

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial

6 NOV. 1978

ES

11

21

22

NUMERO

456.457

A1

FECHA DE PRESENTACION

2.3.77



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
663.046	2.3.76	EE.UU. de A.

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	A61K	

64 TITULO DE LA INVENCION

PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR UNA COMPOSICION ANTIMICROBIALMENTE ACTIVA.

71 SOLICITANTE (ES)

PHARMACO, INC

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

1616 Interstate Drive, Champaign, Illinois, EE.UU. de A.

72 INVENTOR (ES)

Lowell P.Hager., Daniel R. Strom., John A. Katzenellenbogen., Joseph T.Washsman., Richard I. Gumpport

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

D. JOSE MIGUEL GOMEZ-ACEBO Y POMBO.

La presente invención se relaciona con un procedimiento para preparar compuestos antimicrobiales y, más particularmente, para preparar compuestos antimicrobiales enlazados covalentemente a soportes poliméricos de un tamaño relativamente grande.

Muchos de los compuestos antimicrobiales potencialmente útiles no pueden ser utilizados para "fines terapéuticos" con humanos o animales, debido a que estos compuestos se hacen tóxicos cuando son absorbidos a través de la piel, membranas mucosas o tracto gastrointestinal. Por ejemplo, hasta recientemente se utilizó de forma acostumbrada el hexaclorofeno como agente desinfectante y antimicrobial en jabones y detergentes. Sin embargo, el hexaclorofeno ha sido rechazado para su uso acostumbrado a causa de que puede absorberse a través de la piel y exhibir toxicidad neurológica. De un modo similar, los mayores programas de investigación farmacéutica han sido conducidos hacia el aislamiento y caracterización de un gran número de productos naturales que poseen actividad antimicrobial, pero los cuales no pueden ser utilizados de nuevo a causa de sus efectos tóxicos. Al objeto de reducir al mínimo la absorción y, en adición, localizar el agente antimicrobial, se aplican con frecuencia antibióticos localmente en ungüentos inmovilizantes. Por ejemplo, Neosporin contiene bacitracina, polimixina y neomicina en una base de ungüento. Estos tres antibióticos son utilizados de forma rara internamente debido a los efectos tóxicos secundarios asociados con su empleo. En el caso de Neosporin, el ungüento sirve principalmente para localizar el área de tratamiento. Sin embargo, existen muchos agentes antimicrobiales que no pueden ser aplicados, incluso en una base de ungüento, a áreas vocales debido a que se absorberían y por lo tanto serían tóxicos. El clo-

ranfenicol y novobicina son antimicrobiales extremadamente tóxicos que se absorben rápidamente a partir del tracto gastrointestinal. Su empleo se recomienda solamente para aquellas infecciones que no pueden ser tratadas eficazmente por agentes menos tóxicos.

En ciertas áreas, se han llevado a cabo esfuerzos para ligar permanentemente pequeñas moléculas a moléculas soporte poliméricas mucho más grandes que, debido a su tamaño, evitan el paso de los pequeños productos químicos a través de la piel o superficies mucosas.

Esta inmovilización molecular se está llevando a cabo con aditivos alimenticios y una explicación de esta aplicación particular aparece en Food Engineering, enero y junio 1974; The Manufacturing Confectioner, Volúmen 54 - Número 2, febrero 1974; y en un artículo del Wall Street Journal, junio 18, 1973. Parece ser que los colorantes alimenticios, antioxidantes y otros aditivos, cuando se unen químicamente a moléculas poliméricas, pasarán a través del tracto intestinal sin absorberse.

Si bien un colorante o antioxidante alimenticio, cuando se inmoviliza por unión o enlace químico a una molécula soporte polimérica, puede retener su color o propiedades de inhibición de la oxidación, antes de la ingestión, no puede esperarse en absoluto que un agente farmacéutico, tal como un compuesto antimicrobial, permanezca activo cuando se inmoviliza similarmente. En adición, mientras los colorantes y antioxidantes llevan a cabo su función en el alimento antes de la ingestión, incrementando la apariencia visual o preservando el sabor, no existe necesidad de que tales productos químicos retengan sus propiedades deseadas después de la ingestión. En contraste, un agente antimicrobial debe retener su actividad biológica contra

los microbios en todos los ambientes de utilización. Por otra parte, existen de hecho razones que pensar que cuando tales agentes farmacéuticos se unen permanentemente a moléculas soporte poliméricas a través de enlaces químicos estables, se perderá su actividad biológica.

Por ejemplo, las fibras de celulosa han sido derivadas con cationes antibacteriales o residuos de organomercurio u organoestaño. Como se sabe, dichas fibras tratadas exhiben actividad antibiótica solamente en tanto en cuanto las moléculas activas se liberen por degeneración de su enlace químico a la fibra soporte; cuando se utilizan enlaces completamente estables, la fibra tratada no tiene actividad antibiótica (Z.A. Rogovin y A. D. Virnik en *High Polymers*", (N. M. Bikales y L. Segal, eds.) Volumen V, Parte V, Wiley-Interscience, 1971, pág. 1333-1336).

Ciertas patentes describen la inmovilización temporal de agentes farmacéuticos activos por adsorción o dispersión en aceites o pectina (H. Welch, 2491537, Diciembre 20, 1949; H. Welch, 2518510, agosto 15, 1950; B.S. Whittingham, 2481805, Septiembre 13, 1949; B. S. Whittingham, 2481804, Septiembre 13, 1949), por enlaces iónicos a ácidos o bases poliméricas (P.C. Wirth, 3832340, Agosto 27, 1974; L. Loewe, 2656298, Octubre 20, 1953), o por enlaces químicos inestables (G. F. Collins y L. J. Daher 3320236, Mayo 16, 1967). Dichas preparaciones alteran la duración de acción de agente medicinal permitiendo su lenta liberación, pero resulta evidente que solamente el producto medicinal libre, después de la liberación del complejo, resulta activo y no el producto medicinal inmovilizado por sí mismo.

De este modo, no se ha descrito ningún método para solucionar el problema de proporcionar un agente antimicrobial que se inmovilizará permanentemente por enlace a través de

uniones estables a una molécula soporte polimérica, permaneciendo aún eficaz para la finalidad originalmente proyectada, cualquiera que pueda ser dicha finalidad.

5 Si bien el principal obstáculo que ha sido resuelto por esta invención es la necesidad de preservar la actividad biológica de los agentes antimicrobiales inmovilizados, existen otras facetas de los problemas que deben ser tratados al objeto de hacer que la solución sea práctica: identificación de soportes poliméricos que serán adecuados en términos de tamaño, forma
10 / propiedades físicas y químicas, para proporcionar la inmovilización necesaria con respecto al paso a través de la piel o entrada en heridas existentes en la misma o a través de capas mucosas, resistencia a fagofitosis o retención en el punto de aplicación; selección del tamaño y naturaleza de los enlaces químicos en la
15 conexión entre el agente antimicrobial y la molécula soporte; la determinación del punto molecular sobre el agente antimicrobial al cual puede unirse el enlace químico inmovilizante. De hecho son estas dos últimas facetas las que resultan críticas a la hora de asegurar que el agente antimicrobial retenga su
20 actividad biológica en estado inmovilizado.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar principios farmacéuticos, inmovilizados, antimicrobialmente activos, que pueden administrarse internamente a través del tracto gastrointestinal o aplicarse localmente, sin
25 peligro de absorción y ulterior distribución por toda la circulación sistémica.

Constituye otro objeto de la presente invención proporcionar principios farmacéuticos, inmovilizados, antimicrobialmente activos, que pueden administrarse internamente a través del tracto gastrointestinal o aplicarse localmente, sin pér-
30

dida o dilución del compuesto antimicrobial del punto de aplicación, debido al paso del compuesto a través de la piel o heridas de la misma o a través de membranas mucosas.

5 Constituye otro objeto más de la invención proporcionar principios farmacéuticos, inmovilizados, antimicrobialmente activos, que, cuando se administran internamente o se aplican localmente, evitan efectos secundarios tóxicos, son resistentes a la fagocitosis y evitan la sensibilización inmunológica.

10 Otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento para preparar dicho principio farmacéutico, inmovilizado, antimicrobialmente activo.

15 Otro objeto más de la invención es proporcionar un método para evitar efectos tóxicos secundarios, fagocitosis y sensibilización inmunológica en la administración de compuestos antimicrobiales por administración interna o aplicación local de solamente principios farmacéuticos activos e inmovilizados.

20 Otro objeto más de la invención es conseguir la inmovilización de un principio farmacéutico activo mediante enlace covalente del principio a una molécula soporte polimérica relativamente grande que retiene una actividad farmacéutica significativa del principio.

Otros objetos y ventajas serán evidentes a partir de la siguiente descripción y reivindicaciones adjuntas.

25 De acuerdo con los anteriores objetos, la presente invención proporciona compuestos o principios antimicrobiales activos enlazados covalentemente a soportes poliméricos, por ejemplo a base de polisacáridos, de origen natural o sintético para inmovilizar los principios. Dicha inmovilización evita la
30 disolución, absorción y transporte de los compuestos antimicro-

biales por o a través de la piel o heridas de las mismas o membranas mucosas, limitando con ello su acción a focos específicos y eliminando efectos tóxicos secundarios. La unión covalente de compuestos antimicrobiales a soportes poliméricos, de acuerdo con la presente invención, se ha traducido en compuestos antimicrobiales unidos que retienen actividad antimicrobial y en los cuales en enlace covalente, que une el compuesto antimicrobial al soporte polimérico, es estable en todos los ambientes de utilización, incluyendo ambientes gástricos de bajo pH.

Existen numerosos empleos para los compuestos antimicrobiales inmovilizados. Por ejemplo, los antibióticos que son absorbidos de un modo demasiado fácil en su utilización local, pueden utilizarse ahora localmente cuando se inmovilizan por enlace covalente a soportes poliméricos. Los antibióticos que, si se toman internamente deberán pasar a través del porro gastrointestinal, pueden administrarse ahora oralmente para el tratamiento de infecciones del intestino y estómago cuando se inmovilizan por enlaces covalentes a soportes poliméricos. El tamaño y forma de soporte polimérico puede diseñarse para ajustarse al caso particular en el cual se utilizará el agente antimicrobial. En aquellos casos en donde están implicadas heridas o cortes abiertos, la forma del soporte polimérico deberá ser tal que quede asegurado contra la absorción del compuesto antimicrobial a través de la herida o corte abierto al sistema vascular. De este modo, y en tales aplicaciones, un buen ejemplo de soporte polimérico para el agente antimicrobial sería las fibras de celulosa en forma de venda. En el caso de agentes antimicrobiales en jabones o detergentes, el soporte polimérico podría ser mejor un compuesto soluble en agua.

Ejemplos específicos del amplio alcance de utiliza-

ción disponible para antibióticos inmovilizados, se ejemplifican por los dos antibióticos: vancomizina y vacitrazina. Ambos antibióticos manifiestan serios efectos desfavorables cuando entran en la circulación sistémica. Esto último puede ocurrir cuando dichos antibióticos se administran localmente a heridas abiertas. Los efectos desfavorables de la vancomizina pueden incluir reacciones de hipersensibilidad (sarpullidos maculares de la piel y anafilaxis), escalofríos y fiebre, ototoxicidad, nefrotoxicidad, sordera y daños renales. De este modo, la vancomizina no se utiliza actualmente mucho en el campo terapéutico. Los efectos indeseables de los péptidos de bacitracina pueden incluir reacciones de hipersensibilidad, náuseas, vómitos, diarrea, cilindruria, proteinuria, hematuria y daños renales serios (oliguria y anuria).

Naturalmente es imposible enumerar todos los usos concebibles para los compuestos antimicrobiales inmovilizados. Por consiguiente, y como materia general, parecen ser fútiles en todos los tratamientos de humanos o animales (a excepción de la administración parenteral, es decir excepto la introducción por el sistema cardiovascular) en donde el compuesto antimicrobial, sin enlazar a un soporte, se absorberá a través de la piel o membranas mucosas para causar efectos tóxicos secundarios indeseables. Otras ventajas principales son que los compuestos antimicrobiales inmovilizados pueden retenerse de un modo más eficaz en el punto de aplicación y que son relativamente inertes a la modificación química o enzimática.

La finalidad de esta invención consiste en emplear cualquier reacción química que resulte en la unión covalente estable de compuestos antimicrobiales, en formas biológica y farmacéuticamente activas, a entidades moleculares relativamente grandes, tales como soportes sólidos (por ejemplo cristal) o

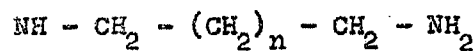
poliméricos (por ejemplo celulosa), al objeto de evitar la absorción del compuesto antimicrobial a través de la piel o membranas mucosas, para evitar su dilución o pérdida y para evitar que el derivado antimicrobial se fagocite. Esta finalidad se consigue ampliamente utilizando, por ejemplo, reacciones de acoplamiento con polisacáridos activados; aminotriazinas; reacciones capaces de formar enlaces amida, sulfonamida, carbonato, carbamato, isourea y otros enlaces iminocarbonato; reacciones capaces de formar enlaces éster, amina, sulfuro o éter; reacciones que implican la formación y reducción de bases de Schiff; y reacciones que implican aldol, aldol deshidratado, alquilo y acilo. Tal y como se utiliza en esta memoria el término "antimicrobial" incluye todos los tipos de agentes antibióticos, antibacteriales, antivirales, antiparasíticos, antifungales y anti-infecciosos similares.

Existen numerosos compuestos antimicrobiales que resultan útiles a la hora de combatir diversos tipos de infecciones en el cuerpo animal y humano, y esta invención no se limita a cualquier grupo particular, o cualquier compuesto antimicrobial individual o cualquier clase de peso molecular. Puesto que la invención es extremadamente útil para aquellos productos antimicrobiales que pueden tener efectos tóxicos secundarios en su aplicación o administración al cuerpo animal o humano, estos compuestos son principios lógicos e importantes para utilizarse en esta invención. Sin embargo, podrá apreciarse que incluso aunque un compuesto antimicrobial no tenga efectos tóxicos secundarios conocidos o sospechados, podría ser de gran ventaja aquí la unión del mismo a una molécula controladora para evitar la inactivación o pérdida o dilución del agente del punto de aplicación. Adicionalmente, dicha inmovilización asegu-

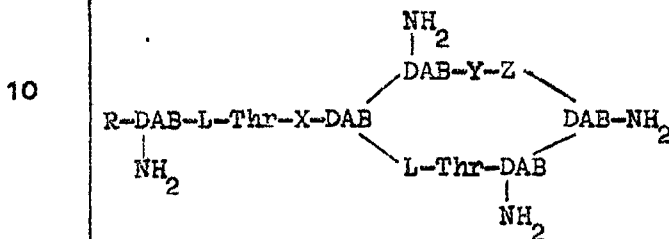
ra al agente antimicrobial contra la sensibilización inmunológica, permitiendo con ello su utilización repetida. A continuación, y con fines solamente ilustrativos, se ofrece una lista ejemplificativa, pero no exhaustiva, de tales compuestos.

5 Compuestos antimicrobiales-antibióticos

a. Diaminas alifáticas que tienen la siguiente estructura general en donde n = 2-18:



b. Polimixinas B₁, B₂, D₁ y D₂, cuyas estructuras son:

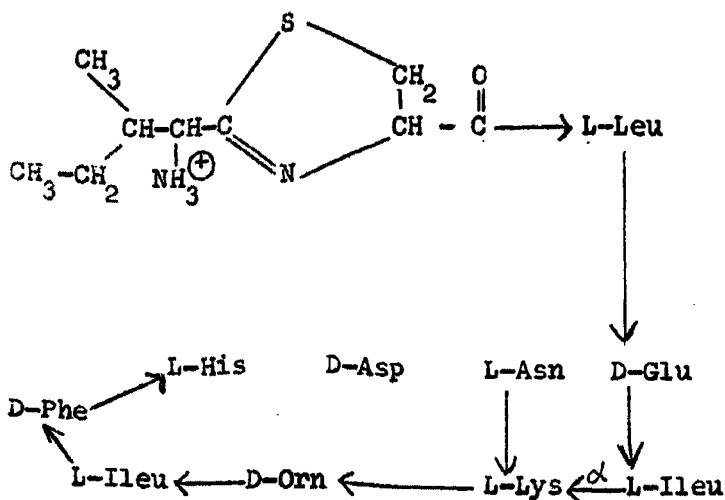


en la fórmula estructural anterior, R, X, Y y Z tienen las siguientes identificaciones químicas:

Especie de polimixina	R	X	Y	Z
B ₁	MeOct	DAB	D-Phe	L-Leu
B ₂	MeHep	DAB	D-Phe	L-Leu
D ₁	MeOct	D-Ser	D-Leu	L-Thr
D ₂	MeHep	D-Ser	D-Leu	L-Thr

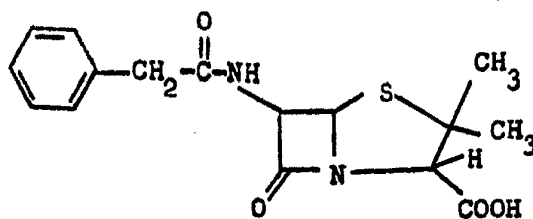
15 MeOct = ácido 6-metiloctanóico; MeHep = ácido 6-metilheptanóico; DAB = ácido L- α , γ -diaminobutírico; Thr = treonina;
 20 Phe = fenilalanina; Ser = serina; Leu = Leucina.

c. Bacitracina A, cuya estructura es la siguiente:

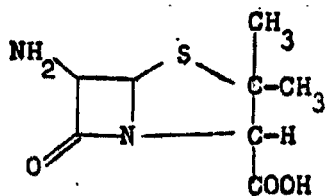


d. Penicilinas, derivados de penicilina y cefalosporinas que se ilustran por los siguientes ejemplos representativos:

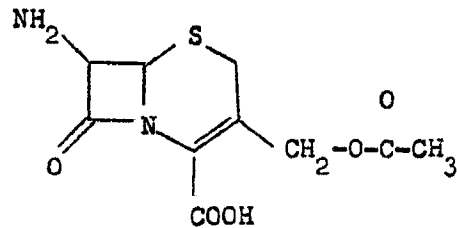
5



Bencilpenicilina



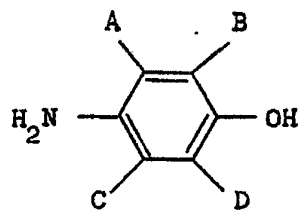
Acido 6-aminopenicilánico



Derivado de Cefalosporina C

e. Aminofenoles y aminofenoles sustituidos, de la siguiente fórmula estructural:

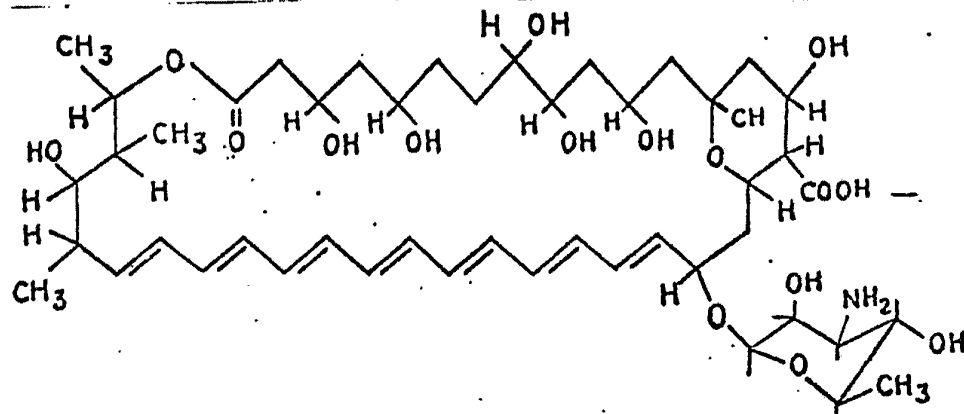
5



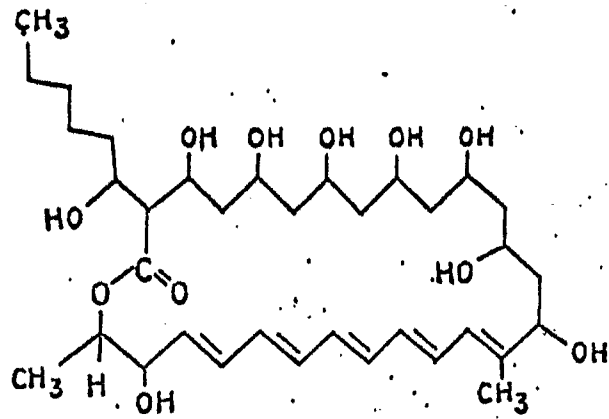
en donde A, B, C y D pueden ser varias funciones incluyendo H, F, Cl, Br, NO₂, NH₂, COOH, y OH.

f. Antibióticos poliénicos tal y como se ejemplifican por los siguientes ejemplos representativos:

10



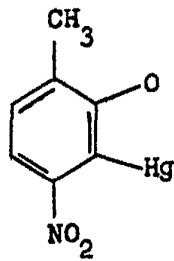
Anfotericina B



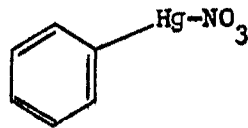
Filipina

g. Productos orgánicos de mercurio, tal como los siguientes tres ejemplos representativos:

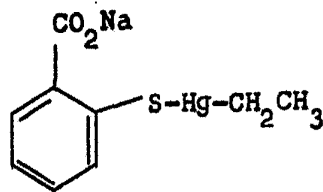
5



Nitromersol



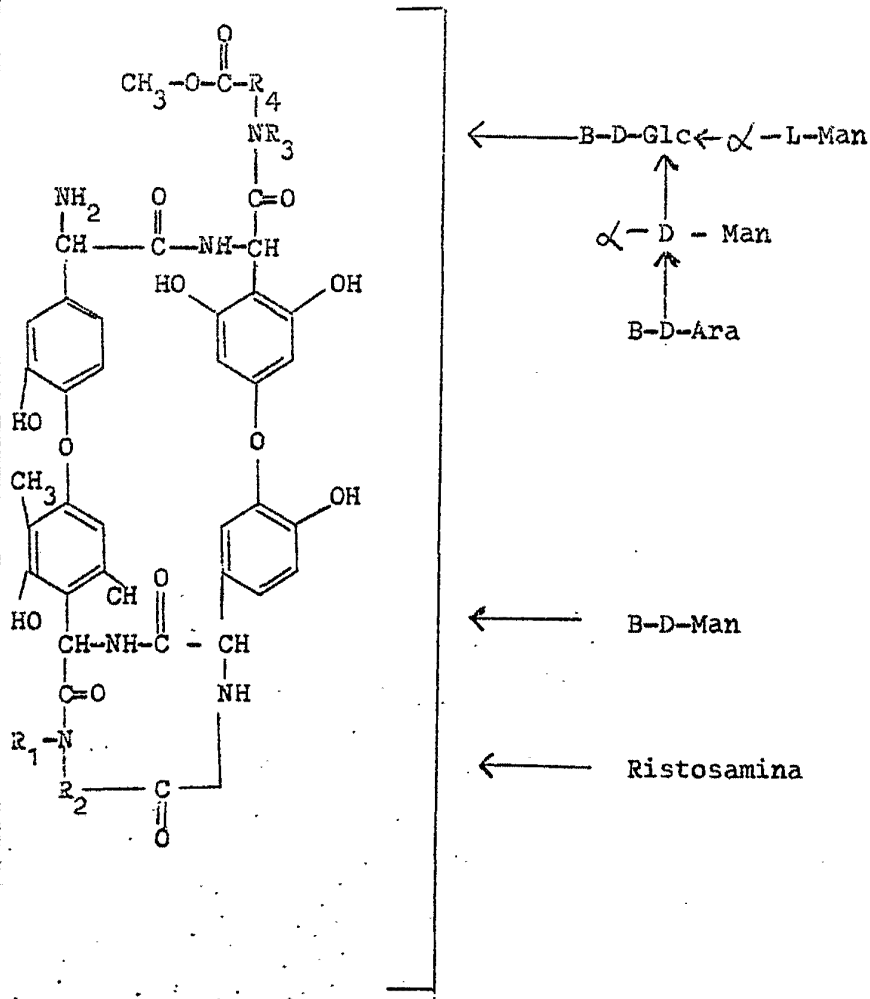
Nitrato fenilmercúrico



Timerosal

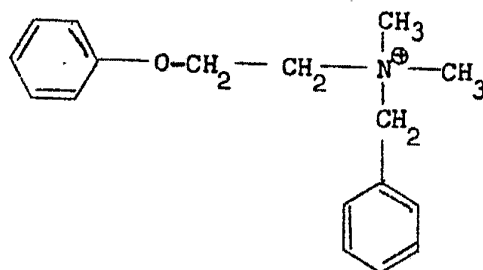
10

h. El grupo vancomizina de antibióticos, tal como la estructura parcialmente establecida de ristomicina A mostrada a continuación:

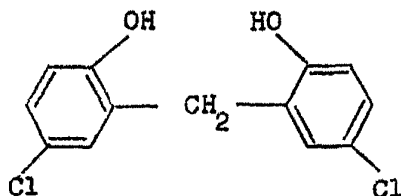


en la que R₁ a R₄ representan enlaces desconocidos.

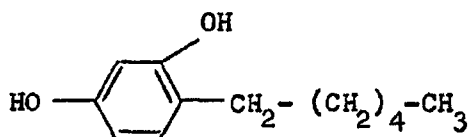
i. Refenio, que tiene la siguiente estructura:



j. Diclorofeno, que tiene la siguiente estructura:



k. Hexilresorcinol, que tiene la siguiente estructura:



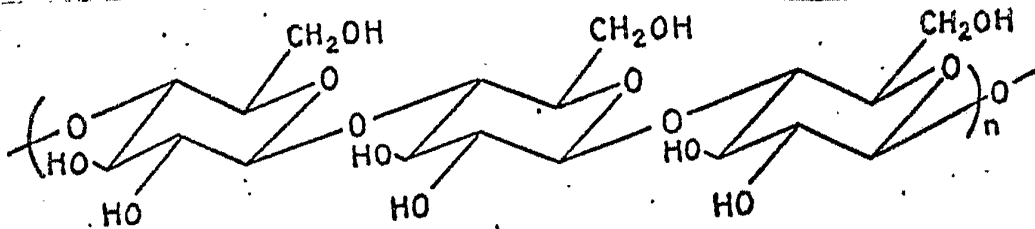
5
10
Los compuestos antimicrobiales preferidos que han de ser unidos a soportes poliméricos son los antibióticos y, específicamente, aquellos compuestos que llevan a cabo su función farmacéutica o antimicrobial actuando sobre o en las paredes celulares o membranas. Los más notables entre estos compuestos son las polimixinas, vacitrazina y los antibióticos poliélicos.

15
20
Al igual que existen muchos compuestos antimicrobiales para enumerar, también los posibles soportes poliméricos que pueden ser seleccionados son demasiado numerosos para enumerarlos exhaustivamente. Sin embargo, y para ilustrar el amplio alcance de posibles materiales soportes, se ofrece la siguiente lista de soportes adecuados seleccionados entre polisacáridos naturales y modificados, vidrio y polímeros sintéticos. Los más preferidos entre todos estos son los polisacáridos, especialmente dextrano y celulosa.

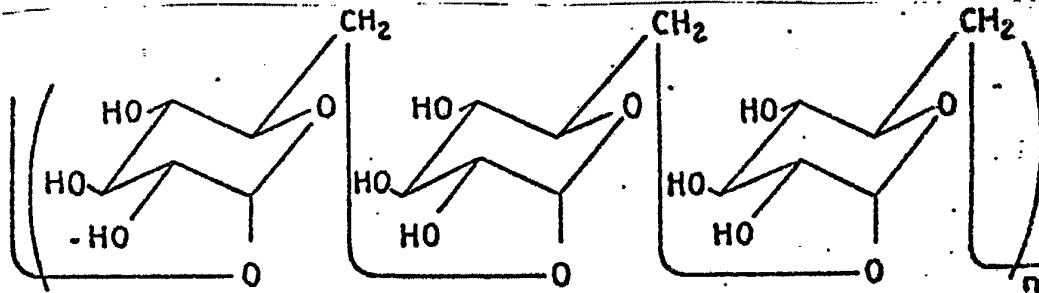
Soportes sólidos y/o poliméricos.

Soportes naturales

5 1. Celulosa - La celulosa es un polímero lineal de unidades D-glucopiranosas enlazadas en $\beta(1,4)$. La estructura es la siguiente:



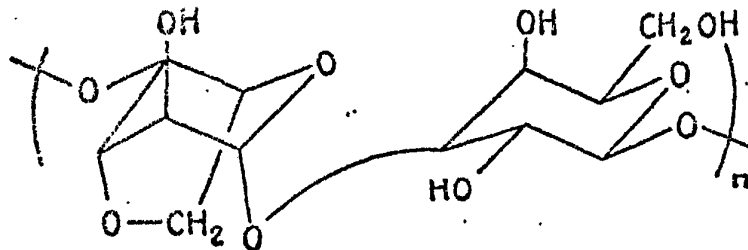
10 2. Dextranos - Los dextranos son polímeros ramificados de unidades D-glucopiranosas; la cadena de espina dorsal está enlazada en $\alpha(1,6)$ y las ramificaciones están enlazadas en $\alpha(1,2)$, $\alpha(1,3)$ y $\alpha(1,4)$. La estructura de la espina dorsal se muestra a continuación:



15 Las cadenas de dextrano pueden reticularse con epíclorhidrina; las cadenas 2-hidroxipropilo llegan a enlazarse en 1,3 a los grupos hidroxilo libres de las cadenas dextrano. Los dextranos con varios grados de reticulación pueden encontrarse en el comercio en forma de perlas bajo el nombre registrado Sephadex de Pharmacia Corp.

20 3. Agarosa - La agarosa es un polisacárido lineal con residuos alternantes de D-galactopiranosas y 3,6-anhidro-L-galactopiranosas. La estructura se muestra a continuación. Las formas de agarosa

sa, en perlas y reticuladas, se encuentran en el comercio bajo los nombres registrados Sefarosa 2B, 4B, 6B, y CL2B, CL4B, y CL6B de Pharmacia Corp.



- 5 4. Almidón: Por ejemplo, α -amiloxa es un polímero sin ramificar de D-glucopiranososa enlazado en $\alpha(1,4)$, y amilopectina es un polímero ramificado con una espina dorsal α -amilosa y ramificaciones enlazadas en $\alpha(1,6)$.
- 10 5. Inulina es un copolímero complejo de unidades D-glucopiranososa y D-fructofuranosa.
6. Xilanos son polímeros lineales de unidades D-xilopiranososa enlazadas en $\beta(1,4)$.
7. Mannanos son polímeros de D-mannopiranososa enlazada en $\beta(1,4)$.
- 15 8. Glucomannanos son copolímeros de D-glucosa y D-mannosa enlazados en $\beta(1,4)$.
9. Galactanos y arabinogalactanos son polímeros altamente ramificados de unidades galactosa y galactosa y arabinosa respectivamente, enlazadas en 1,6 y 1,3.
- 20 10. Goma arábiga y otras gomas de planta.
11. Colágeno y otros polipéptidos de origen natural o sintético y sus derivados.

Materiales soporte de polisacáridos modificados.

1. El tratamiento de los polisacáridos con ácido peryódico bajo condiciones suaves se traduce en la disociación de algunos de los enlaces 1,2-diol para formar grupos dialdehído. No se presenta la disociación extensiva de la cadena polimérica. Las funciones aldehído pueden utilizarse como puntos adicionales de modificación.

2. Los grupos funcionales naturales de los soportes polisacáridos son grupos hidroxilo primarios y secundarios y, en ciertos casos, ácidos carboxílicos (por ejemplo goma arábica y xilanos). Otros grupos funcionales que pueden derivarse de estos son los indicados a continuación:

$-O-CH_2CO_2H$ Carboximetilo, por reacción con hidróxido sódico y cloroacetato sódico; disponible en el comercio, por ejemplo, como carboximetilcelulosa.

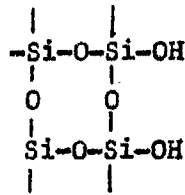
$-OCH_2CH_2NH_2$ Aminoetilo, por reacción con hidróxido sódico y sulfato de aminoetilo; disponible en el comercio, por ejemplo, como aminoetilcelulosa.

$-O-SO_2R$ Sulfonato, por reacción con el correspondiente cloruro de sulfonilo en presencia de una amina terciaria.
(en donde, R=alquilo, arilo)

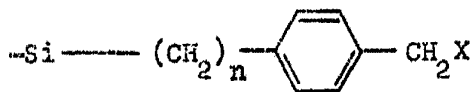
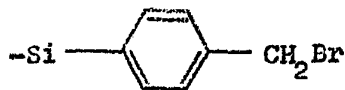
Halógeno Halógeno, por tratamiento con ácido bromhídrico o yodhídrico.

$-O-CH_2-\begin{array}{c} \diagup O \diagdown \\ CH-CH_2 \end{array}$ 2,3-oxidopropilo, por reacción con epiclorhidrina en presencia de una base; las preparaciones de materiales de similar funcionalidad se encuentran disponibles en el comercio como Sepharose 6B epoxi-activada de Pharmacia Corp.

Vidrio - La estructura del vidrio es la siguiente:

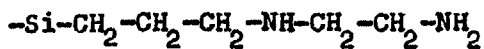
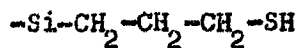
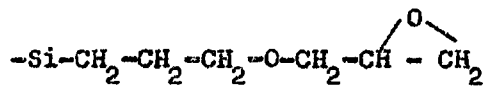
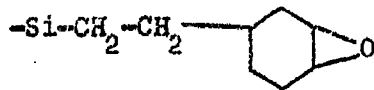
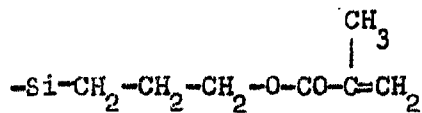
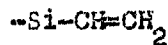


El grupo funcional natural del vidrio es un grupo Si-OH. Ejemplos de otras funciones que pueden estar unidas son:



n = 1-3

X = Hal

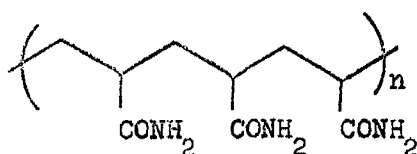


Polímeros artificiales

1. Poliacrilamidas

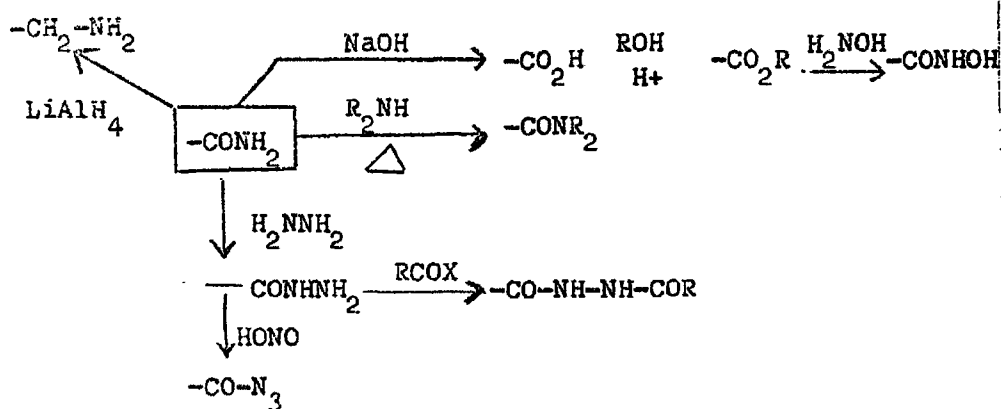
La estructura de la poliacrilamida se muestra a continuación. La estructura está reticulada a veces con unidades metilenbisacrilamida o metilendiácrlato. Estos materiales se encuentran en el comercio en forma de perlas, con diversos

grados de reticulación, bajo el nombre registrado BioGels de Bio-Rad Laboratories.



5

La función natural de las acrilamida son grupos carboxamida. Estos pueden convertirse a otros grupos adecuados para la unión de productos médicos, como se muestra a continuación:



10

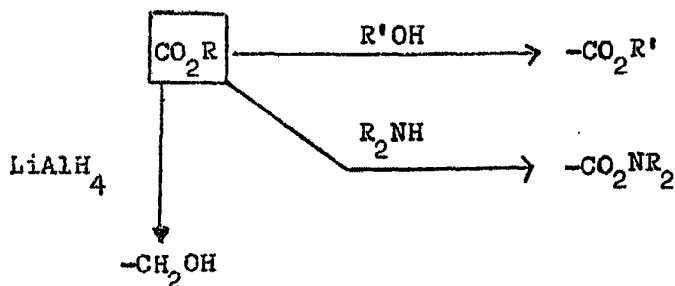
Varios de estos derivados se encuentran en el comercio, suministrados por Bio-Rad Laboratories, por ejemplo, hidrazida (Hidrazida Bio-Gel P-2 y P-150), aminoetilo (Affi-Gel 701 y Aminoetilo Bio-Gel P-2 y P-150), y carboxilo (Affi-Gel 702 y Bio-Gel CM-2)

2. Poliacrilatos

La estructura de los poliacrilatos es la siguiente:

La función natural de estos materiales soporte es el grupo ácido o éster carboxílico. Las reacciones de importancia para la modificación del grupo funcional, para la unión de productos medicinales, se muestran a continuación:

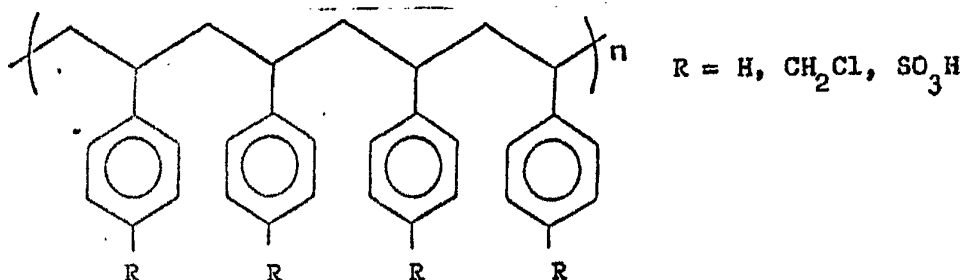
5



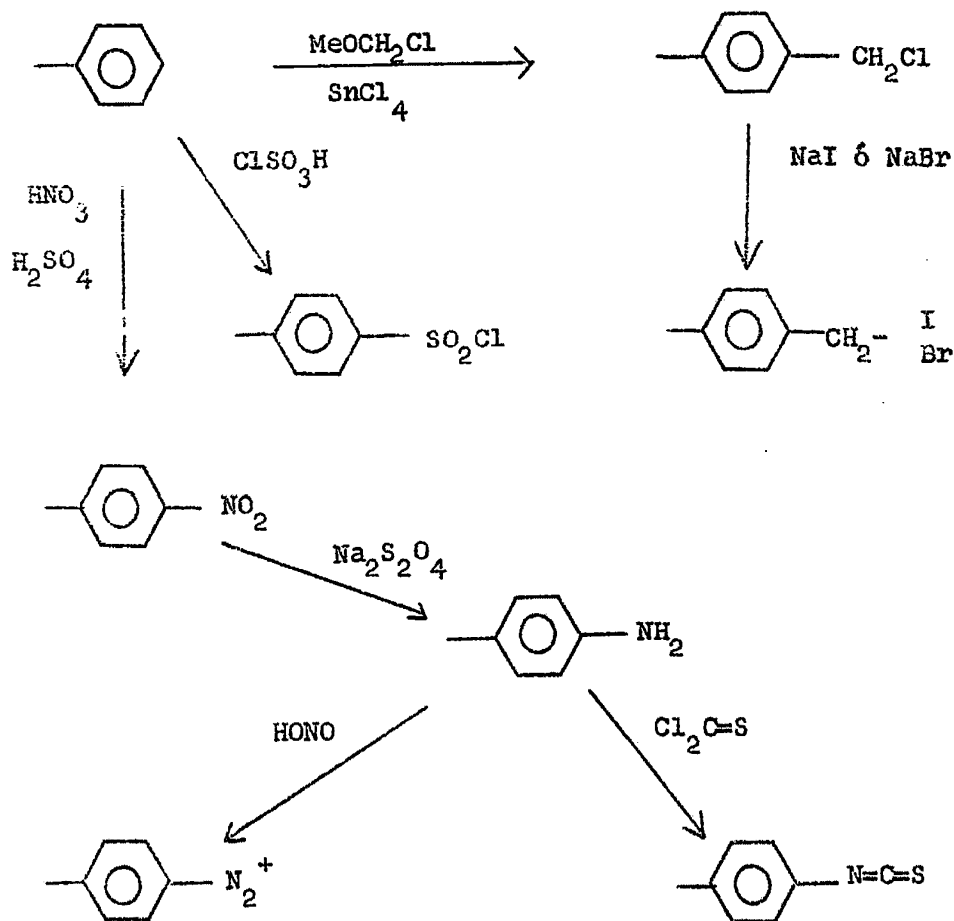
3. Poliestireno

La estructura del poliestireno se muestra a continuación. En el comercio pueden encontrarse varios poliestirenos, al menos en forma de perlas conteniendo bajos porcentajes de 1,4-divinilbenceno como agente reticulante:

10



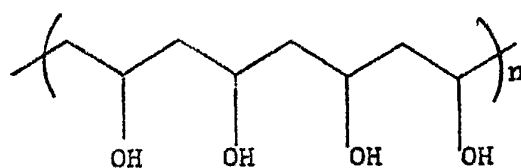
En el siguiente esquema se muestran ciertas reacciones que introducen grupos funcionales en el poliestireno adecuados para la unión de productos medicinales:



Las perlas de poliestireno reticulado y clorometilado se encuentran en el comercio como Bio-Beads S-X1 y S-X2 de Bio-Rad Laboratories.

5 **4. Alcohol polivinílico**

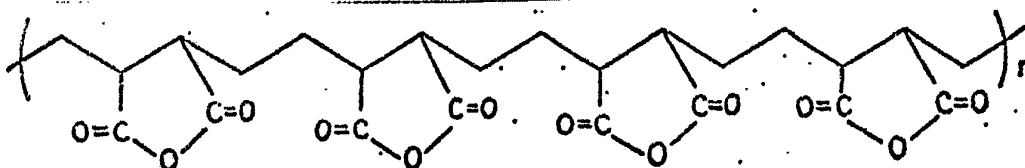
Este material soporte se prepara por hidrólisis de acetato de polivinilo. La estructura es la siguiente:



La función natural de este material es el grupo hidroxilo. Por consiguiente, son aplicables todas las reacciones de funcionalización descritas en conexión con los soportes de polisacáridos, excepto la disociación con peryodato.

5. Copolímero de anhídrido polietilenmaléico

Este material contiene unidades reactivas anhídrido-succínico y puede utilizarse para unir productos medicinales directamente.



6. Otros materiales soporte posibles incluyen los polímeros de condensación tales como poliésteres y poliamidas (nylon) y polivinilpirrolidona.

Puesto que el tamaño del soporte debe ser suficientemente grande para evitar la fagofitosis o penetración a través de membranas biológicas y puesto que los diámetros típicos de las células fagofíticas, en micras, son los siguientes: Monocitos (14-20); Macrofagos (20-40); Neutrofilos (12), Células Langhans (40-50), se cree que las moléculas soporte de esta invención pueden tener un diámetro superior a 50 micras aproximadamente.

Los compuestos antimicrobiales y los soportes sólidos pueden enlazarse de muchos modos, tal y como se explicará detalladamente a continuación, con el resultado de que los compuestos antimicrobiales permanecen farmacéuticamente activos.

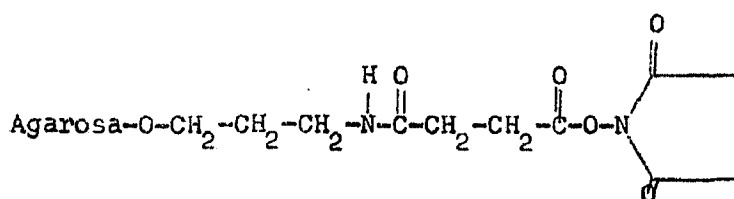
Una forma de enlace contempla la interposición de un brazo mole-

5
10
15
20
25

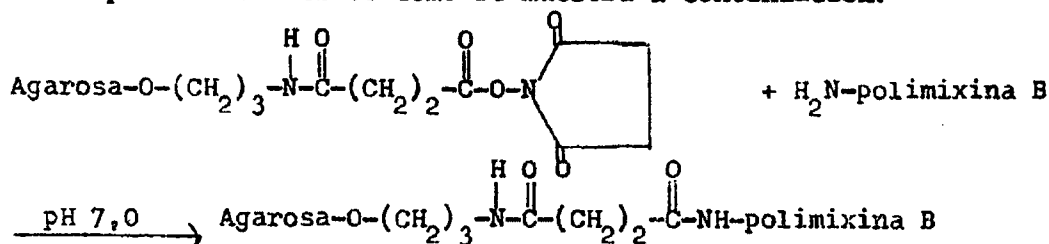
cular entre el soporte y el compuesto antimicrobial, para permitir una penetración celular suficiente de la célula interesada por el producto medicinal, mientras que la molécula soporte controladora limita el movimiento del producto medicinal. Solamente con fines ejemplificativos y para demostrar que pueden prepararse productos medicinales enlazados que retengan su actividad farmacéutica, se enlazó covalente polimixina B a perlas de agarosa activada con un brazo hidrocarbonado de 10 Å entre las mismas, demostrándose la actividad antimicrobial retenida de polimixina B.

EJEMPLO 1

Se enlaza covalentemente polimixina B, un agente antimicrobial de origen natural, conocido, a perlas de agarosa por reacción de polimixina B libre con perlas de agarosa activada (disponibles en el comercio como Affi-Gel 10 de Bio-Rad Laboratories). La estructura de la agarosa activada (Affi-Gel 10) es la siguiente:



El brazo lateral activado está unido covalentemente a agarosa a través de un enlace éter estable. La polimixina B se acopla a Affi-Gel 10 como se muestra a continuación:



Las condiciones para el acoplamiento son las siguientes:

guientes:

1. Se disuelven 2,5 g de sulfato de polimixina B (1,8 mmoles) en 25 ml de tampón fosfato 0,1 M, pH 7.

2. La solución anterior se añade a 1 g de Affi-Gel 10 deshidratado para dar 15 ml de Affi-Gel hinchado conteniendo aproximadamente 0,18 mmoles de brazos laterales activados. Esta mezcla se hace reaccionar entonces durante 8 horas a 42°C con agitación. El derivado final se lava con cloruro sódico 1M hasta que la absorbancia del eluado a 260 nm es de cero.

Como puede observarse, los derivados de este tipo reaccionan con los grupos amino libres de polimixina para producir enlaces amida entre la perla de agarosa y la polimixina. El brazo hidrocarbonado tiene una longitud aproximada de 10 Å y las perlas de agarosa hidratada tienen un diámetro de 74 a 149 micras aproximadamente. Este tamaño de perla es suficientemente grande para evitar la fagofitoxis o penetración a través de membranas biológicas.

Cuando se hincha Affi-Gel 10 existen en el mismo aproximadamente de 8 a 12 micromoles/ml de los grupos del brazo activado. Por consiguiente, se utiliza un exceso molar de 10 veces de polimixina B, con respecto a los grupos activos del brazo, para evitar enlaces amida múltiples a la polimixina B, que tiene cuatro grupos amino libres. La modificación química de cualquier grupo amino no destruye la actividad antibiótica; sin embargo, la modificación de 2 ó más si lo hace. En consecuencia, las condiciones de acoplamiento se eligen de modo que las moléculas de polimixina se unan, en promedio, a las perlas de agarosa a través de solo un enlace amida.

Después de la unión covalente de polimixina B a las perlas de agarosa, se lava 1 ml de este derivado extensivamente

5 con etanol y agua para separar toda la polimixina libre. El procedimiento de lavado consiste en lavados sucesivos de 200 ml de etanol al 10 % en agua, 200 ml de etanol al 5 % en agua y 200 ml de agua. La eficacia del proceso de lavado se establece demostrando que lavados sucesivos eliminan totalmente la polimixina B sin enlazar, tal y como se detecta por ensayos antimicrobiales y absorción ultravioleta. El procedimiento de lavado no es crítico en tanto en cuanto separe todas las trazas de polimixina sin acoplar. Es importante que el lavado final no contenga un disolvente orgánico ya que el etanol residual podría afectar a la interpretación de los resultados conseguidos.

10 La actividad antimicrobial de la polimixina B unida a perlas de agarosa se establece del siguiente modo. Se introduce un medio de cultivo estéril en el interior (50 ml) y exterior (100 ml) de una bolsa de diálisis suspendida en un matrás Erlenmeyer. Las perlas de polimixina-agarosa se colocan en el interior de la bolsa de diálisis y a continuación se inoculan los medios de cultivo del interior y del exterior con números variables de Escherichia coli (ATCC No. 25922) viable que oscilan entre 1×10^6 y 1×10^8 células. Cuando se colocan 0,1 mg de la polimixina-agarosa enlazadas en el interior de la bolsa de diálisis, no se detecta crecimiento alguno de bacterias en el interior de la bolsa cuando el inóculo consiste en 1×10^7 células o menos (Tabla I). Similarmente, cuando la polimixina-agarosa enlazadas se colocan en el exterior de la bolsa, no se detecta crecimiento alguno de bacterias fuera de la bolsa (Tabla I). Las bacterias siempre crecen en el medio de cultivo exterior cuando la polimixina-agarosa se encuentra en el interior de la bolsa y en el medio de cultivo interior cuando la polimixina-agarosa se encuentra en el exterior de la bolsa. En experimentos de control, se añade polimixina B libre (sin enlazar) al interior de la bolsa de diálisis. No se detecta crecimiento bacterial

alguno en el interior o exterior de la bolsa. Según otro experimento de control, se demuestra que las perlas de agarosa, en ausencia de polimixina B enlazada covalentemente, no evita el crecimiento bacterial.

5

Este experimento establece los siguientes puntos:

1. La polimixina unida a perlas de agarosa retiene su actividad antimicrobial.
2. La polimixina se une covalentemente a la perla de agarosa debido a que la polimixina, que había reaccionado químicamente con la perla de agarosa, deja de pasar a través del tubo de diálisis, mientras que la polimixina libre pasa realmente a través de dicho tubo de diálisis.
3. La polimixina en forma activa que puede pasar a través del tubo de diálisis, no se desprende de la perla por cualquier reacción con E. coli.

10

15

TABLA I. Efecto de polimixina-agarosa sobre el crecimiento de E. coli.

Descripción de la muestra	Número de células de <u>E. coli</u> usadas para inóculo	Número de células viables de <u>E. coli</u> por ml después de 18 horas a 37°C.	
		En bolsa de diálisis	Fuera de la bolsa de diálisis
0,1 mg polimixina-agarosa en bolsa de diálisis	5×10^6	0	$1,9 \times 10^9$
0,1 mg polimixina libre en bolsa de diálisis	5×10^6	0	450
0,1 mg polimixina-agarosa en bolsa de diálisis	1×10^7	0	$2,1 \times 10^9$

20

TABLA I (Continuación)

Descripción de la muestra	Número de células de E. coli usadas para inóculo	Número de células viables de E. coli por ml después de 18 horas a 37°C.	
		En bolsa de diálisis	Fuera de la bolsa de diálisis
0,1 mg perlas de agarosa en bolsa de diálisis	1×10^7	$2,1 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$
0,1 mg polimixina-agarosa fuera	1×10^7	$2,0 \times 10^9$	0

5 En otros experimentos se ha demostrado que la polimixina-agarosa es activa contra diversos microorganismos diferentes, incluyendo: (1) Salmonella typhimurium, (2) Pseudomonas aeruginosa y (3) la levadura, Candida albicans.

10 EJEMPLO 2

La eficacia de una amina primaria alifática, un ácido carboxílico alifático y un aminofenol se ilustra en el siguiente experimento. Los compuestos mostrados a continuación se unen covalentemente a agarosa utilizando Affi-Gel 10 como se ha descrito para la polimixina B en el ejemplo 1:

1. $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_{10}-\text{NH}_2$
2. $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_{10}-\text{COOH}$
3. $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_3$
4. $\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$

20 Los derivados de agarosa de estos compuestos acoplados a la perla de agarosa a través de sus grupos amino, son examinados con respecto a la actividad antimicrobial contra

E. coli, S. typhimurium, B. subtilis, y S. aureus en el siguiente experimento. Se añaden inóculos a 9,5 ml de medio de cultivo estéril. El inóculo consiste en 0,5 ml de células en fase estacionaria. En los tubos experimentales, se añaden 0,5 mg del agente antimicrobial inmovilizado. Los tubos de control contienen o bien 0,5 mg de la agarosa sin derivar o bien nada de agarosa. Las muestras se mezclan totalmente y a continuación se efectúan de 1 a 10 diluciones en series del tubo inoculado original, incubándose los cultivos a 37°C durante 12 horas. Las diluciones en serie del cultivo original se efectúan a una dilución final de 1×10^{-10} de la muestra original. Después de 12 horas, las muestras se examinan con respecto al crecimiento bacterial. En la Tabla II mostrada a continuación, se registra la dilución más elevada en la cual se observa el crecimiento bacterial. Estos datos soportan las siguientes conclusiones:

1. Las perlas sin derivar no tienen actividad antimicrobial.

2. La amina primaria alifática (No. 1) demuestra actividad contra E. coli, S. typhimurium y S. aureus.

3. El ácido carboxílico alifático (No. 2) demuestra actividad contra E. coli.

4. El alcano normal C₁₀ (No. 3) no tiene actividad contra ninguna de las cepas.

5. El fenol (No. 4) tiene actividad contra S. typhimurium y B. subtilis.

Estos datos indican que la amina alifática primaria y el fenol, unidos a agarosa, muestran una actividad significativa contra al menos uno de los organismos gram-positivos y al menos uno de los organismos gram-negativos.

Tabla II. Efecto de los derivados de agarosa sobre bacterias gram-positivas y gram-negativas.

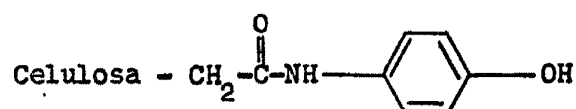
Organismo	Dilución más alta que permite el crecimiento								Agarosa sin derivar ^b	
	#1	#2	#3	#4	#1	#2	#3	#4	Agarosa	
<u>E. coli</u>	Con- trol ^a 10 ⁻⁶	#1 10 ⁻⁵	Con- trol ^a 10 ⁻⁶	#2 10 ⁻⁵	Con- trol ^a 10 ⁻⁶	#3 10 ⁻⁶	Con- trol ^a 10 ⁻⁶	#4 10 ⁻⁶	Con- trol ^a 10 ⁻⁶	Agarosa 10 ⁻⁶
<u>S. typhimurium</u>	10 ⁻⁷	10 ⁻³	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
<u>S. aureus</u>	10 ⁻⁹	10 ⁻⁷	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹
<u>B. subtilis</u>	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸

5 a.) Las muestras de control se tratan idénticamente que las muestras experimentales, excepto que las mismas carecen del derivado de agarosa.

b.) Las pelus de agarosa sin derivar se obtienen por tratamiento de Affi-Gel con tampones acuosos en ausencia de amina añadida.

10 EJEMPLO 3

Se enlaza covalentemente aminofenol a celulosa utilizando carboximetilcelulosa y un reactivo de carbodiimida, mediante el procedimiento indicado a continuación, para dar la estructura:



15 Fenol celulosa I: (A partir de carboximetilcelulosa y p-aminofenol):

Se suspende 1 g de carboximetilcelulosa (sigma, media, 0,7 miliequivalentes por gramo) en 10 ml de agua y se añaden 5 ml de ácido clorhídrico al 5 %. Después de agitar durante 5 minutos,

la lechada se filtra en un embudo Buchner y se lava con 200 ml de agua, 50 ml de etanol y a continuación 50 ml de éter. El polvo seco se transfiere a un matr az Erlenmeyer de 125 ml con un agitador magnético y se añaden 5 ml de dimetilformamida (DMF),
5 seguido por 0,445 g (2,15 mmoles) de dicitclohexilcarbodiimida (DCC; Aldrich) en 7 ml de DMF y 0,545 g (5 mmoles) de p-amino- fenol (Eastman) en 5 ml de DMF. Los laterales del matr az se lavan con otros 3 ml de DMF y la lechada se agita suavemente a temperatura ambiente durante 36 horas. En este momento, se añaden
10 100 ml de agua y el sólido suspendido se recoge en un embudo Buchner y se lava totalmente con 200 ml cada uno de agua, etanol y éter y a continuación se seca al aire para dar un polvo esponjoso de color marrón claro.

El derivado anterior y la celulosa sin modificar se examinan entonces con respecto a la actividad antimicrobial
15 contra E. coli utilizando cantidades variables del derivado celulosa/fenol y diferentes tamaños de inóculo. Las muestras se crecen durante 24 horas y se examinan con respecto al crecimiento bacterial. Estos datos se resumen en la siguiente Tabla III (+ = crecimiento; - = crecimiento). Los datos de la Tabla III
20 demuestran que en contraste a la celulosa sin derivar, el aminofenol acoplado a la celulosa tiene una actividad antibacterial significativa. El aminofenol se acopla también a agarosa en la forma descrita en el ejemplo 1. Este último derivado tiene actividad
25 contra S. typhimurium y B. subtilis pero no contra E. coli (Tabla II). Estos resultados indican que la selección del soporte polimérico y del brazo covalente puede tener efectos significativos sobre la actividad antimicrobial del compuesto unido a un soporte inmovilizado.

TABLA III. Efecto de fenol-celulosa I sobre el crecimiento de E. coli.

		<u>Crecimiento</u>	
	<u>mg de antimicrobial</u>	<u>Celulosa-fenol</u>	<u>Celulosa (sin modificar)</u>
5	1 mg ^a	-	+
	2 mg ^a	-	+
	3 mg ^a	-	+
	4 mg ^a	-	+
	5 mg ^a	-	+
10	1 mg ^b	-	+
	5 mg ^b	-	+
	1 mg ^c	+	+
	0 ^a	+	+
	0 ^c	+	+

- 15 a) tamaño de inóculo: 1×10^6 bacterias
 b) tamaño de inóculo: 1×10^7 bacterias
 c) tamaño de inóculo: 1×10^8 bacterias.

20 En la forma descrita a continuación se preparan otros derivados de fenol-celulosa (II a V) y sus derivados dicloro y diyodo:

Fenol-celulosa II: (A partir de aminoetilcelulosa y ácido 3-(p-hidroxifenil)-propiónico):

25 Se suspenden 3 g de aminoetilcelulosa (Sigma, aproximadamente 0,7 miliequivalentes por gramo) en 20 ml de dimetilformamida (DMF) y se añaden 2,10 g (12,6 mmoles) de ácido 3-(p-hidroxifenil)-propiónico (Aldrich) disuelto en un volumen mínimo de DMF, seguido por 1,15 g (6,3 mmoles) de dicitclohexilcarbo-

diimida (DCC; Aldrich) en 3 ml de DMF. Esta mezcla se agita a temperatura ambiente durante 200 horas. Después de tratar con 20 ml de agua, la lechada se transfiere a un embudo Buchner y se lava totalmente con 200 ml de etanol. La torta del filtro se vuelve a enlechar en un vaso de precipitados con 10 ml de etanol y a continuación se transfiere de nuevo a un embudo Buchner en donde se lava totalmente con 100 ml cada uno de etanol, acetona y éter. Después de secar al aire, el producto es un sólido de un color ligeramente mate.

Derivado dicloro de fenol-celulosa II:

Se enlecha una porción de 0,7 g del fenol-celulosa II en 5 ml de agua y se añaden 3 ml (3 mmoles) de solución de hipoclorito sódico 1N (Clorox). La lechada se agita entonces durante 1 hora a 0°C, durante cuyo tiempo la mezcla de reacción vira desde un color verde amarillento pálido a un color blanco. La reacción se diluye con 20 ml de agua y el exceso de oxidante se destruye (negativo al papel de yoduro de almidón) por adición de 3 ml de una solución acuosa saturada de tiosulfato sódico. El sólido se recoge en un embudo Buchner y se lava extensivamente con porciones de 200 ml de agua, etanol al 95 %, cetona y éter y a continuación se seca al aire para dar un polvo blanco.

Derivado diyodo de fenol-celulosa II:

Usando el procedimiento anterior, se yodan 0,7 g de fenol-celulosa II con 2,5 ml de una solución yodante (15 g de yoduro de potasio y 25 g de yodo en 200 ml de agua, 0,5 M). Después de procesar, se lava y seca como anteriormente, para obtener un polvo de color marrón pálido.

Fenol-celulosa III: (A partir de aminoetilcelulosa y ácido p-hidroxifenilacético)

Se suspenden 3 g de aminoetilcelulosa (sigma, aproximadamente 0,7 miliequivalentes por gramo) en 20 ml de dimetil-

formamida (DMF) y se añade 1,96 g (12,6 mmoles) de ácido p-hidroxifenilacético (Aldrich) en un volumen mínimo de DMF, seguido por 1,15 g (6,3 mmoles) de dicitclohexilcarbodiimida (DCC; Aldrich) en 3 ml de DMF. Esta mezcla se agita a temperatura ambiente durante 48 horas. Después del tratamiento con 100 ml de acetona, el sólido suspendido se recoge en un embudo Buchner y se lava con porciones de 200 ml de etanol, agua, acetona y éter y a continuación se seca al aire para dar un polvo esponjoso de color mate.

10 Derivado dicloro de fenol-celulosa III:

Se enlecha una porción de 0,7 g de fenol-celulosa III en 5 ml de agua y se añaden 3 ml (3 mmoles) de solución de hipoclorito sódico 1N (Clorox). La lechada se agita entonces durante 1 hora a 0°C, durante cuyo tiempo la mezcla de reacción vira lentamente de un color verde amarillento pálido a un color blanco. La reacción se diluye con 20 ml de agua y el exceso oxidante se destruye (negativo al papel de yoduro de almidón) por adición de 3 ml de una solución acuosa saturada de tiosulfato sódico. El sólido se recoge en un embudo Buchner y se lava extensivamente con porciones de 200 ml de agua, etanol al 95 %, acetona y éter, secándose a continuación para dar un polvo blanco.

20 Derivado diyodo de fenol-celulosa III:

Usando el procedimiento anterior, se yodan 0,7 g de fenol-celulosa con 2,5 ml de una solución yodante (15 g de yoduro de potasio y 25 g de yodo en 200 ml de agua, 0,5 M). Después del procesado, se lleva a cabo el lavado y secado como anteriormente, para obtener un polvo de color marrón pálido.

30 Fenol-celulosa IV: (A partir de aminoetilcelulosa y ácido p-hidroxibenzoico)

Se suspenden 3 g de aminoetilcelulosa (sigma, aproximadamente 0,7 miliequivalentes por gramo) en 20 ml de dimetilformamida (DMF) y se añaden 1,74 g (12,6 mmoles) de ácido p-hidroxibenzóico (Eastman) disuelto en un volumen mínimo de DMF, seguido por 1,15 g (6,3 mmoles) de dicitclohexilcarbodiimida (DCC; Aldrich) en 3 ml de DMF. Esta mezcla se agita a temperatura ambiente durante 200 horas. Después del tratamiento con 100 ml de acetona. El sólido suspendido se recoge en un embudo Buchner y se lava con porciones de 200 ml de etanol, agua, acetona y éter, secándose a continuación al aire para dar un polvo esponjoso de color mate.

Derivado yodado de fenol-celulosa IV:

Usando el procedimiento anterior, se yodan 0,7 g de fenol-celulosa IV con 2,5 ml de una solución yodante (15 g de yoduro de potasio y 25 g de yodo en 200 ml de agua, 0,5 M). Después de la elaboración, lavado y secado como anteriormente, se obtiene un polvo de color marrón pálido.

Fenol-celulosa V: (a partir de carboximetilcelulosa y 2-(p-hidroxifenil)-etilamina:

Se suspenden 3 g de carboximetilcelulosa (sigma, media, 0,7 miliequivalentes por gramo) en 40 ml de dimetilformamida (DMF) y se añaden 1,72 g (12,6 mmoles) de 2-(p-hidroxifenil)-etilamina disuelta en un volumen mínimo de DMF, seguido por 1,15 g (6,3 mmoles) de dicitclohexilcarbodiimida (DCC; Aldrich) en 3 ml de DMF.

Esta mezcla se agita a temperatura ambiente durante 48 horas durante cuyo tiempo vira a color marrón. Después del tratamiento con 100 ml de acetona, el sólido suspendido se recoge en un embudo Buchner y se lava con porciones de 200 ml de etanol, agua, acetona y éter, secándose entonces al aire para

dar un polvo esponjoso de color mate.

Derivado dicloro de fenol-celulosa V:

5 Se enlecha una porción de 0,7 g de fenol-celulosa V en 5 ml de agua y se añaden 3 ml (3 mmoles) de solución de hipoclorito sódico 1N (Clorox). La lechada se agita entonces durante 1 hora a 0°C, durante cuyo tiempo la mezcla de reacción vira a un color marrón claro. La reacción se diluye con 20 ml de agua y el exceso de oxidante se destruye (negativo al papel de yoduro de almidón) por adición de 3 ml de una solución acuosa saturada
10 de tiosulfato sódico. El sólido se recoge en un embudo Buchner y se lava extensivamente con porciones de 200 ml cada una de agua, etanol al 95 %, acetona y éter, para secarse entonces al aire y dar un polvo blanco.

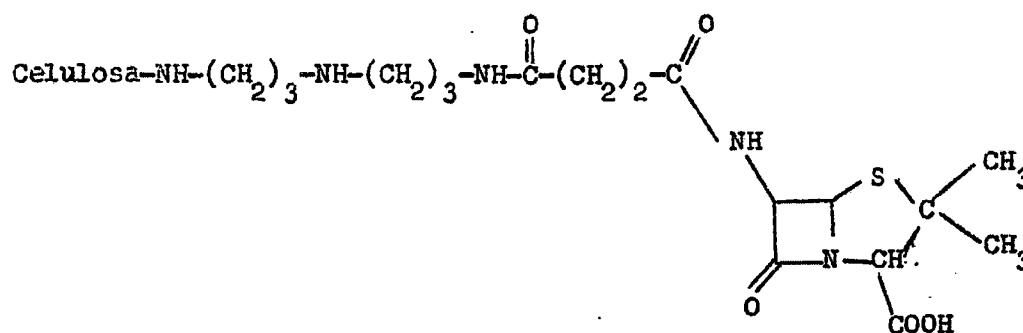
Derivado diyodo de fenol-celulosa V:

15 Usando el procedimiento anterior, se yodan 0,7 g de fenol-celulosa V con 2,5 ml de una solución yodante (15 g de yoduro de potasio y 25 g de yodo en 200 ml de agua, 0,5 M). La mezcla de reacción de color marrón chocolate se elabora, lava y seca como anteriormente, para dar un polvo de color marrón pálido.

20 Podrá apreciarse que a la vista de los numerosos compuestos antimicrobiales adecuados, los muchos materiales soporte apropiados y los diversos enlaces químicos adecuados entre el compuesto antimicrobial y los soportes, es imposible
25 ejemplificar cada combinación posible. Por consiguiente, y con fines ilustrativos y no limitativos, los siguientes ejemplos intentan ilustrar un acoplamiento químico típico de compuestos antimicrobiales representativos a celulosa a través de los brazos espaciadores que se unen covalentemente a la celulosa.

EJEMPLO 6

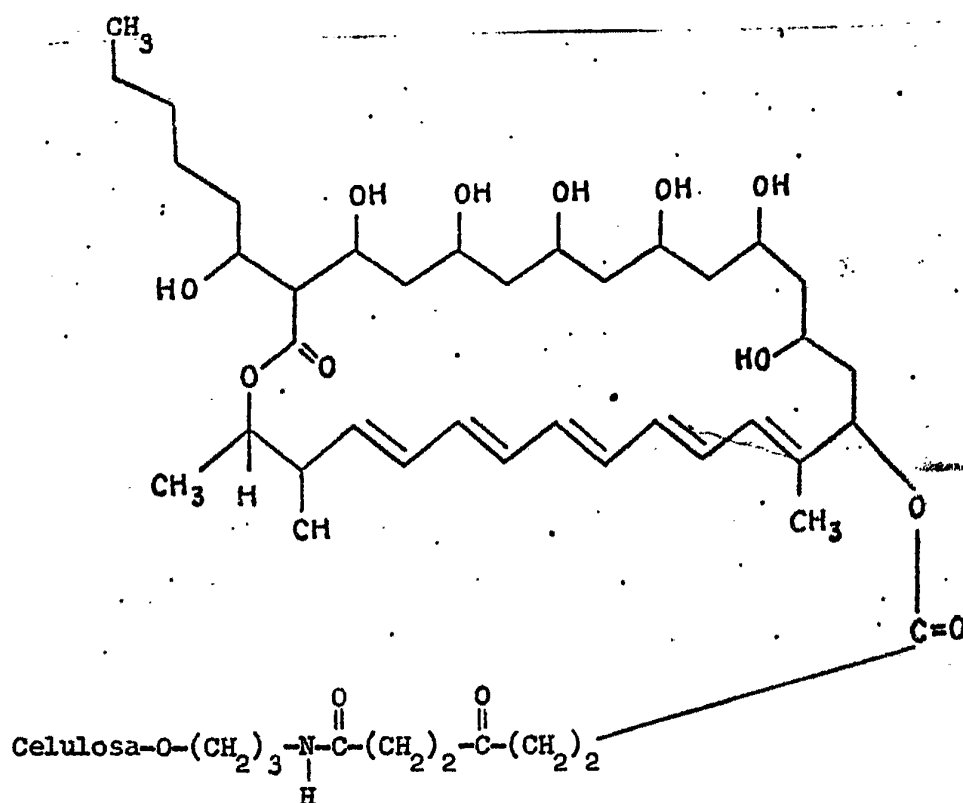
El ácido 6-aminopenicilánico se puede acoplar a celulosa del siguiente modo:



5

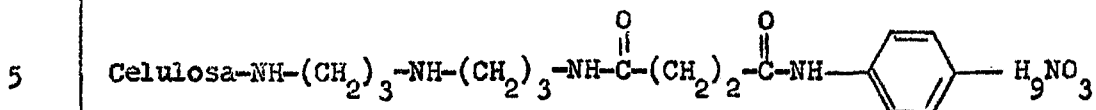
EJEMPLO 7

Los polienos, ilustrados en la presente invención por Filipina, pueden enlazarse covalentemente a celulosa a través de un enlace éster, tal y como se muestra a continuación:



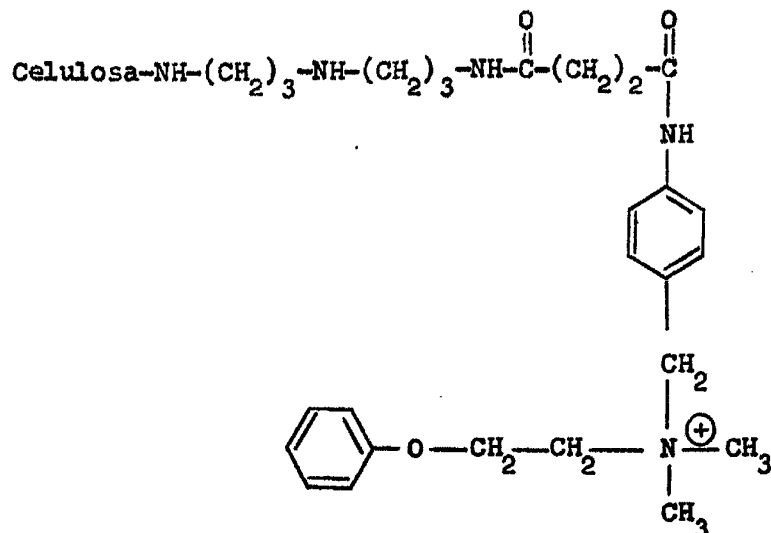
EJEMPLO 8

Los derivados de productos mercuriales orgánicos, tal como nitrato fenilmercúrico, pueden enlazarse covalentemente a celulosa del siguiente modo:



EJEMPLO 9

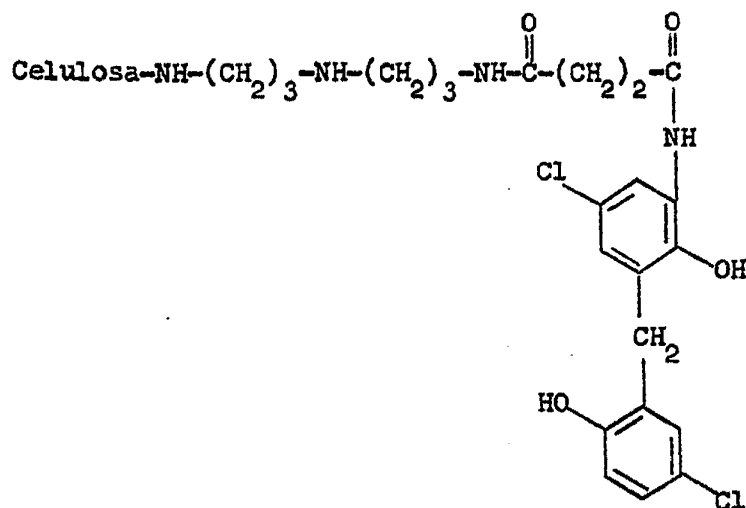
Los derivados de bfenio pueden unirse a celulosa del siguiente modo:



10

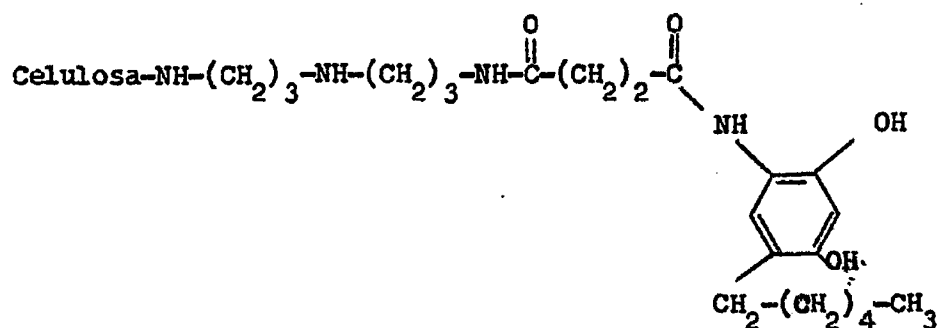
EJEMPLO 10

Los derivados de diclorofeno pueden unirse a celulosa como se indica a continuación:



EJEMPLO 11

Los derivados de hexilresorcinol se pueden unir a celulosa a través de enlaces amida, como sigue:



5

Como ya se ha mencionado, las reacciones químicas para enlazar los compuestos antimicrobiales a los materiales soporte, son muchas. Una breve descripción de mecanismos de reacción ilustrativos se establece a continuación en los párrafos A a H.

10

A. Derivados de agarosa activada con bromuro de cianógeno

La activación de agarosa con bromuro de cianógeno se efectúa por tratamiento de la agarosa con bromuro de cianógeno finamente dividido, en exceso, a un pH altamente alcalino y a temperaturas no superiores a 20°C. La ulterior derivación

se efectúa por reacción de la agarosa activada con un producto farmacéutico adecuado en un tampón o disolvente orgánico adecuado durante varias horas, a temperatura ambiente o inferior. De este modo, la reacción con aminas proporciona iminocarbonatos cíclicos sustituidos en el nitrógeno y/o uretanos o carbamatos, pero principalmente la isourea N-sustituída. En esta reacción se pueden emplear también otros nucleófilos, tales como fenoles.

Puesto que los derivados de ligandos monovalentes de isourea N-sustituída no son totalmente estables, la presente invención intenta preparar derivados de agarosa polivalentes y estables. Por ejemplo, se acopla agarosa activada con bromuro de cianógeno a poli-D-lisina, albúmina de suero bobino u otras grandes moléculas que contienen grupos poliamino. El espaciador polivalente se derivará entonces adicionalmente por procedimientos convencionales, de modo que el espaciador pueda enlazarse a su vez al producto farmacéutico activo mediante enlaces covalentes estables (péptidos, éteres, etc.). El empleo de poli-D-lisina como espaciador resulta particularmente adecuado, puesto que es resistente a la proteólisis.

B. Derivación de agarosa activada con ácido cianúrico

Se han activado varios soportes, por ejemplo agarosa, para su ulterior acoplamiento por reacción con 2-amino-4,6-dicloro-s-triazina. La reacción del soporte activado con reactivos nucleófilos, incluyendo aminas, tioles y alcoholes, proporciona la triazina asimétrica. La derivación final tiene lugar en tampones ligeramente básicos a temperatura ambiente, durante varias horas.

C. Formación de enlaces amida

Los ácidos carboxílicos se pueden convertir a reactivos acilantes altamente reactivos por tratamiento con ciertos

reactantes. Los ésteres activos resultantes, que en términos generales pueden ser de dos tipos, aquellos generados in situ para la ulterior reacción inmediata y aquellos que son suficientemente estables para su aislamiento y caracterización.

5 1. Esteres activos generados in situ . El método de generar in situ agentes acilantes consiste en el tratamiento del ácido carboxílico con una carbodiimida adecuada, determinándose la elección de la carbodiimida por el disolvente de la reacción. Normalmente, el ácido carboxílico se disuelve en un disolvente
10 adecuado ajustándose el pH a 4,5-6. El tratamiento de la solución con el reactivo carbodiimida forma el agente acilante activo que reacciona adicionalmente con aminas primarias para dar las amidas. Los tiempos de reacción típicos son de 8 a 16 horas a temperatura ambiente. Por otra parte, se pueden utilizar etoxi-
15 acetileno como reactivo activante.

2. Esteres activados estables o aislables.

Los ácidos carboxílicos o sus derivados activos se pueden utilizar para acilar p-nitrofenol o N-hidroxisuccinimida, para dar los correspondientes ésteres. Estos materiales
20 son muy activos como agentes acilantes. Si bien el procedimiento típico recurre a la activación del ácido carboxílico mediante un reactivo carbodiimida, parece ser que la utilidad de estos ésteres activos reside en su alta estabilidad lo cual permite su aislamiento y purificación antes de acoplarse a un soporte.

25 3. Empleo de anhídridos mixtos como reactivos acilantes

Los ácidos carboxílicos pueden ser acilados con respecto a la acilación, mediante formación de un anhídrido mixto con un derivado de ácido carboxílico o ácido carbónico adecuado. Reactivos peculiares incluyen los anhídridos de iso-
30 valerilo o trimetilacetilo que se forman normalmente en disolven-

tes orgánicos por tratamiento del ácido carboxílico con el haluro de ácido adecuado en presencia de la cantidad calculada de una amina terciaria. La formación del anhídrido mixto es rápida incluso a bajas temperaturas, es decir -10°C , y los derivados se pueden hacer reaccionar con el nucleófilo adecuado en un espacio de tiempo muy corto. Los anhídridos no se aíslan normalmente antes de su ulterior reacción.

Un segundo tipo de anhídrido mixto es el anhídrido carbónico-carboxílico, de los cuales el más popular resulta ser el carbonato de isobutilo. Estos reactivos se forman por reacción con cloroformato de isobutilo y ácido carboxílico en la forma anteriormente descrita. Las ventajas de los anhídridos carbónicos-carboxílicos mixtos, en relación a los anhídridos carboxílicos mixtos, reside en que en el primer caso los subproductos son alcoholes altamente volátiles y dióxido de carbono.

D. Formación de ésteres carboxílicos

La formación de ésteres carboxílicos se puede efectuar a través de la acilación de un alcohol adecuado mediante una de las formas activadas de un ácido carboxílico anteriormente descritas.

E. Acilación sobre carbono

Los ésteres activos descritos en el párrafo C.2 anterior, relativo a ésteres activados estables o aislables, resultan adecuados como electrófilos para la reacción con centros de carbonos nucleofílicos, por ejemplo, enoles y ciertos sistemas areno ricos en electrones. Pueden considerarse tres casos como a continuación se describe.

1. Nucleófilos enolato. Los materiales que contienen hidrógenos activos se pueden convertir, reversible o irreversiblemente, a sus aniones enolato por tratamiento con agentes adecuados.

5 En el caso de la formación irreversible del enolato, el componente de hidrógeno activo del sistema se refluirá, por ejemplo, con sodio metálico o hidruro potásico con el fin de obtener los derivados metalados. El disolvente de elección para esta reacción será uno de los éteres, por ejemplo, tetrahidrofurano o diglima. Puede decirse que la acilación de las especies metálicas procederá rápidamente a temperatura ambiente bajo estas condiciones.

10 Alternativamente, el enolato puede generarse reversiblemente por tratamiento con reactivos tales como alcóxidos de sodio en un alcohol adecuado. Debe observarse en este caso, sin embargo, que el reactivo mismo debe ser no nucleófilo y por lo tanto la elección de los disolventes está restringida hacia aquellos que están altamente impedidos. En este procedimiento, el alcóxido, el material que ha de ser acilado y el
15 reactivo acilante se refluyen entre sí hasta que la desaparición del reactivo acilante indica el término de la reacción.

2. Nucleófilos enólicos. La acilación de compuestos enolizables se puede realizar por tratamiento de una mezcla del agente
20 acilante y del compuesto de hidrógeno activo con un catalizador adecuado, por ejemplo, trifluoruro de boro o eterato de trifluoruro de boro, a temperaturas próximas a 0°C. El método resulta mejor adecuado para la preparación de β -dicetonas.

3. Nucleófilos aromáticos. Los sistemas aromáticos se pueden
25 acilar en reacciones catalizadas por ácidos de Lewis, por ejemplo tricloruro de aluminio, trifluoruro de boro o cloruro estánnico o de zinc, bajo condiciones anhidras. Agentes acilantes adecuados incluyen los anhídridos simples y los cloruros de ácido.

30 F. Alquilación de nucleófilos carbonados

5 1. Los enolatos descritos en el párrafo E.1 anterior son nucleófilos adecuados para el desplazamiento de anión haluro o sulfonato a partir de grupos alquilo primarios o secundarios. Las reacciones tienen lugar normalmente en éter o alcohol como disolvente, en función de la base utilizada en la generación del enolato. Igualmente, se pueden emplear óxidos como componente electrofílico, dando lugar a la alquilación a alcoholes secundarios o terciarios. Con aldehidos o cetonas como electrofílicos, los productos de reacción pueden ser compuestos carbonilo β -hidroxi o α, β -insaturados (condensación aldólica).

10 2. La alquilación de nucleófilos aromáticos (alquilación de Friedel-Crafts) se presenta por reacción de haluros y sulfonatos de alquilo con arenos en presencia de catalizadores de ácido de Lewis, normalmente tricloruro de aluminio. El empleo de sistemas aromáticos reactivos está indicado para mitigar las condiciones de reacción frecuentemente vigorosas.

15 Una reacción relacionada es la "hidroxialquilación" de aldehidos y cetonas. Esta reacción con fenoles es especialmente útil, dando lugar al metileno difenilado en reacción con aldehidos en medios alcalinos.

20 G. Alquilación de nucleófilos oxigenados

25 La reacción de alcóxidos de alquilo o arilo con electrofílicos adecuados da lugar a éteres en un buen rendimiento. Los sustratos para la reacción incluyen haluros, sulfonatos, sulfatos y epóxidos de alquilo. La reacción proporciona los mejores rendimientos y menos reacciones secundarias en el caso de que la alquilación comprenda el desplazamiento de centros carbonados primarios de alcóxidos de alcoholes primarios o secundarios. Bajo condiciones forzantes, los alcoholes reacciona-

30

rán con sales de arildiazonio para dar éteres arílicos.

H. Alquilación de aminas

5 1. Las aminas se pueden reaccionar con haluros, sulfatos o sulfonatos de alquilo para proporcionar la amina alquilada. La reacción se puede controlar solamente con dificultad y resulta común la adición de más de un grupo alquilo al nitrógeno; de este modo, el método es de un empleo particular para la preparación de aminas terciarias.

10 La reacción de aminas con epóxidos para proporcionar el amino-alcohol es la reacción general, pero resulta de más éxito con epóxidos que tienen un centro primario para el ataque. Bajo condiciones forzantes, las aminas reaccionarán con sales de arildiazonio para dar arilaminas.

15 2. Alquilación reductiva. Las aminas primarias reaccionan con aldehidos y cetonas en solución alcohólica para dar la base de Schiff (imina). Estos intermediarios se pueden reducir, sin aislamiento, por diversos reactivos, incluyendo borohidruro sódico, ácido fórmico, zinc y ácido clorhídrico, y por reducción catalítica sobre níquel Raney.

20 Debe observarse que la alquilación reductiva de otras funciones nitrogenadas resulta posible, en el caso de que el grupo funcional sea inestable a la reducción por un reactivo anteriormente indicado, por ejemplo grupos nitro, nitroso o azo.

25 3. Formación de bases de Mannich. Las aminas alifáticas reaccionan con compuestos que contienen hidrógenos activos, incluyendo aldehidos, cetonas, ácidos carboxílicos y ésteres, nitrilos, nitrocompuestos y ciertos fenoles y compuestos bencílicos, en presencia de formaldehido o de otros aldehidos de bajo peso
30 molecular, para dar bases de Mannich, es decir los compuestos de

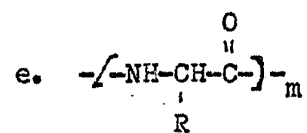
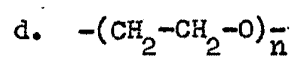
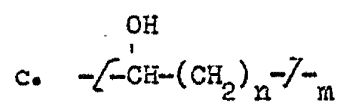
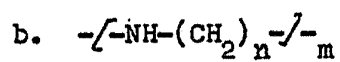
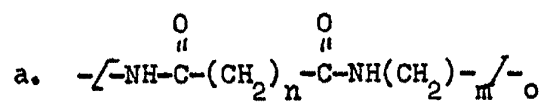
hidrógeno activo, que han sido aminometilados en el punto del hidrógeno activo. La reacción tiene lugar normalmente en solución acuosa o alcohólica en reflujo y puede ser catalizada con ácidos o bases.

5 I. Alquilación de nucleófilos sulfurados

Los mercaptanes o mercaptidas alcalinas reaccionan bien con haluros o sulfonatos de alquilo, sales de arildiazonio y epóxidos para dar el sulfuro (tioéter). Las condiciones para la reacción son bastante similares a las empleadas para la formación de éteres (véase párrafo G anterior) o aminas (véase párrafo H.1. anterior) a partir de estos electrófilos.

10 El enlace covalente entre el soporte y el producto medicinal se forma por reacción del grupo funcional del componente 1 (componente activado; electrófilo) con el grupo funcional del componente 2 (nucleófilo). El producto medicinal o el soporte puede ser cualquiera de los componentes. En cada caso, los grupos funcionales clave de los dos componentes implicados en la formación del enlace y la estructura del enlace final, se indican e identifican en la Tabla IV. Como norma general, se prefieren los enlaces amida, éter y amina en términos de la estabilidad en diversos ambientes operativos.

15 En ciertos casos, y como anteriormente se ha indicado, puede ser preferible interponer un brazo molecular entre el material soporte y el producto medicinal. El brazo puede ser cualquiera de los componentes 1 ó 2. Por lo tanto, y después de la reacción, el brazo se localiza entre el soporte y el material biológicamente activo. Los brazos, que se ejemplifican a continuación, pueden formarse por las mismas reacciones utilizadas para unir el soporte y el producto medicinal:



en donde m, n, y o son al menos 1.

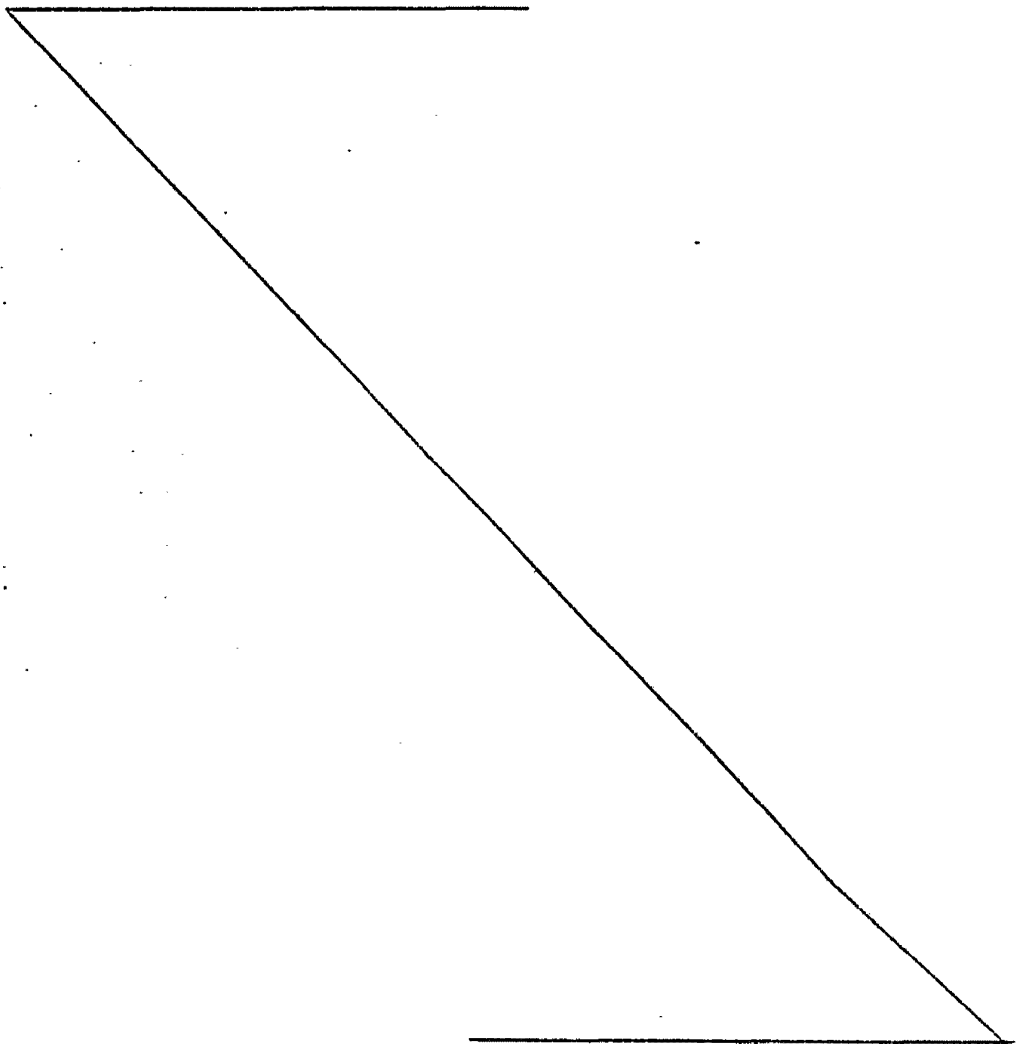


TABLA IV

COMPONENTE 1 (COMPONENTE ACTIVADO: ELECTROFILO)	ESTRUCTURA DEL ENLACE Y NOMBRE	COMPONENTE 2 (NUCLEOFILO)
<u>Polisacáridos activados con bromuro de cianógeno</u>	$\textcircled{1} - \text{O} - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \overset{\text{R}}{\text{N}} - \textcircled{2}$ Uretano o carbamato	$\text{HN} - \textcircled{2}$ R
	$\textcircled{1} \begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \\ \text{C} = \text{N} - \textcircled{2} \\ \diagdown \\ \text{O} \end{array}$	$\text{HN} - \textcircled{2}$ R
$\textcircled{1} - \text{O} - \text{C} \text{N}$ y	$\textcircled{1} - \text{O} - \overset{\text{N-H}}{\parallel} \text{C} - \overset{\text{R}}{\text{N}} - \textcircled{2}$ Isourea	$\text{HN} - \textcircled{2}$ R
$\textcircled{1} \begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \\ \text{C} = \text{NH} \\ \diagdown \\ \text{O} \end{array}$	$\textcircled{1} - \text{O} - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{O} - \textcircled{2}$ Carbonato	$\text{HO} - \textcircled{2}$
	$\textcircled{1} - \text{O} - \overset{\text{NH}}{\parallel} \text{C} - \text{O} - \textcircled{2}$ Iminocarbonato	$\text{HO} - \textcircled{2}$
<u>Soportes activados con ácido cianúrico</u>	$\textcircled{1} \left[\begin{array}{c} \text{O} \\ \text{N} \\ \text{N} \\ \text{N} \end{array} \right] \begin{array}{c} \text{R} \\ \text{Cl} \end{array}$ $\textcircled{1} \text{NR} \begin{array}{c} \text{N} \\ \text{N} \\ \text{N} \end{array} \begin{array}{c} \text{R} \\ \text{Cl} \end{array}$ $\textcircled{1} \text{S} \begin{array}{c} \text{N} \\ \text{N} \\ \text{N} \end{array} \begin{array}{c} \text{R} \\ \text{Cl} \end{array}$ Triazinas	$\text{HO} - \textcircled{2}$ $\text{HN} - \textcircled{2}$ R $\text{HS} - \textcircled{2}$

TABLA IV (Continuación)

COMPONENTE 1 (COMPONENTE ACTIVADO: ELECTROFILO)	ESTRUCTURA DEL ENLACE Y NOMBRE	COMPONENTE 2 (NUCLEOFILO)
<u>Esteres/anhidridos activos</u>		
$\textcircled{1} - \text{CO} - \text{O} - \text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{CO} \\ \diagdown \text{CO} \end{array}$	$\textcircled{1} - \text{CO} - \overset{\text{R}}{\text{N}} - \textcircled{2}$ Amida	$\text{HN} - \textcircled{2}$ R
$\textcircled{1} - \text{CO} - \text{N}_3$		
$\textcircled{1} - \text{CO} - \text{O} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NO}_2$	$\textcircled{1} - \text{CO} - \text{O} - \textcircled{2}$ Ester	$\text{HO} - \textcircled{2}$
$\textcircled{1} - \text{CO} - \text{O} \begin{array}{l} \diagup \text{N-R} \\ \diagdown \text{NH-R} \end{array}$		
$\textcircled{1} - \text{CO} - \text{O} - \text{CO} - \text{R}$	$\textcircled{1} - \text{CO} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} - \text{CO} - \textcircled{2}$ enlace acilo (cetona)	$\text{HO} - \textcircled{2}$
$\textcircled{1} - \text{CO} - \text{O} - \text{CO}_2\text{R}$		
$\textcircled{1} - \text{CO} - \text{O} - \text{C}(\text{OR}') = \text{CR}_2$	$\textcircled{1} - \text{CO} - \text{[Ar]}^* - \textcircled{2}$ enlace acilo (cetona)	$\text{[Ar]}^* - \textcircled{2}$
<u>Epóxido</u>		
$\textcircled{1} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}$	$\textcircled{1} - \text{C}(\text{OH}) - \text{NR} - \textcircled{2}$ Amina	$\text{HN} - \textcircled{2}$ R
* [Ar] —representa un areno activo, por ejemplo, fenol, anilina.		
	$\textcircled{1} - \text{C}(\text{OH}) - \text{O} - \textcircled{2}$ éter	$\text{HO} - \textcircled{2}$
	$\textcircled{1} - \text{C}(\text{OH}) - \text{S} - \textcircled{2}$ sulfuro	$\text{HS} - \textcircled{2}$

TABLA IV (Continuación)

COMPONENTE 1 (COMPONENTE ACTIVADO: ELECTROFILO)	ESTRUCTURA DEL ENLACE Y NOMBRE	COMPONENTE 2 (NUCLEOFILO)
	<p>enlace alquilo</p>	
<u>Aldehido/cetona</u>		
<p>δ</p>	<p>Aldol</p>	
	<p>Aldol deshidratado</p>	
	<p>enlace alquilo</p>	
	<p>enlace alquilo</p>	
	<p>enlace alquilo</p>	

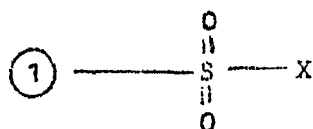
TABLA IV (Continuación)

COMPONENTE 1 (COMPONENTE ACTIVADO: ELECTROFILO)	ESTRUCTURA DEL ENLACE Y NOMBRE	COMPONENTE 2 (NUCLEOFILO)	
$\textcircled{1} \text{---} \text{C} \begin{matrix} \text{=O} \\ \text{R} \end{matrix}$ <p>+BH₄</p>	$\textcircled{1} \text{---} \overset{\text{H}}{\text{C}} \text{---} \text{NR} \text{---} \textcircled{2}$ <p>Amina (Aminación reductiva)</p>	$\text{HN} \text{---} \textcircled{2}$ <p>R</p>	
$\textcircled{1} \text{---} \text{NH} + \text{CHO}$ <p>R</p>	$\textcircled{1} \text{---} \text{NR} \text{---} \overset{\text{H}}{\text{C}} \text{---} \overset{\text{R}'}{\text{C}} \text{---} \text{CO} \text{---} \textcircled{2}$ <p>Base de Mannich</p>	$\text{HO} \text{---} \textcircled{2}$	
$\textcircled{1} \text{---} \overset{\text{R}'}{\text{N}^+} = \text{CHR}'$ <p>R</p>		$\textcircled{1} \text{---} \text{NR} \text{---} \overset{\text{R}'}{\text{C}} \text{---} \text{[Ar]} \text{---} \textcircled{2}$ <p>Base de Mannich</p>	$\text{[Ar]} \text{---} \textcircled{2}$
<p><u>Haluro/sulfonato</u></p>			
$\textcircled{1} \text{---} \overset{\text{R}}{\text{C}} \text{---} \text{X}$ <p>R</p>	$\textcircled{1} \text{---} \text{CR}_2 \text{---} \text{O} \text{---} \textcircled{2}$ <p>Eter</p>	$\text{HO} \text{---} \textcircled{2}$	
		$\textcircled{1} \text{---} \text{CR}_2 \text{---} \text{S} \text{---} \textcircled{2}$ <p>Sulfuro</p>	$\text{HS} \text{---} \textcircled{2}$
		$\textcircled{1} \text{---} \text{CR}_2 \text{---} \text{NR} \text{---} \textcircled{2}$ <p>Amina</p>	$\text{HN} \text{---} \textcircled{2}$ <p>R</p>
		$\textcircled{1} \text{---} \text{CR}_2 \text{---} \overset{\text{H}}{\text{C}} \text{---} \text{CO} \text{---} \textcircled{2}$ <p>Enlace alquilo</p>	$\text{HO} \text{---} \textcircled{2}$
		$\textcircled{1} \text{---} \text{CR}_2 \text{---} \text{[Ar]} \text{---} \textcircled{2}$ <p>Enlace alquilo</p>	$\text{[Ar]} \text{---} \textcircled{2}$
<p>en donde: X = Cl, Br, I, O = SO₂R</p>			

TABLA IV (Continuación)

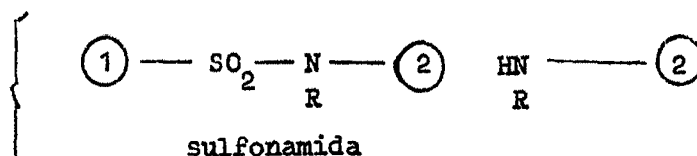
COMPONENTE 1 (COMPONENTE ACTIVADO: ELECTROFILO)	ESTRUCTURA DEL ENLACE Y NOMBRE	COMPONENTE 2 (NUCLEOFILO)
--	-----------------------------------	------------------------------

Haluros de sulfonilo

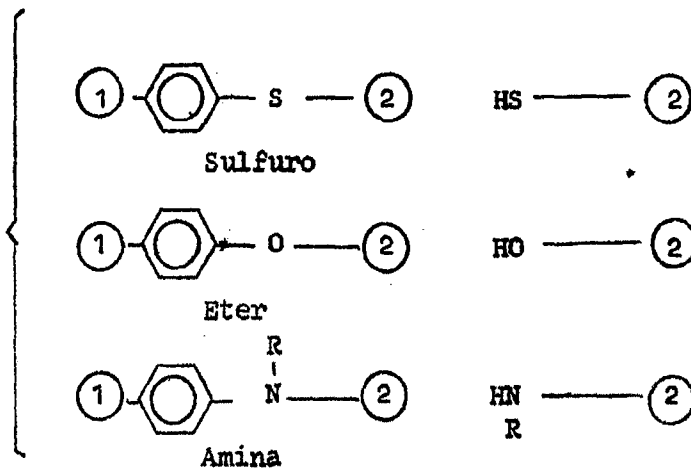
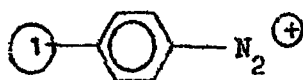


en donde:

X = Cl, Br



Sal de diazonio



Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.

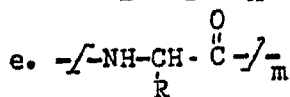
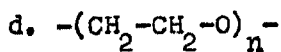
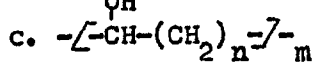
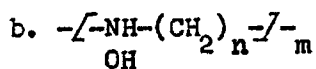
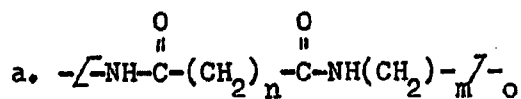
REIVINDICACIONES

5 1.- Procedimiento para producir una composición antimicrobialmente activa, que no puede pasar a través de la piel, membranas mucosas o heridas de la piel a la circulación sistémica, caracterizado porque comprende hacer reaccionar a través de sustitución nucleofílica, un principio antimicrobial farmacéuticamente activo elegido del grupo consistente en diaminas alifáticas, polimixinas, bacitracina, penicilinas, de rivados de penicilina, cefalosporinas, aminofenoles, fenoles
10 sustituidos, antibióticos poliénicos, productos mercuriales orgánicos, antibióticos de vancomicina, bifenio, diclorofeno y hexilresorcinol; con un material soporte elegido del grupo consistente en polisacáridos naturales, polisacáridos modificados, polipéptidos naturales, polipéptidos sintéticos, vidrio, vidrio
15 que tiene grupos funcionales activos unidos al mismo, y polímeros sintéticos; para formar un enlace covalente entre el principio farmacéuticamente activo y el material soporte, cuyo enlace es estable en todos los ambientes de utilización proyectados.

20 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el enlace covalente formado por dicha reacción se elige del grupo consistente en enlaces amida, carbonato, carbamato, iminocarbonato, isourea, triazina, acilo, alquilo, base de Mannich, sulfuro, sulfonamida, éster, amina y éter.

25 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se interpone un brazo molecular entre dicho principio antimicrobial activo y dicho soporte.

30 4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque dicho brazo molecular se elige del grupo consistente en:



5

y sus combinaciones, en donde n, m y o son al menos 1.

5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el diámetro de dichas moléculas soporte es superior a 50 micras aproximadamente.

10

6.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dichas moléculas soporte son colágeno o polisacáridos seleccionados del grupo consistente en celulosa, dextranos, agarosa, almidón, inulina, xilanos, mananos, glucomannanos, galactanos, arabinogalactanos, goma arábiga, gomas de plantas y formas derivadas y modificadas por oxidación con peróxido de cualquiera de los anteriores.

15

7.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dichas moléculas soporte son polímeros elegidos del grupo consistente en poliacrilamidas, poliacrilatos, poliestirenos con grupos funcionales unidos, alcohol polivinílico, copolímero de polietileno-anhidrido maléico, polivinilpirrolidona y polímeros de condensación, tales como poliésteres y poliamidas.

20

25

8.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho principio antimicrobial activo se elige entre compuestos antimicrobiales que tienen moléculas suficientemente pequeñas para permitir su paso a través de la piel,

membranas mucosas o heridas de la piel y que causan efectos tóxicos secundarios cuando se distribuyen dentro de la circulación sistémica.

5 9.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho principio activo antimicrobial es un compuesto que actúa sobre o en las paredes celulares o membranas del organismo contra el cual se dirige su actividad.

10 10.- Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque dicho principio antimicrobial se elige del grupo consistente en polimixinas, bacitracina y antibióticos poliénicos.

11.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dichas moléculas soporte son polisacáridos naturales elegidos entre dextrano y celulosa.

15 12.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dichas moléculas soporte se eligen entre polisacáridos y dicho enlace covalente entre el principio antimicrobial y el soporte se elige del grupo consistente en enlaces amida, amina y éter.

20 13.- Procedimiento para producir una composición antimicrobialmente activa, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 56 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

67 MAY 1978

PHARMACO, INC

