol., 1987, 14, 91).
50

[0023] Otra posible forma de incorporar péptidos bioactivos en polímeros (en este caso, fibras de algodón) para otorgar propiedades reparadoras y antimicrobianas a tejidos biomédicos se describe en "Synthesis and formulation of covalently and ionically bound peptide-cellulose conjugates", J. V. Edwards, Bioconjugate Chem., 2000, 17, 469. El método implica la pre-esterificación de celulosa con glicina o, como alternativa, lisina, histidina y arginina, como un engarce entre la celulosa y una enzima. Sin embargo, dada la labilidad del enlace éster entre el engarce y la celulosa, la enzima se libera fácilmente en el sitio de la lesión.
55

[0024] El uso de bases de Schiff reducidas para la conjugación de moléculas bioactivas con fibras de celulosa también se describe en "Immobilization of hyaluronate on cellulose fibres and its use for the isolation of cartilage components", D. L. Kalpaxis et al. Int J Biochem. (1985) 17 (1), 61-66. En este caso, el hialuronato se fija sobre un producto intermedio de celulosa derivatizado con ácido épsilon aminocaproico a través de un enlace estable (base de Schiff reducida), obteniendo un enlace amida entre el grupo amino de la proteína de proteoglicano y el grupo carboxilo del ácido caproico usando la técnica de carbodiimida. El método de bases de Schiff reducidas también se
60
65

usa en la Solicitud de Patente WO 2007/135548 A2, que describe un proceso industrial para funcionalizar hilos de celulosa con moléculas bioactivas usando plantas normales para tejidos matriz.

5 [0025] Finalmente, se conoce la funcionalización de polímeros (usada inmediatamente para la producción de apósitos, gasas o similares) con antibióticos. Estas moléculas pueden incidir en la síntesis de proteínas en microorganismos y con su función en la membrana celular, siendo por lo tanto capaces de desarrollar su función microbicida simplemente incluso a través del contacto con el microorganismo (véase el libro "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Goodman & Gilman, 8ª edición, 1990, 1098-1116).

10 [0026] La Solicitud de Patente internacional WO 90/15628 A1 considera el enlace covalente de uretano, éster o amida entre polímeros (prefiriéndose el polietilenglicol, PEG) y antibióticos. Estos se caracterizan por un índice terapéutico bajo y/o una semi-vida muy corta que excluye su uso terapéutico. El método de este documento está basado en el hecho de que un antibiótico con un índice terapéutico bajo (por ejemplo un antibiótico, tal como polimixina o amfotericina, que es incluso nefrotóxico a dosis terapéuticas) puede conjugarse, de manera covalente, con un polímero, permitiendo al mismo tiempo que la actividad antimicrobiana permanezca sin cambios con una nefrotoxicidad reducida y una semi-vida circulante aumentada; el objetivo es, por lo tanto, recuperar aquellos antibióticos, que de lo contrario serían inservibles debido a sus propiedades desfavorables, para terapia sistémica, oral y/o parenteral.

20 [0027] Finalmente, otro ejemplo de conjugación de antibióticos con materiales de tejido celulósico se describe en la Patente de Estados Unidos 900.803, que explica la adhesión de neomicina a un tejido usando diferentes tipos de abrillantadores y/o fijadores. En este caso el fin es proporcionar a los tejidos características contra el olor. De hecho, se sabe que la presencia masiva de flora microbiana es la raíz del mal olor durante la transpiración.

25 [0028] Por lo tanto, en las diversas formas comercializadas, se conocen diversos sistemas para fijar/conjugar sustancias, que tienen actividad biológica/farmacológica, con polímeros celulósicos, incluyendo para el tratamiento de lesiones en la piel. Sin embargo, en ningún caso la técnica tuvo por objeto una protección prolongada contra el riesgo de infecciones, posiblemente con un efecto simultáneo sobre el desarrollo de neoangiogénesis y hemostasia.

30 Sumario de la invención

[0029] El objeto de la presente invención es proporcionar fibras, hilos y tejidos, basados en celulosa, funcionalizados con antibióticos, que sean capaces de garantizar protección a largo plazo de infecciones de lesiones en la piel sin la necesidad de cambios frecuentes de vendaje, manteniendo al mismo tiempo los niveles necesarios de intercambio de oxígeno entre el entorno y la lesión con una provisión simultánea de factores neoangiogénéticos. Un objeto adicional de la invención es proporcionar un proceso para la producción de dichas fibras, hilos y tejidos.

35 [0030] Estos objetivos se consiguen con la presente invención que, en un primer aspecto, se refiere a fibras, hilos y tejidos de algodón funcionalizados simultáneamente al menos con un antibiótico aminoglucósido (denominado simplemente, más adelante, aminoglucósido) y al menos una gelatina.

40 [0031] La funcionalización tiene lugar mediante la formación de enlaces covalentes entre las moléculas de antibiótico y gelatina en un lado y algodón en el otro lado. Los aminoglucósidos son particularmente eficaces para los fines de la invención porque, además de tener un grupo amino funcional necesario para la conjugación con el algodón (como se describe más adelante), presentan un amplio espectro de acción antimicrobiana y una rápida acción bactericida. Los aminoglucósidos preferidos para los fines de la invención son gentamicina, kanamicina, tobramicina, amikacina y neomicina. Los autores de la presente invención han observado que fijando los aminoglucósidos y la gelatina mediante enlaces covalentes a algodón (en sus diversas formas comercializadas correspondientes a fibra, hilo, gasa y tejido no tejido), pueden obtenerse conjugados estables en el tiempo sin influir en el intervalo y grado de acción del antibiótico y son, por lo tanto, ideales para obtener diversos tipos de vendajes y otros apósitos útiles para garantizar largos periodos de protección contra el riesgo de infecciones.

50 [0032] La cantidad de aminoglucósidos unidos al algodón varía de acuerdo con el tipo de aminoglucósido, con su actividad como antibiótico y con la forma comercializada de algodón usado.

55 [0033] Esta cantidad se determina, tras ensayos preliminares, para tener productos finales que contengan en peso hasta 20 veces el valor MIC (es decir, la concentración más baja posible de un antibiótico para destruir todos los microorganismos patógenos) del antibiótico proporcionado para aquellas bacterias susceptibles al mismo antibiótico. Preferentemente, los productos de la invención contienen de 2 a 5 veces el valor MIC. La razón por la que, en los productos de la invención, se conjugan cantidades de antibióticos sustancialmente más altas que el valor MIC con algodón, es porque la producción de la reacción de conjugación nunca alcanza el 100% y por tanto trabajar con cantidades más altas garantiza que existan cantidades suficientes de antibiótico en el algodón. Además, los aminoglucósidos no son igualmente eficaces contra todo el panel de patógenos susceptibles al antibiótico y, como consecuencia de los tratamientos clínicos realizados en llagas y heridas, algunas de estas cepas pueden volverse parcialmente resistentes a los antibióticos, siendo esta una circunstancia previamente imprevisible. Es por lo tanto mejor proporcionar un exceso de antibióticos, especialmente en vista del contacto prolongado con estas zonas a

tratar para las cuales se destinan los productos de la invención.

[0034] Los autores de la presente invención han verificado experimentalmente que las cantidades de aminoglucósido útiles para los fines de la invención son entre aproximadamente 4 y 15 mg de antibiótico (preferentemente entre 6 y 10 mg) por gramo de fibra de algodón o tejido no tejido y entre aproximadamente 15 y 45 mg de antibiótico (preferentemente entre 18 y 30 mg) por gramo de fibra de algodón en forma de gasa o hilo.

[0035] Dadas las dificultades analíticas para determinar la cantidad de gelatina que realmente se une al algodón durante la reacción, la concentración de gelatina en el producto final no puede constatar. No obstante los autores de la presente invención han verificado que los productos útiles para los fines de la invención se producen haciendo reaccionar cantidades de gelatina entre 0,2 y 5 mg, preferentemente entre 0,5 y 1 mg de gelatina, por gramo de fibra de algodón, y entre 0,3 a 6 mg de gelatina, preferentemente entre 0,7 y 1,2 mg de gelatina por gramo de gasa de algodón.

[0036] Las gelatinas preferidas son tipos de gelatinas obtenidas de piel de bovino o porcino, o de huesos de porcino. Las gelatinas son productos disponibles en el mercado y se comercializan, por ejemplo, por la compañía Sigma-Aldrich.

[0037] Gracias a la presencia del antibiótico, los productos de la invención pueden garantizar un largo periodo de protección contra el riesgo de infecciones y proporcionar el sustrato peptídico óptimo para las enzimas presentes en el exudado de la lesión, dando lugar así a la producción de oligopéptidos útiles para facilitar el proceso de restauración angiogénico.

[0038] Los productos de la invención pueden usarse para producir vendajes protectores para lesiones en la piel en forma de gasa, tiritas o tejido no tejido, representando la segunda barrera contra infecciones y que están destinados para el contacto directo con la lesión. Estos productos están formados por algodón que, antes de la funcionalización, se hacen hidrófilos.

[0039] Como se sabe, estos productos están generalmente acoplados a una barrera primaria, que no está destinada al contacto directo con la lesión y que principalmente sirve como una protección mecánica, en forma de vendajes no deshilachados o vendajes elásticos, que pueden, por ejemplo, formarse a partir de derivados de algodón de tipo hidrófobo. Estas barreras primarias también pueden funcionalizarse con antibióticos para aumentar el efecto protector contra cualquier bacteria que desde el exterior penetre en el área de la lesión. Por el contrario, en este caso, el algodón hidrófobo de la barrera primaria no necesita funcionalizarse adicionalmente con gelatinas, ya que no está destinado para el contacto directo con la lesión. La conjugación covalente impide la liberación y/o eliminación por lavado del antibiótico que protege la lesión, impidiendo así la acumulación de flora microbiana y por tanto la infección en el sitio durante largos periodos de tiempo. Esto permite reducir la necesidad de cambiar con frecuencia los apósitos, facilitando así y acelerando el proceso de restauración.

[0040] En un segundo aspecto, la invención se refiere al proceso de funcionalización del algodón con el antibiótico y una gelatina.

[0041] El antibiótico y la gelatina se unen al polímero mediante un proceso químico que implica las siguientes etapas:

- blanqueo y posible hidrofiliación del algodón en una de las formas comercializadas de fibra, hilo, algodón, gasa o tejido no tejido;
- oxidación del algodón previamente blanqueado y posiblemente hidrofiliado, con transformación de grupos hidroxilo en la cadena polimérica del algodón en grupos carbonilo (aldehído o cetona);
- formación de iminas entre los grupos amino del antibiótico y de la proteína, y los grupos carbonilo formados en la etapa anterior;
- reducción de la imina, formada en la etapa previa, en la amina correspondiente.

[0042] La reacción de formación de imina se realiza simplemente usando el antibiótico previamente disuelto en una solución de gelatina.

[0043] En la siguiente descripción, a menos que se especifique de otra manera, debe entenderse que las concentraciones se proporcionan como peso/volumen (p/v, es decir, se proporcionan en gramos de soluto por 100 ml de disolvente) en el caso de solutos sólidos o solutos en forma de gel como gelatinas, antibióticos, metaperiodato de sodio, borohidruro de sodio, hidruro de litio y aluminio o similares, mientras que, cuando el soluto es H₂O₂, soda cáustica (NaOH), Solvipol, tampones de acetato y carbonato, debe entenderse que las concentraciones se proporcionan como volumen/volumen (v/v).

Descripción detallada de la invención

[0044] Todas las reacciones del proceso se realizan en recipientes de tinción típicos, en los que los líquidos de reacción se suministran a presión en la cámara del recipiente mediante bombas adecuadas y se extraen a una presión más baja desde el centro de la cámara por medio de una abertura de succión. La diferencia de presión entre

el suministro y la extracción desde la cámara determina el grado de absorción por el algodón y por tanto el grado de reacción, como se conoce bien en la industria. Una ventaja del proceso de la invención es que operando en las condiciones descritas a continuación, todo el proceso se realiza en una secuencia de etapas continua dentro del mismo recipiente, con un considerable ahorro de tiempo y coste en comparación con procesos similares conocidos.

[0045] La etapa preliminar de blanqueo y posible hidrofiliación del algodón se realiza de acuerdo con métodos bien conocidos que no requieren ninguna descripción detallada en el presente documento. Esta etapa puede realizarse, por ejemplo, haciendo reaccionar el algodón (en la forma comercial previamente seleccionada) en presencia de peróxido de hidrógeno, soda cáustica y un detergente, siendo Solvicol ECL el detergente preferido, proporcionado por la compañía Lautex s.r.l. de Grassobbio (BG, Italia). La determinación del resultado de esta etapa preliminar, es decir el blanqueo simple o el blanqueo y la hidrofiliación, se consigue, como se conoce bien en el ámbito de aplicación, controlando los parámetros del proceso, tales como, la concentración de hidróxido de sodio (siendo esta mayor si se requiere hidrofiliación), la temperatura del tratamiento (para la hidrofiliación se requiere ebullición) y los tiempos de contacto con reactivos (siendo estos más prolongados en el caso de hidrofiliación).

[0046] La reacción de oxidación del algodón se realiza preferentemente con ácido periódico o con un peryodato (preferentemente metaperyodato de sodio) a una temperatura generalmente comprendida entre 40 y 60 ° C durante aproximadamente 15 minutos y una hora, con presiones de suministro en fase líquida del reactor de entre 0,30 y 0,50 MPa (3 y 5 bares). En esta reacción, en el recipiente se suministra una solución de ácido peryódico o peryodato de tal manera que la concentración de especies activas en la cámara de reacción es de entre aproximadamente 3 y 10 g/l.

[0047] La reacción de la formación de imina generalmente se realiza a presión, a una temperatura de entre aproximadamente 40 y 60 °C, preferentemente aproximadamente 50 °C; a valores de presión de entre aproximadamente 0,30 y 0,40 MPa (3 y 4 bares), preferentemente aproximadamente 0,35 MPa (3,5 bares); a un pH entre 8,0 y 9,0, preferentemente aproximadamente 8,5, lo que se consigue añadiendo un sistema de tampón carbonato; y con tiempos de reacción entre una y cinco horas.

[0048] El antibiótico puede usarse en forma libre o en forma de una sal del mismo, tal como el sulfato en el caso de la gentamicina.

[0049] La gelatina se usa preferentemente en forma de una solución acuosa de la misma en una concentración entre el 0,5 y el 3%, preferentemente aproximadamente el 1%. Si se usa una solución de gelatina, el antibiótico o su sal se suspende o disuelve en dicha solución.

[0050] La reacción de formación de imina, que conduce a una conjugación covalente entre el algodón y el antibiótico más la gelatina, se realiza directamente en recipientes de tinción, sin interrupción del proceso, después de la hidrofiliación y el blanqueo de los diversos artículos, con un ahorro de coste significativo en comparación con los sistemas tradicionales.

[0051] Finalmente, la reacción de reducción de imina a la amina correspondiente se realiza usando métodos conocidos en el ámbito de aplicación, por ejemplo, a las mismas condiciones de pH que las de la etapa anterior, añadiendo a la mezcla de reacción resultante de dicha reacción un agente reductor tal como borohidruro de sodio (NaBH_4) o hidruro de litio y aluminio (LiAlH_4) en forma de solución acuosa, a una concentración de aproximadamente 1 g/l.

[0052] La invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Parte experimental: Química

Ejemplo 1 (comparativo)

[0053] Este ejemplo se refiere a la conjugación de gentamicina con fibra de algodón que se ha vuelto hidrófila.

[0054] Se usa un recipiente de tinción de circulación forzada, que tiene un volumen total de cámara de recipiente de aproximadamente 100 l y un volumen operativo de 60 l (el volumen operativo es un valor tecnológico proporcionado por el fabricante del recipiente y es el volumen máximo de líquido que puede suministrarse de manera segura en su interior). En el recipiente se cargan 10 kg de fibra de algodón y se deja circular agua de manera continua durante diez minutos para una correcta absorción. Después se realiza el siguiente procedimiento:

- hidrofiliación y blanqueo de la fibra

el recipiente se lleva a su volumen nominal, es decir, se llena hasta el volumen operativo de 60 l con agua desionizada y se añade lo siguiente:

- 10 g/l de peróxido de hidrógeno a una concentración del 35%;
- 4 g/l de soda cáustica a una concentración del 30%;
- 1 g/l de detergente Solvicol ECL.

La temperatura del baño se lleva a 102 °C y se deja que la reacción continúe, todavía a circulación forzada, durante 30 minutos. Después se realiza una serie de lavados continuos hasta neutralizar las aguas de lavado;

- oxidación de la fibra blanqueada e hidrofílica

5 la cámara de reacción se carga y el pH se ajusta 5,6 añadiendo tampón acetato. La temperatura se lleva a 50 °C y la presión a 0,35 MPa (3,5 bares). Se añade metaperyodato de sodio a una cantidad tal que su concentración en la mezcla de reacción sea igual a 5,32 g/l y se deja reaccionar durante 30 minutos (oxidación controlada). Después se realizan dos lavados continuos de una duración de diez minutos;

- funcionalización con el antibiótico

10 la cámara de reacción se carga de nuevo, la temperatura se lleva de nuevo a 50 °C y la presión a 0,35 MPa (3,5 bares); después el pH se ajusta a 8,5 añadiendo tampón carbonato. Se añade sulfato de gentamicina, previamente disuelto en agua, a una cantidad tal que su concentración en la mezcla de reacción sea igual a 0,8 g/l, y se deja que la reacción continúe durante tres horas. En esta reacción, la imina (base Schiff) se forma entre los grupos aldehído del algodón oxidado y un grupo amino de gentamicina. Se realizan dos lavados continuos durante diez minutos cada uno;

- reducción de los grupos imina obtenidos a aminas

15 el recipiente se carga de nuevo y el pH se vuelve a llevar a 8,5 añadiendo un tampón carbonato; se añade borohidruro de sodio en una cantidad tal que su concentración en la mezcla de reacción sea igual a 1,0 g/l, y se deja que la reacción continúe a temperatura ambiente durante 15 minutos. En esta reacción la imina se reduce a la alquilamina correspondiente. Se realizan tres lavados continuos durante diez minutos cada uno y la fibra se descarga y se seca en un túnel de aire caliente a una temperatura de aproximadamente 80-90 °C.

25 **[0055]** La fibra hidrófila obtenida de esta manera, blanqueada y conjugada con gentamicina, es la muestra 1. Esta fibra se usa para crear pelusa para parches y tejidos no tejidos protectores.

Ejemplo 2

30 **[0056]** Este ejemplo se refiere a la conjugación de gentamicina pregelatinizada con fibra de algodón que se ha vuelto hidrófilo.

[0057] Se repite el procedimiento de hidrofílicación, blanqueo y oxidación de 10 kg de fibras de algodón descrito en el Ejemplo 1, excepto que en la etapa de oxidación se usa metaperyodato de sodio en una cantidad tal que su concentración en la mezcla de reacción sea igual a 3,8 g/l.

35 **[0058]** En un recipiente distinto, se realiza la pregelatinización del sulfato de gentamicina. Para este fin, 100 g de sulfato de gentamicina se disuelven en 1 litro de una solución acuosa a una concentración del 1% de gelatina de tipo B, procedente de piel de bovino (225 Bloom, comercializado por Sigma Aldrich Chemical Company), manteniéndolo, con agitación, a una temperatura de 50 °C. La mezcla de reacción se mantiene a esta temperatura hasta su uso en la reacción de conjugación con algodón.

40 **[0059]** La fibra previamente preparada, hidrofílica, blanqueada y oxidada se hace reaccionar con el antibiótico pregelatinizado. La cámara de reacción que contiene la fibra se calienta a una temperatura de 50 °C y la presión se ajusta a 0,35 MPa (3,5 bares), después se ajusta el pH a 8,5 añadiendo tampón carbonato. La gentamicina pregelatinizada se añade en una cantidad tal que la concentración de sulfato de gentamicina sea igual a 1,4 g por litro de mezcla de reacción y la mezcla se deja reaccionar durante tres horas con formación de iminas entre los grupos aldehído del algodón oxidado y un grupo amino de gentamicina y parte de los grupos amino de la gelatina. Se realizan dos lavados continuos de diez minutos cada uno.

45 **[0060]** Finalmente la reducción con borohidruro de sodio se repite como se describe en el Ejemplo 1. Esa parte de la gelatina usada que no se conjuga queda atrapada, incluso después del lavado, entre las hebras de fibra de algodón. Se realizan tres lavados continuos durante diez minutos cada uno y después la fibra se descarga y se seca en un túnel de aire a 40 °C.

50 **[0061]** La fibra hidrófila obtenida de esta manera, blanqueada y conjugada con gentamicina gelatinizada, es la muestra 2; esta fibra también se usa para producir pelusa para tiras y tejidos no tejidos protectores.

Ejemplo 3 (comparativo)

60 **[0062]** Este ejemplo se refiere a la conjugación de gentamicina con un hilo de algodón hidrófobo.

[0063] En un recipiente de tinción de hilo de circulación forzada de 100 l se cargan 10 kg de hilo en bobinas y se deja circular agua de manera continua durante 10 minutos para una correcta absorción del hilo. Al hilo se le añade hipoclorito sódico al 15% (20 g/l) y soda cáustica 36 BE (1,5 g/l) y se deja que la reacción continúe durante una hora a 60 °C. El hilo se lava repetidamente y después se añaden 30 volúmenes de peróxido de hidrógeno (6 g/l) y soda cáustica 36 BE (2 g/l) dejando que la reacción continúe durante una hora más, seguido de lavado repetido hasta

neutralizar el agua de lavado. Después se produce la oxidación del algodón como se describe en el proceso del Ejemplo 1, con la única diferencia de que se usa metaperyodato de sodio en una cantidad tal que su concentración en la mezcla de reacción es igual a 5 g/l, y que se deja que la reacción continúe durante 15 minutos. En estas condiciones la oxidación se controla, con objeto de mantener las propiedades del mercado necesarias para tejer el hilo. Se realizan dos lavados continuos durante diez minutos cada uno. La funcionalización con el procedimiento de gentamicina del Ejemplo 1 se repite después, con la única diferencia de que se usa sulfato de gentamicina en una cantidad tal que su concentración en la mezcla de reacción sea de 1,6 g/l. Se realizan dos lavados continuos durante diez minutos cada uno.

5
10 **[0064]** Finalmente, el procedimiento de reducción del Ejemplo 1 se repite y las bobinas de hilo se descargan y se secan en un túnel de aire caliente de 80 a 90 °C.

[0065] El hilo obtenido de esta manera, blanqueado y conjugado con gentamicina, es la muestra 3. Este hilo se teje para crear vendajes ribeteados y vendajes elásticos para la protección externa de heridas y lesiones en la piel.

15 Ejemplo 4

[0066] Este ejemplo se refiere a la conjugación de gentamicina pregelatinizada con gasa de algodón que se ha vuelto hidrófila. En un recipiente de tinción de tejido de circulación forzada de 200 l (denominado también autoclave de tinción en haz), se cargan 20 kg de gasa de algodón en rollos de 150 cm de anchura. El agua se deja circular de manera continua durante diez minutos para una correcta absorción de la gasa.

[0067] El procedimiento de hidrofiliación, blanqueo y oxidación del Ejemplo 1 se repite con la única diferencia de que en la etapa de oxidación se usa metaperyodato de sodio en una cantidad tal que su concentración en la mezcla de reacción es igual a 6,2 g/l.

[0068] Independientemente, se realiza la pregelatinización del sulfato de gentamicina, repitiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 2 para este fin, siendo la única diferencia en este caso que se usan 500 g de sulfato de gentamicina. La mezcla de reacción se mantiene a esta temperatura hasta su uso en la reacción de conjugación con algodón. La gasa hidrofiliada y blanqueada obtenida como se ha descrito anteriormente se hace reaccionar con el antibiótico pregelatinizado, repitiendo el procedimiento del Ejemplo 2 siendo la única diferencia que la gentamicina pregelatinizada se añade en tal cantidad que la concentración de sulfato de gentamicina es igual a 2,6 g por litro de mezcla de reacción. Se realizan dos lavados continuos durante diez minutos cada uno. Finalmente, el procedimiento de reducción de imina del Ejemplo 2 se repite. De nuevo, parte de la gelatina usada, aunque no conjugada, queda atrapada, incluso después del lavado, en la gasa de algodón. Se realizan tres lavados continuos de diez minutos cada uno y el rollo de gasa se descarga y se seca desenrollando el rollo y haciéndolo pasar simultáneamente a través de un túnel de aire caliente.

[0069] La gasa hidrófila obtenida de esta manera, blanqueada y conjugada con gentamicina gelatinizada, es la muestra 4. Después de cortar esta gasa al tamaño apropiado, se usa como una segunda capa protectora en contacto directo con heridas o lesiones.

Ejemplo 5

45 **[0070]** Este ejemplo se refiere a la conjugación de kanamicina pregelatinizada con una fibra de algodón que se ha vuelto hidrófila.

[0071] El procedimiento del Ejemplo 2 se repite, siendo la única diferencia que se usa sulfato de kanamicina en lugar de sulfato de gentamicina y que, en la funcionalización de la fibra, se usa una cantidad de kanamicina pregelatinizada de tal manera que la concentración de sulfato de kanamicina es igual a 1 gramo por litro de mezcla de reacción. De nuevo, parte de la gelatina usada, aunque no conjugada, queda atrapada, incluso después del lavado, entre las hebras de las fibras de algodón. Se realizan tres lavados continuos durante diez minutos cada uno y la fibra se descarga y se seca en un túnel de aire a 40 °C.

55 **[0072]** La fibra hidrófila obtenida de esta manera, blanqueada y conjugada con kanamicina gelatinizada, es la muestra 5. Esta fibra se usa para producir pelusa para tiritas y tejidos no tejidos protectores destinados para el contacto directo con la lesión.

Ejemplo 6 (comparativo)

60 **[0073]** Este ejemplo se refiere a la conjugación de kanamicina con un hilo de algodón hidrófobo.

[0074] El procedimiento del Ejemplo 3 se repite, siendo la única diferencia que se usa kanamicina en lugar de gentamicina y que, en la funcionalización con antibiótico, se usa sulfato de kanamicina en tal cantidad que su concentración en la mezcla de reacción es igual a 1,2 g/l.

[0075] El hilo obtenido de esta manera, blanqueado y conjugado con kanamicina, es la muestra 6 y se emplea para el mismo uso que el hilo en el Ejemplo 3.

Ejemplo 7

5 [0076] Este ejemplo se refiere a la conjugación de kanamicina pregelatinizada con gasa de algodón que se ha vuelto hidrófila.

10 [0077] El procedimiento en el Ejemplo 4 se repite, siendo la única diferencia que se usa kanamicina en lugar de gentamicina y que, en la funcionalización de la gasa, se usa una cantidad de sulfato de kanamicina pregelatinizada de tal manera que la concentración de sulfato de kanamicina en la mezcla de reacción es igual a 1,8 g/l. De nuevo, parte de la gelatina usada, aunque no conjugada, queda atrapada, incluso después del lavado, en la gasa de algodón.

15 [0078] La gasa obtenida de esta manera, blanqueada y conjugada con kanamicina gelatinizada, es la muestra 7. Después de cortar esta gasa al tamaño apropiado, se usa como la segunda capa protectora en contacto directo con heridas o lesiones.

Ejemplo 8

20 [0079] Este ejemplo se refiere a la conjugación de amikacina pregelatinizada con fibra de algodón que se ha vuelto hidrófila.

25 [0080] El procedimiento en el Ejemplo 2 se repite, siendo la única diferencia que se usa sulfato de amikacina en lugar de sulfato de gentamicina y que, en la funcionalización de la fibra, se usa una cantidad de amikacina pregelatinizada de tal manera que la concentración de sulfato de amikacina es igual a 1,5 g por litro de mezcla de reacción. De nuevo, parte de la gelatina usada, aunque no conjugada, queda atrapada, incluso después del lavado, entre las hebras de la fibra de algodón.

30 [0081] La fibra hidrófila obtenida de esta manera, blanqueada y conjugada con amikacina gelatinizada, es la muestra 8. Esta fibra se usa para producir pelusa para tiritas y tejido no tejido protector destinado para el contacto directo con la lesión.

Ejemplo 9 (comparativo)

35 [0082] Este ejemplo se refiere a la conjugación de amikacina con hilo de algodón hidrófobo.

40 [0083] El procedimiento en el Ejemplo 3 se repite, siendo la única diferencia que se usa amikacina en lugar de gentamicina y que, en la funcionalización con el antibiótico, se usa sulfato de amikacina en una cantidad tal que su concentración en la mezcla de reacción es de 2,0 g/l.

[0084] El hilo obtenido de esta manera, blanqueado y conjugado con amikacina, es la muestra 9 y se emplea para el mismo uso que el hilo en el Ejemplo 3.

45 Ejemplo: 10

[0085] Este ejemplo se refiere a la conjugación de amikacina pregelatinizada con gasa de algodón que se ha vuelto hidrófila.

50 [0086] El procedimiento en el Ejemplo 4 se repite, siendo la única diferencia que se usa amikacina en lugar de gentamicina y que, en la funcionalización de la gasa, se usa sulfato de amikacina pregelatinizada en una cantidad tal que la concentración de sulfato de amikacina en la mezcla de reacción es igual a 3,0 g/l. De nuevo, parte de la gelatina usada, aunque no conjugada, queda atrapada, incluso después del lavado, en la gasa de algodón.

55 [0087] La gasa obtenida de esta manera, blanqueada y conjugada con amikacina gelatinizada, es la muestra 10 y se emplea para el mismo uso que la gasa en el Ejemplo 4.

Parte experimental: Farmacología

60 Ejemplo 11

[0088] Este ejemplo se refiere a la inhibición del crecimiento de bacterias Gram + y Gram - sobre placas de agar con nutriente por las muestras de la invención.

65 [0089] Se preparó a una serie de placas de Petri de 9 cm de diámetro que contenían agar con nutriente estéril en el que se introdujeron 20 µl de un cultivo reciente de *S. aureus* o *E. coli*. Después de enfriar, en la superficie de agar,

se colocaron discos de 3 cm de diámetro de muestras 1-10, preparadas como se describe en los ejemplos anteriores.

5 **[0090]** Las placas se incubaron a 37°C durante 18 horas y después se examinó el número de UFC (unidades formadoras de colonias) de microorganismos patógenos sobre la superficie del medio de cultivo cerca del disco de algodón así como cualquier zona de inhibición (ZI, en milímetros) que, si están presente, indica la liberación de antibiótico en el medio de cultivo.

10 **[0091]** En paralelo, se prepararon algunas placas sobre las que se colocó un disco de algodón no conjugado (control).

[0092] Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1

Muestra		Resultados			
Nº	Estructura	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
		UFC (nº)	ZI (mm)	UFC (nº)	ZI (mm)
1	Fibra hidrófila con gentamicina	0	2	0	1
2	Fibra hidrófila con gentamicina gelatinizada	0	0	0	0
3	Hilo hidrófobo con getamicina	0	1	0	0
4	Gasa hidrófila con gentamicina gelatinizada	0	0	0	0
5	Fibra hidrófila con kanamicina gelatinizada	0	0	0	1
6	Hilo hidrófobo con kanamicina	0	2	0	2
7	Gasa hidrófila con kanamicina gelatinizada	0	0	0	0
8	Fibra hidrófila con amikacina gelatinizada	0	0	0	0
9	Hilo hidrófobo con amikacina	0	1,5	0	1
10	Gasa hidrófila con amikacina gelatinizada	0	0	0	0
/	Gasa de algodón hidrófila no tratada (control)	> 1000	/	> 1000	/
/	Vendaje de algodón hidrófobo no tratado (control)	> 1000	/	> 1000	/

15 **[0093]** Los resultados demuestran que, en ninguna de las muestras de la invención conjugadas con antibióticos aminoglucósidos, basadas en algodón hidrófilo o basadas en algodón hidrófobo, y en presencia o ausencia de gelatina, existe crecimiento microbiano (Gram + y Gram -) en sus superficies. Esto demuestra la actividad microbicida completa de los antibióticos, conjugados con algodón, en las dos formas diferentes y el hecho de que la gelatinización no influye negativamente en las propiedades microbicidas de los antibióticos.

20 **[0094]** La existencia reducida, y en la mayoría de los casos, la ausencia de una zona de inhibición de crecimiento microbiano alrededor de la superficie de los discos de algodón conjugado, demuestra la no liberación de los antibióticos en el medio de cultivo, siendo esto indicativo de un enlace de conjugación estable.

25 Ejemplo 12

[0095] Este ejemplo se refiere a la inhibición de crecimiento de bacterias Gram + y Gram – en caldo con nutriente.

30 **[0096]** En tubos microbiológicos, que contenían 20 ml de caldo con nutriente estéril, por encima del nivel del caldo se colocaron bolitas de algodón conjugado con antibióticos, con un peso de aproximadamente un gramo y correspondiente a las muestras 1-10.

35 **[0097]** En la parte superior de estos se depositaron 20 µl de un cultivo reciente de *S. aureus* o *E. coli* y se mantuvo en contacto durante una hora. Las bolitas se sumergieron después en el caldo de cultivo y los tubos se incubaron a 37 °C durante 18 horas. Al final de la incubación, las bolitas se retiraron de los tubos y se determinó la intensidad del desarrollo del cultivo mediante un lector de opalescencia espectrofotométrico (D.O.) a 640 nm.

[0098] En paralelo, se realizaron ensayos de cultivo sin bolitas de algodón (controles de cultivo) y ensayos usando bolitas de algodón no tratado (controles de referencia).

40 **[0099]** Los resultados se indican en la Tabla 2

Tabla 2

Muestra		Resultados (D.O. a 640 nm)	
Nº	Estructura	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1	Fibra hidrófila con gentamicina	0,020	0,034
2	Fibra hidrófila con gentamicina gelatinizada	0,036	0,024
3	Hilo hidrófobo con gentamicina	0,018	0,022
4	Gasa hidrófoba con gentamicina gelatinizada	0,030	0,030
5	Fibra hidrófila con kanamicina gelatinizada	0,016	0,024
6	Hilo hidrófobo con kanamicina	0,026	0,036
7	Gasa hidrófila con kanamicina gelatinizada	0,014	0,026
8	Fibra hidrófila con amikacina gelatinizada	0,020	0,020
9	Hilo hidrófobo con amikacina	0,030	0,015
10	Gasa hidrófila con amikacina gelatinizada	0,026	0,018
/	Control de cultivo	0,540	0,500
/	Gasa de algodón hidrófila no tratada (control)	0,960	0,880
/	Vendaje de algodón hidrófobo no tratado (control)	0,750	0,800

5 **[0100]** Los resultados demuestran que, un tiempo de contacto de una hora entre los diversos antibióticos aminoglucósidos conjugados con las diversas formas hidrófilas e hidrófobas de algodón, tanto con o sin pregelatinización del mismo, con microorganismos patógenos Gram + y Gram - , es suficiente para la inhibición completa de su crecimiento. Así bien, en este caso también se obtiene la prueba de que la gelatinización de las muestras no influye negativamente en las propiedades microbicidas del antibiótico.

10 **[0101]** En cambio, cuando el inóculo micro-orgánico se pone en contacto con algodón de control normal en forma de vendaje, se observa un aumento significativo en el crecimiento microbiano en comparación con el control de cultivo. Esto es una prueba de que el algodón normal no sólo actúa como un acumulador de flora microbiana, sino también como un catalizador para su crecimiento.

15 Ejemplo 13

20 **[0102]** Este ejemplo se refiere a la inhibición de crecimiento de bacterias Gram + y Gram - en caldo con nutriente después de contacto prolongado con sangre y sudor artificial. Aproximadamente muestras de 2 g de gasa de algodón y vendajes conjugados con antibióticos, correspondientes a las muestras 1-10, se sumergieron durante seis días en sangre de cerdo citrada, que ocasionalmente se agitaba. Después las muestras se recuperaron, se lavaron con agua hasta retirar los restos de sangre, se sumergieron en sudor artificial (R. Séller et al. The Chemistry and Technology of Cosmetic Products, 1977, 11) y se mantuvieron en su interior, de nuevo agitando ocasionalmente, durante cuatro días más.

25 **[0103]** Al final del tratamiento, las muestras se lavaron repetidamente con agua, se secaron en una corriente de aire caliente y después se sometieron a ensayo para determinar la actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *E. coli*, de acuerdo con el método descrito en el ejemplo anterior.

30 **[0104]** Los resultados se indican en la Tabla 3.

Tabla 3

Muestra		Resultados (D.O. a 640 nm)	
Nº	Estructura	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1	Fibra hidrófila con gentamicina	0,040	0,036
2	Fibra hidrófila con gentamicina gelatinizada	0,024	0,038
3	Hilo hidrófobo con gentamicina	0,054	0,046
4	Gasa hidrófoba con gentamicina gelatinizada	0,060	0,034
5	Fibra hidrófila con kanamicina gelatinizada	0,052	0,048
6	Hilo hidrófobo con kanamicina	0,072	0,080
7	Gasa hidrófila con kanamicina gelatinizada	0,040	0,050
8	Fibra hidrófila con amikacina gelatinizada	0,034	0,060
9	Hilo hidrófobo con amikacina	0,065	0,070
10	Gasa hidrófila con amikacina gelatinizada	0,046	0,054
/	Control de cultivo	0,480	0,520

[0105] Los resultados demuestran indirectamente que los diversos antibióticos aminoglucósidos conjugados con algodón, hidrófilo e hidrófobo, bien tal cual o en presencia de gelatina, no se liberan después de un período de contacto significativo con sangre y sudor, lo que puede correlacionarse con los tiempos usados con los apósitos, garantizando de esta manera la conservación prolongada de actividad microbiana en condiciones de uso real. Así pues, en este caso también se obtuvo la prueba de que la gelatinización de las muestras no influye negativamente en las propiedades microbicidas del antibiótico.

Ejemplo 14

[0106] Este ejemplo se refiere a la prevención de infecciones por *S. epidermidis* en piel dañada de rata.

[0107] Ratas Wistar hembra, con un peso de aproximadamente 200 g, cinco por grupo, se rasuraron adecuadamente en la región dorsal y después, con una ligera anestesia, se sometieron a una exposición prolongada de rayos UV hasta inducir lesiones claras en la piel.

[0108] En el área dañada, usando adhesivo, se aplicaron discos de gasa o vendaje de algodón conjugado con diversos antibióticos, producido de acuerdo con los ejemplos 1-10 y se mantuvieron en contacto *in situ* durante diez días. Cada día, se aplicaron 5 µl/sitio de un cultivo de *S. epidermidis* reciente en tres puntos diferentes en la superficie de los discos. Al final del tratamiento, los discos se retiraron y se examinó el estado infeccioso de las lesiones extrayendo el exudado con un frotis e inoculando con este en caldo de cultivo. Al mismo tiempo se llevó a cabo un examen subjetivo del estado de la propia lesión.

[0109] Se realizó un tratamiento paralelo en un grupo de animales aplicando discos de algodón, gasa o vendaje de algodón no conjugados (controles).

[0110] Los resultados se indican en la tabla 4. Los datos para el crecimiento microbiano se proporcionan como el número de animales que presentan infección por *S. epidermidis*, verificado tomando un frotis de la lesión y examinando el crecimiento en caldo de cultivo y por tinción Gram, sobre el número total de animales sometidos a ensayo (n/n). Los resultados, indicados en la columna "Estado de la lesión", se proporcionan en forma de indicadores de gravedad de lesión subjetivos, de acuerdo con la siguiente escala: (+++) necrótico, (++) muy grave, (+) grave, (-) mejorado, (- -) muy mejorado, (- - -) considerablemente mejorado.

Tabla 4

Muestra		Resultados	
Nº	Estructura	Crecimiento microbiano	Estado de la lesión
1	Fibra hidrófila con gentamicina	0/5	(--)
2	Fibra hidrófila con gentamicina gelatinizada	0/5	(---)
3	Hilo hidrófobo con gentamicina	0/5	(-)
4	Gasa hidrófila con gentamicina gelatinizada	0/5	(---)
5	Fibra hidrófila con kanamicina gelatinizada	0/5	(---)
6	Hilo hidrófobo con kanamicina	0/5	(-)
7	Gasa hidrófila con kanamicina gelatinizada	0/5	(---)
8	Fibra hidrófila con amikacina gelatinizada	0/5	(---)
9	Hilo hidrófobo con amikacina	0/5	(-)
10	Gasa hidrófila con amikacina gelatinizada	0/5	(---)
/	Gasa de algodón hidrófila no tratada (control)	5/5	(+++)
/	Vendaje de algodón hidrófobo no tratado (control)	5/5	(++)

5 [0111] Los resultados demuestran que, a diferencia de la aplicación de algodón de control normal, donde se presentan infecciones por lesión en todos los animales tratados, los conjugados entre los diversos aminoglucósidos y el algodón hidrófilo e hidrófobo, tal cual o en forma gelatinizada, son capaces de proporcionar protección total de infecciones.

10 [0112] Un examen subjetivo del estado de lesión, inspeccionado sobre la extracción del disco protector, demuestra que el conjugado entre algodón y antibióticos gelatinizados permite una mejora particularmente clara en la gravedad del eritema, tal como casi curada; en cambio, el conjugado entre el algodón y sólo antibióticos, aunque impide el crecimiento microbiano, da lugar a una recuperación del daño en la piel en mucha menor medida.

Ejemplo 15

15 [0113] Este ejemplo se refiere al análisis de propiedades hemostáticas en ratas.

[0114] Ratas Wistar hembra, con un peso de aproximadamente 300 gramos, se dividieron en dos grupos de ocho unidades cada uno.

20 [0115] En cada animal, tras anestesia con éter, se realizó una incisión vertical profunda de 2 cm de longitud con una hoja de afeitar en la vena caudal, de tal manera que cada animal tenía, en la medida de lo posible, la misma herida y flujo de sangre resultantes. Posteriormente, se aplicaron tiras de las diversas muestras de gasa de algodón sometidas a estudio y se mantuvieron en contacto íntimo hasta que se detuvo el sangrado (lo que lleva un promedio de dos a cuatro minutos). Después de su retirada, se examinó el tamaño de la mancha de sangre y el estado del coágulo sobre las diversas muestras de gasa, lo último de manera subjetiva (sangre más o menos seca, firmeza del tapón plaquetario).

25 [0116] Durante las seis horas siguientes se controló a los animales para la posible reanudación de sangrado y firmeza del coágulo en formación.

30 [0117] Los resultados se presentan en la tabla 5 que indica los resultados relacionados con los datos de mancha de sangre sobre la muestra (en cm²), reanudación de sangrado (como un % del número de animales) y firmeza del coágulo, evaluado usando la siguiente escala subjetiva: +++ = coágulo muy firme y seco; ++ = coágulo firme y húmedo, + = coágulo débil.

35

Tabla 5

Muestra		Resultados		
Nº	Estructura	Mancha de sangre (cm ²)	Reanudación del sangrado (% de animales)	Firmeza del coágulo
1	Fibra hidrófila con gentamicina	4,2	0,0	++
2	Fibra hidrófila con gentamicina gelatinizada	1,9	0,0	+++
3	Hilo hidrófobo con getamicina	4,5	12,5	+
4	Gasa hidrófila con gentamicina gelatinizada	2,0	0,0	+++
5	Fibra hidrófila con kanamicina gelatinizada	2,3	0,0	+++
6	Hilo hidrófobo con kanamicina	4,8	25,0	+
7	Gasa hidrófila con kanamicina gelatinizada	1,8	0,0	+++
8	Fibra hidrófila con amikacina gelatinizada	2,2	0,0	+++
9	Hilo hidrófobo con amikacina	5,4	12,5	+
10	Gasa hidrófila con amikacina gelatinizada	2,6	0,0	+++
/	Gasa de algodón hidrófila no tratada (control)	4,8	12,5	+
/	Vendaje de algodón hidrófobo no tratado (control)	6,0	25,0	+

5 [0118] Los resultados para la mancha de sangre, procedente de la herida, demuestran una aceleración significativa de hemostasis y una reducción igualmente significativa en los fenómenos hemorrágicos para las muestras que contienen el antibiótico aminoglucósido gelatinizado en comparación con los que solo contienen antibiótico.

10 [0119] El efecto hemostático de los conjugados de la invención se confirma por una ausencia total de reanudación de sangrado y un tapón hemostático notorio más firme encontrado en los animales tratados con este tipo de protección.

Parte experimental: Clínica

Ejemplo 16

15 [0120] Este ejemplo se refiere a estudios preliminares sobre el uso para heridas quirúrgicas. Los vendajes protectores basados en algodón (gasa, vendajes y tiritas) conjugados de manera covalente con aminoglucósidos y aminoglucósidos pregelatinizados se compararon con gasas, vendajes y tiritas en uso normal en la práctica de quirúrgica clínica en un número significativo de pacientes sometidos a procedimientos quirúrgicos de pequeña a gran dimensión.

20 [0121] Las heridas se protegieron aplicando, en contacto directo con las mismas, gasa basada en algodón hidrófilo conjugada con el antibiótico gelatinizado (segunda barrera protectora antimicrobiana) que, a su vez, se cubrió con vendajes basados en algodón hidrófobo conjugado con el mismo antibiótico no gelatinizado (primera barrera protectora antimicrobiana).

25 [0122] Mientras que los vendajes protectores normales (controles) se sustituían cada veinticuatro o cuarenta y ocho horas, de acuerdo con la práctica rutinaria, con desinfección normal simultánea de la herida, los artículos de la invención se dejaron para proteger el sitio dañado hasta el final del período necesario para la curación de la herida, sobre un promedio comprendido entre ocho y doce días.

30 [0123] Usando los artículos producidos de acuerdo con la invención, no se presentaron casos de infección en el sitio de aplicación. Adicionalmente, comparados con los valores obtenidos con los vendajes de control, los artículos producidos de acuerdo con la invención fueron más rápidos y mejores en la hemostasis y en la restauración tisular (curación).

35

Ejemplo 17

5 **[0124]** Este ejemplo se refiere a estudios preliminares de uso con lesiones crónicas en la piel. Los vendajes protectores (gasas, vendajes) producido de acuerdo con la invención se compararon con gasas y vendajes convencionales, para la protección de quemaduras o escaras en un número significativo de pacientes.

10 **[0125]** La lesión se protegió aplicando, en contacto directo con la misma, gasa de algodón hidrófilo conjugado con el antibiótico gelatinizado (segunda barrera protectora antimicrobiana) que, a su vez, se cubrió con vendajes basados en algodón hidrófobo conjugados con el mismo antibiótico no gelatinizado (primera barrera protectora antimicrobiana).

15 **[0126]** Mientras que los artículos protectores normales (controles) se sustituían sobre un promedio cada cuarenta y ocho horas, de acuerdo con la práctica rutinaria, con desinfección normal simultánea de la herida, los artículos de la invención se sustituyeron sobre un promedio cada diez/doce días. El tratamiento fue continuado, dependiendo de la naturaleza de la lesión, durante hasta seis meses.

20 **[0127]** Usando los artículos preparados de acuerdo con la invención, no se presentaron casos de infección en la lesión protegida; por el contrario, cuando se usaron artículos normales, en un gran número de sujetos, tuvo que realizarse una desinfección minuciosa. La prolongación, de manera significativa, de los intervalos de sustitución de los artículos protectores ha dado como resultado una mejora significativa en el estado general de las lesiones en comparación con controles, estando estos sometidos a una sustitución frecuente. Con los artículos producidos de acuerdo con la presente invención, realmente se observó un retroceso significativo de la lesión con una ausencia de sitios necróticos y una tendencia a normalizar la exudación.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Producto basado en algodón hidrófilo, funcionalizado al menos con un antibiótico aminoglucósido y al menos una gelatina, **caracterizado porque** el antibiótico y la gelatina se unen al algodón mediante un enlace covalente, el antibiótico está presente en una cantidad comprendida entre aproximadamente 4 y 45 mg por gramo de algodón, y dicho producto se obtiene haciendo reaccionar el algodón con cantidades de al menos una gelatina comprendidas entre 0,2 y 6 mg por gramo de algodón.
- 10 **2.** Producto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el antibiótico es uno o más seleccionado de gentamicina, kanamicina, tobramicina, amikacina, y neomicina.
- 3.** Producto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el algodón está presente en forma de fibra, hilo, gasa o tejido no tejido.
- 15 **4.** Producto de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la cantidad de antibiótico está comprendida entre 4 y 15 mg por gramo de algodón que cuando esta última está en forma de fibra.
- 5.** Producto de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha cantidad de antibiótico está comprendida entre 6 y 10 mg por gramo de algodón.
- 20 **6.** Producto de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la cantidad de antibiótico está comprendida entre 14 y 45 mg por gramo de algodón cuando este último está en forma de gasa.
- 7.** Producto de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha cantidad de antibiótico está comprendida entre 18 y 30 mg por gramo de algodón.
- 25 **8.** Producto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichas gelatinas se obtienen de piel de bovino o de porcino o de partes de hueso de porcino.
- 30 **9.** Producto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cantidad de gelatinas está comprendida entre 0,2 y 5 mg por gramo de algodón cuando este último está en forma de fibra.
- 10.** Producto de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha cantidad de gelatinas está comprendida entre 0,5 y 1 mg por gramo de algodón.
- 35 **11.** Producto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cantidad de gelatinas está comprendida entre 0,3 y 6 mg por gramo de algodón cuando este último está en forma de gasa.
- 12.** Producto de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicha cantidad de gelatinas está comprendida entre 0,7 y 1,2 mg por gramo de algodón.
- 40 **13.** Proceso para producir un producto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, basado en algodón hidrófobo, que comprende las siguientes etapas:
- 45 - blanqueo del algodón en una de las formas comercializadas: fibra, hilo, gasa o tejido no tejido;
- oxidación del algodón previamente blanqueado, con transformación de los grupos hidroxilo presentes en la cadena polimérica del algodón en grupos carbonilo (aldehído o cetona);
- formación de iminas entre los grupos amino del antibiótico y de la gelatina y los grupos carbonilo formados en la etapa anterior;
- 50 - reducción de las iminas, formadas en la etapa anterior, en aminas
- 14.** Proceso para la producción de un producto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, basado en algodón hidrófilo que comprende las siguientes etapas:
- 55 - blanqueo e hidrofiliación del algodón en una de las formas comercializadas: fibra, hilo, gasa o tejido no tejido;
- oxidación del algodón previamente hidrofiliado y blanqueado, con transformación de grupos hidroxilo presentes en la cadena polimérica del algodón en grupos carbonilo (aldehído o cetona);
- formación de iminas entre los grupos carbonilo formados en la etapa anterior y los grupos amino del antibiótico y de la gelatina;
- 60 - reducción de las iminas, formadas en la etapa anterior, en aminas.
- 15.** Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, en el que el blanqueo del algodón se realiza haciendo reaccionar el algodón con peróxido de hidrógeno, soda cáustica y un detergente.
- 65 **16.** Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, en el que la oxidación del algodón se realiza con ácido peryódico o un peryodato con una concentración comprendida entre 3 y 10 g/l, a una temperatura

comprendida entre 40 y 60°C, durante periodos comprendidos entre aproximadamente 15 minutos y 1 hora y con presiones de suministro en fase líquida del reactor de entre 0,30 y 0,50 MPa (3 y 5 bares).

- 5 **17.** Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, en el que la formación de iminas tiene lugar a una temperatura comprendida entre aproximadamente 40 y 60 °C, con valores de presión comprendidos entre aproximadamente 0,30 y 0,40 MPa (3 y 4 bares), a un pH comprendido entre 8,0 y 9,0, y con tiempos de reacción comprendidos entre 1 y 5 horas y en el que el antibiótico se usa en forma libre o como una sal del mismo.
- 10 **18.** Proceso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la formación de iminas se realiza haciendo reaccionar los grupos carbonilo de algodón y los grupos amino del antibiótico y de las proteínas de gelatina a una temperatura comprendida entre aproximadamente 40 y 60 °C, con valores de presión comprendidos entre aproximadamente 0,30 y 0,40 MPa (3 y 4 bares), a un pH comprendido entre 8,0 y 9,0 y con tiempos de reacción comprendidos entre 1 y 5 horas, y en el que el antibiótico se usa en forma libre o como una sal del mismo.
- 15 **19.** Proceso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que la formación de iminas se realiza usando el antibiótico o una sal del mismo previamente disuelto o suspendido en una solución acuosa de una o más gelatinas, en el que la concentración total de dichas gelatinas está comprendida entre el 0,5 y el 3% en p/v.
- 20 **20.** Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, en el que la reducción de las iminas en aminas se realiza añadiendo, a la mezcla de reacción resultante de la etapa anterior, un agente reductor tal como borohidruro de sodio (NaBH_4) o hidruro de litio y aluminio (LiAlH_4) en forma de soluciones acuosas que tienen una concentración de 1 g/l.