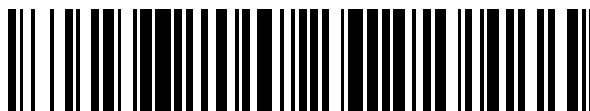


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 305**

51 Int. Cl.:

A01N 37/44 (2006.01)
A01N 37/46 (2006.01)
A61L 2/16 (2006.01)
A61L 27/34 (2006.01)
A61L 31/10 (2006.01)
C02F 1/50 (2006.01)
C09D 5/14 (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01)
A23L 3/3535 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.03.2006** **PCT/SE2006/000350**
87 Fecha y número de publicación internacional: **28.09.2006** **WO06101438**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2006** **E 06717035 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016** **EP 1860937**

54 Título: **Agente antimicrobiano que comprende un compuesto de cisteína unido covalentemente a un sustrato, en particular mediante unión a través de un puente S-S mediante una molécula espaciadora**

30 Prioridad:

21.03.2005 SE 0500629
01.04.2005 SE 0500729

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.11.2016

73 Titular/es:

CYTACOAT AB (100.0%)
Retzius väg 8
171 65 Solna, SE

72 Inventor/es:

WIRSEN, ANDERS;
AGERBERTH, BIRGITTA;
GUDMUNDSSON, GUDMUNDUR;
ODEBERG, JACOB y
LINDBERG, TORBJÖRN

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 588 305 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

Agente antimicrobiano que comprende un compuesto de cisteína unido covalentemente a un sustrato, en particular mediante unión a través de un puente S-S mediante una molécula espaciadora

Campo técnico

La invención se refiere a agentes o dispositivos antimicrobianos que entran en contacto con microorganismos y/o que se desea mantener libres de acumulación y/o adhesión de microorganismos. El sustrato o la superficie de dispositivo presenta un agente antimicrobiano de la invención.

Antecedentes técnicos

En diversas situaciones y aplicaciones de, por ejemplo, cuidado médico, manipulación de alimentos y almacenamiento de alimentos es muy importante que los dispositivos y productos que se usan se mantengan libres del crecimiento o la proliferación de microorganismos. Aún más, esto es extremadamente importante cuando se trata de dispositivos médicos que se ponen en contacto con pacientes en un hospital, puesto que los dispositivos contaminados pueden participar en la propagación de enfermedades y microorganismos de modo que pueden afectar gravemente a la salud de muchos pacientes.

Por ejemplo, sería muy ventajoso si los dispositivos y productos que entran en contacto con microorganismos potencialmente dañinos tuvieran la capacidad para inhibir o destruir bacterias y/u otros microorganismos, tales como virus y hongos, para prevenir la propagación de enfermedades.

El objetivo es impedir la colonización inicial que puede desarrollarse posteriormente para dar una biopelícula. La fase inicial de colonización puede suprimirse o bien mediante inhibición o bien mediante la destrucción de microorganismos.

Para obtener una protección de este tipo, se conoce dotar una superficie en un dispositivo de iones de metal, tales como iones de los elementos Ag y Ni. A menudo se aplica Ag como aleación con el fin de liberar los iones Ag^+ a una velocidad adecuada para el entorno, previniendo de ese modo la acumulación de microorganismos.

Sin embargo, un problema de esta solución es la adhesión del metal o la aleación a la superficie en cuestión. Además, el efecto antimicrobiano no se controla fácilmente, y además la superficie recubierta con ion de metal puede tener efectos citotóxicos.

El documento US-A-6475434 da a conocer una composición de penetración en biopelícula para la retirada de biopelículas formadas y constituidas por microorganismos infecciosos así como para recubrir dispositivos médicos para impedir la formación de tales biopelículas. La composición comprende cisteína y análogos o derivados de la misma que van a seleccionarse como uno de los componentes. El papel de la cisteína o el componente relacionado con cisteína no está claro y en particular para aplicaciones de recubrimiento se usan en combinación con agentes antimicrobianos conocidos tales como rifamicinas, tetraciclinas y penicilinas. Especialmente, tal como se muestra en los ejemplos 2 y 3 del documento US-A-6475434, el único componente de cisteína sometido a prueba (que es N-acetil-cisteína) no tiene ningún efecto a menos que se combine con los antibióticos sometidos a prueba. Además para la protección frente a biopelículas, se aplican todos los componentes mediante impregnación del dispositivo o mezclado con el material del dispositivo durante su fabricación. Los componentes se unen entonces físicamente mediante adhesión y penetración en el material del dispositivo, lo que significa que su función se produce en gran medida tras su liberación al entorno. Particularmente en aplicación médica, tales conceptos requieren un estricto control del equilibrio entre efectos antimicrobianos, citotóxicos e inmunogénicos. Puesto que la difusión depende del tiempo y la temperatura, el almacenamiento y la durabilidad de los dispositivos recubiertos también se convierten en asuntos de grave preocupación.

Olofsson *et al.* (Applied and Environmental Microbiology, agosto de 2003; 69(8), 4814-4822) han descrito que N-acetil-cisteína puede afectar al crecimiento bacteriano en disolución. Otros efectos de N-acetil-cisteína fueron disminuir la adhesión de bacterias de múltiples especies sobre superficies de acero inoxidable o facilitar el desprendimiento de una biopelícula sobre superficies de acero inoxidable.

Un propósito principal de la presente invención es proporcionar un agente antimicrobiano que tenga la capacidad para impedir o al menos reducir sustancialmente la acumulación y/o adhesión de microorganismos individuales sobre la superficie de un dispositivo de manera estable y a largo plazo. Este propósito lo consiguen los inventores en un primer aspecto de la invención, haciendo referencia a un agente antimicrobiano que comprende un sustrato con un componente de cisteína unido covalentemente.

La invención proporciona un agente antimicrobiano en el que el componente de cisteína se une a través de un puente S-S mediante una molécula espaciadora al sustrato. El espaciador comprende una cadena carbonada, opcionalmente interrumpida por uno o más heteroátomos, por ejemplo O, S, N, P o Si, y la cadena está

opcionalmente sustituida con uno o más grupos alquilo, preferiblemente grupos alquilo inferior con 1-6 átomos de carbono, grupos hidroxilo o grupos alcoxilo. En los ejemplos facilitados a continuación, el componente de cisteína se une en una posición terminal del espaciador mediante un puente S-S, que es una realización preferida de la invención. Sin embargo, también son posibles otras posiciones en la cadena del espaciador siempre que la función cisteína se exponga al entorno.

Según una realización preferida de la invención, el ligando que contiene cisteína unido a un sustrato tiene la fórmula general:

(1) $R_1-X-L-S-S-(\text{componente de cisteína})$, en la que

- R_1 es un sustrato soluble o insoluble; por ejemplo una superficie sólida o una molécula o un polímero orgánico soluble.

- X es un grupo de unión de la reacción de acoplamiento entre el sustrato y L.

- L es una molécula espaciadora seleccionada del grupo que comprende $(CH_2)_m$ en el que m es 1-20, preferiblemente 1-12, 1-8 ó 1-6; $(CH_2CH_2O)_n(CH_2)_p$ o $(CH(CH_3)CH_2O)_n(CH_2)_p$ en el que n es 1-1000, preferiblemente 1-100 ó 3-50, y p es 1-20, preferiblemente 1-12, 1-10 ó 1-6. El segmento $(CH_2)_p$ se une al puente disulfuro pero también puede aparecer opcionalmente entre los segmentos $(CH_2CH_2O)_n$ y/o $(CH(CH_3)CH_2O)_n$ en un copolímero de bloque;

- el componente de cisteína se denomina en el presente documento residuo de un compuesto de cisteína que comprende cisteína, un análogo de cisteína o derivado de cisteína que proporciona actividad antimicrobiana que es sustancialmente igual o de un nivel comparable a la conferida por cisteína. Se ha observado que una realización de la invención en la que el componente de cisteína se une mediante un puente S-S que comprende un S del grupo tiol del componente de cisteína y un S de la molécula espaciadora es de especial importancia, al menos en algunas aplicaciones, debido a su actividad antimicrobiana superior.

Por consiguiente, se proporciona un agente antimicrobiano que se une covalentemente a la superficie del dispositivo, y que, debido a los efectos sorprendentemente ventajosos de la cisteína unida covalentemente, tiene un efecto elevado y a largo plazo; véanse los ejemplos a continuación, sobre microorganismos individuales, previniendo de ese modo o inhibiendo sustancialmente la adhesión y acumulación de microorganismos individuales. Por tanto, la presente invención ofrece un enorme potencial para todas las aplicaciones en las se desea que una superficie o un sustrato presente propiedades antimicrobianas/antibacterianas. Una ventaja adicional y esencial de la invención, es que los inventores han mostrado que el agente de la invención parece carecer de efectos citotóxicos, lo que hace que pueda usarse en muchas aplicaciones diferentes.

En un aspecto de la presente invención, diversos dispositivos que se desea mantener libres de acumulación y/o adhesión de microorganismos se recubren por completo o parcialmente con un agente antimicrobiano según la invención.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un agente antimicrobiano de la invención para impedir el crecimiento y/o la proliferación de microorganismos sobre un sustrato y/o una superficie de un dispositivo.

En contraposición al documento US-A-6475434, la presente invención proporciona un método para tener la cisteína o el componente relacionado con cisteína unidos covalentemente a un sustrato. Un uso importante para la invención es proporcionar un recubrimiento antimicrobiano en un dispositivo sólido. Mediante este concepto, los agentes antimicrobianos se unen de manera permanente a la superficie y el efecto antimicrobiano se produce tras el contacto con la superficie más que a partir de la reacción con agentes liberados, lo que disminuirá en gran medida el riesgo de efectos adversos en un entorno biológico. Esto es una diferente importante en comparación con los métodos de la técnica anterior en los que se proporciona cisteína tal cual como agente de liberación. También mediante unión covalente, puede hacerse que la superficie sea más específica en cuanto a concentración en superficie y estructura química. Por tanto no sólo la propia cisteína o el propio componente relacionado con cisteína unidos a la superficie sino, al menos en algunas aplicaciones, también el enlace disulfuro mediante el que se unen a la superficie es una de las características inventivas del presente concepto con respecto al efecto antimicrobiano. Además, la unión covalente proporciona una superficie, que *in situ* así como en almacenamiento es superior en cuanto a consistencia y durabilidad en comparación con superficies en las que la difusión y fuga de los agentes activos son una preocupación importante.

“Un agente antimicrobiano” comprende un sustrato que se ha modificado para presentar un componente de cisteína unido covalentemente y tiene el efecto de impedir, o al menos impedir sustancialmente la acumulación, el crecimiento y/o la proliferación de al menos un microorganismo específico. Este efecto puede observarse, por ejemplo, mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo mediante los métodos usados en la sección de ejemplos de esta divulgación.

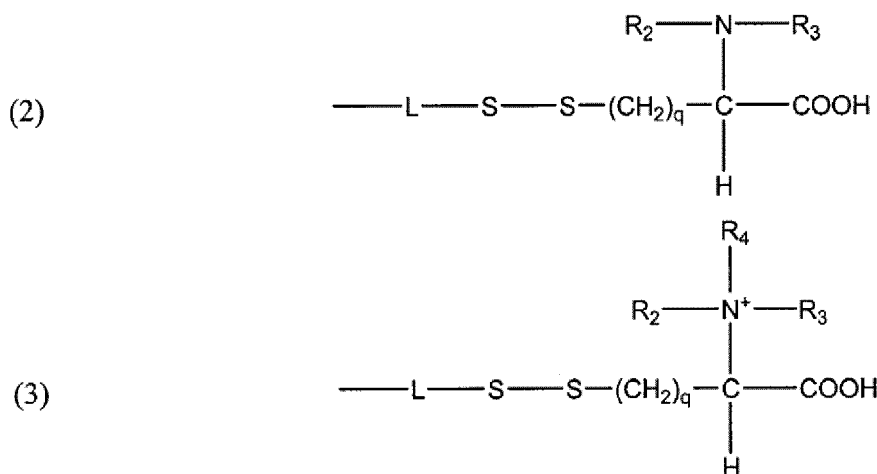
Un "componente de cisteína" comprende el residuo de cisteína, un análogo de cisteína o derivado de cisteína que tiene efecto antimicrobiano, por ejemplo homocisteína o cisteínas N-sustituidas tales como N-acetil-L-cisteína y cisteínas N-alquiladas.

"Sustrato" (R_1) comprende cualquier artículo, dispositivo, molécula o polímero, soluble o insoluble que puede funcionalizarse para obtener propiedades antimicrobianas mediante la unión de un componente de cisteína. De especial interés son los artículos sólidos como dispositivos médicos que van a usarse en el interior de o en contacto con el cuerpo humano o animal, en particular tejidos sensibles y líquidos corporales. Esta lista de posibles aplicaciones es extensa, véase además a continuación, e incluye implantes, tubos, catéteres de drenaje, etc. que van a usarse, por ejemplo, en aplicaciones extracorpóreas, drenaje (por ejemplo de oídos o hidrocefalia), diálisis, lentes de contacto, lentes intraoculares, pieles artificiales, equipos para diálisis, sistemas de circulación extracorpórea, materiales de sutura, dispositivos para el cuidado de heridas, productos dentales, administración parenteral, administración de fármacos, endoprótesis, bombas (por ejemplo para insulina), audífonos, jeringas, materiales de sutura, marcapasos, etc.

"Impedir" o "inhibir" comprende la capacidad para detener o reducir sustancialmente el crecimiento y/o la proliferación y/o acumulación y/o reducir sustancialmente la viabilidad de microorganismos en una posición en la que está presente el agente de la invención.

El principal potencial de la presente invención es ofrecer la posibilidad de proporcionar una superficie antimicrobiana en un dispositivo sólido, que potencialmente entra en contacto con microorganismos, y que se desea mantener libre de acumulación y/o proliferación de microorganismos y/o servir como depósito para microorganismos viables. El gran número de dispositivos que van a usarse en aplicaciones médicas así como de manipulación de alimentos en las que la presencia de microorganismos puede ser más o menos peligrosa, ilustra el potencial de esta invención. Para hacer que esto sea posible, los inventores han usado satisfactoriamente la sustancia cisteína, que los inventores han mostrado que tiene un efecto antimicrobiano inesperadamente intenso cuando se une covalentemente tal como se describe y reivindica en el presente documento. También se han mostrado efectos antimicrobianos para análogos y derivados de cisteína, como N-acetilcisteína y homocisteína.

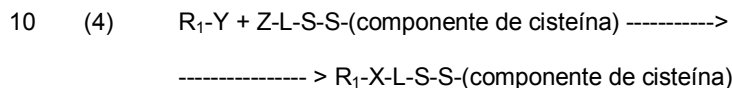
Los polímeros u oligómeros de óxido de etileno y óxido de propileno, es decir poli(óxido de etileno) o poli(etilenglicol) son inmediatamente solubles en agua y además el poli(óxido de etileno) tiene propiedades repelentes de proteínas, lo que puede añadirse a la función antibacteriana de esta invención especialmente cuando se usa en relación con superficies. Dependiendo del componente de cisteína, las siguientes estructuras son ejemplos de ligandos adecuados que van a usarse:



En la fórmula (2), los sustituyentes R_2 , R_3 pueden ser hidrógeno o alquilo con de 1 a 20 átomos de carbono, preferiblemente desde 1 hasta 12, más preferiblemente de 1 a 6, en cualquier combinación de R_2 y R_3 y q puede tener la misma variación que m y p para los constituyentes de metileno del segmento L tal como se describió anteriormente, es decir desde 1 hasta 20, preferiblemente desde 1 hasta 12, más preferiblemente desde 1 hasta 6. Cuando $q = 1$ y $R_2 = R_3 = H$ el componente de cisteína se convierte en un residuo de cisteína que como los homólogos y derivados de cisteína se acopla mediante su grupo tiol que contribuye con un azufre al enlace disulfuro. Además de la alquilación directa del grupo amino de cisteína, los alquilos de R_2 y R_3 pueden unirse mediante un enlace amida que comprende el nitrógeno del componente de cisteína, por ejemplo cuando R_2 es hidrógeno y R_3 es metilo, el componente de cisteína se convierte en acetilcisteína.

En la fórmula (3), R_2 , R_3 , R_4 son sustituyentes alquilo que proporciona un grupo amino cuaternario cargado positivamente. En este caso, el número de átomos de carbono en las cadenas de alquilo de los sustituyentes R_2 , R_3 ,

R_4 puede variar entre 1 y 25, preferiblemente entre 1 y 18 en cualquier combinación. Además, q puede tener la misma variación que m y p para los constituyentes de metileno del segmento L tal como se describió anteriormente es decir desde 1 hasta 20, preferiblemente desde 1 hasta 12, más preferiblemente desde 1 hasta 6. Dependiendo del pH, también pueden aparecer grupos iónicos cargados como grupos amino protonados en (2) y grupos carboxilato en (2) y (3). El acoplamiento $-X-$ entre el sustrato R_1 y el ligando se obtiene mediante reacciones químicas entre grupos funcionales en R_1 y el ligando respectivo. Si R_1 tiene una funcionalidad química Y y una funcionalidad de ligando Z que tras reacción proporciona X , la reacción de acoplamiento principal mediante la que pueden omitirse los subproductos, puede escribirse como:



Dependiendo de la elección de Y y Z y las condiciones de reacción, el grupo X obtenido puede ser amida, amina secundaria, éster, éter, hidrazina, uretano, urea, carbonato y otros. Un gran número de reacciones específicas y eficientes están disponibles, que están bien establecidas en la química orgánica. Los grupos Y , Z y X así como las reacciones facilitadas en el presente documento son por tanto ejemplos y no limitativos para la invención.

Tabla 1

20	(a)	cuando $Y = \text{COOH}$	y $Z = \text{NH}_2$	entonces $X = \text{CONH}$
	(b)	" $Y = \text{COCl}$	" $Z = \text{NH}_2$	" $X = \text{CONH}$
25	(c)	" $Y = \text{COOH}$	" $Z = \text{OH}$	" $X = \text{COO}$
	(d)	" $Y = \text{COCl}$	" $Z = \text{OH}$	" $X = \text{COO}$
30	(e)	" $Y = \text{NH}_2$	" $Z = \text{CHO}$	" $X = \text{NH}$
	(f)	" $Y = \text{NHNH}_2$	" $Z = \text{CHO}$	" $X = \text{NHNH}$
	(g)	" $Y = \text{NH}_2$	" $Z = \text{NCO}$	" $X = \text{NHCONH}$
35	(h)	" $Y = \text{NH}_2$	" $Z = \text{OCOO}_p\text{NO}_2$	" $X = \text{NHCOO}$
	(i)	" $Y = \text{NH}_2$	" $Z = \text{succinimidil-}$	" $X = \text{NHCO}$
40	(j)	" $Y = \text{NH}_2$	" $Z = \text{epoxi-}$	" $X = \text{NHCH}_2\text{CH(OH)}$
	(k)	" $Y = \text{OH}$	" $Z = \text{NCO}$	" $X = \text{OCONH}$
	(l)	" $Y = \text{OH}$	" $Z = \text{epoxi}$	" $X = \text{OCH}_2\text{CH(OH)}$
45	(m)	" $Y = \text{OSO}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$	" $Z = \text{NH}_2$	" $X = \text{CH}_2\text{NH}$
	(n)	" $Y = \text{OSO}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$	" $Z = \text{SH}$	" $X = \text{CH}_2\text{S}$
50	(o)	" $Y = \text{SS}$	" $Z = \text{SH}$	" $X = \text{SS}$
	(p)	" $Y = (\text{alquil})_3\text{COK}$	" $Z = (\text{alquil})\text{Br}$	" $X = \text{O}$
	(q)	" $R_1 = \text{Au, Ag}$	" $Z = \text{SH}$	" $X = \text{S}$
55	(r)	" $R_1 = \text{Au, Ag}$	" $Z = \text{SS}$	" $X = \text{S}$
	(s)	" $R_1 = R_1\cdot$	" $Z = \text{CH}_2=\text{C-}$	" $X = \text{CH-C-}$

Los grupos Y y Z en los ejemplos (a) a (p) pueden intercambiarse entre R_1 y el ligando para dar el mismo grupo de unión X aunque invertido entre R_1 y el ligando. Por ejemplo cuando se intercambian los grupos funcionales en (a) a $Y = \text{NH}_2$ y $Z = \text{COOH}$, el grupo de unión X se convierte en HNOC . En los ejemplos (e) y (f), la imina obtenida inicialmente conocida generalmente como base de Schiff se reduce para dar el grupo de unión de amina secundaria con NaCNBH_3 . A menudo se usan etapas intermedias para aumentar la selectividad y el rendimiento. Ejemplos bien conocidos son activación del grupo carboxílico (Y) en (a) con una carbodiimida y/o imida N -hidroxisuccínica antes de la formación de amida con el grupo amino (Z). Pueden activarse grupos amina con carbonato de disuccinimidilo para formar el grupo de unión de urea con otro grupo amina.

Además de grupos carboxílicos y amino, también son útiles grupos hidroxílicos en un gran número de aplicaciones de acoplamiento:

- 5 - después de la derivatización para dar carbonatos que proporcionan el grupo Z en (h) en el que ϕ indica un anillo de benceno o en grupos tresilados como en (m) y (n)
- después de la activación de grupos hidroxílicos mediante derivatización para dar grupos carbonato de tosilo o succinimidilo o tratamiento con Br_2 o CNBr para reacciones de acoplamiento con nucleófilos como aminas y/o tioles.
- 10 - dos grupos hidroxílicos pueden unirse junto con fosgeno para formar un grupo de unión de carbonato.

15 En la bibliografía se encuentran revisiones exhaustivas sobre la química de acoplamiento con las reacciones mencionadas en el presente documento así como reacciones de acoplamiento adicionales (ref. Herman S. *et al.* J. Bioact. Compat. Pol. 1995, 10, 145-187)

20 En el ejemplo (s) de la tabla 1, R_1 simboliza(n) un sustrato sólido con radicales libres accesible para la reacción con un grupo insaturado ejemplificado pero no limitado a dobles enlaces etilénicos, acrílicos o metacrílicos. Usando monómeros que tienen el ligando -L-S-S-(componente de cisteína) unidos enlaces carbono-carbono reactivos, pueden obtenerse cadenas oligoméricas o poliméricas que se unen covalentemente al sustrato y que tienen el ligando como grupos laterales. La concentración de estos grupos laterales en las cadenas oligoméricas o poliméricas puede controlarse mediante copolimerización con monómeros adecuados ejemplificados pero no limitados a ácidos o ésteres acrílicos o metacrílicos o acrilamida. Otra ruta sería usar monómeros como ácido maleico, anhídrido maleico, ácido tíglico o alilamina que se unen fácilmente a una superficie que proporciona radicales libres pero tienen una propagación de cadena fuertemente reducida. Los grupos funcionales proporcionados por estos monómeros, es decir anhídrido, carboxilo o amina se quedarán por tanto confinados a una capa de superficie muy delgada sobre el sustrato. Mediante esta ruta, cada acoplamiento de ligando se producirá esencialmente mediante unión terminal directamente a grupos funcionales sobre la superficie, proporcionando por tanto una estructura diferente en comparación con la obtenida cuando el ligando participa en polimerización por injerto.

35 La reacción de acoplamiento con $\text{R}_1\text{-Y}$ puede producirse según (4) siempre que el grupo Y reaccione selectivamente con el grupo Z del ligando y no con grupos amino o carboxílicos en el componente de cisteína.

En casos en los que el grupo Y puede no reaccionar exclusivamente con el grupo Z del ligando representado por:

(5) Z-L-S-S-(componente de cisteína)

40 sino también con el grupo amino y/o carboxílico del componente de cisteína, estos grupos pueden protegerse, si se requiere, mediante sustitución y esterificación, respectivamente. El grupo amino puede protegerse mediante sustituyentes ejemplificados por butiloxycarbonilo terciario (t-BuO). Naturalmente, esto sólo es necesario cuando el grupo amino no se alquila para dar aminas terciarias o cuaternarias tal como se define en las ecuaciones (2) y (3). El grupo carboxilo del componente de cisteína puede protegerse mediante metilación. Después de la reacción de acoplamiento entre $\text{R}_1\text{-Y}$ y el ligando Z para obtener el ligando unido a X como en la ecuación (4), el t-BuO y los grupos metilo de éster pueden eliminarse mediante hidrólisis ácida y alcalina, respectivamente y por tanto restaurar la estructura original del ligando Z. Con estas opciones, el ligando Z tal como se define en las ecuaciones (2)-(4) y mediante la fórmula (5) y además disponible con diversas funcionalidades Z como elemento independiente de esta invención que va a usarse como componente de un kit para una modificación en una sola etapa de superficies funcionalizadas. Este aspecto de la invención también cubre el ejemplo descrito anteriormente en el que la funcionalidad Y del sustrato es un radical libre y la funcionalidad Z del ligando es un enlace carbono-carbono reactivo insaturado.

55 Cuando el grupo funcional Y se une a un sustrato sólido, puede sinterizarse el ligando *in situ* sobre el sustrato superficie. Esto tiene la ventaja de que se eliminan los grupos Y sin reaccionar así como los subproductos en etapas intermedias. Mediante este procedimiento, la primera etapa será hacer reaccionar superficie con $\text{R}_1\text{-Y}$ con un compuesto que tiene la composición general

(6) Z-L-S-S- R_5

60 en la que L tiene la misma definición que anteriormente y en la que el sustituyente R_5 se sustituye fácilmente tras reacción con tioles para dar un nuevo enlace disulfuro con un compuesto de tiol.

La primera etapa de acoplamiento puede expresarse como:

(7) $\text{R}_1\text{-Y} + \text{Z-L-S-S-}\text{R}_5 \text{ -----} >$

----- > R₁-X-L-S-S-R₅

y la siguiente etapa:

(8) R₁-X-L-S-S-R₅ + HS-componente de cisteína ----- >

----- > R₁-X-L-S-S-componente de cisteína (+ R₅HS)

10 Un ejemplo común de R₅ es piridinilo pero también se usa dansilo. Alternativamente, el enlace disulfuro en (6) pueden pertenecer a un grupo tiosulfato que dará también una unión disulfuro tras reacción con un tiol.

Además, existe una ruta alternativa para obtener esencialmente la misma estructura química que anteriormente y que también está dentro del alcance de esta invención. En este caso, un segmento de tiol o grupo -L-SH se une a R₁ mediante el grupo de acoplamiento X y en los que L y X se definen como anteriormente y -SH es un grupo tiol terminal. Este puede reaccionar exclusivamente con el grupo tiol del componente de cisteína en presencia de oxidantes para formar el grupo de unión de disulfuro con el componente de cisteína:

(9) R₁-X-L-SH + HS-(componente de cisteína) ----->

-----> R₁-X-L-S-S-(componente de cisteína)

+ (H₂ o subproducto que contiene hidrógeno)

25 Cuando finalmente el componente de cisteína se acopla según la fórmula (9), se obtiene un ligando antimicrobiano que se une covalentemente a R₁, tal como se muestra esquemáticamente en la fórmula (9). Puede lograrse la funcionalización de superficie de materiales poliméricos tales como plásticos, caucho, materiales celulósicos, etc. mediante injerto o adsorción de compuestos que portan grupos funcionales, tales como por ejemplo carboxilo o amina. El injerto que proporciona un grupo de unión covalente al sustrato requiere funcionalización de la superficie.

30 Se injertan compuestos que pueden reaccionar con radicales libres durante o después de la activación con UV, irradiación con haz de electrones o radiación gamma o plasma gaseoso. Mediante estos métodos, pueden generarse radicales libres en sustratos poliméricos que pueden iniciar la polimerización por injerto sobre tales sustratos. Estos métodos de modificaciones de superficie para sustratos poliméricos sólidos se representan mediante el ejemplo (q) en la tabla 1. En este procedimiento, el injerto implica habitualmente propagación de cadena desde la superficie del sustrato conocida como polimerización por injerto. Monómeros que se usan frecuentemente en la polimerización por injerto por radicales libres son compuestos acrílicos como ácido acrílico, ácido metacrílico y sus ésteres o acrilamida así como vinilpirrolidona. Mediante la polimerización por injerto de tales monómeros que contienen grupos funcionales, por ejemplo carboxilo, amino, halógenos etc., puede dotarse una superficie sólida de grupos funcionales unidos covalentemente para la unión covalente del ligando antimicrobiano. Una aplicación especial de la polimerización por injerto también comprendida en la presente invención se describió anteriormente en la que el ligando antimicrobiano tal como se representa en la fórmula (6) podría polimerizarse por injerto cuando Z es un grupo reactivo con radicales libres que contiene enlaces carbono-carbono insaturados reactivos. Esto proporcionaría ligandos antimicrobianos como grupos laterales en las cadenas polimerizadas por injerto cuya concentración y ubicación pueden controlarse mediante copolimerización por injerto con monómeros vinílicos o acrílicos adecuados. Sin embargo, tal como se describió también anteriormente, el ligando antimicrobiano puede unirse de manera terminal directamente al sustrato. En este caso, la funcionalización del sustrato se realiza en una primera etapa mediante injerto monomolecular con compuestos insaturados que tienen una propagación de cadena insignificante como anhídrido maleico, ácido maleico y ácido trifílico o un monómero de autoterminación como alilamina. Mediante este procedimiento, pueden generarse grupos funcionales sobre la superficie para la unión terminal directa del ligando antimicrobiano mediante acoplamiento químico. También en casos en los que un ligando vinílico o acrílico en la fórmula (6) no se polimerizará, por ejemplo por motivos estéricos, se uniría directamente mediante reacción terminal con radicales libres en el sustrato. En casos en los que el sustrato tal cual es un material de plástico hidrolizable como poliéster (PET), poliamida (Nylon™, Nomex™, Kevlar™) o poliacrilato (PMMA), puede obtenerse la funcionalización de superficie mediante hidrólisis en una disolución básica o ácida. Los poliésteres proporcionarían grupos carboxílicos e hidroxílicos y las poliamidas grupos carboxílicos y de amina, que pueden usarse en modificaciones posteriores mediante acoplamiento o adsorción.

Pueden funcionalizarse en superficie sustratos metálicos como acero inoxidable con grupos carboxílicos mediante tratamiento con radiación y plasma. Se carboxilan artículos médicos como endoprótesis mediante exposición a plasma gaseoso de silano y ácido acrílico. Pueden injertarse superficies de oro y plata usando su reactividad frente a compuestos de tiol y disulfuro, que también portarían otros grupos como carboxilo o amina. Para sustratos metálicos también puede obtenerse el injerto por radicales libres de superficies mediante polarización catódica de los sustratos conductores durante la exposición a monómeros que pueden formar grupos de unión covalentes tras la reacción con radicales libres. El injerto de superficie es análogo al de sustratos poliméricos sólidos en cuanto a la iniciación, propagación y los monómeros y también se representa mediante el ejemplo (s) en la tabla de la tabla 1. Cuando se realiza modificación de superficie de sustratos poliméricos a través de adsorción, a menudo se realiza la imprimación

del sustrato mediante oxidación química, tratamiento corona o plasma gaseoso oxidativo para obtener grupos hidrófilos e iónicos en la capa de superficie. Un ejemplo es la adsorción de polietilenimina sobre sustratos poliméricos que se han oxidado con permanganato o persulfato. Las superficies con amino obtenidas pueden usarse para reacciones de acoplamiento químico así como adsorción de polímeros cargados negativamente como poli(ácido acrílico), sulfato de dextrano o heparina a pH adecuado. A menudo tales polielectrolitos en sus estados cargados iónicamente se adsorben en capas alternas con las propiedades de interés en la capa más externa. Especialmente se realiza a menudo la carboxilación de superficies metálicas mediante adsorción de poli(ácido acrílico) o poli(ácido metacrílico). Tal como se describió anteriormente, pueden aminorarse entonces mediante acoplamiento químico o mediante adsorción iónica de, por ejemplo, polietilenimina o polialilamina. Otro modo de obtener adsorción, que no requiere ninguna funcionalización primaria del sustrato, es usar copolímeros de bloque que tienen bloques o segmentos tanto hidrófobos como hidrófilos que se adsorberán selectivamente en y funcionalizarán la superficie del sustrato. Tales copolímeros de bloque típicos son polietilenglicol-polipropileno (Pluronic) y policrilatos-poliestireno, poliácridatos-polietileno, polibutadienos-poliestireno y otros que también pueden contener funcionalidades aminas o carboxílicas.

Por definición, el ligando antibacteriano -L-S-S-(componente de cisteína) de esta invención siempre está unido covalentemente a un sustrato, R_1 . Sin embargo, puesto que la definición de R_1 incluye compuestos orgánicos y poliméricos, R_1 también cubrirá polímeros que pueden unirse posteriormente a un sustrato sólido mediante unión covalente o adsorción. Las opciones para la unión covalente del agente antibacteriano de esta invención sobre un sustrato sólido se enfatizan mediante la definición de R_1 , que comprende esa unión del agente antimicrobiano a un sustrato sólido mediante adsorción. En este caso, R_1 es un sustrato soluble, ejemplificado por ejemplo por polímeros ionizables como polietilenimina o poli(ácido acrílico) o copolímeros de bloque con bloques hidrófobos/hidrófilos como polietilenglicol-polipropilenglicol o poliácridatos en copolímeros de bloque con poliestireno, polietileno y otros. El componente de cisteína se une covalentemente a un sustrato soluble que en una etapa adicional se inmoviliza sobre un sustrato sólido tal como se describe en el presente documento.

Por tanto, las modificaciones de superficie así como el posterior acoplamiento químico o adsorción usados para unir los agentes antibacterianos pueden realizarse mediante muchas rutas diferentes. Además, los sustratos pueden ser materiales orgánicos o inorgánicos que comprenden polímeros sintéticos o naturales así como metales y minerales. Por tanto, los métodos, las reacciones químicas y los sustratos, que se presentan en el presente documento y los ejemplos a continuación, sólo son descriptivos y no limitativos para la obtención de las superficies y los agentes antibacterianos cubiertos por la invención.

La concentración en superficie del agente de la invención, tal como L-cisteína, está en el intervalo desde 10^{-11} hasta 10^{-4} mol/cm², y preferiblemente en el intervalo desde 10^{-9} hasta 10^{-5} mol/cm².

Para obtener la inhibición de microorganismos clínica o técnicamente importantes, se logró preferiblemente una inhibición de 100 veces según la invención con respecto a bacterias viables adherentes que pueden liberarse con el ensayo, partiendo de una gran exposición (título de 400 000 ufc/ml en el cultivo de partida). Esto puede depender en parte del organismo específico y del grado/título de exposición. Las condiciones sometidas a prueba superan ampliamente lo que puede esperarse en la situación clínica real.

Ejemplos de microorganismos, para los que puede usarse la invención para impedir el crecimiento y/o la proliferación de, son bacterias anaerobias y aerobias que engloban tanto diferentes bacterias Gram-positivas elegidas de, pero sin limitarse a, diferente especies de *Staphylococci*, tales como *S. aureus*, *S. epidermidis* y otros *Staphylococci* negativos para coagulasa, *S. saprophyticus*, *Enterococcus* spp, *Nisseriae* (meningococos, gonococos), *Streptococci* (*Viridans*, hemolítico y no hemolítico, grupo B y D, *S. pneumoniae*), *Chlostridia* (*perfringens*, *botulinum*), *Bacillus megaterium*, así como diferentes especies Gram-negativas elegidas de, pero sin limitarse a, diferentes *Enterobacter* spp, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Proteus*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Hemophilus* (*influenza*), *Bacteriodes* (*fragilis*, *bivius*), *Pseudomonas* (*aeruginosa*, *cepacia*), *Legionella* (*pneumophila*). También están incluidas diferentes especies de *Mycoplasma* y especies de *Candida* y diferentes hongos. Ejemplos preferidos de bacterias son la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli*, o la bacteria Gram-positiva *Bacillus megaterium*.

La invención puede usarse para impedir o inhibir el crecimiento de microorganismos sobre superficies de diferentes aplicaciones que pueden provocar un problema debido a colonización o infección. Se ha mostrado en el presente documento que es eficaz frente a bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas (la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli*, o las bacterias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* y *Bacillus megaterium*). Se han descrito varios microorganismos diferentes en relación con la colonización de catéteres e infección en el sector de la atención sanitaria y el ámbito hospitalario. Estos microorganismos incluyen, pero no se limitan a, las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas enumeradas a continuación. También diferentes hongos son un problema frecuente, especialmente en pacientes inmunocomprometidos (que se someten a trasplante, o terapia inmunosupresora de otro modo, etc.). La invención puede utilizarse cuando la infección, colonización o formación de biopelícula en dispositivos artificiales (catéteres, tubos de traqueostomía, etc.) pueden ser un problema en la atención sanitaria. Ejemplos de microorganismos conocidos o que se describe que se transmiten por catéter, y frente a los que puede usarse la invención, son (pero no se limitan a): *Staphylococci* spp (tales como *S. aureus*, *S. epidermidis* y otros

Staphylococci negativos para coagulasa como *S. saprophyticus*); *Streptococci* spp (*viridans*, hemolítico y nonhemolítico, grupo B y D, *S. pneumoniae*; *Enterococcus* spp, *S. faecalis*; *Chlostridia* (*perfringens*, *botulinum*); diferentes *Enterobacter* spp, como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp (*pneumonia*), *Enterobacter cloace*, *aerogenes*, *Proteus*, (*mirabilis*), *Campylobacter*, *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Hemophilus* (*influenza*), *Neisseriae* (meningococo y gonococo), *Bacteroides* (*Bacteroides* Spp. y *Fusobacterium*), *Pseudomonas* (*aeruginosa*, *cepacia*), *Legionella* (*pneumophila*), *Serratia marcenens*, *Acinetobacter* spp, *Morganella morganii*, *Stenotrophomonas*, *Citrobacter* spp, *Corynebacterium* spp, *Burkholderia cepafia*, *Acinetobacter* spp; diferentes especies de *Mycoplasma* (*M. avian* y otros); y también hongos tales como *Candida* spp, *C. tropicales*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichosporon*, *Blastoschizomyces*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Malassezia*, *Burkholderia cepafia*, *Aspergillus*.

En muchas aplicaciones de la presente invención, el sustrato forma parte de un dispositivo, un aparato y/o una superficie elegidos de (a) dispositivos médicos, tales como dispositivos médicos extracorpóreos, que son aplicables al exterior del cuerpo humano o animal o dispositivos médicos intracorpóreos, que son aplicables en el interior del cuerpo humano o animal, (b) dispositivos de puntos de venta de alimentación, y (c) otros dispositivos. Los ejemplos de aplicaciones enumerados a continuación sólo pretenden demostrar el potencial de la invención sin ser limitativos en modo alguno.

Dispositivos médicos (a) comprenden aplicaciones elegidas de:

- piel artificial o protección para heridas de quemaduras
- diálisis (tubos desde y al dispositivo para diálisis)
- drenaje de los oídos (drenaje de una cavidad, herida o absceso o en el interior del oído)
- implantes en los oídos (implantes en el interior del oído)
- audífono (aparato auditivo colocado internamente)
- tubos de un sistema de circulación extracorpórea (tubos desde y al dispositivo del sistema de circulación extracorpórea)
- drenaje en hidrocefalia (drenaje de la región/ventrículos cerebrales)
- jeringa (jeringas desechables)
- ostomías (dispositivos para ostomía)
- materiales de sutura (dispositivos de sutura)
- cuidado de heridas (dispositivos para el cuidado de heridas, tales como yeso).
- catéteres (dispositivos de catéter desechable y permanente, por ejemplo catéteres venosos centrales (CVC), catéteres venosos periféricos (CVP), catéteres centrales insertados de manera periférica, sondas urinarias y catéteres peritoneales)
- productos dentales (productos implantados en la región bucal)
- implantes en el cuerpo (huesos, para periodontitis (productos implantados en la región bucal))
- bomba de insulina (tubos desde y a la bomba de insulina)
- líneas guía de nervios (dispositivos de guiado para nervios)
- marcapasos (marcapasos y sus dispositivos circundantes)
- drenaje posoperatorio (dispositivos de drenaje de manera posterior a cirugía)
- drenaje de regiones y/u órganos y cavidades dentro del cuerpo humano (absceso, nefrostomía y similar)
- endoprótesis intracorpóreas/intraluminales (endoprótesis usadas para mantener abiertas diferentes luces, por ejemplo en el sistema vascular y los vasos, en órganos y tejidos, en el sistema intestinal, vías biliares, etc.)
- tubos o equipos usados para la administración parenteral de líquidos, disoluciones, infusiones, administración de fármacos.

Los dispositivos de puntos de venta de alimentación (b) comprenden aplicaciones elegidas de:

- superficies de contacto para alimentos frescos o sustratos o dispositivos usados en la transformación de alimentos (superficies que pueden estar en contacto con fuentes bacterianas)
- envases de fármacos (para mantener la abertura libre de bacterias) (acondicionamiento para fármacos sensibles)
- dispositivos de ordeño (dispositivos sometidos a fuentes bacterianas durante operaciones de ordeño)
- dispositivos rociadores (dispositivos rociadores y otros dispositivos de transporte de agua que pueden colonizar microorganismos, tales como boquillas en una tienda de alimentación)
- acero para rodillos dentro de la industria de la pesca (rodillos usados en la industria de la pesca para potenciar la producción de productos de pescado).

Los dispositivos variados (c) comprenden aplicaciones elegidas de:

- lentes de contacto (lentes de contacto habituales)
- lentes intraoculares
- productos cosméticos envasados (envases para diferentes productos cosméticos)
- tanques de agua (tanques de agua que contienen agua corriente o agua de recirculación)
- tuberías de agua (tuberías que transportan agua corriente o agua de recirculación)
- dispositivos de aire acondicionado, enfriamiento de aire y agua,
- otros dispositivos para el almacenamiento de productos o materiales en los que no se desea el crecimiento bacteriano en superficies del material de almacenamiento.

En todas estas aplicaciones, el agente antimicrobiano de la invención se acopla a una superficie del dispositivo, tal como se comentó anteriormente, para conferir el efecto antimicrobiano.

En una realización preferida, el agente antimicrobiano se acopla a una superficie de catéter, proporcionando de ese modo un catéter que puede impedir el crecimiento y/o la proliferación de microorganismos. Normalmente la superficie interior y/o la exterior del catéter se recubre con el agente de la invención. Puede incorporarse además el procedimiento de recubrimiento de la superficie del catéter durante o después de la extrusión del catéter, o como etapa independiente, antes o después del ensamblaje del catéter específico. Para muestras de catéter tratado, se ha mostrado que el efecto microbiano permanece después de varios años de almacenamiento en condiciones ambientales. Se proporcionan catéteres que pueden usarse en la invención de proveedores comerciales de canales de catéter, por ejemplo Rehau, Habia, Vygon, Teknofluor, Optinova, Baxter, etc.

Adicionalmente, se da a conocer un kit de partes para su uso en el tratamiento de una superficie con un agente antimicrobiano, que comprende, en compartimentos independientes, (a) un precursor del agente antimicrobiano según la reivindicación 1, teniendo el precursor la fórmula:

Z-L-S-S-(componente de cisteína)

en la que L, m y el componente de cisteína son tal como se definieron anteriormente, y Z es una funcionalidad de ligando tal como se definió anteriormente que puede reaccionar con un compuesto químico Y tal como se definió anteriormente para dar el compuesto químico X, tal como se definió anteriormente, y (b) reactivos necesarios para unir covalentemente el precursor a una superficie, en la que el kit comprende además instrucciones para el uso del kit. Los reactivos necesarios pueden comprender cualquier reactivo que sea necesario para realizar una reacción de acoplamiento de Y y Z para obtener X (tal como se explicó anteriormente), y dependerá de la identidad específica de Y y Z. El experto en la técnica sabrá qué reactivos serán necesarios en cada situación.

En el presente documento, se describe un kit que puede usarse para tratar cualquier superficie deseada con el agente antimicrobiano de la invención para dar a la superficie propiedades antimicrobianas.

La invención se ilustrará además a continuación mediante ejemplos. Estos ejemplos son con un fin ilustrativo únicamente, y no se considerará que limitan el alcance de la invención en modo alguno.

Sección de ejemplos

Métodos

Análisis de la inhibición del crecimiento bacteriano sobre superficies modificadasCepas de bacterias

Los siguientes análisis se realizaron con tres (3) cepas de bacterias diferentes, pero las aplicaciones no se limitan a las mismas: un aislado clínico (de un paciente con septicemia) de bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, (un aislado clínico B5381), la bacteria Gram-positiva *Bacillus megaterium* (cepa Bm11), la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* (cepa D21). Esta selección de bacterias comprende bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas incluyendo bacterias que presentan problemas significativos desde el punto de vista clínico.

Preparación de cultivo bacteriano para determinar el título

La siguiente descripción tiene el objetivo de, pero no se limita a, determinar un título de aproximadamente 400.000 - 800.000 ufc/ml de diferentes cultivos bacterianos, usados como fuente de exposición para evaluar la inhibición del crecimiento bacteriano sobre superficies funcionales. Se inoculó medio LB (caldo de Luria Bertani) con cepa bacteriana específica, pero que no se limita a este medio. Se sembró la cepa seleccionada sobre una placa de agar de medio seleccionado el día antes y se dejó crecer durante la noche a 37°C. Se rascaron varias colonias de la placa y se usaron para inocular el medio que posteriormente se dejaron crecer hasta una densidad óptica de 0,4. Se diluyó el cultivo con el medio LB idéntico hasta un título inicial de aproximadamente 400.000 – 800.000 ufc/ml. Se determinó el número de bacterias sembrando en placa diluciones en serie y contando las colonias en las diluciones apropiadas. (El número apropiado de bacterias a contar en una placa es de entre 30-300 como referencia general).

Tratamiento previo de discos

Se trataron previamente los discos en casos seleccionados mediante incubación en:

a) disolución salina tamponada con fosfato (PBS)

b) Suero de ternero fetal (FCS)

c) Medio LB estéril,

durante diferentes periodos de tiempo: 1 h, 1,5 h, 2,5 h, durante la noche, 2 días o 7 días, tal como se menciona en los ejemplos a continuación. Se realizó la incubación mediante rotación (200 rpm) a 37°C en tubos Eppendorf estériles.

Exposición de superficies funcionales a diferentes cepas bacterianas

Se colocaron sustratos modificados en superficie, en forma de discos circulares, en tubos Eppendorf estériles. Se colocó cada disco (de 5 ó 9 mm de diámetro) en un volumen especificado (500 ó 1000 µl, respectivamente) del cultivo inicial. Estos tubos se denominan “tubo 1”. Se incubaron los discos en los cultivos iniciales durante 2,5 h a 37°C mediante rotación (200 rpm). Se incubó un volumen idéntico del cultivo inicial en paralelo como muestra de referencia (denominada “cultivo tras la incubación”). Esto se usó para determinar hasta qué niveles crecería el título del cultivo de partida (el cultivo en el que tenían que incubarse los discos), cuando no se expone a los discos. Se incubaron muestras de control (los mismos discos que los usados para comparar el nivel de inhibición) con medio LB estéril, y posteriormente se manipularon de la misma manera, como control negativo para excluir la contaminación.

Ensayo para el análisis de la adherencia de bacterias viables sobre superficies funcionales

Tras la incubación (en el caso actualmente descrito: 2,5 h), se retiró el disco de cada tubo usando un par de pinzas estériles. Se transfirió en paralelo el cultivo en el que se había incubado el disco a un tubo Eppendorf estéril separado, y se determinó su título tal como se describe. Se sumergieron las pinzas y el disco en un tubo con aproximadamente 4 ml de disolución PBS estéril, y después se introdujo el disco en un segundo tubo con PBS, denominado “tubo 2”. Posteriormente se retiró el disco con un par de pinzas estériles del tubo 2. Se realizó este procedimiento con el fin de eliminar gotas de exceso de suspensión bacteriana resultantes del cultivo bacteriano en el que se había incubado el disco, y por tanto retirar cualquier bacteria que no fuera directamente adherente a las superficies del disco. Se colocó el disco lavado en un tubo Eppendorf (denominado “tubo 3”) con 1 ml de PBS y se agitó bruscamente con un dispositivo giratorio de tipo vórtex durante 10 minutos. Las bacterias viables adherentes (que no se habían retirado en las etapas anteriores) se desprenden ahora de la superficie a la disolución PBS. Esta disolución se denomina “lavado 1”, y se determina su título. Después se retira el disco con un par de pinzas estériles mediante inmersión en un tubo con aproximadamente 4 ml de PBS estéril, y después se introducen en otro tubo con aproximadamente 2 ml de PBS estéril, de la misma manera que se describió anteriormente. Se retira el disco inmediatamente con un par de pinzas esterilizadas y se transfiere a un nuevo tubo Eppendorf, al que se le añade 1

ml de PBS estéril, y se repite el procedimiento de vórtex descrito. Se transfiere la disolución PBS a un tubo Eppendorf estéril (denominado "lavado 2") y se determinó su título. Se colocó brevemente el disco sobre una toallita Kleenex estéril, para eliminar las gotas en exceso del lavado 2, y posteriormente se colocó sobre una placa de agar estéril de medios LB, que se incubó durante la noche a 37°C. Se monitorizó la aparición de colonias bacterianas, rodeando el crecimiento bacteriano los bordes del disco.

Determinación del título bacteriano en los diferentes cultivos y disoluciones de lavado

Se realizaron las diluciones en medios LB y diluciones seleccionadas (véase a continuación), en las que se analizaron y contaron las colonias.

Se extendió un volumen de 100 µl de diluciones en serie de las siguientes suspensiones:

1. Cultivo inicial antes de la dilución para dar el cultivo de incubación (DO de aproximadamente 0,4):
2. El cultivo de incubación inicial (estimado a 400.000 - 800.000 ufc/ml); 1:100, 1:1000 y 1:10 000.
3. Cultivos tras la incubación (tanto de referencia como incubado con discos); 1:1000, 1:10000, 1:100000.
4. Control negativo (medio sin cultivo bacteriano inicial).
5. Lavado 1: 1:10 y 1:100.
6. Lavado 2: 1:1.

Ejemplo 1

Se irradió previamente policaprolactona (PCL; UC 787), en forma de muestras planas de 1 mm de grosor con un diámetro de 5 mm, con un generador de impulsos (6,5 MeV/75 Hz/4 µs/60 mA) hasta una dosis de 1 Mrad. Entonces pueden injertarse las muestras directamente tal como se describe a continuación o almacenarse en nitrógeno líquido antes del injerto. Tras la irradiación, alternativamente tras el almacenamiento intermitente en nitrógeno líquido, se introducen las muestras de PCL en una disolución en agua de ácido acrílico (al 20% en peso) y sal de Mohr al 0,1% en peso, se ajustan con termostato hasta 30°C. Se liberó la disolución de oxígeno purgando gas inerte que también actúa como agitación. Tras 2 minutos en la disolución de ácido acrílico, se lavaron las muestras con grandes cantidades de agua corriente a aproximadamente 30°C y se almacenan adicionalmente en agua desionizada antes de la modificación de superficie sucesiva. Se depositaron varias muestras, que tenían un área total de 5 cm² y muestras de referencia no injertadas durante 6 horas con una cantidad especificada de NaOH 0,01 M a temperatura ambiental. Tras la titulación potenciométrica se determinó una concentración en superficie de $(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-5}$ mol de COOH/cm².

Ejemplo 2

Se mezclaron disoluciones separadas de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) y N-hidroxi-succinimida (NHS) (Sigma) en agua desionizada a 0°C, estableciendo una disolución con concentraciones de EDC 0,3 M y NHS 0,075 M, respectivamente. Se lavaron muestras de PCL con injerto de ácido acrílico, según el ejemplo 1, en tampón HEPES (pH 7,4) y se sumergieron en 20 ml de la disolución de EDC/NHS. Tras 10 minutos de agitación mediante sacudidas, se aclararon las muestras en agua desionizada y se les añadió una disolución de clorhidrato de 2-(2-piridinilditio)-etilamina 0,04 M (PDEA) en un tampón de borato 0,1 M (pH 8,5). Tras 15 minutos de agitación se aclararon las muestras en agua desionizada y se les añadió una disolución de L-cisteína 0,5 M (Sigma) en tampón de formiato 0,1 M (pH 4,3) con NaCl 1 M. Tras lavar con NaCl 1 M y agua desionizada, se dejaron secar las muestras al aire y se mantuvieron en un desecador. Los análisis de superficie con ESCA (XPS) midieron un valor del 6,8% atómico de nitrógeno.

Ejemplo 3

Se irradiaron previamente muestras de polietileno de baja densidad (LDPE) con una dosis de 2,5 Mrad, según el ejemplo 1. Tras injertar ácido acrílico a 50°C durante 4 minutos, y todas las demás condiciones idénticas a las del ejemplo 1, se detectó un valor de carboxilación de $(2,7 \pm 0,2) \times 10^{-5}$ moles de COOH/cm². Se realizaron reacciones de acoplamiento de PDEA y L-cisteína al LDPE con injerto de ácido acrílico de la misma manera que para PCL en el ejemplo 2, y proporcionaron un valor de nitrógeno del 6,0% atómico, según el análisis de superficie con ESCA.

Ejemplo 4

Se cortaron catéteres de poliuretano (Vygon®), que tenían un diámetro externo de 2 mm, en longitudes de 20 mm y se irradiaron previamente según el ejemplo 1, hasta una dosis de 1 Mrad. Se realizó el injerto según el ejemplo 2.

Ejemplo 5

El acoplamiento sobre una superficie funcional de amina será similar al procedimiento en el ejemplo 2. La diferencia es que el grupo amina dentro de PDEA se sustituye por un grupo carboxílico para obtener ácido 2-(2-piridilditio)-etilcarboxílico (PDEC). Cuando se hace reaccionar este compuesto con los grupos amina sobre una superficie el grupo carboxílico se activa por separado con EDC/NHS antes de la reacción con la superficie de amina. Entonces se realizará el acoplamiento posterior con L-cisteína como en el ejemplo 2.

Ejemplo 6

Se prepararon superficies de referencia según los ejemplos 1 y 2 con la distinción de que se acopló L-cisteína directamente a la superficie de PCL carboxilada tras la activación con EDC/NHS mediante el grupo amina dentro de la cisteína, es decir, se excluyó la etapa de acoplamiento con PDEA, eliminando por tanto el enlace disulfuro obtenido cuando se acopla con PDEA, como en el ejemplo 2.

Ejemplo 7

Se prepararon superficies de referencia según los ejemplos 1 a 3, difiriendo en que se acopló acetilcisteína, en lugar de L-cisteína, según el procedimiento descrito en el ejemplo 2.

Ejemplo 8

Se prepararon superficies de referencia según los ejemplos 1 a 3, difiriendo en que se acopló homocisteína, en lugar de L-cisteína, según el procedimiento descrito en el ejemplo 2.

Ejemplo 9

Se sometió a prueba la inhibición del crecimiento bacteriano en un cultivo de la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* (cepa D21) con discos con PCL en 500 µl de medio de cultivo LB, para discos acoplados con:

- a) L-cisteína acoplada a PCL con injerto de ácido acrílico como en el ejemplo 1 y 2 (denominados “discos con Cys”)
- b) PCL con injerto de ácido acrílico como en el ejemplo 1.

El título inicial del cultivo era de 513.000 ufc/ml y el título tras la incubación de cultivo (referencia, sin disco) era de 28.000.000 ufc/ml. El cultivo incubado con discos con Cys mostró una inhibición de 125 veces del crecimiento en el medio de cultivo durante la incubación en comparación con el cultivo tras la incubación (sin disco presente). No se detectó ninguna inhibición en el cultivo incubado con discos con ácido acrílico en comparación con cultivo tras la incubación (sin disco presente). Las pruebas para detectar bacterias adherentes, discos con Cys mostraron una inhibición de 100 veces del número de bacterias viables en comparación con discos con ácido acrílico únicamente, analizando la adherencia de bacterias viables a discos. Se observó crecimiento bacteriano que rodeaba los bordes del disco, colocado en agar LB, para discos con ácido acrílico únicamente y no para discos con Cys.

Ejemplo 10

Se sometió a prueba la inhibición del crecimiento bacteriano en el cultivo de *Staphylococcus aureus* (B5381, un aislado clínico) con discos con PE en 1000 µl de cultivo bacteriano.

Las superficies funcionales en los discos eran:

- a) L-cisteína acoplada a discos con injerto de ácido acrílico según el ejemplo 3 (previamente lavados / previamente incubados durante 1,5 h en PBS)
- b) L-cisteína acoplada a discos con injerto de ácido acrílico según el ejemplo 3 (previamente lavados / previamente incubados durante 2 días en PBS)
- c) L-cisteína acoplada a discos con injerto de ácido acrílico según el ejemplo 3 (previamente lavados / previamente incubados durante 7 días en PBS)
- d) Discos con injerto de ácido acrílico según el ejemplo 3

El título inicial del cultivo de incubación era de 400.000 ufc/ml y el título tras la incubación era de 10.000.000 ufc/ml. El cultivo incubado con discos con Cys previamente lavados durante 1,5 h mostró una inhibición de 25 veces del crecimiento bacteriano. El cultivo incubado con discos con Cys previamente lavados durante 7 días presentó una inhibición de 17 veces del crecimiento bacteriano. Los discos con Cys previamente lavados durante 2 días y 7 días mostraron aproximadamente 50 veces menos bacterias viables que los discos con ácido acrílico cuando se

sometieron a prueba para determinar la adherencia de bacterias. En resumen, se considera que la inhibición debida al acoplamiento con Cys es permanente a lo largo de al menos 7 días.

Ejemplo 11

Se sometió a prueba la inhibición del crecimiento bacteriano en un cultivo de la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (B5381, un aislado clínico) con discos con polietileno (PE) en 1000 µl de cultivo en medios LB. Las superficies funcionales eran:

- a) L-cisteína acoplada a discos con injerto de ácido acrílico según el ejemplo 3 (denominados "discos con Cys")
- b) Discos con injerto de ácido acrílico según el ejemplo 3 (denominados discos acrílicos)
- c) Discos irradiados con haz de electrones únicamente, según el ejemplo 3 (denominados "discos EB")

En paralelo, se analizaron dos experimentos de control con L-cisteína disuelta en cultivo: 50 µg/ml y 5 µg/ml.

El cultivo inicial se estableció a 10 veces superior (superando los 4 millones de ufc/ml) al descrito en el procedimiento de ensayo, lo cual permite la evaluación del efecto de adhesión de bacterias viables a una exposición extrema a bacterias. El cultivo de discos con Cys demostró 8 veces menos crecimiento en comparación con cultivo tras la incubación. Los discos EB no mostraron ninguna reducción significativa en comparación con el cultivo tras la incubación. No se observó ninguna inhibición para cultivos con L-cisteína disuelta. Los discos con Cys mostraron de 25 a 40 veces menos bacterias adherentes viables en comparación con discos con ácido acrílico y de 21 a 27 veces en comparación con discos EB en el análisis para determinar la adherencia de bacterias. Sólo se observó crecimiento bacteriano que rodeaba los bordes del disco para discos con ácido acrílico y EB. El efecto del acoplamiento a Cys sobre la adherencia de bacterias *Staph. aureus* viables sobre los discos todavía es evidente y significativo a pesar de que se extinguió el sistema.

Ejemplo 12

Se examinó la inhibición del crecimiento bacteriano en el cultivo de *Escherichia coli* (cepa D21) con discos con PE en 1000 µl del cultivo bacteriano en medios LB. Las superficies sometidas a prueba eran:

- a) L-cisteína acoplada a discos con injerto de ácido acrílico según el ejemplo 3 (denominados "discos con Cys")
- b) N-acetil-cisteína acoplada a discos con injerto de ácido acrílico según el ejemplo 3 y 7 (denominados "discos con acetil-Cys")
- c) Discos con injerto de ácido acrílico según el ejemplo 3 denominados discos con "ácido acrílico"

Todos los discos se incubaron previamente en PBS durante la noche.

El título inicial del cultivo era de 1.000.000 ufc/ml y el título tras la incubación de cultivo (sin disco) era de 50.000.000 ufc/ml.

Los discos con Cys presentaron una inhibición de 45 veces del crecimiento en el medio de cultivo en comparación con el cultivo tras la incubación (sin disco presente) durante la incubación. Los discos con acetil-Cys mostraron una inhibición de 10 veces en el medio de cultivo. No se detectó ninguna inhibición en el cultivo con disco con ácido acrílico presente. Los discos con Cys mostraron 70 veces menos bacterias viables que los discos con ácido acrílico mientras que los discos con acetil-cisteína mostraron 7 veces menos bacterias viables que los discos con ácido acrílico cuando se investigó la adherencia bacteriana. Se detectó crecimiento bacteriano que rodeaba los bordes del disco alrededor de todos los discos con ácido acrílico, parcialmente alrededor de los discos con acetil-Cys, mientras que no se observaron bacterias alrededor de los discos con Cys

Ejemplo 13

Se sometió a prueba la inhibición del crecimiento bacteriano en un cultivo de *Escherichia coli* (cepa D21) con discos con PE en 1000 µl de cultivo bacteriano, para discos acoplados con

- a) L-cisteína acoplada a discos con injerto de ácido acrílico según el ejemplo 3 (denominados "discos con Cys")
- b) L-cisteína acoplada mediante grupo amino a discos con PE con injerto de ácido acrílico según el ejemplo 3 y 6 (denominados "discos con Cys acoplados a amino")
- c) Discos con injerto de ácido acrílico según el ejemplo 3 (denominados "discos con ácido acrílico")

Se incubaron previamente todos los discos en medio LB estéril durante la noche.

El título inicial del cultivo era de 680.000 ufc/ml y el título tras la incubación de cultivo (sin disco) era de 32.000.000 ufc/ml. Los discos con Cys mostraron una inhibición de 26 veces del crecimiento bacteriano en el medio de cultivo en comparación con el cultivo tras la incubación (sin disco presente) durante la incubación. Ni los discos con Cys acoplados a amino ni el disco con ácido acrílico mostraron inhibición en el medio de cultivo. Los discos con Cys mostraron de 100 a 140 veces menos bacterias adherentes viables que los discos con ácido acrílico mientras que los discos con Cys acoplados a amino no mostraron ninguna reducción en el número de bacterias adherentes viables en comparación con discos con ácido acrílico, según se somete a prueba para determinar la adherencia de bacterias. Se detectó crecimiento bacteriano significativo que rodeaba los bordes del disco, analizado sobre placas de agar LB tras los procedimientos de lavado, para todos los discos acoplados a amino y discos con ácido acrílico, pero no para discos con Cys.

Ejemplo 14

Se sometió a prueba la inhibición del crecimiento bacteriano en un cultivo de *Staphylococcus aureus* (B5381, un aislado clínico) con discos con PE en 1000 µl de cultivo bacteriano en medio LB con concentraciones bacterianas extremas.

Las superficies funcionales en los discos eran:

a) L-cisteína acoplada a discos con injerto de ácido acrílico según el ejemplo 3 (denominados "discos con Cys")

b) Homocisteína acoplada a discos con injerto de ácido acrílico según el ejemplo 3 (denominados "discos con homocisteína")

c) Discos con injerto de ácido acrílico según el ejemplo 3 (denominados "discos con ácido acrílico")

El título inicial del cultivo era de 4.000.000 ufc/ml y el título tras la incubación de cultivo (sin disco) era de 80.000.000 ufc/ml.

Los discos con Cys mostraron una inhibición de 13 veces del crecimiento en el medio de cultivo en comparación con el cultivo tras la incubación sin disco presente. Los discos con homocisteína mostraron una inhibición de 20 veces en el medio de cultivo. Los discos con Cys mostraron aproximadamente de 4 a 10 veces menos bacterias adherentes viables en comparación con discos con ácido acrílico y los discos con homocisteína presentaron de 2 a 4 veces menos bacterias viables en comparación con discos con ácido acrílico, cuando se sometió a prueba para determinar la adherencia de bacterias viables en condiciones de exposición extrema. Se obtuvo un efecto detectable a pesar de las condiciones extinguidas para discos tanto con cisteína como con homocisteína.

Ejemplo 15

Se sometió a prueba la duración y estabilidad a largo plazo del efecto antibacteriano usando catéteres modificados en la superficie almacenados durante más de 3 años. Se sometió a prueba la inhibición del crecimiento bacteriano en el cultivo de *Escherichia coli* D21 con catéteres de poliuretano Vygon (ejemplo 4) en 1000 µl de cultivo bacteriano en medio LB. Estas muestras de catéteres modificados con cisteína se habían almacenado durante 3 años en condiciones ambientales junto con superficies de referencia (irradiadas con EB y con injerto de ácido acrílico según el ejemplo 4). Antes del experimento, se cortaron estos catéteres (20 mm de longitud) por la mitad, generando dos fragmentos de 10 mm de longitud. Las superficies funcionales en los discos eran:

d) L-cisteína acoplada a catéteres Vygon con injerto de ácido acrílico según el ejemplo 4, denominados catéteres con Cys (previamente lavados / previamente incubados durante 2 h en PBS)

e) Catéteres Vygon irradiados con EB (parte del ejemplo 1 y el ejemplo 4) (previamente lavados / previamente incubados durante 2 h en PBS)

El título inicial del cultivo de incubación era de 264.000 ufc/ml y el título tras la incubación era de 52.000.000 ufc/ml, cuando no había ninguna muestra de catéter presente. El cultivo incubado con catéteres con Cys (previamente lavados durante 2 h) mostró una inhibición de 34 veces del crecimiento bacteriano en comparación con tras el cultivo sin disco. El cultivo incubado con catéteres Vygon irradiados con EB (previamente lavados durante 2 h) (materiales de control) no mostró ninguna inhibición en comparación con cultivo tras la incubación sin catéter. Los catéteres con Cys mostraron 130 veces menos bacterias viables en comparación con catéteres Vygon irradiados con EB cuando se sometieron a prueba para determinar la adherencia de bacterias. En resumen, el almacenamiento del producto durante periodos prolongados no afecta de manera crítica a las propiedades antibacterianas de la modificación de superficie.

Ejemplo 16

Se sometió a prueba la inhibición del crecimiento bacteriano en un cultivo de *Staphylococcus aureus* (B5381, un aislado clínico) con superficie de catéter de poliuretano, en 800 µl de cultivo bacteriano en medio LB. Se lavaron previamente los discos durante 1-5 horas en PBS. Se cortaron estos catéteres en fragmentos de 5x4 mm y se irradiaron previamente según el ejemplo 1, hasta una dosis de 1 Mrad. Se realizó el injerto según el ejemplo 2.

Las superficies funcionales en los discos eran:

a) Se prepararon muestras con injerto de ácido acrílico acopladas a PDEA esencialmente siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 1 y 2 con las siguientes modificaciones: tiempos de injerto de 5 min y lavado en baño con ultrasonidos durante 15 minutos tras el injerto.

b) Se usaron las muestras de PDEA obtenidas en (a) para acoplar L-cisteína siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 2.

Se comparó el efecto antibacteriano para las muestras de (a) y (b) para investigar una posible influencia significativa del componente de PDEA antes del acoplamiento de cisteína. El título inicial del cultivo era de 800.000 ufc/ml y el título tras la incubación de cultivo (sin disco) era de 19.000.000 ufc/ml. No se observó ninguna diferencia en el título tras la incubación entre los tipos de muestras (a) y (b). Las muestras con Cys-ácido acrílico (b) mostraron aproximadamente 35 veces menos bacterias adherentes viables en comparación con muestras con ácido acrílico acoplado a PDEA (a) cuando se sometieron a prueba determinar la adherencia de bacterias viables. Este experimento verifica que el componente de Cys es esencial para el efecto antibacteriano.

Ejemplo 17

Se sometió a prueba la inhibición del crecimiento bacteriano en un cultivo de *Staphylococcus aureus* (B5381) con discos con poliuretano (PUR) en 500 µl de cultivo bacteriano en medio LB. Se cortaron estas muestras en discos cuadrados de 5x5 mm.

Las superficies funcionales en los discos eran:

(a) Se irradiaron las muestras de PUR con EB hasta 1 Mrad y se injertaron durante 3 minutos a 35°C con ácido acrílico y se lavaron extensamente en agua corriente caliente y agua MilliQ incluyendo un baño de lavado con ultrasonidos durante 15 minutos, seguido por acoplamiento con PDEA y finalmente L-cisteína según los procedimientos descritos en el ejemplo 1 y 2. Estas muestras se denominaron "PDEA-Cys"

(b) Se preparó una superficie de la siguiente manera: se hizo reaccionar PDEA con trietilamina en cantidad equimolar con una cantidad equimolar de cloruro de acrililo en un disolvente seco. Se purificó el producto 2-(2-piridinilditio)-etilacrilamida, denominado en el presente documento "PDEAm", mediante precipitación en dietil éter, lo cual se repitió hasta que se obtuvo un filtrado transparente incoloro. Se secó el producto ligeramente amarillo a vacío. Se desaireó una disolución que contenía 2,2 mmol (0,5 g) de PDEAm y 16,1 mmol (1g) de ácido acrílico en 5 ml de agua MilliQ purgando con argón durante 10 minutos y se ajustó con termostato hasta 35°C. Se tomaron las muestras de PUR irradiadas con EB (a) del almacenamiento en nitrógeno líquido y se sumergieron en la disolución en la que la corriente de argón también actuó como dispositivo de agitación. Se interrumpió la reacción de injerto tras 8 minutos y se lavaron las muestras exhaustivamente en agua corriente caliente y agua MilliQ incluyendo un baño de lavado con ultrasonidos durante 15 minutos. Se acopló L-cisteína según los procedimientos descritos en el ejemplo 1 y 2. Se secaron las muestras a vacío. Estas muestras se denominan "PDEAm-Cys". Se realizó una comparación entre PDEA-Cys (a) y PDEAm-Cys (b). El título inicial del cultivo era de 500.000 ufc/ml y el título tras la incubación de cultivo (sin disco) era de 20.000.000 ufc/ml. PDEA-Cys (a) mostró una inhibición de 45 veces del título tras la incubación en comparación con cultivo sin disco presente. PDEAm-Cys (b) mostró una inhibición de 50 veces de título tras la incubación en comparación con cultivo sin disco presente. PDEA-Cys (a) y PDEAm-Cys (b) muestran una inhibición igual de unidades de formación de colonias de bacterias viables cuando se someten a prueba para determinar la adherencia de bacterias viables usando el método descrito anteriormente. No se detectó ningún crecimiento bacteriano que rodeaba los bordes del disco, según se analiza sobre placas de agar LB tras los procedimientos de lavado, para ninguna de las muestras.

Ejemplo 18

Se analizó la inhibición del crecimiento bacteriano en un cultivo de la bacteria Gram-positiva *Bacillus megaterium* (cepa Bm 11) con un disco con PCL en 500 µl de cultivo bacteriano en medio LB. Las superficies funcionales eran:

a) L-cisteína acoplada a PCL con injerto de ácido acrílico como en el ejemplo 1 y 2 (denominado "discos con Cys")

b) PCL con injerto de ácido acrílico como en el ejemplo 1

El título inicial del cultivo era de 292.000 ufc/ml y el título tras la incubación de cultivo (sin disco) era de 9

850.000 ufc/ml. Para tubos con discos con Cys había una inhibición de 13,5 veces del crecimiento bacteriano en el cultivo incubado con el disco durante la incubación en comparación con el cultivo tras la incubación de referencia (sin disco presente). Los discos sólo con ácido acrílico no presentaron ninguna inhibición del crecimiento bacteriano en el cultivo en comparación con el control sin disco presente. Las pruebas para determinar la adherencia de bacterias viables mostraron de 10 a 13 veces menos bacterias viables en discos con Cys en comparación con discos con ácido acrílico. Sólo se encontró crecimiento bacteriano que rodeaba los bordes del disco para discos acoplados con ácido acrílico cuando se establecieron los discos en placas de LB tras el procedimiento de lavado y se incubaron durante la noche.

10 Ejemplo 19

Se sometió a prueba la citotoxicidad mediante incubación de los diferentes discos funcionales con células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de donantes de sangre sanos.

15 Las muestras sometidas a prueba eran:

a) Discos con Cys (ejemplo 2)

b) Discos con ácido acrílico (ejemplo 1)

c) Discos irradiados con haz de electrones (parte del ejemplo 1) (denominados "discos EB")

d) Células de control (incubadas sin ningún disco presente).

25 Se realizaron las determinaciones tras 24, 48 y 69 h, respectivamente.

La cantidad de células muertas era del 4% al 7% tras 18 horas de incubación con CMSP para todos los tipos de discos y controles, lo que indica que no hay diferencias significativas entre discos con Cys, discos con ácido acrílico, discos EB o células de control incubadas sin ningún disco presente. Esto se observó independientemente de si los discos se habían lavado previamente en PBS o no. Las partes de células muertas eran del 10% al 15% en discos con Cys sin lavar y discos con ácido acrílico tras 48 horas de incubación. No había ninguna diferencia notable en el número de células muertas entre discos con Cys lavados, discos con ácido acrílico, discos EB, en comparación con células de control sin ningún disco presente (5-6%). Se estudió la proliferación de células T mediante estimulación con fitohemaglutinina de mitógeno (PHA). Se aislaron CMSP de donantes de sangre sanos y se estimularon las células con PHA (Sigma, St Louise, MO, EE.UU.) por triplicado. Se pulsaron los cultivos con 1µCi de metil-3H-timidina (Amersham, LIFE SCIENCE) a los 2 días tras la estimulación. Se recogieron las células en filtros, usando un colector de placas (Harvester 996, Tomtec, Hamden, Connecticut, EE.UU.) al día siguiente, según las instrucciones del fabricante, y se contaron en un contador automático (1450 MicroBeta Trilux, WALLAC, Suecia AB). Se expresaron los resultados como cuentas por minuto (cpm). No se observó ninguna diferencia en la proliferación de células T entre cualquier tipo de disco y los controles. Se realizaron las siguientes pruebas con el fin de investigar si la capacidad de monocitos derivados de CMSP para diferenciarse para dar macrófagos se veía negativamente afectada por la exposición a los diferentes tipos de discos. Se sembraron CMSP de donantes de sangre sanos sobre placas Petri (Primaria, Falcon, Becton Dickinson) a una concentración celular de $10 \cdot 10^6$ células/ml en medio modificado por Iscove con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml (Gibco BRL, Grand Island, NY), suero AB al 10% y se incubaron a 37°C durante la noche. Se retiraron las células no adherentes al día siguiente. Se lavaron extensamente los cultivos y se estimularon las células enriquecidas en monocitos mediante adición de un alo-sobrenadante de 24 horas. Se preparó el alo-sobrenadante de la siguiente manera: se mezclaron CMSP de diferentes donantes de sangre y se incubaron durante 24 horas en medio completo de Iscove. A continuación, se recogió el sobrenadante, se aclaró mediante centrifugación y se usó para estimular cultivos de monocitos individuales. A de 2 a 3 días de estimulación posterior, se lavaron los cultivos con medio de Iscove y a continuación se cultivaron en el 60% de medio AIM-V, el 30% de medio modificado por Iscove y el 10% de suero AB, con la adición de L-glutamina, penicilina y estreptomycin (medio 60/30 completo). Se cambió el medio por medio 60/30 completo reciente cada 3-4 días. No se observó ninguna diferencia significativa entre células de control o células expuestas a los diferentes tipos de discos, es decir se observaron cultivos de macrófagos sanos o en buenas condiciones en todas las placas Petri.

Ejemplo 20

También se analizó la citotoxicidad midiendo el efecto hemolítico de los diferentes tipos de disco colocando los discos sobre agar sangre, o bien sólo encima o bien empujando los discos al interior del agar sangre.

Las muestras sometidas a prueba eran:

a) Discos con Cys sin lavar (ejemplo 3)

b) Discos con Cys previamente tratados con medios LB (ejemplo 3)

c) Discos con Cys previamente tratados con suero de ternero fetal (FCS) (ejemplo 3)

d) Catéteres Vygon con Cys (ejemplo 4)

5 Se midió el diámetro de zonas con lisis tras la incubación a 37°C durante la noche. Se colocó un control positivo en el centro de cada placa de agar sangre. En la inspección, se retiraron los discos y se analizó el área debajo y alrededor de la ubicación de los discos.

10 No pudo detectarse ninguna lisis para ninguno de los tipos de disco analizados.

Se detectó un color amarillo de aproximadamente 4 a 5 mm desde el borde de los discos para los discos con Cys sin lavar. Para los discos previamente tratados, o bien con medios LB o bien con suero de ternero fetal (FCS), se observó un cambio muy débil del color en el borde más cercano del disco.

15 En conclusión, los discos con Cys no tienen ningún efecto citotóxico significativo sobre células de sangre humanas.

REIVINDICACIONES

1. Agente antimicrobiano que comprende un sustrato con un componente de cisteína unido covalentemente, en el que el componente de cisteína se une a través de un puente S-S mediante una molécula espaciadora al sustrato; el espaciador comprende una cadena carbonada, o una cadena carbonada interrumpida por uno o más heteroátomos.
2. Agente antimicrobiano según la reivindicación 1, en el que la molécula espaciadora comprende uno o más heteroátomos seleccionados de O, S, N, P y Si.
3. Agente antimicrobiano según la reivindicación 1 ó 2, en el que la cadena está sustituida con uno o más grupos alquilo, grupos hidroxilo o grupos alcoxilo.
4. Agente antimicrobiano según la reivindicación 3, en el que los grupos alquilo son grupos alquilo inferior con 1-6 átomos de carbono.
5. Agente antimicrobiano según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que tiene el sustrato de fórmula -X-L-S-S-(componente de cisteína), en el que

- L es una molécula espaciadora seleccionada del grupo que comprende $(CH_2)_m$ en el que m es 1-20; $(CH_2CH_2O)_n(CH_2)_p$ o $(CH(CH_3)CH_2O)_n(CH_2)_p$ en los que n es 1-1000, y p es 1-20; estando el segmento $(CH_2)_p$ unido al puente disulfuro o estando situado entre los segmentos $(CH_2CH_2O)_n$ o $(CH(CH_3)CH_2O)$;

- X es un grupo de unión de la reacción de acoplamiento entre el sustrato y L.

6. Agente antimicrobiano según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que tiene la fórmula



en la que R_1 es el sustrato

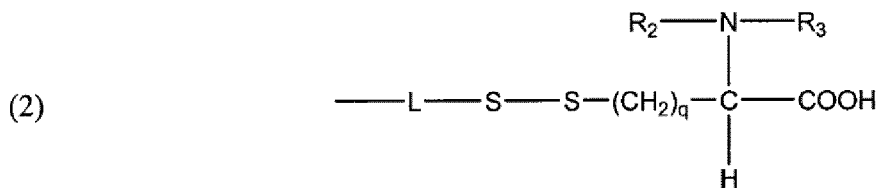
X es un grupo químico obtenido mediante una reacción química de acoplamiento

L es $(CH_2)_m$ o $(CH_2CH_2O)_n(CH_2)_p$

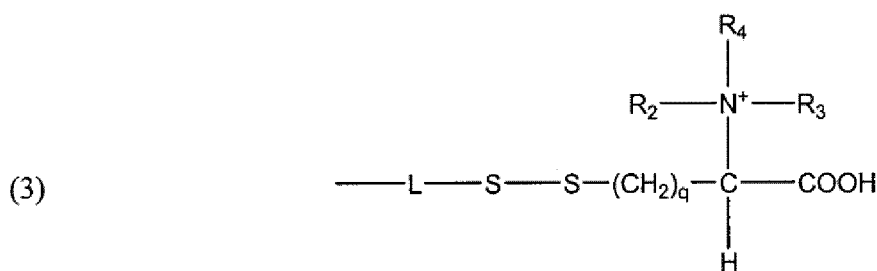
m es 1-8, n es 1-100 y p es 1-10

en los que el segmento $(CH_2)_p$ cuando aparece junto con el $(CH_2CH_2O)_n$ está situado entre el segmento $(CH_2CH_2O)_n$ y el enlace disulfuro.

7. Agente antimicrobiano según las reivindicaciones 1-6, en el que -L-S-S-(componente de cisteína) tiene una de las siguientes estructuras:



en la que R_2 , R_3 es hidrógeno o alquilo con de 1 a 25 átomos de carbono, en cualquier combinación; q es desde 1-20



en la que R_2 , R_3 , R_4 son sustituyentes alquilo con 1-25 átomos de carbono, en cualquier combinación; q tiene un valor en el intervalo de 1-20, en el que los sustituyentes alquilo pueden conectarse al grupo amino

mediante alquilación directa o mediante un enlace amida que comprende el nitrógeno del componente de cisteína.

8. Agente antimicrobiano según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que uno de R_2 o R_3 tal como se describe en la fórmula (2) en la reivindicación 7 se une mediante un enlace amida que comprende el nitrógeno del componente de cisteína.

9. Agente antimicrobiano según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el sustrato es una superficie sólida.

10. Dispositivo que comprende un sustrato según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

11. Dispositivo según la reivindicación 10, en el que el dispositivo se elige de:

(a) dispositivos médicos que incluyen dispositivos médicos extracorpóreos, que son aplicables al exterior del cuerpo humano o animal y dispositivos médicos intracorpóreos, que son aplicables en el interior del cuerpo humano o animal;

(b) dispositivos de puntos de venta de alimentación, y

(c) otros dispositivos seleccionados de lentes de contacto, productos cosméticos envasados, tanques de agua dulce y tuberías de agua, dispositivos para el almacenamiento de productos o materiales en los que no se desea el crecimiento bacteriano en superficies del material de almacenamiento.

12. Dispositivo según la reivindicación 11, en el que el dispositivo se elige de piel artificial para heridas de quemaduras, un dispositivo para diálisis, un dispositivo para el drenaje de los oídos, implantes en los oídos, un audífono, tubos de un sistema de circulación extracorpórea, drenaje en hidrocefalia, una jeringa, ostomías, dispositivos para el cuidado de heridas, materiales de sutura, catéteres, productos dentales, tubos o equipos usados para la administración parenteral de líquidos, disoluciones, infusiones, administración de fármacos, implantes en el cuerpo, bomba de insulina, líneas guía de nervios, marcapasos, drenaje desde dentro del cuerpo, endoprótesis intraluminales incluyendo vasculatura y luces en órganos y tejidos.

13. Uso de un agente antimicrobiano según las reivindicaciones 1-9, para impedir o inhibir el crecimiento y/o la proliferación de microorganismos sobre un sustrato y/o una superficie.

14. Uso según la reivindicación 13, en el que los microorganismos comprenden *Staphylococci* spp (tal como *S. aureus*, *S. epidermidis* y otros *Staphylococci* negativos para coagulasa como *S. saprophyticus*); *Streptococci* spp (*viridans*, hemolítico y no hemolítico, grupo B y D, *S. pneumoniae*); *Enterococcus* spp, *S. faecalis*; *Chlostridia* (*perfringens*, *botulinum*); *Enterobacter* spp, (*Enterobacter cloacae*, *aerogenes*) *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp (*pneumonia*), *Proteus* (*mirabilis*), *Campylobacter*, *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Hemophilus* (*influenza*), *Neisseriae* (meningococo y gonococo), *Bacteroides* (*Bacteroides* Spp. y *Fusobacterium*), *Pseudomonas* (*aeruginosa*, *cepacia*), *Legionella* (*pneumophila*), *Serratia marcenens*, *Acinetobacter* spp, *Morganella morganii*, *Stenotrophomonas*, *Citrobacter* spp, *Corynebacterium* spp, *Burkholderia cepafia*, *Acinetobacter* spp; especies de *Mycoplasma* (*M. avian* y otros); y hongos tales como *Candida* spp, *C. tropicales*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichosporon*, *Blastoschizomyces*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Malassezia*, *Burkholderia cepafia*, *Aspergillus*.

15. Método para fabricar un dispositivo antimicrobiano que comprende las etapas de

i) proporcionar un dispositivo

ii) unir covalentemente un ligando -L-S-S-(componente de cisteína) a grupos funcionales en la superficie del dispositivo, o a un sustrato soluble que se inmoviliza posteriormente sobre la superficie del dispositivo.

16. Método según la reivindicación 15, en el que:

la superficie del dispositivo o el sustrato soluble comprende un radical libre Y, y

el ligando tiene la forma Z-L-S-S-(componente de cisteína), siendo Z un grupo que contiene un enlace carbono-carbono insaturado reactivo.

17. Agente antimicrobiano según la reivindicación 7, en el que el -L-S-(componente de cisteína) comprende un compuesto de fórmula (2) seleccionado de compuestos de fórmula (2) en los que (i) R_2 y R_3 son ambos hidrógeno, $q=1$; (ii) R_2 y R_3 son ambos hidrógeno, $q=2$; (iii) R_2 y R_3 son ambos metilo, $q=1$; y (iv) R_2 es hidrógeno y R_3 es acetilo, $q=1$.

18. Método según la reivindicación 15, en el que:

la superficie del dispositivo comprende un grupo funcional Y, y

el ligando tiene la forma Z-L-S-S-(componente de cisteína), tras lo cual una reacción entre los grupos funcionales Y y Z da el grupo de acoplamiento X que une covalentemente el ligando al sustrato R₁

R₁-X-L-S-S-(componente de cisteína),

siendo X, Y y Z según una de las siguientes:

(a)	cuando Y = COOH	y Z = NH ₂	entonces X = CONH
(b)	" Y = COCl	" Z = NH ₂	" X = CONH
(c)	" Y = COOH	" Z = OH	" X = COO
(d)	" Y = COCl	" Z = OH	" X = COO
(e)	" Y = NH ₂	" Z = CHO	" X = NH
(f)	" Y = NHNH ₂	" Z = CHO	" X = NHNH
(g)	" Y = NH ₂	" Z = NCO	" X = NHCONH
(h)	" Y = NH ₂	" Z = OCOO _φ NO ₂	" X = NHCOO
(i)	" Y = NH ₂	" Z = succinimidil-	" X = NHCO
(j)	" Y = NH ₂	" Z = epoxi-	" X = NHCH ₂ CH(OH)
(k)	" Y = OH	" Z = NCO	" X = OCONH
(l)	" Y = OH	" Z = epoxi	" X = OCH ₂ CH(OH)
(m)	" Y = OSO ₂ CH ₂ CF ₃	" Z = NH ₂	" X = CH ₂ NH
(n)	" Y = OSO ₂ CH ₂ CF ₃	" Z = SH	" X = CH ₂ S
(o)	" Y = SS	" Z = SH	" X = SS
(p)	" Y = (alquil) ₃ COK	" Z = (alquil)Br	" X = O
(q)	" R ₁ = Au, Ag	" Z = SH	" X = S
(r)	" R ₁ = Au, Ag	" Z = SS	" X = S
(s)	" R ₁ = R ₁ •	" Z = CH ₂ =C-	" X = CH-C-

en los que los grupos Y y Z en (a) a (p) pueden intercambiarse entre R₁ y el ligando para dar el mismo X, y en los que en (e) y (f) la imina obtenida inicialmente se reduce para dar el grupo de unión de amina secundaria con NaCNBH₃.