

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102009901755268A1

Publication Date

20110130

Applicant

FRANZONI FILATI S.P.A.

Title

AMINOGLICOSIDI ED AMINOGLICOSIDI PREGELATINIZZATI CONIUGATI
COVALENTEMENTE AL COTONE

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:

AMINOGLICOSIDI ED AMINOGLICOSIDI PREGELATINIZZATI CONIUGATI
COVALENTEMENTE AL COTONE

DESCRIZIONE

La presente invenzione si riferisce a fibre, filati o tessuti di cotone sulla cui superficie sono coniugati covalentemente aminoglicosidi, eventualmente pregelatinizzati, per l'impiego nella medicazione di lesioni cutanee.

Le lesioni cutanee sono alterazioni della parte esterna del corpo umano o animale, e possono essere di diversi tipo. Un primo tipo sono le ferite, termine con cui generalmente si intendono lacerazioni della cute causate da fattori esterni, come eventi traumatici o interventi chirurgici. Anche le ustioni, pur non comportando necessariamente lacerazioni cutanee, sono dovute ad eventi esterni. Viceversa, le lesioni croniche o cronicizzate sono conseguenti ad alterazioni della funzionalità della cute o di parti interne del corpo; queste comprendono, per esempio, piaghe da stasi o da decubito, ulcere, ulcere diabetiche, flebiti, varicoflebiti e trombosi periferiche. Nel presente testo, con la definizione "lesioni cutanee" si intenderanno tutte le tipologie di alterazione sopra citate.

Le possibili patologie e i meccanismi di riparazione collegati a queste alterazioni variano a seconda del tipo di lesione.

Le ferite sono caratterizzate da processi immunodifensivi, coagulativi e riparativi con funzionalità normale, da periodi relativamente brevi di remissione del danno, e da un rischio medio-alto di contaminazione microbica. Le lesioni croniche e le ustioni sono caratterizzate, in genere, da scarsa ossigenazione della parte lesa, da problemi circolatori e vascolari, da presenza di necrosi tissutale e depositi fibrotico-cheratinocitici e, nelle ulcere diabetiche, da dismetabolismo riparativo, alterazioni del tessuto nervoso periferico e da un elevatissimo rischio di infezioni complicato dalla possibilità di generarsi di sacche anaerobiotiche. Nel trattamento delle patologie collegate alla presenza di lesioni cutanee è necessario tener conto dei problemi sopra citati, e quindi i mezzi di cura devono essere in grado di svolgere varie funzioni, tra cui, fornire un'adeguata barriera di protezione contro le infezioni, consentire una corretta ossigenazione dei tessuti interessati, e

supportare la medicazione con mezzi terapeutici idonei ed efficaci (normocoagulanti, oppure elementi che favoriscono la rivascolarizzazione della zona trattata, noti nel settore medico come neoangiogenetici, ecc.).

Alcuni mezzi noti di trattamento di ferite danno luogo ad inconvenienti, o possono addirittura risultare controproducenti.

Per esempio, l'uso di gel e pomate è da considerare un "palliativo", poiché lo strato lipidico tipico di queste forme farmaceutiche, oltre a ridurre significativamente l'ossigenazione del sito, può contribuire alla formazione di sacche di anaerobiosi con rischio di gravi infezioni.

L'uso topico di farmaci antibiotici, fatto per prevenire le infezioni, è in grado di ridurre la funzionalità del sistema reticoloendoteliale subcutaneo, con compromissione delle capacità immunodifensive.

L'uso di antinfiammatori in particolare steroidei, fatto anche per lenire il dolore in fase di medicazione, contrasta il processo riparativo (ridotta neoangiogenesi).

L'uso frequente di antisettici, per i loro effetti citotossici, potenzia il processo di necrotizzazione ed antagonizza l'attività macrofagica.

Ampiamente usati nel trattamento delle lesioni cutanee sono anche mezzi di protezione, come garze, compresse, bende o cerotti, realizzati con cotone nativo e succedanei o similari eventualmente previamente sterilizzati, che hanno lo scopo principale di proteggere meccanicamente la zona della lesione e di costituire una barriera protettiva contro le infezioni.

Anche questi mezzi non sono esenti da possibili problemi.

In primo luogo, possono costituire un ricettacolo di microrganismi facilmente trasferibili alla lesione attraverso l'essudato ed il sangue non perfettamente coagulato presenti; addirittura, è stato osservato sperimentalmente (tramite la loro esposizione in siti contaminati, dopo applicazione su piastre di agar coltura) che questi mezzi possono funzionare da veri e propri promotori della crescita dei microrganismi.

Ciò comporta la necessità di un frequente ricambio che, a causa della capacità di funzionare come substrati per l'adesione cellulare, ne fa un mezzo in grado di favorire la deposizione di tessuto necrotico. Sempre in conseguenza del loro frequente ricambio, con contemporanea rimozione delle cellule in riparazione, si

ha una iperproduzione di essudato con conseguente riduzione della tensione transcutanea di ossigeno (P_{tcO_2}) ed ulteriore rallentamento dei biomeccanismi riparativi, anche se farmacologicamente promossi.

Le conseguenze ultime di questi processi sono un incremento di fenomeni di necrotizzazione e/o alterazione delle immunodifese (dovuto all'uso frequente di antisettici o antibiotici necessari per la disinfezione), una incrementata produzione di essudato, e una ridotta neoangiogenesi.

In definitiva si può affermare che la frequenza dei ricambi nelle medicazioni, in buona parte imputabile alle caratteristiche dei mezzi di protezione, anche se presterilizzati, non solo è alla base di un notevole disagio per il paziente ma è anche responsabile di un vero e proprio allungamento dei tempi di guarigione.

Per superare questi problemi, sono stati proposte protezioni "medicate", cioè realizzati con bende, garze, compresse e simili, la cui superficie è funzionalizzata con molecole dotate di attività farmacologica.

La domanda di brevetto EP 611573 A2, ad esempio, descrive la funzionalizzazione di polimeri contenenti numerosi gruppi idrossilici liberi, del tipo cellulosa, agarosio o polivinilalcol, con proteine in genere rappresentate da enzimi proteolitici, del tipo tripsina, chimotripsina, lisozima, collagenasi, albumina e ialuronidasi, impiegati per rimuovere il materiale purulento e necrotico (chimotripsina), ridurre la presenza di patogeni (lisozima), e decomporre il collagene prevenendo una cicatrizzazione irregolare (collagenasi). I polimeri, tra cui preferita è la cellulosa, possono essere in forma di polvere ma anche di tessuto adatto per l'uso come bendaggio o altro per la protezione delle lesioni; la funzionalizzazione avviene previo trattamento con composti N-eterociclici, allo scopo di distanziare tra loro le catene polimeriche e facilitare la reazione tra i gruppi amminici della proteina e i gruppi funzionali sulla superficie di dette catene.

La coniugazione tra polisaccaridi ed enzimi proteolitici è descritta anche nella domanda di brevetto CA 1217134 A1. Secondo gli insegnamenti di questo documento vengono funzionalizzate con l'enzima derivati dialdeidici di destrano o cellulosa, in forma di sferule di dimensioni inferiori a mezzo millimetro, allo scopo di mettere in contatto l'enzima con la lesione e i fluidi presenti su di essa, inibendone però la penetrazione a livello circolatorio in modo da evitare gli effetti

collaterali derivanti dalle caratteristiche antigeniche e pirogene di questi enzimi; con questo metodo inoltre si aumenta la stabilità degli enzimi in presenza di liquidi. Tra le sostanze in grado di fornire substrato al processo neoangiogenetico sono note le proteine e/o i loro frammenti peptidici (si veda per esempio l'articolo di M. D. Caldwell et al., *Progr. in Clin. and Biol. Res.*, 1991, 365, 205).

Un metodo per funzionalizzare polimeri di tipo cellulosico con proteine è di trasformare parte degli idrossili del polimero in gruppi aldeidici, e poi sfruttare la reazione di condensazione tra i gruppi amminici della proteina e i gruppi carbonilici sul polimero, con formazione di gruppi imminici (anche noti come basi di Schiff).

La funzionalizzazione di polimeri polialdeidici con proteine viene però descritta come (generalmente) incompleta da S. Margel et al. (*J. Polym. Sci. Chem.*, 1984, Ed. 22th, 145) secondo il quale, approssimativamente, solo una frazione tra lo 0,5% e il 10% dei gruppi aldeidici liberi partecipano alla reazione. I gruppi aldeidici residui possono reagire intramolecolarmente con i gruppi amminici della proteina legata, riducendone significativamente l'attività, come descritto nell'articolo "Affinity separation with polyaldehyde microsphere beads", S. Margel, *J. of Chromatography* (1989) 462, pagine 177-189.

Un possibile modo per bloccare i gruppi aldeidici residui e stabilizzare nel contempo le suddette immine è tramite trattamento riduttivo. I polimeri ridotti presentano però una significativa riduzione della resistenza meccanica, una più alta solubilità in acqua e, frequentemente, una significativa riduzione dell'attività della proteina dovuta, probabilmente, alla riduzione di legami, quali quello disolfidico, necessari per l'attività nativa della proteina (L. Peng e coll., *Appl. Biochem. Bio techn.*, 1987, 14, 91).

Un'altra possibile via di incorporazione di peptidi bioattivi in polimeri (nel caso specifico, fibre di cotone) per conferire ai tessuti biomedicali proprietà riparative ed antimicrobiche è descritto nell'articolo "Synthesis and formulation of covalently and ionically bound peptido-cellulose conjugates", J. V. Edwards, *Bioconjugate Chem.*, 2000, 17, 469. Il metodo prevede la pre-esterificazione della cellulosa con glicina o, alternativamente, lisina, istidina ed arginina, come elemento di collegamento (linker) tra la cellulosa e un enzima. Data la labilità del legame estereo tra il linker e la cellulosa, l'enzima viene però facilmente rilasciato nel sito della lesione.

L'impiego di basi di Schiff ridotte per la coniugazione di molecole bioattive alle fibre di cellulosa è descritto anche nell'articolo "Immobilization of hyaluronate on cellulose fibers and its use for the isolation of cartilage components", D.L. Kalpaxis et al., Int. J. Biochem. (1985) 17(1), 61-66. In questo caso, lo ialuronato viene fissato su un intermedio di cellulosa derivatizzata con acido epsilon-amino-caproico, via legame stabile (base di Schiff ridotta), ottenendo un legame amidico tra l'aminogruppo della proteina del proteoglicano ed il gruppo carbossilico dell'acido caproico con la tecnica della carbodiimide.

Infine, è nota la funzionalizzazione di polimeri (da impiegare poi per la produzione di bende, garze o simili) con antibiotici. Queste molecole sono in grado di interagire con la sintesi proteica del microrganismo e con la funzione della loro membrana cellulare, essendo quindi in grado di sviluppare la loro funzione microbica anche solamente grazie al contatto con il microrganismo (si veda il libro "The pharmacological basis of Therapeutics", Goodman & Gilman, 8th Ed., 1990, 1098 – 1116).

La domanda di brevetto internazionale WO 90/15628 A1 prende in considerazione il legame covalente, uretanico, estereo o amidico tra polimeri (preferito il polietilenglicol, PEG), ed antibiotici. Questi sono caratterizzati da un basso indice terapeutico e/o un tempo di emivita molto breve che ne precludono l'uso terapeutico. Il metodo di questo documento si basa sul fatto che un antibiotico con basso indice terapeutico (per esempio un antibiotico nefrotossico già a dosi terapeutiche come la polimixina e la amfotericina) può essere coniugato covalentemente ad un polimero consentendo di mantenere inalterata l'attività antimicrobica con riduzione della nefrotossicità ed incremento del tempo di emivita in circolo; la finalità è quindi quella di recuperare all'impiego terapeutico sistemico, orale e/o parenterale, degli antibiotici altrimenti non utilizzabili per le loro sfavorevoli proprietà.

Infine, un altro esempio di coniugazione di antibiotici a materiale tessile cellulosico è descritto nel brevetto US 900.803, che insegna la fissazione di neomicina ad un tessuto mediante impiego di brillantanti e/o fissativi di diversa natura. In questo caso la finalità è quella di fornire ai tessuti delle caratteristiche anti-odore; è infatti noto come alla base del cattivo odore durante la sudorazione contribuisca in

buona parte la presenza massiccia di flora microbica.

Sono quindi noti numerosi sistemi di fissazione/coniugazione di sostanze dotate di attività biologica/farmacologica ai polimeri cellulosici nelle varie forme merceologiche, anche per il trattamento di lesioni cutanee, ma in nessun caso la tecnica era mirata ad una lunga protezione contro il rischio di infezioni, eventualmente con effetto contemporaneo sullo sviluppo della neoangiogenesi e sulla emostatizzazione.

Scopo della presente invenzione è quello di fornire fibre, filati e tessuti a base di cellulosa funzionalizzati con antibiotici, che siano in grado di assicurare una protezione a lungo termine di lesioni cutanee da infezioni, senza la necessità di frequenti ricambi delle medicazioni, mantenendo nel contempo i necessari livelli di interscambio di ossigeno tra l'ambiente e la lesione e con un contemporaneo apporto di fattori neoangiogenetici; un altro scopo dell'invenzione è quello di fornire un processo per la produzione di detti fibre, filati e tessuti.

Questi scopi sono ottenuti con la presente invenzione che, in un suo primo aspetto, riguarda fibre, filati e tessuti di cotone funzionalizzati con antibiotici amminoglicosidici (indicati semplicemente come amminoglicosidi nel seguito).

La funzionalizzazione avviene tramite la formazione di legami covalenti tra le molecole di antibiotico e il cotone. Gli amminoglicosidi risultano particolarmente efficaci per gli scopi dell'invenzione perché, oltre ad avere una funzionalità amminica necessaria per la coniugazione con il cotone (come descritto nel seguito), presentano un ampio spettro di azione antimicrobico e una rapida azione battericida. Gli amminoglicosidi preferiti per gli scopi dell'invenzione sono gentamicina, kanamicina, tobramicina, amikacina e neomicina.

Gli inventori hanno osservato che fissando tramite legami covalenti amminoglicosidi al cotone (nelle sue varie forme merceologiche corrispondenti a fibra, filato, garze e tessuto non tessuto) è possibile ottenere dei coniugati stabili nel tempo senza alterare lo spettro e l'entità di azione degli antibiotici, idonei, quindi, per ottenere bendaggi di vario tipo ed altri articoli da medicazione utili per garantire un lungo periodo di protezione contro il rischio di infezioni.

La quantità di amminoglicosidi legata al cotone varia in funzione del tipo di amminoglicoside, in funzione della attività antibiotica di questo, e della forma

merceologica in cui il cotone è impiegato. Questa quantità è determinata, in seguito a prove orientative, in modo da avere prodotti finali contenenti in peso fino a 20 volte il valore di MIC (ovvero, la minima concentrazione di antibiotici in grado di uccidere la totalità di microrganismi patogeni) del dato antibiotico per i batteri sensibili all'antibiotico stesso; preferibilmente, i prodotti dell'invenzione contengono da 2 a 5 volte il valore di MIC. I motivi per cui nei prodotti dell'invenzione si fanno coniugare al cotone quantità di antibiotico sensibilmente superiori al valore di MIC sono che la resa della reazione di coniugazione non è mai del 100%, e quindi lavorare con quantitativi superiori garantisce di avere sul cotone quantitativi sufficienti di antibiotico; inoltre, gli amminoglicosidi non hanno la stessa efficacia nei confronti di tutto il pannello di patogeni sensibili all'antibiotico, e alcuni ceppi di questi, anche in conseguenza dei trattamenti clinici che vengono fatti su piaghe e ferite, possono assumere una resistenza parziale nei confronti degli antibiotici, cosa non prevedibile a priori: e quindi è meglio prevedere un eccesso di antibiotico, soprattutto in vista dei contatti prolungati con le parti da trattare a cui i prodotti dell'invenzione sono destinati.

Gli inventori hanno verificato sperimentalmente che quantità di amminoglicosidi utili per gli scopi dell'invenzione sono comprese tra circa 4 e 15 mg di antibiotico (preferibilmente tra 6 e 10 mg) per grammo di cotone in fibra o tessuto non tessuto, e tra circa 15 e 45 mg di antibiotico (preferibilmente tra 18 e 30 mg) per grammo di cotone in forma di garze o filato.

In una forma di realizzazione preferita, l'invenzione riguarda fibre, filati e tessuti di cotone funzionalizzati contemporaneamente con amminoglicosidi e con gelatine. Date le difficoltà analitiche nel determinare la quantità di gelatine che effettivamente si legano al cotone durante la reazione, non è possibile indicare la concentrazione di gelatine nel prodotto finale; gli inventori hanno comunque verificato che prodotti utili agli scopi dell'invenzione vengono prodotti facendo reagire quantità comprese tra 0,2 e 5 mg di gelatine, preferibilmente tra 0,5 e 1 mg di gelatine, per grammo di cotone in fibra, e tra tra 0,3 e 6 mg di gelatine, preferibilmente tra 0,7 e 1,2 mg di gelatine, per grammo di cotone in garza.

Tra le gelatine, preferibilmente vengono impiegate quelle del tipo ottenuto da pelle bovina o suina, o parti ossee di suini; le gelatine sono prodotti disponibili

commercialmente, venduti per esempio dalla società Sigma-Aldrich.

I prodotti dell'invenzione, in questa sua seconda forma di realizzazione, sono in grado sia di garantire un lungo periodo di protezione contro il rischio di infezioni, grazie alla presenza dell'antibiotico, sia di fornire il substrato peptidico ottimale per gli enzimi presenti nell'essudato della lesione, dando luogo così alla generazione degli oligopeptidi utili ad agevolare il processo di riparazione angiogenetica.

I prodotti ottenuti secondo una qualunque delle due forme di realizzazione sopra descritte possono essere impiegati per la realizzazione di bendaggi protettivi di lesioni cutanee, in forma di garze, cerotti, o tessuto non tessuto, che rappresentano la seconda barriera contro le infezioni e che sono destinati al diretto contatto con la lesione stessa; questi prodotti vengono realizzati con cotone reso idrofilo prima della funzionalizzazione.

Questi prodotti sono generalmente accoppiati, come noto, ad una barriera primaria, non destinata ad andare a contatto diretto con la lesione, che ha principalmente una funzione di protezione meccanica, in forma per esempio di bende orlate o bende elastiche, che possono essere formate da derivati del cotone di natura idrofoba. Anche queste barriere primarie possono essere funzionalizzate con antibiotici per aumentare l'effetto di protezione contro i batteri che potrebbero arrivare sulla zona della lesione dall'esterno; non è invece necessario in questo caso funzionalizzare anche con gelatine il cotone idrofobo della barriera primaria, in quanto questa non è destinata a venire a diretto contatto con la lesione.

La coniugazione covalente evita il rilascio e/o il dilavaggio dell'antibiotico a protezione della lesione, impedendo l'accumulo di flora microbica nel sito e, quindi, l'infezione per lunghi periodi di tempo. Ciò consente di ottenere l'effetto di una ridotta necessità di frequenti ricambi della medicazione, agevolando ed accelerando il processo riparativo.

In un suo secondo aspetto, l'invenzione riguarda il processo di funzionalizzazione del cotone l'antibiotico ed eventualmente la proteina, preferibilmente una gelatina.

Il fissaggio al polimero di antibiotico ed eventuale proteina avviene tramite un processo chimico che prevede le seguenti operazioni:

- sbiancatura ed eventuale idrofilizzazione del cotone in una delle forme

merceologiche di fibra, filato, cotone, garza o tessuto non tessuto;

- ossidazione del cotone preventivamente sbiancato ed eventualmente idrofilizzato, con trasformazione di gruppi ossidrilici presenti nella catena polimerica del cotone in gruppi carbonilici (aldeidici o chetonici);

- formazione di immine tra i gruppi amminici dell'antibiotico e dell'eventuale proteina e i gruppi carbonilici formati nell'operazione precedente;

- riduzione dell'immina formata nell'operazione precedente alla corrispondente ammina.

Nel caso si voglia realizzare il prodotto della seconda forma di realizzazione sopra definita, cioè un cotone funzionalizzato contemporaneamente con antibiotici e gelatine, la reazione di formazione di immine viene condotta semplicemente impiegando l'antibiotico previamente disciolto in una soluzione di gelatina.

Nella descrizione che segue, a meno che non sia diversamente specificato, le concentrazioni sono da intendere come peso/volume (p/v, cioè indicate in grammi di soluto per 100 cm³ di solvente) nel caso di soluti solidi o in gel, come gelatine, antibiotici, sodio metaperiodato, sodio boroidruro, litio alluminoidruro o simili; sono invece da intendere come volume/volume (v/v) quando il soluto è H₂O₂, soda caustica (NaOH), Solvipol, tamponi acetato e carbonato.

Tutte le reazioni del processo vengono condotte nei reattori tipici di tintoria, in cui i liquidi di reazione vengono alimentati sotto pressione alla camera del reattore tramite apposite pompe, ed estratti ad una pressione inferiore dal centro della camera tramite un'apertura di aspirazione; la differenza di pressione tra alimentazione alla camera ed estrazione dalla stessa si determina il grado di imbibizione del cotone e quindi il grado di reazione, come ben noto nel settore. Un vantaggio offerto dal processo dell'invenzione è che, operando nelle condizioni di seguito descritte, tutto il processo viene condotto in una sequenza continua di operazioni all'interno dello stesso reattore, con un notevole risparmio di tempo ed economico rispetto ad analoghi processi noti.

L'operazione preventiva di sbiancatura ed eventuale idrofilizzazione del cotone viene condotta secondo metodi ben noti, e che non richiedono una descrizione dettagliata in questa sede; questa operazione può essere condotta per esempio mettendo il cotone (nella forma merceologica prescelta) a reagire in presenza di

acqua ossigenata, soda caustica e un detergente; preferito è il detergente Solvapol ECL, commercializzato dalla società Lautex s.r.l. di Grassobbio (BG). La determinazione del risultato di questa operazione preventiva, di semplice sbiancatura da una parte, o di sbiancatura ed idrofilizzazione dall'altra, è ottenuta come ben noto nel settore tramite il controllo di parametri di processo quali la concentrazione della soda (più elevata nel caso si desideri ottenere l'idrofilizzazione), la temperatura di trattamento (per la idrofilizzazione si arriva all'ebollizione) ed i tempi di contatto con i reagenti (maggiori nel caso dell'idrofilizzazione).

La reazione di ossidazione del cotone viene condotta preferibilmente con acido periodico o un periodato (preferibilmente sodio metaperiodato), ad una temperatura generalmente compresa tra 40 e 60 °C, per tempi compresi tra circa 15 minuti e un'ora, con pressioni di alimentazione nel reattore delle fasi liquide comprese tra 3 e 5 bar. In questa reazione, al reattore si alimenta una soluzione di acido periodico o periodato tale che la concentrazione della specie attiva nella camera del reattore sia compresa tra circa 3 e 10 g/l.

La reazione di formazione dell'immina avviene generalmente ad una temperatura compresa tra circa 40 e 60 °C, preferibilmente di circa 50 °C; sotto pressione, a valori di pressione compresi tra circa 3 e 4 bar e preferibilmente di circa 3,5 bar; ad un pH compreso tra 8,0 e 9,0, preferibilmente di circa 8,5, ottenuto per aggiunta di un sistema tampone carbonato; e con tempi di reazione compresi tra un'ora e cinque ore.

L'antibiotico può essere impiegato in forma libera o in forma di un suo sale, per esempio il solfato nel caso della gentamicina.

La gelatina viene preferibilmente impiegata in forma di una sua soluzione acquosa di concentrazione compresa tra 0,5 e 3%, preferibilmente di circa l'1%; nel caso di impiego della soluzione di gelatina, l'antibiotico o il suo sale vengono sospesi o disciolti in detta soluzione.

La reazione di formazione dell'immina, che porta alla coniugazione covalente tra il cotone e l'antibiotico (o antibiotico più gelatina) viene condotta direttamente in reattori da tintoria senza interruzione di processo dopo la idrofilizzazione e sbiancatura dei vari articoli, con significativi risparmi economici rispetto ai sistemi

tradizionali.

Infine, la reazione di riduzione dell'immina alla corrispondente ammina viene condotta con metodi noti nel settore, per esempio nelle stesse condizioni di pH dell'operazione precedente, tramite aggiunta nella miscela di reazione risultante da detta reazione di un agente riducente come sodio boroidruro (NaBH_4) o litio alluminioidrato (LiAlH_4) in forma di soluzioni acquose di concentrazione di circa 1 g/l.

L'invenzione verrà ulteriormente illustrata tramite i seguenti esempi.

Parte sperimentale chimica

Esempio 1

Questo esempio si riferisce alla coniugazione di gentamicina alla fibra di cotone resa idrofila.

Viene impiegato un reattore a circolazione forzata da tintoria, avente un volume complessivo della camera di reazione di circa 100 l e un volume di esercizio di 60 l (il volume di esercizio è un dato tecnologico fornito dal costruttore del reattore, e corrisponde al massimo volume di liquido che può essere alimentato in condizioni di sicurezza). Nel reattore vengono caricati 10 kg di fibra di cotone e si lascia circolare acqua in continuo per dieci minuti per una corretta imbibizione. Vengono poi svolte le seguenti operazioni:

- Idrofilizzazione e sbiancatura della fibra

si porta il reattore a volume, cioè lo si riempie fino al volume di esercizio di 60 l con acqua deionizzata, e si aggiungono:

- 10 g/l di acqua ossigenata a concentrazione 35%;
- 4 g/l di soda caustica a concentrazione 30%;
- 1 g/l di detergente Solvipol ECL.

La temperatura del bagno viene portata a 102 °C e si lascia reagire, sempre in circolazione forzata, per 30 minuti. Si eseguono poi una serie di lavaggi in continuo fino a neutralizzazione delle acque di lavaggio.

- Ossidazione della fibra sbiancata ed idrofilizzata

Si riempie la camera di reazione e si aggiusta il pH a 5,6 per aggiunta di tampone acetato; si porta la temperatura a 50 °C e la pressione a 3,5 bar. Si aggiunge sodio metaperiodato in quantità tale che la sua concentrazione nella miscela di

reazione sia pari a 5,32 g/l e si lascia reagire per 30 minuti (ossidazione controllata). Si eseguono poi due lavaggi di dieci minuti in continuo.

- Funzionalizzazione con l'antibiotico

Si riempie di nuovo la camera di reazione, si riporta la temperatura a 50 °C e la pressione a 3,5 bar, quindi si aggiusta il pH a 8,5 per aggiunta di tampone carbonato. Si aggiunge gentamicina solfato, presolubilizzata in acqua, in quantità tale che la sua concentrazione nella miscela di reazione sia pari a 0,8 g/l e si lascia reagire per tre ore. In questa reazione si forma l'immina (base di Schiff) tra i gruppi aldeidici del cotone ossidato ed un gruppo amminico della gentamicina. Si eseguono due lavaggi in continuo da dieci minuti cadauno.

- Riduzione ad ammina dei gruppi immina ottenuti

Si riempie di nuovo il reattore, si riporta a pH 8,5 per aggiunta di tampone carbonato, e si aggiunge sodio boroidruro in quantità tale che la sua concentrazione nella miscela di reazione sia pari a 1,0 g/l, e si lascia reagire a temperatura ambiente per 15 minuti. In questa reazione l'immina si riduce alla corrispondente alchilammina. Si eseguono tre lavaggi in continuo da dieci minuti cadauno e si scarica la fibra che viene asciugata in tunnel di aria calda ad una temperatura di circa 80 - 90 °C.

La fibra idrofila così ottenuta, sbiancata e coniugata a gentamicina, costituisce il campione 1; questa fibra viene impiegata per la realizzazione di fluff per cerotti e tessuti-non-tessuti protettivi.

Esempio 2

Questo esempio si riferisce alla coniugazione di gentamicina pregelatinizzata alla fibra di cotone resa idrofila.

Viene ripetuta la procedura di idrofilizzazione, sbiancatura e ossidazione di 10 kg di fibra di cotone descritta nell'esempio 1, con l'unica differenza che nell'operazione di ossidazione si impiega sodio metaperiodato in quantità tale che la sua concentrazione nella miscela di reazione sia pari a 3,8 g/l.

In un reattore separato si procede alla pregelatinizzazione della gentamicina solfato. A tale scopo, 100 g di gentamicina solfato vengono sciolti in 1 l di una soluzione acquosa a concentrazione 1% di gelatina di tipo B da pelle bovina (Bloom 225, venduta da Sigma Aldrich Chemical Company), mantenendo sotto

agitazione alla temperatura di 50 °C; la miscela di reazione viene mantenuta a questa temperatura fino al suo impiego nella reazione di coniugazione su cotone.

La fibra idrofilizzata, sbiancata e ossidata preparata in precedenza viene fatta reagire con l'antibiotico pregelatinizzato. La camera di reazione contenente la fibra viene portata ad una temperatura di 50 °C e la pressione è regolata a 3,5 bar; quindi si aggiusta il pH a 8,5 per aggiunta di tampone carbonato. Si aggiunge gentamicina pregelatinizzata in quantità tale che la concentrazione di gentamicina solfato sia pari a 1,4 g per litro di miscela reagente e si lascia reagire per tre ore con formazione di immine tra i gruppi aldeidici del cotone ossidato e un gruppo amminico della gentamicina e parte dei gruppi amminici della gelatina. Si eseguono due lavaggi in continuo da dieci minuti cadauno.

Viene infine ripetuta la procedura di riduzione con sodio boroidruro descritta nell'esempio 1. Parte della gelatina impiegata non coniugata rimane intrappolata, anche dopo i lavaggi, tra i filamenti di fibra di cotone. Si eseguono tre lavaggi in continuo da dieci minuti cadauno e si scarica la fibra che viene asciugata in tunnel di aria a 40 °C.

La fibra idrofila così ottenuta, sbiancata e coniugata a gentamicina gelatinizzata, costituisce il campione 2; anche questa fibra viene impiegata per la realizzazione di fluff per cerotti e tessuti-non-tessuti protettivi.

Esempio 3

Questo esempio si riferisce alla coniugazione di gentamicina ad un filato di cotone idrofobo.

In un reattore da 100 l a circolazione forzata per tintura di filati vengono caricati 10 Kg di filato in rocche e si lascia circolare acqua in continuo per 10 minuti per una corretta imbibizione del filato. Al filato vengono aggiunti ipoclorito di sodio al 15% (20 g/l) e soda caustica 36 BE (1,5 g/l), lasciando reagire per un'ora a 60 °C; si lava ripetutamente e si aggiungono, successivamente, acqua ossigenata 30 vol (6 g/l) e soda caustica 36 BE (2 g/l) lasciando reagire per un'altra ora, dopo di che si lava ripetutamente fino a neutralizzazione delle acque di lavaggio.

Si procede poi all'ossidazione del cotone secondo la procedura descritta nell'esempio 1, con le uniche differenze che si impiega sodio metaperiodato in quantità tale che la sua concentrazione nella miscela di reazione sia pari a 5 g/l, e

che la reazione viene lasciata proseguire per 15 minuti; in queste condizioni si ha un'ossidazione controllata, finalizzata al mantenimento delle proprietà merceologiche necessarie per la tessitura del filato. Si eseguono due lavaggi in continuo di dieci minuti cadauno.

Si ripete poi la procedura di funzionalizzazione con gentamicina dell'esempio 1, con l'unica differenza che la gentamicina solfato è impiegata in quantità tale che la sua concentrazione nella miscela di reazione è pari a 1,6 g/l. Si eseguono due lavaggi in continuo da dieci minuti cadauno.

Infine, si ripete la procedura di riduzione dell'esempio 1, e si scaricano le rocche di filato che vengono asciugate in tunnel di aria calda a 80 – 90 °C.

Il filato così ottenuto, sbiancato e coniugato con gentamicina, costituisce il campione 3; questo filato viene tessuto per la realizzazione di bende orlate e bende elastiche di protezione esterna di ferite e lesioni cutanee.

Esempio 4

Questo esempio si riferisce alla coniugazione di gentamicina pregelatinizzata ad una garza di cotone resa idrofila.

In un reattore da 200 l a circolazione forzata per la tintura di tessuti (reattore cosiddetto a siluro) vengono caricati 20 kg di garza di cotone in pezze con altezza di 150 cm; si lascia circolare acqua in continuo per dieci minuti per una corretta imbibizione della garza.

Si ripete la procedura di idrofilizzazione, sbiancatura e ossidazione dell'esempio 1 con l'unica differenza che nell'operazione di ossidazione si impiega sodio metaperiodato in quantità tale che la sua concentrazione nella miscela di reazione sia pari a 6,2 g/l.

A parte, si procede alla pregelatinizzazione della gentamicina solfato, ripetendo la procedura descritta a tale scopo nell'esempio 2, con l'unica differenza che si impiegano in questo caso 500 g di gentamicina solfato; la miscela di reazione viene mantenuta a questa temperatura fino al suo impiego nella reazione di coniugazione su cotone.

La garza idrofilizzata e sbiancata ottenuta come descritto in precedenza viene fatta reagire con l'antibiotico pregelatinizzato, ripetendo la procedura dell'esempio 2 con l'unica differenza che la gentamicina pregelatinizzata è aggiunta in quantità

tale che la concentrazione di gentamicina solfato risulta pari a 2,6 g per litro di miscela reagente. Si eseguono due lavaggi in continuo di dieci minuti cadauno.

Si ripete infine la procedura di riduzione dei gruppi immina dell'esempio 2. Anche in questo caso, parte della gelatina impiegata e non coniugata rimane intrappolata, anche dopo i lavaggi, nella garza di cotone. Si eseguono tre lavaggi in continuo da dieci minuti cadauno e si scarica il rotolo di garza che viene asciugato per svolgimento del rotolo e contemporaneo passaggio in tunnel ad aria calda.

La garza idrofila così ottenuta, sbiancata e coniugata a gentamicina gelatinizzata, costituisce il campione 4; questa garza dopo taglio in dimensioni opportune, viene impiegata come secondo strato protettivo a diretto contatto con ferite o lesioni.

Esempio 5

Questo esempio si riferisce alla coniugazione di kanamicina pregelatinizzata ad una fibra di cotone resa idrofila.

Si ripete la procedura dell'esempio 2, con le uniche differenze che si impiega kanamicina solfato al posto della gentamicina solfato, e che nell'operazione di funzionalizzazione della fibra si impiega una quantità di kanamicina pregelatinizzata tale che la concentrazione di kanamicina solfato sia pari a 1 g per litro di miscela reagente. Anche in questo caso, parte della gelatina impiegata e non coniugata rimane intrappolata, anche dopo i lavaggi, tra i filamenti di fibra di cotone. Si eseguono tre lavaggi in continuo di dieci minuti ciascuno e si scarica la fibra che viene asciugata in tunnel di aria a 40 °C.

La fibra idrofila così ottenuta, sbiancata e coniugata a kanamicina gelatinizzata, costituisce il campione 5; questa fibra viene impiegata per la realizzazione di fluff per cerotti e tessuti-non-tessuti protettivi destinati al contatto diretto con la lesione.

Esempio 6

Questo esempio si riferisce alla coniugazione di kanamicina ad un filato di cotone idrofobo.

Si ripete la procedura dell'esempio 3, con le uniche differenza dell'impiego della kanamicina al posto della gentamicina, e che nell'operazione di funzionalizzazione con antibiotico, la kanamicina solfato è impiegata in quantità tale che la sua concentrazione nella miscela di reazione è pari a 1,2 g/l.

Il filato così ottenuto, sbiancato e coniugato con kanamicina, costituisce il

campione 6, e viene impiegato per gli stessi usi del filato dell'esempio 3.

Esempio 7

Questo esempio si riferisce alla coniugazione di kanamicina pregelatinizzata ad una garza di cotone resa idrofila.

Si ripete la procedura dell'esempio 4, con le uniche differenze che si impiega kanamicina al posto della gentamicina, e che nell'operazione di funzionalizzazione della garza si impiega kanamicina solfato pregelatinizzata in quantità tale che la concentrazione di kanamicina solfato nella miscela di reazione è pari a 1,8 g/l. Anche in questo caso, parte della gelatina impiegata e non coniugata rimane intrappolata, anche dopo i lavaggi, nella garza di cotone.

La garza idrofila così ottenuta, sbiancata e coniugata a kanamicina gelatinizzata, costituisce il campione 7; questa garza dopo taglio in dimensioni opportune, viene impiegata come secondo strato protettivo a diretto contatto con ferite o lesioni.

Esempio 8

Questo esempio si riferisce alla coniugazione di amikacina pregelatinizzata ad una fibra di cotone resa idrofila.

Si ripete la procedura dell'esempio 2, con le uniche differenze che si impiega amikacina solfato al posto della gentamicina solfato, e che nell'operazione di funzionalizzazione della fibra si impiega una quantità di amikacina pregelatinizzata tale che la concentrazione di amikacina solfato sia pari a 1,5 g per litro di miscela reagente. Anche in questo caso, parte della gelatina impiegata e non coniugata rimane intrappolata, anche dopo i lavaggi, tra i filamenti di fibra di cotone.

La fibra idrofila così ottenuta, sbiancata e coniugata a kanamicina gelatinizzata, costituisce il campione 8; questa fibra viene impiegata per la realizzazione di fluff per cerotti e tessuti-non-tessuti protettivi destinati al contatto diretto con la lesione.

Esempio 9

Questo esempio si riferisce alla coniugazione di amikacina al filato idrofobo di cotone.

Si ripete la procedura dell'esempio 3, con le uniche differenze dell'impiego della amikacina al posto della gentamicina, e che nell'operazione di funzionalizzazione con antibiotico, la amikacina solfato è impiegata in quantità tale che la sua concentrazione nella miscela di reazione è pari a 2,0 g/l.

Il filato così ottenuto, sbiancato e coniugato con kanamicina, costituisce il campione 9, e viene impiegato per gli stessi usi del filato dell'esempio 3.

Esempio 10

Questo esempio si riferisce alla coniugazione di amikacina pregelatinizzata ad una garza di cotone resa idrofila.

Si ripete la procedura dell'esempio 4, con le uniche differenze che si impiega amikacina al posto della gentamicina, e che nell'operazione di funzionalizzazione della garza si impiega amikacina solfato pregelatinizzata in quantità tale che la concentrazione di amikacina solfato nella miscela di reazione è pari a 3,0 g/l. Anche in questo caso, parte della gelatina impiegata e non coniugata rimane intrappolata, anche dopo i lavaggi, nella garza di cotone.

La garza idrofila così ottenuta, sbiancata e coniugata a amikacina gelatinizzata, costituisce il campione 10, e viene impiegata per gli stessi usi della garza dell'esempio 4.

Parte sperimentale farmacologica

Esempio 11

Questo esempio si riferisce all'inibizione della crescita di batteri Gram + e Gram - su piastra di agar nutriente da parte dei campioni dell'invenzione.

Viene preparata una serie di piastre Petri del diametro di 9 cm contenenti agar nutriente sterile nel quale sono stati inseminati μ l 20 di una coltura fresca di *S. aureus* e di *E. coli*. Dopo raffreddamento, sulla superficie dell'agar si appoggia un dischetto del diametro di 3 cm dei campioni 1-10 preparati come descritto negli esempi precedenti.

Le piastre vengono poste ad incubare a 37 °C per 18 ore dopodiché si controlla il numero di UFC (unità formanti colonie) dei microrganismi patogeni sulla superficie del terreno di coltura in corrispondenza del dischetto di cotone e l'eventuale presenza di un alone di inibizione (AI, in millimetri), che se presente è indice di rilascio dell'antibiotico nel terreno di coltura.

In parallelo vengono predisposte delle piastre in cui viene appoggiato un dischetto di cotone non coniugato (controllo).

I risultati sono riportati in tabella 1.

Tabella 1

Campione		Risultati			
N°	Struttura	S. aureus		E. coli	
		UFC (no.)	AI (mm)	UFC (no.)	AI (mm)
1	Fibra idrofila con gentamicina	0	2	0	1
2	Fibra idrofila con gentamicina gelatinizzata	0	0	0	0
3	Filato idrofobo con gentamicina	0	1	0	0
4	Garza idrofila con gentamicina gelatinizzata	0	0	0	0
5	Fibra idrofila con kanamicina gelatinizzata	0	0	0	1
6	Filato idrofobo con kanamicina	0	2	0	2
7	Garza idrofila con kanamicina gelatinizzata	0	0	0	0
8	Fibra idrofila amikacina gelatinizzata	0	0	0	0
9	Filato idrofobo amikacina	0	1,5	0	1
10	Garza idrofila amikacina gelatinizzata	0	0	0	0
/	Garza cotone idrofilo non trattato (controllo)	> 1000	/	> 1000	/
/	Benda cotone idrofobo non trattato (controllo)	> 1000	/	> 1000	/

I risultati evidenziano come con tutti i campioni dell'invenzione coniugati ad antibiotici aminoglicosidici, sia a base di cotone idrofilo che a base di cotone idrofobo, e con presenza o meno di gelatina, non vi è crescita microbica (Gram + e Gram -) in corrispondenza della loro superficie; ciò evidenzia una completa attività microbica degli antibiotici coniugati, nelle due diverse forme, al cotone.

L'assenza di un alone di inibizione della crescita microbica intorno alla superficie dei dischetti di cotone coniugato, dimostra il non rilascio degli antibiotici stessi nel mezzo di crescita, indicando con ciò un legame di coniugazione stabile.

Esempio 12

Questo esempio si riferisce all'inibizione della crescita di Gram + e Gram - su brodo nutriente.

In provette da microbiologia contenenti 20 ml di brodo nutriente sterile, si appoggiano, sopra al livello del brodo, batuffoli di cotone coniugato con antibiotici, del peso di circa un grammo, corrispondenti ai campioni 1-10.

Su di essi si depositano 20 µl di una coltura fresca di *S. aureus* e di *E. coli* che si lasciano a contatto per un'ora. Successivamente, i batuffoli vengono immersi nel brodo di coltura e le provette vengono poste ad incubare a 37 °C per 18 ore. Terminato il periodo di incubazione, i batuffolo vengono rimossi dalle provette e l'intensità dello sviluppo della coltura viene determinato mediante lettura spettrofotometrica dell'opalescenza a 640 nm.

In parallelo, vengono condotte delle prove di crescita in assenza di batuffolo di cotone (controllo della crescita) e delle prove utilizzando dei batuffoli di cotone non trattati (controlli di riferimento).

I risultati sono riportati in tabella 2.

Tabella 2

Campione		Risultati (D.O. a 640 nm)	
N°	Struttura	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1	Fibra idrofila con gentamicina	0,020	0,034
2	Fibra idrofila con gentamicina gelatinizzata	0,036	0,024
3	Filato idrofobo con gentamicina	0,018	0,022
4	Garza idrofila con gentamicina gelatinizzata	0,030	0,030
5	Fibra idrofila con kanamicina gelatinizzata	0,016	0,024
6	Filato idrofobo con kanamicina	0,026	0,036
7	Garza idrofila con kanamicina gelatinizzata	0,014	0,026
8	Fibra idrofila amikacina gelatinizzata	0,020	0,020
9	Filato idrofobo amikacina	0,030	0,015
10	Garza idrofila amikacina gelatinizzata	0,026	0,018
/	Controllo della crescita	0,540	0,500
/	Garza cotone idrofilo non trattato (controllo)	0,960	0,880
/	Benda cotone idrofobo non trattato (controllo)	0,750	0,800

I risultati evidenziano che il contatto, per un'ora, dei diversi antibiotici aminoglicosidici coniugati alle diverse forme idrofile e idrofobe di cotone, in presenza o meno di pregelatinizzazione degli stessi, con microrganismi patogeni Gram + e Gram -, è sufficiente per una totale inibizione della loro crescita.

Per contro, nel caso di contatto dell'inoculo microorganico con cotone normale di

controllo nella forma di bendaggi, si evidenzia un significativo incremento della crescita microbica rispetto al controllo della crescita; ciò a dimostrazione che il cotone normale funziona non solo da accumulatore di flora microbica ma anche da catalizzatore per la crescita della stessa.

Esempio 13

Questo esempio si riferisce all'inibizione della crescita di Gram + e Gram - su brodo nutriente dopo contatto prolungato con sangue e con sudore artificiale.

Campioni di circa 2 g di garze e bende di cotone coniugato ad antibiotici corrispondenti ai campioni 1-10 vengono immersi per sei giorni in sangue suino intero citratato, che viene agitato saltuariamente. Successivamente, i campioni vengono ripresi, lavati con acqua fino ad eliminazione dei residui di sangue, immersi in sudore artificiale (R. Selleri et al., Chimica e Tecnologia dei Prodotti Cosmetici, 1977, 11) ed ivi mantenuti, sempre agitando saltuariamente, per altri quattro giorni.

Al termine del trattamento, i campioni vengono sottoposti a lavaggio ripetuto con acqua, asciugati in corrente d'aria calda e quindi sottoposti ad analisi dell'attività antimicrobica nei confronti di *S. aureus* e di *E. coli* secondo il metodo descritto nell'esempio precedente.

I risultati sono riportati in tabella 3.

Tabella 3

Campione		Risultati (D.O. a 640 nm)	
N°	Struttura	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1	Fibra idrofila con gentamicina	0,040	0,036
2	Fibra idrofila con gentamicina gelatinizzata	0,024	0,038
3	Filato idrofobo con gentamicina	0,054	0,046
4	Garza idrofila con gentamicina gelatinizzata	0,060	0,034
5	Fibra idrofila con kanamicina gelatinizzata	0,052	0,048
6	Filato idrofobo con kanamicina	0,072	0,080
7	Garza idrofila con kanamicina gelatinizzata	0,040	0,050
8	Fibra idrofila amikacina gelatinizzata	0,034	0,060
9	Filato idrofobo amikacina	0,065	0,070
10	Garza idrofila amikacina gelatinizzata	0,046	0,054

/	Controllo della crescita	0,480	0,520
---	--------------------------	-------	-------

I risultati evidenziano, in via indiretta, che i vari antibiotici aminoglicosidici coniugati al cotone, idrofilo ed idrofobo, sia in forma tal quale che in presenza di gelatina, non vengono rilasciati dopo un significativo periodo di contatto con sangue e sudore, correlabile ai tempi di utilizzo nelle medicazioni, garantendo un lungo periodo di conservazione dell'attività microbica in condizioni di impiego applicativo.

Esempio 14

Questo esempio si riferisce alla prevenzione delle infezioni da *S. epidermidis* nella cute del ratto lesionata.

Ratti Wistar femmine del peso di 200 gr circa, in numero di cinque per gruppo, vengono opportunamente depilati nella zona dorsale e, quindi, sotto leggera anestesia, vengono sottoposti ad esposizione prolungata a raggi UV fino a provocare evidenti lesioni della cute.

Nella zona lesa vengono applicati, mediante adesivo, dei dischi di garza o benda di cotone coniugato ai diversi antibiotici, prodotti secondo gli esempi 1-10, che vengono mantenuti a contatto "in sito" per dieci giorni. Ogni giorno, sulla superficie dei dischetti si applicano, in tre punti diversi, 5 µl/sito di una coltura fresca di *S. epidermidis*.

Al termine del trattamento, i dischetti vengono rimossi e viene controllato lo stato di infettività della lesione mediante prelievo di essudato con tampone e semina dello stesso in brodocoltura; contemporaneamente viene eseguito l'esame soggettivo dello stato della lesione stessa.

In parallelo, su un gruppo di animali il trattamento è stato eseguito applicando dei dischi di garza o benda di cotone non coniugato (controlli).

I risultati sono riportati in tabella 4; i dati di crescita microbica sono forniti come numero di animali che presentano infezione da *S. epidermidis*, controllata mediante prelievo tampone sulla lesione e controllo della crescita su brodo coltura e colorazione Gram, sul totale animali degli animali sottoposti al test (n/n); i risultati riportati nella colonna "Stato della lesione" sono forniti in forma di indicatori soggettivi della gravità della lesione, secondo la scala: (+++) necrotico; (++) molto grave; (+) grave; (-) migliorato; (- -) molto migliorato; (---) notevolmente

migliorato.

Tabella 4

Campione		Risultati	
N°	Struttura	Crescita microbica	Stato della lesione
1	Fibra idrofila con gentamicina	0/5	(--)
2	Fibra idrofila con gentamicina gelatinizzata	0/5	(---)
3	Filato idrofobo con gentamicina	0/5	(-)
4	Garza idrofila con gentamicina gelatinizzata	0/5	(---)
5	Fibra idrofila con kanamicina gelatinizzata	0/5	(---)
6	Filato idrofobo con kanamicina	0/5	(-)
7	Garza idrofila con kanamicina gelatinizzata	0/5	(---)
8	Fibra idrofila amikacina gelatinizzata	0/5	(---)
9	Filato idrofobo amikacina	0/5	(-)
10	Garza idrofila amikacina gelatinizzata	0/5	(---)
/	Garza cotone idrofilo non trattato (controllo)	5/5	(+++)
/	Benda cotone idrofobo non trattato (controllo)	5/5	(++)

I risultati mettono in evidenza che, al contrario dell'applicazione di cotone normale di controllo dove si è avuto l'infezione della lesione nella totalità degli animali trattati, i coniugati tra i vari aminoglicosidi ed il cotone, idrofilo ed idrofobo, nella forma tal quale o in quella gelatinizzata, sono in grado di dare un totale protezione contro le infezioni.

L'esame soggettivo dello stato della lesione, esaminato al momento della rimozione del dischetto di protezione, evidenzia un miglioramento della gravità dell'eritema particolarmente evidente, fino quasi alla guarigione, per i coniugati tra cotone ed antibiotico gelatinizzato.

Esempio 15

Questo esempio si riferisce all'analisi delle proprietà emostatiche nel ratto.

Ratti Wistar femmine del peso di circa 300 gr vengono suddivisi in gruppi di otto unità cadauno.

A ciascun animale, dopo anestesia eterea, viene incisa, con una lametta, la vena caudale verticalmente per una lunghezza di 2 cm ed in modo profondo cercando

di avere per tutti gli animali una ferita ed un conseguente flusso di sangue di pari entità. Successivamente, sulla ferita, viene applicata una striscia dei vari campioni di garza di cotone allo studio che viene mantenuta in stretto contatto fino alla cessazione del processo di sanguinamento (che mediamente richiede da due a quattro minuti). Dopo rimozione, sui vari campioni di garza viene controllata la dimensione dell'alone di sangue e, in modo soggettivo, lo stato del coagulo (sangue più o meno essiccato, consistenza del tappo piastrinico).

Sugli animali, nelle successive sei ore vengono controllati l'eventuale ripresa del processo di sanguinamento e la consistenza del coagulo in formazione.

I risultati sono riportati in tabella 5 che riporta i risultati di alone di sangue sul campione (in cm²), i dati della ripresa di sanguinamento (in % sul numero di animali) e la consistenza del coagulo valutata con la seguente scala soggettiva: +++ = coagulo molto consistente e secco; ++ = coagulo consistente e umido; + = coagulo poco consistente.

Tabella 5

Campione		Risultati		
N°	Struttura	Alone di sangue (cm ²)	Ripresa sanguinamento (% animali)	Consistenza coagulo
1	Fibra idrofila con gentamicina	4,2	0,0	++
2	Fibra idrofila con gentamicina gelatinizzata	1,9	0,0	+++
3	Filato idrofobo con gentamicina	4,5	12,5	+
4	Garza idrofila con gentamicina gelatinizzata	2,0	0,0	+++
5	Fibra idrofila con kanamicina gelatinizzata	2,3	0,0	+++
6	Filato idrofobo con kanamicina	4,8	25,0	+
7	Garza idrofila con kanamicina gelatinizzata	1,8	0,0	+++
8	Fibra idrofila amikacina gelatinizzata	2,2	0,0	+++
9	Filato idrofobo amikacina	5,4	12,5	+
10	Garza idrofila amikacina gelatinizzata	2,6	0,0	+++
/	Garza cotone idrofilo non trattato (controllo)	4,8	12,5	+
/	Benda cotone idrofobo non trattato (controllo)	6,0	25,0	+

I risultati relativi all'alone di sangue fuoriuscito dalla ferita dimostrano una significativa accelerazione del processo emostatico e un'altrettanto significativa riduzione del fenomeno emorragico per i campioni contenenti l'antibiotico aminoglicosidico gelatinizzato.

L'effetto emostatizzante di questi coniugati trova conferma nella totale assenza di ripresa del sanguinamento e nell'evidente maggiore consistenza del tappo emostatico riscontrato negli animali trattati con questo tipo di protezione.

Ciò a conferma delle proprietà emostatizzanti, in parte già note, della gelatina.

Parte sperimentale clinica

Esempio 16

Questo esempio si riferisce a studi preliminari di impiego nelle ferite chirurgiche.

Bendaggi protettivi (garze, bende e cerotti) a base di cotone coniugato covalentemente con aminoglicosidi e con aminoglicosidi pregelatinizzati sono stati messi a confronto con garze, bende e cerotti di normale utilizzo nella pratica clinico-chirurgica su un numero significativo di pazienti sottoposti ad interventi chirurgici di piccola/media entità.

La protezione della ferita è stata fatta applicando a diretto contatto con la stessa garza a base di cotone idrofilo coniugato all'antibiotico gelatinizzato (seconda barriera di protezione antimicrobica) a loro volta ricoperte da bende a base di cotone idrofobo coniugato allo stesso antibiotico non gelatinizzato (prima barriera di protezione antimicrobica).

Mentre i normali bendaggi protettivi (controlli), secondo la prassi routinaria, sono stati sostituiti ogni ventiquattro o quarantotto ore, procedendo allo stesso tempo alla normale disinfezione della ferita, quelli dell'invenzione sono stati lasciati a protezione del sito leso per tutto il periodo necessario alla cicatrizzazione della ferita stessa, mediamente compreso tra otto e dodici giorni.

Con l'impiego di articoli realizzate secondo l'invenzione non si è avuto alcun caso di infezione del sito di applicazione. Inoltre, con gli articoli realizzati secondo l'invenzione sono risultati accelerati e migliorati, rispetto ai valori ottenuti con bendaggi di controllo, sia il processo di emostatizzazione sia quello della riparazione tissutale (cicatrizzazione) con un ordine di efficacia: cotone-aminoglicoside pregelatinizzato > cotone-aminoglicoside >> cotone normale.

Esempio 17

Questo esempio si riferisce a studi preliminari di impiego nelle lesioni cutanee croniche.

Bendaggi protettivi (garze, bende) realizzati secondo l'invenzione sono stati messi a confronto con garze e bende normali, su un numero significativo di pazienti, nella protezione di ustioni o piaghe da decubito.

La protezione della lesione è stata fatta applicando a diretto contatto con la stessa delle garze di cotone idrofilo coniugato all'antibiotico gelatinizzato (seconda barriera di protezione antimicrobica) a loro volta ricoperte da bende a base di cotone idrofobo coniugate allo stesso antibiotico non gelatinizzato (prima barriera di protezione antimicrobica).

Mentre i normali articoli protettivi (controlli), secondo la prassi routinaria, sono stati sostituiti mediamente ogni quarantotto ore procedendo contemporaneamente alla disinfezione del sito leso, gli articoli dell'invenzione sono stati sostituiti mediamente ogni dieci/dodici giorni. Il trattamento è proseguito, in funzione della natura della lesione, fino a sei mesi.

Con l'impiego di articoli preparati secondo l'invenzione, in nessun caso si è avuta infettazione della lesione protetta; viceversa, nel caso di impiego di articoli normali si è dovuti ricorrere a profonde disinfettazioni in un cospicuo numero di soggetti.

Il significativo prolungamento dei tempi di sostituzione degli articoli protettivi ha portato ad un significativo miglioramento, rispetto ai controlli soggetti a frequente sostituzione, dello stato generale della lesione. Nel caso particolare degli articoli a base di cotone coniugato ad antibiotici pregelatinizzati si è addirittura osservata una significativa regressione della lesione con assenza di siti necrotici e tendenza alla normalizzazione del processo essudativo.

RIVENDICAZIONI

1. Prodotto a base di cotone idrofobo o idrofilo funzionalizzato con almeno un antibiotico amminoglicosidico per la protezione a lungo termine da infezioni di lesioni cutanee, caratterizzati dal fatto che l'antibiotico è legato al cotone tramite un legame covalente ed è presente in quantità compresa tra circa 4 e 45 mg per grammo di cotone.
2. Prodotto secondo la rivendicazione 1, in cui l'antibiotico è uno o più scelto tra gentamicina, kanamicina, tobramicina, amikacina e neomicina.
3. Prodotto secondo la rivendicazione 1, in cui il cotone è presente in forma di fibra, filato, garza o tessuto non tessuto.
4. Prodotto secondo la rivendicazione 3, in cui la quantità di antibiotico è compresa tra circa 14 e 15 mg per grammo di cotone quando questo è in forma di fibra.
5. Prodotto secondo la rivendicazione 4, in cui detta quantità di antibiotico è compresa tra 6 e 10 mg per grammo di cotone.
6. Prodotto secondo la rivendicazione 3, in cui la quantità di antibiotico è compresa tra circa 14 e 45 mg per grammo di cotone quando questo è in forma di garza.
7. Prodotto secondo la rivendicazione 6, in cui detta quantità di antibiotico è compresa tra 18 e 30 mg per grammo di cotone.
8. Prodotto secondo la rivendicazione 1 a base di cotone idrofilo, comprendente inoltre una o più gelatine, ottenibile facendo reagire con il cotone quantità di gelatine comprese tra 0,2 e 6 mg per grammo di cotone.
9. Prodotto secondo la rivendicazione 8, in cui dette gelatine sono ottenute da pelle bovina o suina, o parti ossee di suini.
10. Prodotto secondo la rivendicazione 8, in cui in cui la quantità di gelatine è compresa tra circa 0,2 e 5 mg per grammo di cotone quando questo è in forma di fibra.
11. Prodotto secondo la rivendicazione 10, in cui detta quantità di gelatine è compresa tra 0,5 e 1 mg per grammo di cotone.
12. Prodotto secondo la rivendicazione 8, in cui in cui la quantità di gelatine è compresa tra circa 0,3 e 6 mg per grammo di cotone quando questo è in forma di

garza.

13. Prodotto secondo la rivendicazione 12, in cui detta quantità di gelatine è compresa tra 0,7 e 1,2 mg per grammo di cotone.

14. Processo per la realizzazione di un prodotto di una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 7, a base di cotone idrofobo, comprendente le operazioni di:

- sbiancatura del cotone in una delle forme merceologiche di fibra, filato, cotone, garza o tessuto non tessuto;
- ossidazione del cotone preventivamente sbiancato, con trasformazione di gruppi ossidrilici presenti nella catena polimerica del cotone in gruppi carbonilici (aldeidici o chetonici);
- formazione di immine tra i gruppi amminici dell'antibiotico e i gruppi carbonilici formati nell'operazione precedente;
- riduzione ad ammine delle immine formate nell'operazione precedente.

15. Processo per la realizzazione di un prodotto di una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 13, a base di cotone idrofilo, comprendente le operazioni di:

- sbiancatura ed idrofilizzazione del cotone in una delle forme merceologiche di fibra, filato, cotone, garza o tessuto non tessuto;
- ossidazione del cotone preventivamente idrofilizzato e sbiancato, con trasformazione di gruppi ossidrilici presenti nella catena polimerica del cotone in gruppi carbonilici (aldeidici o chetonici);
- formazione di immine tra i gruppi carbonilici formati nell'operazione precedente e i gruppi amminici dell'antibiotico;
- riduzione ad ammine delle immine formate nell'operazione precedente.

16. Processo secondo una delle rivendicazioni 14 o 15, in cui l'operazione di sbiancatura del cotone viene condotta mettendo a reagire il cotone con acqua ossigenata, soda caustica e un detergente.

17. Processo secondo una delle rivendicazioni 14 o 15, in cui l'operazione di ossidazione del cotone viene condotta con acido periodico o un periodato a concentrazione compresa tra 3 e 10 g/l, ad una temperatura compresa tra 40 e 60 °C, per tempi compresi tra circa 15 minuti e un'ora, e con pressioni di alimentazione nel reattore delle fasi liquide comprese tra 3 e 5 bar.

18. Processo secondo una delle rivendicazioni 14 o 15, in cui l'operazione di

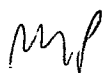
formazione delle immine avviene ad una temperatura compresa tra circa 40 e 60 °C, a valori di pressione compresi tra circa 3 e 4 bar, ad un pH compreso tra 8,0 e 9,0, e con tempi di reazione compresi tra un'ora e cinque ore, ed in cui l'antibiotico viene impiegato in forma libera o di un suo sale.

19. Processo secondo la rivendicazione 15, in cui l'operazione di formazione delle immine viene effettuata facendo reagire i gruppi carbonilici del cotone e i gruppi amminici dell'antibiotico e delle proteine delle gelatine ad una temperatura compresa tra circa 40 e 60 °C, a valori di pressione compresi tra circa 3 e 4 bar, ad un pH compreso tra 8,0 e 9,0, e con tempi di reazione compresi tra un'ora e cinque ore, ed in cui l'antibiotico viene impiegato in forma libera o di un suo sale.

20. Processo secondo la rivendicazione 19, in cui l'operazione di formazione delle immine viene condotta impiegando l'antibiotico o il suo sale previamente disciolto o sospeso in una soluzione acquosa di una o più gelatine, in cui la concentrazione complessiva di dette gelatine è compresa tra 0,5 e 3% p/v.

21. Processo secondo una delle rivendicazioni 14 o 15, in cui l'operazione di riduzione ad ammine delle immine viene condotta tramite aggiunta nella miscela di reazione risultante dall'operazione precedente di un agente riducente come sodio boroidruro (NaBH_4) o litio alluminoidruro (LiAlH_4) in forma di soluzioni acquose di concentrazione di circa 1 g/l.

(MP/as)



CLAIMS

1. Product based on hydrophobic or hydrophilic cottonwool, functionalized with at least one aminoglycosidic antibiotic for the long-term protection against infections of skin injuries, characterized in that the antibiotic is linked to the cottonwool by means of a covalent bond and is present in an amount comprised between about 4 and 45 mg per gram of cottonwool.
2. Product according to Claim 1, wherein the antibiotic is one or more chosen among gentamicin, kanamycin, tobramycin, amikacin and neomycin.
3. Product according to Claim 1, wherein the cottonwool is present in the form of fibre, yarn, gauze or non-woven fabric.
4. Product according to Claim 3, wherein the amount of antibiotic is comprised between about 14 and 15 mg per gram of cottonwool when this latter is in the form of fibre.
5. Product according to Claim 4, wherein said amount of antibiotic is comprised between 6 and 10 mg per gram of cottonwool.
6. Product according to Claim 3, wherein the amount of antibiotic is comprised between about 14 and 45 mg per gram of cottonwool when this latter is in the form of gauze.
7. Product according to Claim 6, wherein said amount of antibiotic is comprised between 18 and 30 mg per gram of cottonwool.
8. Product according to Claim 1 based on hydrophilic cottonwool, further comprising one or more gelatins, obtainable by reacting the cottonwool with amounts of gelatins comprised between 0.2 and 6 mg per gram of cottonwool.
9. Product according to Claim 8, wherein said gelatins are obtained from cow or pig skin, or bony parts of pigs.
10. Product according to Claim 8, wherein the amount of gelatins is comprised between about 0.2 and 5 mg per gram of cottonwool when this latter is in the form of fibre.
11. Product according to Claim 10, wherein said amount of gelatins is comprised between 0.5 and 1 mg per gram of cottonwool.
12. Product according to Claim 8, wherein the amount of gelatins is comprised between about 0.3 and 6 mg per gram of cottonwool when this latter is in the form

of gauze.

13. Product according to Claim 12, wherein said amount of gelatins is comprised between 0.7 and 1.2 mg per gram of cottonwool.

14. Process for producing a product according to any one of Claims 1-7, based on hydrophobic cottonwool, comprising the following steps:

- bleaching of the cottonwool in one of the market forms: fibre, yarn, gauze or non-woven fabric;
- oxidation of the cottonwool previously bleached, with the transformation of oxydrilic groups present in the polymeric chain of the cottonwool into carbonyl groups (aldehyde or ketone);
- formation of imines between the amine groups of the antibiotic and the carbonyl groups formed in the previous step;
- reduction to amines of the imines formed in the previous step.

15. Process for the production of a product according to any one of Claims 1-13, based on hydrophilic cottonwool, comprising the following steps:

- bleaching and hydrophilization of the cottonwool in one of the market forms fibre, yarn, gauze or non-woven fabric;
- oxidation of the cottonwool previously hydrophilized and bleached, with the transformation of the oxydrilic groups present in the polymeric chain of the cottonwool into carbonyl groups (aldehyde or ketone);
- formation of imines between the carbonyl groups formed in the previous step and the amine groups of the antibiotic;
- reduction to amines of the imines formed in the previous step.

16. Process according to any one of Claims 14 or 15, wherein the bleaching of the cottonwool is carried out by reacting the cottonwool with hydrogen peroxide, caustic soda and a detergent.

17. Process according to any one of Claims 14 or 15, wherein the oxidation of the cottonwool is carried out with periodic acid or a periodate with a concentration comprised between 3 and 10 g/l, at a temperature comprised between 40 and 60 °C, for periods comprised between about 15 minutes and 1 hour, and with feeding pressures of the liquid phases into the reactor comprised between 3 and 5 bars.

18. Process according to any one of Claims 14 or 15, wherein the formation of the imines takes place at a temperature comprised between about 40 and 60 °C, with

pressure values comprised between about 3 and 4 bars, at a pH comprised between 8.0 and 9.0, and with reaction times comprised between 1 and 5 hours, and wherein the antibiotic is used in a free form or as a salt thereof.

19. Process according to Claim 15, wherein the formation of the imines is carried out by reacting the carbonyl groups of cottonwool and the amine groups of the antibiotic and of the proteins of the gelatins at a temperature comprised between about 40 and 60 °C, with pressure values comprised between about 3 and 4 bars, at a pH comprised between 8.0 and 9.0, and with reaction times comprised between 1 and 5 hours, and wherein the antibiotic is used in a free form or as a salt thereof.

20. Process according to Claim 19, wherein the formation of the imines is carried out by using the antibiotic or a salt thereof previously dissolved or suspended in an aqueous solution of one or more gelatins, wherein the total concentration of said gelatins is comprised between 0.5 and 3% w/v.

21. Process according to any one of Claims 14 or 15, wherein the reduction to amines of the imines is carried out by adding to the reaction mixture resulting from the previous step a reducing agent such as sodium borohydride (NaBH_4) or lithium aluminium hydride (LiAlH_4) in the form of aqueous solutions having a concentration of about 1 g/l.