

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 294**

51 Int. Cl.:

A61L 27/34 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2010** **E 10706171 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2013** **EP 2391399**

54 Título: **Hidrogel antibacteriano y uso del mismo en ortopedia**

30 Prioridad:

30.01.2009 EP 09151755

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

19.03.2014

73 Titular/es:

MERO S.R.L. (50.0%)
Via Turati 7
20121 Milano, IT y
NOVAGENIT S.R.L. (50.0%)

72 Inventor/es:

GIAMMONA, GAETANO;
PITARRESI, GIOVANNA;
PALUMBO, FABIO;
ROMANO', CARLO LUCA;
MEANI, ENZO y
CREMASCOLI, EDGARDO

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 449 294 T3

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

DESCRIPCIÓN

Hidrogel antibacteriano y uso del mismo en ortopedia

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a un hidrogel obtenido a partir de derivados del ácido hialurónico y cargado con agentes antibacterianos, y a su uso en el campo de la ortopedia, en particular para la producción de recubrimientos antibacterianos de prótesis para su implante en el cuerpo humano o animal; la invención también se refiere a un kit para el uso del hidrogel antibacteriano.

Antecedentes de la invención

[0002] La ortopedia es una rama de la cirugía que se ocupa de la fijación, la reparación o la reconstrucción de huesos dañados, también se aplica en campos tales como la traumatología, la neurocirugía y la cirugía maxilofacial.

[0003] Una técnica usada habitualmente en la ortopedia es la inserción de implantes en el cuerpo para la fijación o la reconstrucción de huesos y de sus partes. Los implantes están hechos generalmente de metales biocompatibles (en particular de titanio, cobalto-cromo, etc.), polímeros, cerámicas, hidroxiapatito o sus combinaciones (por ejemplo, metales recubiertos con una capa de hidroxiapatito). La técnica se usa generalmente en osteosíntesis, sustituciones articulares, reconstrucción ósea ortopédica y traumatológica, cirugía de la médula espinal y maxilofacial y en aplicaciones odontológicas. Los implantes pueden usarse para sustituir, al menos parcialmente, huesos, articulaciones o dientes dañados; o pueden ser un medio de ayuda que se use para fijar partes óseas o ayudar a que estas partes mantengan una correcta relación espacial; en este segundo caso, los implantes pueden ser placas de fijación ósea (por ejemplo, craneofacial, maxilofacial, ortopédica, esquelética y similares), uñas, tornillos, mallas y similares. El término "prótesis" sería más apropiado para dispositivos de la primera clase, pero según se usa en la presente invención, pretenderá significar tanto las prótesis reales como cualquier otro medio de ayuda que se va a insertar en un cuerpo humano o animal para las aplicaciones mencionadas anteriormente.

[0004] Otra técnica adoptada en ortopedia es la inyección de materiales biocompatibles en partes dañadas de los huesos, tales como fracturas u orificios; la última puede ser el resultado de la extracción del hueso de implantes temporales, tales como tornillos. El material biocompatible en este caso tiene la función de sustituir temporalmente el tejido óseo, con objeto de mantener la resistencia mecánica durante el periodo necesario para que dichos tejidos crezcan y rellenen el área o el espacio dañado.

[0005] Las infecciones bacterianas debidas a biomateriales implantados o inyectados aún representan una complicación grave en la cirugía ortopédica. Muchos estudios han documentado la transferencia de organismos desde el personal de quirófano al paciente durante las intervenciones quirúrgicas; véase, por ejemplo, Bather C. J. y col, "The effects of 'in-use' surgical handwashing on the pre- and postoperative fingertip flora during cardiothoracic and orthopaedic surgery", *Journal of Hospital Infection*, (1995) 30, 283 - 293.

[0006] Las infecciones osteomielíticas agudas o crónicas también pueden aparecer en muchos casos de osteosíntesis tras fracturas óseas. En las situaciones en las que se implanta un cuerpo foráneo inerte en un tejido ya lesionado o debilitado, se desarrolla una competición por la colonización de las superficies del implante entre las bacterias (tales como *Staphylococcus Aureus*, que se ha encontrado a menudo en casos de fracturas óseas contaminadas) y las células del sistema inmunitario. Sin embargo, las bacterias tienen las ventajas, sobre las células del sistema inmunitario, de unos procesos reproductores más rápidos y una gran flexibilidad para adaptarse al entorno. Además, algunos estudios indican que los procedimientos para el implante de una prótesis, y la presencia de la propia prótesis en el sitio de la fractura ósea, dañan la respuesta local del sistema inmunitario, con el resultado de que el número de bacterias requeridas para causar una infección puede caer en un factor de incluso 10.000 (Fluckiger U. y col, "Factors influencing antimicrobial therapy of surface adhering microorganisms", *Recent Res. Devel. Antimicrob. Agents Chemother.*, (2000) 4, 165 - 175).

[0007] Una técnica de implantación estándar de prótesis y osteosíntesis consiste en la extirpación masiva del tejido necrótico y dañado, la limpieza de la cavidad, la implantación de una prótesis y la profilaxis parenteral sistémica con antibióticos. Se adoptan procedimientos similares en el caso de la inyección de biomateriales fluidos en fracturas o en cavidades óseas. La liberación sistémica de antibióticos implica ciertos inconvenientes tales como la toxicidad sistémica, una absorción reducida en los tejidos isquémicos o necróticos y una prolongada hospitalización para monitorizar los niveles de fármacos y sus efectos. En los casos en los que la colonización bacteriana de la parte tratada no se evita de forma eficaz mediante una profilaxis sistémica, puede requerirse una nueva intervención quirúrgica (especialmente en el caso de que sea necesaria la sustitución de la prótesis), y una extensión del periodo de hospitalización, dando como resultado molestias adicionales para el paciente.

[0008] Con objeto de evitar estos inconvenientes, la terapia antibiótica local ha sido una alternativa o un complemento aceptado y común en las terapias antibióticas sistémicas, para la profilaxis y la prevención de infecciones bacterianas derivadas de intervenciones quirúrgicas ortopédicas. La terapia antibiótica local a menudo

ofrece varias ventajas sobre la terapia sistémica, que incluyen: una elevada concentración del principio activo en el sitio de la infección, a la vez que se elimina la toxicidad sistémica; una erradicación más exhaustiva de la infección; y el uso de dosis más pequeñas de fármaco que no provocan efectos tóxicos.

5 **[0009]** Por las razones mencionadas anteriormente, numerosos investigadores han propuesto materiales antibacterianos con propiedades anti-ensuciamiento, en particular para su uso como recubrimientos de las prótesis ortopédicas; dichos materiales serían preferiblemente capaces de liberar un principio activo inmediatamente después de la intervención y durará al menos las siguientes 6 horas, preferiblemente hasta 48 - 72 horas, de forma que se cubra el periodo crítico de posible ataque y proliferación bacterianos en el lugar de la intervención.

10 **[0010]** Se han desarrollado y usado varios portadores para la liberación local de fármacos, tales como microesferas de metacrilato de polimetilo (PMMA) en las que se recubre el fármaco. Sin embargo, estos materiales no son reabsorbidos y requieren una subsiguiente intervención para su extracción. Además, la baja porosidad de las microesferas de PMMA inhibe la liberación del fármaco en un 25 - 50 %, reduciendo así la cantidad de fármaco liberada y aumentando el riesgo de selección de mutantes bacterianos resistentes al principio activo.

15 **[0011]** Los materiales biodegradables ofrecen las ventajas de una biorreabsorción, que evita la subsiguiente intervención para extraerlos, reduce las reacciones inducidas por cuerpos extraños y aumenta localmente la liberación total del fármaco; además, la cinética de liberación del fármaco desde la matriz puede ser modulada controlando los procesos de degradación de la matriz.

20 **[0012]** Un conocido polímero biodegradable y biorreabsorbible es el ácido hialurónico. El ácido hialurónico (también indicado como HA en el resto de la descripción) es un nombre genérico para los polisacáridos derivados de la polimerización de una unidad repetitiva que comprende ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina. El HA, en las formas en las que aparece de forma natural en muchos tejidos animales, puede tener un peso molecular (MW) que varía desde aproximadamente 5.000 hasta aproximadamente 20 millones de Dalton (Da), y las propiedades de una muestra específica del compuesto pueden variar dependiendo de su MW real. El HA es un componente fundamental de la matriz extracelular (ECM) y es esencial para el buen funcionamiento de numerosos tejidos corporales tales como tejidos conectivos o epiteliales, y en los fluidos del oído interno, en el humor vítreo de los ojos y también en el líquido esencial de las articulaciones (líquido sinovial). Es un polímero muy biocompatible y biodegradable con unas propiedades antiadhesivas y lubricantes bien conocidas, las últimas explotadas en la Solicitud de Patente Internacional WO 2004/014303. Sin embargo, el HA como tal no es adecuado para su inyección o para el recubrimiento de prótesis debido a su rápida degradación por las hialuronidasas, enzimas naturales del cuerpo humano y animal; como consecuencia de dicha rápida degradación, no puede garantizarse la liberación del fármaco durante el periodo referido. Adicionalmente, debido a su alta hidrofiliia, un recubrimiento producido con HA no tendría la suficiente estabilidad mecánica cuando se implanta una prótesis en el cuerpo, es decir, en un entorno basado esencialmente en agua.

30 **[0013]** Se han estudiado derivados del HA con vistas a varias posibles aplicaciones médicas.

40 **[0014]** La Solicitud de Patente Internacional WO 2006/069578 desvela copolímeros de HA con polímeros de alfa hidroxiácidos u otros polímeros, para diferentes usos en el ámbito cosmético o médico; este documento no menciona el uso de estos copolímeros basados en HA para su inyección o el tratamiento de prótesis.

45 **[0015]** La Patente EP 1773399 B1 desvela composiciones obtenidas mediante la reticulación del HA con una polihidrazida; estas composiciones forman hidrogeles cuando entran en contacto con el agua.

50 **[0016]** La Solicitud de Patente US 2004/0013626 A1 desvela nanopartículas para usar como vectores de fármacos, formadas por un polímero obtenido injertando al menos una molécula de un polisacárido en un polímero biodegradable diferente al polisacárido, preferiblemente un poliéster.

55 **[0017]** El artículo "New amphiphilic lactic acid oligomer-hyaluronan conjugates: synthesis and physicochemical characterization", Pravata L. y col, Biomacromolecules (2008) 9, 340 - 348, describe un derivado del HA producido injertando oligómeros de ácido láctico (OLA), con un peso molecular medio de aproximadamente 500 Da, en los radicales hidroxilo del ácido. Estos derivados HA-OLA muestran una hidrofiliia menor que la del HA y unas propiedades biológicas modificadas en comparación con el mismo, lo que los hace más estables en un ambiente acuoso, mientras conservan unas buenas características de biodegradabilidad y biorreabsorción.

60 **[0018]** El artículo "New graft copolymers of hyaluronic acid and polilactic acid: synthesis and characterization", Palumbo F. S. y col, Carbohydrate Polymers (2006) 66, 379 - 385, describe derivados del HA obtenidos injertando ácido poliláctico (también abreviado PLA en el resto de la descripción) en un HA con un MW medio de 266.000 Da con dos grados de sustitución diferentes, en el primer caso una proporción entre las cadenas de PLA y las unidades repetitivas de HA del 1,5 %, en el segundo caso, un grado de sustitución del 7,8 %; el primer compuesto es aún bastante hidrófilo, mientras que el segundo es más hidrófobo y da lugar a dispersiones de tipo gel en agua. Este artículo indica algunas posibles aplicaciones de los copolímeros injertados desvelados en el ámbito biomédico, tales como el uso de sus disoluciones acuosas para reducir la adhesión tras una cirugía abdominal, en procedimientos

oftálmicos y para la lubricación de articulaciones, pero no se proporciona ningún indicio sobre posibles usos en implantes ortopédicos.

[0019] El artículo "Synthesis of novel graft copolymers of hyaluronan, polietilenglicol and polilactic acid", Pitarresi G. y col, *Macromolecules an Indian Journal*, Vol. 3, Número 2, agosto de 2007, 53 - 56, describe derivados del HA obtenidos injertando en la cadena de HA tanto PLA como polietilenglicol (abreviado PEG), demostrando que estos últimos son menos hidrófobos que los compuestos obtenidos mediante HA y PLA solos.

[0020] La Solicitud de Patente Internacional WO 2005/032417 desvela un recubrimiento producido mediante el uso de una mezcla física de HA con uno o más polímeros biocompatibles, entre ellos PLA, y cargada con un agente antimicrobiano; este documento también desvela el uso de dicha mezcla para producir una película seca cargada con el agente microbiano sobre la superficie de una prótesis, para su subsiguiente implante. Los recubrimientos de prótesis producidos según este documento adolecen sin embargo de al menos dos inconvenientes: en primer lugar, el agente antimicrobiano, por ejemplo, un antibiótico, tiene una vida limitada, por lo que puede no ser completamente eficaz en el momento del implante; en segundo lugar, este procedimiento no permite ajustar el recubrimiento de la prótesis en los requisitos específicos de los diferentes casos, por ejemplo, intolerancias conocidas de un paciente a un antibiótico dado, o la necesidad de adoptar un antibiótico en particular, o un nivel de dosificación específico del mismo, en una situación específica.

[0021] Finalmente, la Solicitud de Patente EP 1666518 A1 desvela portadores de fármacos derivados de un producto de modificación del HA, en los que se han injertado cadenas de poliéster (seleccionadas de entre copolímeros de ácido poliláctico, ácido poliglicólico y ácido láctico-ácido glicólico) en la cadena de base del HA. Según se establece en este documento, y se demuestra en todas las fórmulas proporcionadas en el mismo, el injerto del poliéster en la cadena de HA se produce uniéndolo, bien directamente o bien a través de separadores de diamino o de dihidrazida, a los grupos carboxílicos presentes en las fracciones de ácido glucurónico del HA. De esta forma, al menos parte de los grupos carboxílicos del HA son transformados en grupos amida; dado que los grupos carboxílicos libres son responsables de la hidrofilia del HA, la modificación propuesta en este documento conduce a una reducción en dicha hidrofilia; de hecho, las cadenas modificadas de HA del documento EP 1666518 A1 muestran una tendencia a enroscarse sobre sí mismas, haciendo que estos productos sean adecuados para la producción de micro o nanoesferas usadas como portadores de fármacos inyectables según un aspecto de la invención desvelado en el documento mencionado. Además, las composiciones desveladas en este documento están destinadas y ajustadas a una liberación sostenida del fármaco, durante un periodo mayor de varios días (véase el párrafo [0007] del documento), pero esta característica no es deseable en el campo específico de la ortopedia.

[0022] Existe por tanto una necesidad en el campo de materiales antibacterianos mejorados para su uso en cirugía ortopédica que no adolezcan de los inconvenientes de la técnica anterior.

Sumario de la invención

[0023] Es por lo tanto un objeto de la invención proporcionar un hidrogel que comprende un derivado del ácido hialurónico y un componente antibacteriano con propiedades mejoradas de estabilidad química-mecánica y de liberación del componente antibacteriano, un procedimiento para el uso de dicho hidrogel en cirugía ortopédica y un kit para su uso en dicho procedimiento.

Descripción detallada de la invención

[0024] Según su primer aspecto, la invención proporciona un hidrogel antibacteriano que comprende agua, un derivado del ácido hialurónico y un agente antibacteriano, en el que:

- el derivado del ácido hialurónico comprende ácido hialurónico o una sal del mismo, con un peso molecular comprendido entre 50.000 y 3.500.000 Da en las fracciones de N-acetil-D-glucosamina, en las que se han injertado cadenas de un poliéster biodegradable y biocompatible con un peso molecular comprendido entre 3.000 y 900.000 Da, en una cantidad tal que el derivado comprende entre 1 y 15 de dichas cadenas de poliéster por 100 unidades repetitivas de ácido D-glucurónico / N-acetil-D-glucosamina de ácido hialurónico;
- la concentración del derivado de ácido hialurónico está entre el 1 y el 30 % p/v; y
- el agente antibacteriano se elige de entre antibióticos, iones metálicos antifúngicos y sus combinaciones, y tiene una concentración de entre el 0,001 % y el 80 % p/v.

[0025] Como el hidrogel final se obtiene añadiendo un agente antibacteriano a otro hidrogel, con objeto de distinguirlos, en la siguiente descripción el hidrogel que no contiene el agente antibacteriano se denominará simplemente "hidrogel", mientras que el hidrogel al que se le ha añadido el agente antibacteriano se denominará con el término "hidrogel antibacteriano". Además, todos los porcentajes de la siguiente descripción están expresados como peso/volumen (p/v, lo que indica la masa de soluto en gramos por 100 ml de la disolución o gel resultante), salvo que se especifique de otro modo.

[0026] Los inventores han averiguado que, partiendo de una clase en particular de derivados del HA, es posible producir un hidrogel estable que pueda ser cargado con las cantidades deseadas de un agente antibacteriano, útil para su inyección en fracturas o en cavidades óseas y para la producción de recubrimientos de prótesis a las que se otorga una mezcla de propiedades químicas, mecánicas y de liberación del agente antibacteriano, bien adecuadas para su uso previsto. Aunque el resto de la descripción se realizará con referencia al ácido hialurónico, se entiende que este término también engloba sales del ácido presentes normalmente en un cuerpo humano o animal, tales como sales de Na^+ , K^+ , Mg^{2+} o Ca^{2+} . En particular, los inventores han averiguado que injertando el poliéster biocompatible en las fracciones de N-acetil-D-glucosamina del HA, a través de una reacción con el grupo hidroxilo libre presente en estas fracciones, el derivado del HA conserva su elevada hidrofilia, combinada con unas propiedades de viscosidad y retención de la viscosidad con el tiempo, así como una rápida liberación del agente antibacteriano, lo que hace que estos derivados sean extremadamente bien adecuados para aplicaciones en el campo de la ortopedia. Esto es contrario a la enseñanza del mencionado documento EP 1666518 A1, en el que el injerto de cadenas laterales de poliéster tiene lugar en cambio sobre los grupos de ácido carboxílico, dando lugar a una hidrofilia reducida.

[0027] El principal componente del hidrogel es un derivado del ácido hialurónico obtenido injertando cadenas de poliésteres biodegradables y biocompatibles en una fracción del ácido con un peso molecular en un intervalo en particular.

[0028] La fracción útil del HA que se va a usar como material de partida en la preparación del derivado tiene un peso molecular (MW) comprendido entre aproximadamente 50 kDa y 3,5 MDa, preferiblemente entre 100 kDa y 1,5 MDa, y más preferiblemente de aproximadamente 200 - 300 kDa. El HA con un MW en estos intervalos puede obtenerse mediante la degradación de fracciones superiores del HA en entornos fuertemente ácidos, según se describe en el artículo "Disulfide crosslinked hyaluronan hydrogel", Shu X. Z. y col, Biomacromolecules (200) 3, 1304 - 1311. El material de partida puede obtenerse a partir de fuentes naturales (por ejemplo, crestas de gallos); como alternativa, puede ser producido por microorganismos (según se describe, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. US 4.801.539 y EP 694616) o por vías recombinantes (según se describe, por ejemplo, en las solicitudes de patente WO 03/054163 y WO 2006/069578). También pueden adaptarse vías sintéticas (a partir de microorganismos o de una vía recombinante) para producir el HA ya con el intervalo de MW deseado, que por lo tanto no necesita una etapa de degradación.

[0029] El otro reactivo en la producción del derivado es un poliéster biodegradable y biocompatible o una mezcla de poliésteres o de copolímeros de los mismos. Los poliésteres más interesantes para el propósito de la invención son el ácido poliláctico, el ácido poliglicólico, la policaprolactona (estos últimos también se denominan en el resto de la descripción PGA y PCL, respectivamente), sus mezclas y sus copolímeros. Se ha averiguado que los hidrogeles con las propiedades deseadas pueden prepararse con derivados del HA producidos con poliésteres con un MW en el intervalo de entre 3 - 150 kDa en el caso del PLA, en el intervalo de 1 - 900 kDa en el caso del PGA, y en el intervalo de 3 - 900 kDa en el caso de la PCL o de copolímeros de PLA-PGA (también denominados en lo sucesivo PLGA) o de copolímeros que comprenden PCL. Estos compuestos están disponibles en el mercado, por ejemplo, en Boehringer Ingelheim o en distribuidores de productos químicos, tales como Fluka o Sigma-Aldrich.

[0030] Con objeto de mejorar la reactividad del poliéster, es preferible activar su extremo carboxílico mediante una reacción con un buen grupo saliente, por ejemplo, una imida, preferiblemente N-hidroxisuccinimida (NHS). La formación de estos compuestos de poliéster-NHS se realiza a través de una primera reacción del grupo carboxilo libre del poliéster con diciclohexilcarbodiimida (DCC) y funcionalizándolo después con NHS; la reacción se lleva a cabo, por ejemplo, a temperatura ambiente durante 24 horas.

[0031] Debido al hecho de que el HA es un compuesto fuertemente hidrófilo, mientras que los anteriores poliésteres (incluso cuando son activados con NHS) son hidrófobos, es necesario hacer que uno de los reactivos sea compatible con los disolventes adecuados para el otro reactivo. Según la presente invención, este resultado se obtiene transformando el HA en una sal de amonio, tal como la sal de cetiltrimetilamonio (CTA) o preferiblemente la sal de tetrabutilamonio (TBA). La formación de la sal de amonio puede llevarse a cabo simplemente neutralizando el HA con el hidróxido del catión de amonio. La reacción procede con un rendimiento del 100 %, y el producto resultante es soluble en dimetilsulfóxido (DMSO), en el que también son solubles los poliésteres y sus derivados de NHS. En el caso de que el HA esté disponible en forma de una de sus sales inorgánicas (por ejemplo, la sal sódica, la forma más comercial del HA), es posible pasar en primer lugar a una disolución acuosa del mismo a través de una columna ácida de intercambio iónico, o tratarlo con un ácido, con objeto de recuperar el HA en forma ácida.

[0032] El HA sustituido con amonio y el compuesto de poliéster-NHS se hacen reaccionar entonces en DMSO en presencia de dietilamina (DEA) como catalizador; la reacción tiene lugar, por ejemplo, durante 24 horas a 40 °C. La reacción consiste en la condensación de la función carboxílico del poliéster (activada con NHS) con el grupo hidroxilo de las unidades de N-acetil-D-glucosamina del HA. La proporción entre las unidades de N-acetil-D-glucosamina en las que se va a injertar la cadena de poliéster y el número total de dichas unidades presentes en el HA se define en la presente invención como "grado de derivatización". Los inventores han averiguado que los hidrogeles con las propiedades deseadas pueden producirse con derivados del HA en los que dicho grado de derivatización está comprendido entre el 1 y el 15 %.

- 5 **[0033]** Las propiedades (en particular la hidrofilia y las características anti-ensuciamiento) del derivado del HA pueden modularse adicionalmente mediante una segunda derivatización, en la que una parte de los grupos carboxilo del ácido D-glucurónico del HA son funcionalizados con cadenas de polietilenglicol (PEG). Se sabe que el PEG es un polímero biocompatible (está aprobado por la FDA) y se usa ampliamente en el ámbito farmacéutico tanto para la preparación de formas de dosificación convencionales como para innovadores sistemas de liberación. Los mejores resultados finales se obtienen cuando el PEG empleado tiene un MW entre 400 Da y 20 kDa, preferiblemente de aproximadamente 5 kDa, y el grado de derivatización del HA con el PEG (a saber, la proporción entre las unidades de ácido D-glucurónico derivatizadas con PEG y el número total de dichas unidades en el HA) está comprendida entre el 5 y el 20 %.
- 10 **[0034]** El PEG está preferiblemente pre-activado, para mejorar su reactividad, mediante el intercambio del grupo OH libre en un extremo del mismo por $-NH_2$ (PEG- NH_2); este último compuesto también está disponible comercialmente. El PEG- NH_2 es añadido en DMSO al producto de la reacción del HA sustituido con amonio y el poliéster-NHS, después de que el último haya sido aislado mediante la precipitación de la mezcla de reacción con un disolvente no polar (por ejemplo, éter dietílico), una filtración y un lavado repetido con acetona para eliminar cualquier poliéster-NHS sin reaccionar.
- 15 **[0035]** Los derivados del HA así obtenidos (con o sin PEG) se purifican entonces mediante un medio conocido por el experto en la técnica, por ejemplo, diálisis y liofilización, y se someten posiblemente a un intercambio iónico de los iones amonio por iones de Na^+ o K^+ , más compatibles con el uso previsto.
- 20 **[0036]** Entonces el derivado del HA se añade a agua (normalmente agua bidestilada, una disolución de NaOH con una concentración de entre 0,075 y 0,75 M, o una disolución fisiológica), en una cantidad tal que su concentración en el hidrogel resultante, antes de la adición del agente antibacteriano, esté comprendida entre el 1 y el 35 % p/v, preferiblemente entre el 2 y el 10 % p/v. Operando como se ha descrito hasta ahora, todas las concentraciones del derivado del HA entre el 1 y el 35 % p/v proporcionan geles viscosos uniformes y transparentes. Estos hidrogeles son estables durante largos períodos y pueden ser almacenados durante al menos seis meses incluso a temperatura ambiente sin que se alteren sus propiedades, en particular su viscosidad.
- 25 **[0037]** La etapa final en la preparación del hidrogel antibacteriano de la invención es la adición de uno o más agente(s) antibacteriano(s) elegido(s) de entre antibiótico(s), antifúngico(s) e ión(es) metálico(s) conocido(s), en una cantidad tal que su concentración en el hidrogel antibacteriano esté comprendida entre el 0,001 % y el 80 % p/v.
- 30 **[0038]** Algunos ejemplos de antibióticos adecuados son daptomicina, tigeciclina, telavancina, cloranfenicol, ácido fusídico, bacitracina, rifampina, etambutol, estreptomina, isoniazida, y todos aquellos comprendidos en las siguientes familias antibacterianas: glucopéptidos (incluyendo, pero no se limitan a, teicoplanina, vancomicina, etc.), aminoglucósidos (incluyendo pero no se limita a, gentamicina, tobramicina, ampicacina, netimicina, etc.), cefalosporinas (incluyendo, pero no se limitan a, cefazolina, cefoxitina, cefotaxima, cefuroxima, moxalactama, etc.), macrólidos (incluyendo, pero no se limitan a, eritromicina), oxazolidinonas (incluyendo, pero no se limitan a, linezolid), quinolonas, polimixinas, sulfonamidas, tetraciclinas y penicilinas.
- 35 **[0039]** Los antifúngicos útiles son aquellos comprendidos en las siguientes familias: antifúngicos de polieno, antifúngicos de imidazol y de triazol, alilaminas, equinocandinas, griseofulvina.
- 40 **[0040]** Algunos ejemplos de metales cuyos iones tienen actividad antibacteriana son formulaciones de plata y de nanoplata, cinc, cobre, cobalto, níquel.
- 45 **[0041]** En el caso de los metales, éstos deben ser añadidos al hidrogel directamente durante la etapa previa de adición de agua al derivado del HA, en forma de sus sales solubles en agua, cuyos aniones son biocompatibles, tales como los nitratos.
- 50 **[0042]** Por otro lado, los antibióticos se añaden preferiblemente al hidrogel poco antes de su uso: esto proporciona varias ventajas a la presente invención en comparación con los sistemas conocidos, ya que es posible añadir el antibiótico únicamente en el momento en el que se necesita, evitando por lo tanto los problemas de la vida de almacenamiento de las prótesis tratadas del documento WO 2005/032417; además, es posible elegir el antibiótico óptimo en cada caso específico, teniendo en cuenta la especificidad del paciente; finalmente, es posible decidir la dosis del agente antibacteriano en cada caso individual (estando presente esta ventaja también en el caso de los iones metálicos).
- 55 **[0043]** Los hidrogeles antibacterianos de la invención tienen una velocidad de reabsorción en el cuerpo tal que la liberación del agente antibacteriano siempre dura al menos 6 horas después de la intervención ortopédica, que son las más críticas desde punto de vista del ataque bacteriano; a menudo, la liberación del agente antibacteriano se prolonga durante 48 - 72 horas, de forma que cubra los primeros días posteriores a dicha intervención.
- 60 **[0044]** En su segundo aspecto, la invención proporciona un procedimiento para el uso del hidrogel antibacteriano descrito previamente en cirugía ortopédica.
- 65

[0045] Según el procedimiento, el hidrogel antibacteriano se produce mezclando el hidrogel del derivado del HA con el agente antibacteriano elegido en la proporción deseada; y se aplica a la superficie de una prótesis que va ser implantada. La aplicación del hidrogel antibacteriano sobre la prótesis puede realizarse mediante varios procedimientos, tales como la inmersión de la prótesis en el hidrogel, mediante pulverización, extensión, cepillado y similares.

[0046] En su último aspecto, la invención es sobre un kit para su uso en el procedimiento desvelado anteriormente. El kit está formado por dos composiciones, siendo la primera el hidrogel formado por el derivado del HA y agua, siendo la segunda el agente antibacteriano o una disolución o una suspensión en un medio adecuado del agente antibacteriano.

[0047] El hidrogel antibacteriano tiene una concentración del derivado del HA comprendida entre el 1 y el 30 % p/v, preferiblemente entre el 2 y el 10 % p/v, y una concentración del agente antibacteriano comprendida entre el 0,001 % y el 80 % p/v, preferiblemente entre el 1 y el 10 % p/v. Para obtener estas concentraciones finales, las dos composiciones que forman el kit pueden tener unas concentraciones en unos intervalos amplios y mezclas en diferentes proporciones, como apreciará el técnico experto. En los casos más habituales, el volumen de la composición del derivado del HA usado es mayor que el volumen de la disolución del agente antibacteriano; por esta razón, la concentración de la composición de partida del derivado del HA será próxima a la concentración del mismo derivado en el hidrogel antibacteriano, y está comprendida entre el 1 y el 35 % p/v, preferiblemente del 2 - 10 % p/v. Por el contrario, la concentración de la composición de partida de agente antibacteriano puede diferir ampliamente de la concentración de dicho agente en el hidrogel antibacteriano (puede ser incluso del 100 % en el caso de que dicha segunda composición sea el agente antibacteriano en forma pura).

[0048] Según las formas de realización habituales de la invención, en la preparación del hidrogel antibacteriano se mezclan la disolución del derivado del HA y el agente antibacteriano en una proporción de volumen comprendida entre 20:1 y 1:1, preferiblemente entre 10:1 y 1,5:1. Para evitar que partes del hidrogel antibacteriano no estén lo suficientemente cargadas con fármaco, la mezcla formada por las dos composiciones se homogeneiza preferiblemente mediante agitación o mezcla, que puede realizarse simplemente manualmente o con un medio automático.

[0049] El kit de la invención hace posible que el cirujano decida la carga real del agente antibacteriano en el hidrogel antibacteriano, tanto la naturaleza de dicho agente como su concentración, justo antes o incluso durante la intervención quirúrgica, permitiendo el mejor ajuste del material de inyección antibacteriano o del recubrimiento sobre la prótesis, según las necesidades específicas de los pacientes (por ejemplo, intolerancias conocidas a agentes antibacterianos específicos) o de la intervención específica. Por ejemplo, se han obtenido buenos resultados combinando las composiciones del derivado del HA a una concentración de aproximadamente el 5 % p/v con composiciones antibacterianas que contienen vancomicina a una concentración de entre el 10 y el 20 % p/v en una proporción en volumen de aproximadamente 9:1; o, combinando composiciones del derivado del HA a una concentración del 7,5 % p/v con composiciones antibacterianas que contienen tobramicina a una concentración de aproximadamente el 5 % p/v en una proporción en volumen de aproximadamente 4:1.

[0050] La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, destinados a ayudar a comprender la invención y que no deben interpretarse como específicamente limitantes de la invención descrita y reivindicada en este documento.

[0051] En los ejemplos se han usado los siguientes materiales y equipos:

Materiales:

[0052] La sal sódica del ácido hialurónico (MW de 1.500 kDa), la vancomicina, la tobramicina y las prótesis de titanio recubiertas con hidroxiapatito han sido proporcionados por NOVAGENIT s.r.l. (Milán, Italia). El ácido D,L-poliláctico (PLA) (MW de 8 kDa) es vendido por Bidachem-Boeringher Ingelheim (Milán, Italia) con el nombre RESOMER R 202. La N,N'-díciclohexilcarbodiimida (DCC), la N-hidroxisuccinimida (NHS), el hidróxido de tetrabutilamonio (TBA-OH), el ácido clorhídrico, la disolución salina de Dulbecco tamponada con fosfato (DPBS a pH 7,4) y la disolución del reactivo en o-ftaldialdehído (OPA) se adquirieron en Sigma Aldrich (Milán, Italia). La resina de intercambio catiónico Dowex 50Wx8-200, la dietilamina (DEA), el dimetilsulfóxido anhidro (DMSO) y el O-2-aminoetil-O'-metilpolietilenglicol 5000 (PEG-NH₂) se obtuvieron en Fluka (Milán, Italia).

Equipos:

[0053] Los espectros de RMN-¹H se obtuvieron con un instrumento Bruker AC-300. El análisis cromatográfico de alta resolución (HPLC) se realizó usando un cromatógrafo de líquidos Agilent 1100 Series equipado con un inyector Agilent 7725i (provisto de un serpentín de 20 µl) y con un detector UV Agilent 1100 series de longitud de onda variable conectado con una estación informatizada. La columna cromatográfica era una Agilent Zorbax Eclipse XDB C8 de fase inversa con un diámetro interno de 46 mm x 150 mm producida por Agilent. Para evaluar la liberación de vancomicina, la fase móvil usada era dihidrogenofosfato potásico 5 mM a pH 2,8 / acetonitrilo (96:4), caudal de 1

ml/min; el eluido procedente de la columna se determinó a una longitud de onda de 280 nm. Para evaluar la liberación de tobramicina, la fase móvil usada era fosfato 0,02 M a pH 6,5 / acetonitrilo 52:48, caudal de 1 ml/min; como la tobramicina no absorbe la luz ultravioleta, se realizó una reacción entre la muestra que se iba analizar y el reactivo OPA; el eluido procedente de la columna se determinó a una longitud de onda de 254 nm. Los espectros de FT-IR se registraron en forma de discos de KBr en el intervalo de 4.000 - 400 cm^{-1} usando un espectrofotómetro Perkin Elmer 1720 y una transformada de Fourier, con una resolución de 1 cm^{-1} ; cada espectro se registró después de 100 barridos. El análisis de SEC se realizó usando un sistema multidetector SEC equipado con una bomba Water 600, un medidor del índice de refracción Water 410 y una columna lineal proporcionados por Water (tamaño de partícula de 5 μm). La curva de calibración se determinó usando estándares de ácido hialurónico adquiridos en Hyalose (EE.UU.). Las condiciones de dilución eran las siguientes: tampón de fosfato 200 mM (pH 6,5) / MeOH 90:10 (v/v), caudal de 0,6 ml/min, a una temperatura de 35 °C.

EJEMPLO 1

15 **[0054]** Este ejemplo es sobre la formación de la sal de tetrabutilamonio del HA (HA-TBA).

[0055] Se disuelve 1 g de HA con un peso molecular 1.500 kDa en 100 ml de una disolución de HCl con un pH de 0,5, y se dejan reaccionar a 37 °C durante 24 horas. El producto resultante tiene un MW medio de 230 kDa, según se determina mediante un análisis por SEC. A este producto se añade hidróxido de tetrabutilamonio (TBA-OH) hasta que se alcanza un pH de 7; entonces la mezcla de reacción se somete a una diálisis exhaustiva.

[0056] La sal resultante de HA-TBA se recupera mediante liofilización y se caracteriza mediante un análisis por RMN- ^1H (D_2O) que confirma que ha tenido lugar el intercambio con TBA con un rendimiento del 100 %. El espectro de RMN- ^1H (D_2O) del HA-TBA muestra señales a: δ 0,97 (m, 12 H, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3)_4$); δ 1,40 (m, 8H, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3)_4$); δ 1,64 (m, 8H, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3)_4$); δ 2,04 (s, 3H, -NH-CO-CH $_3$); δ 3,82 (m, 8H, $\text{N}^+(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3)_4$).

EJEMPLO 2

30 **[0057]** Este ejemplo es sobre la activación de un poliéster (PLA) con NHS.

[0058] La síntesis se realiza siguiendo la ruta sintética del derivado del ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) descrita en el artículo "Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles", Yoo H. S. y col, Journal of Controlled Release, (2004) 96: 273 - 283.

[0059] Se disuelven 2,4 g de PLA con un MW medio de 8 kDa en 30 ml de diclorometano. A esta disolución se añaden en primer lugar 0,25 g del agente de condensación dicitohexilcarbodiimida (DCC), y después 0,14 g de NHS, dejando que la reacción transcurra a temperatura ambiente durante 24 horas. Después de este periodo, la mezcla de reacción se concentra mediante la evaporación parcial del diclorometano y el producto se precipita en etanol y se lava repetidamente con el mismo disolvente. El sólido obtenido se filtra después y se seca a vacío. Se obtiene un sólido cristalino de color blanco con un rendimiento que supera el 80 % en peso sobre la cantidad de partida de PLA. El espectro de RMN- ^1H confirma que ha tenido lugar la activación del grupo carboxilo del PLA con la N-hidroxisuccinimida. El rendimiento de la derivatización, expresado como la proporción de moles unidos de NHS con respecto a los moles de una cadena individual de PLA, es del 90 %.

[0060] El espectro de RMN- ^1H del producto PLA-NHS (CDCl_3) muestra señales a: δ 1,5 y δ 1,6 (d, 3H, -O-CO-CH(CH $_3$)-OH); δ , 3H, O-CO-CH(CH $_3$)-O-), δ 2,80 (m, 4H, -OC-CH $_2$ -CH $_2$ -CO-); δ 4,3 y δ 5,2 (m, 1H, -O-CO-CH(CH $_3$)-OH); m, 1H, -O-CO-CH(CH $_3$)-O-).

EJEMPLO 3

50 **[0061]** Este ejemplo es sobre la síntesis de derivados del HA-PLA.

[0062] El HA-TBA preparado según se describió en el Ejemplo 1 y el PLA-NHS preparado según se describió en el Ejemplo 2 se hacen reaccionar en tres proporciones diferentes, para obtener productos de PLA con diferentes grados de derivatización. Se obtienen tres disoluciones de HA-TBA de la misma concentración disolviendo para disolución 600 mg de HA-TBA en 48 ml de DMSO anhidro en presencia de 576 μl del catalizador dietilamina (DEA). Por separado se preparan tres disoluciones de diferentes concentraciones de PLA-NHS disolviendo, respectivamente, 1,5, 3,6 y 7,2 g de PLA-NHS en 6 ml de DMSO anhidro. Las tres disoluciones de PLA-NHS se añaden a gota a gota durante un periodo de una hora a las disoluciones de HA-TBA; la proporción nominal entre los moles de PLA-NHS y los moles de las unidades de N-acetil-D-glucosamina del HA en las tres mezclas de reacción es de 0,2, 0,5 y 1,0, respectivamente. Los tres diferentes derivados se denominan como los siguientes HA-PLA $_{(A)}$, HA-PLA $_{(B)}$ y HA-PLA $_{(C)}$.

65 **[0063]** Después de 24 horas en una atmósfera de argón anhidro a 40 °C, cada mezcla de reacción se hace pasar

a través de una resina de intercambio sódico a Dowex para intercambiar el TBA por Na⁺. Entonces el eluido se pone en diálisis frente a agua destilada para eliminar el DMSO, después se congela y se seca mediante liofilización. El sólido se lava repetidamente con acetona y se seca de nuevo.

5 **[0064]** El espectro de FT-IR de los derivados de HA-PLA obtenidos muestra una banda a 3.540 cm⁻¹ (ν_{as} OH + ν_{as} NH del HA), bandas a 1.757 cm⁻¹ (ν_{as} COO del PLA), 1.623 cm⁻¹ (amida I del HA), 1.456 cm⁻¹ (ν_{as}, CH₃ del PLA), 1.382 cm⁻¹ (ν_s CH₃ del PLA), 1.189 cm⁻¹ (ν_s C-O-C de los grupos éster del PLA), 1.089 cm⁻¹ y 1.048 cm⁻¹ (ν C-O alcohólico y etérico del HA).

10 **[0065]** El espectro de RMN-¹H de los derivados obtenidos de HA_{LMW}-PLA (DMSO-d₆ / D₂O, 90:10) muestra: δ 1,25 y δ 1,45 (2d, -O-CO-CH(CH₃)-O- del PLA); δ 1,85 (s, 3H, -NH-CO-CH₃ del HA) δ 5,1 ppm (m, -O-CO-CH(CH₃)- del PLA).

15 **[0066]** El grado de derivatización (DD, en %) en el PLA de los derivados de HA-PLA se calcula evaluando el número de cadenas de PLA a partir de las integrales de los dos picos relativos a los protones a δ 1,25 y a δ 1,45 (atribuibles a los grupos metilo de la cadena de PLA) y el número de N-acetil-D-glucosamina presentes en el HA a partir de la integral relativa a los protones a δ 1,85, atribuible al grupo -NHCOCH₃, y aplicando después la fórmula:

$$DD = (\text{n}^\circ \text{ de moles PLA} / \text{n}^\circ \text{ de moles de unidades de glucosamina}) \times 100$$

20 **[0067]** Los resultados del grado de derivatización para las tres mezclas de reacción diferentes son según se proporcionan en la Tabla 1:

Tabla 1

Muestra	DD (en %) en el PLA
HA-PLA _(A)	2,7
HA-PLA _(B)	3,5
HA-PLA _(C)	7

25 **EJEMPLO 4**

[0068] Este ejemplo es sobre la síntesis de derivados del PEG-HA-PLA.

30 **[0069]** Se repite la preparación de los derivados de HA-PLA descrita en el Ejemplo 3, con las diferencias de que en este caso se usan tres disoluciones obtenidas disolviendo en 6 ml de DMSO anhidro, respectivamente, 5,2, 7,2 y 14,0 g de PLA-NHS (correspondientes a las proporciones nominales entre los moles de PLA-NHS y los moles de unidades de N-acetil-D-glucosamina de HA de 0,7, 1,0 y 2,0, respectivamente), y que no se realiza el intercambio de los iones de TBA al final de la reacción. El producto sólido obtenido se recupera mediante filtración y se lava repetidamente con acetona, y el producto se seca a vacío.

35 **[0070]** Se disuelven 300 mg de cada producto de HA-PLA preparado mediante el uso de 5,2, 7,2 y 14,0 g de PLA-NHS en 24 ml de DMSO anhidro en argón, obteniéndose tres disoluciones. Individualmente se preparan tres disoluciones de diferentes concentraciones de PEG-NH₂, obtenidas mediante la disolución en 6 ml de DMSO anhidro, respectivamente, de 0,42, 0,43 y 0,84 g de PEG-NH₂ con un peso molecular medio de 5.000 Da. A cada una de las tres disoluciones se añade gota a gota una disolución. Las tres disoluciones de PEG-NH₂ se añaden gota a gota a las disoluciones de HA-PLA, con la condición de que las disoluciones de PEG-NH₂ de mayor concentración se añadan a las disoluciones de los productos de HA-PLA obtenidos con mayor cantidad de PLA-NHS. La reacción se realiza en presencia de DCC y se añaden activadores de NHS en cantidades equimolares a las del PEG-NH₂ usado. Después de 24 horas a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se lleva a 5 °C durante 10 min para facilitar la precipitación de la dicitohexilurea (DCU) formada, que después se elimina de la mezcla de reacción mediante filtración. Posteriormente, la mezcla de reacción filtrada se eluye en una resina sódica Dowex 50W x 8-200 para eliminar el TBA y el eluido se dializa frente a agua usando una membrana de diálisis Spectra/por Tubing con un corte de 3,5 kDa, para eliminar completamente el DMSO. El producto recuperado tras la liofilización se disuelve en agua y se eluye en una resina ácida Dowex 50W x 8-200; el eluido se purificó finalmente mediante una diálisis frente a unas disoluciones concentradas de NaCl (al 5 % p/v) durante tres días y frente a agua bidestilada durante los últimos dos días, usando una membrana de diálisis Spectra/por Tubing de 12.000 / 14.000 Da. La disolución se seca finalmente mediante liofilización, y el derivado obtenido de PEG-HA-PLA muestra los siguientes datos tras un análisis de RMN-¹H [THF-d₈ / D₂O, 1/1]: δ 1,4 y 1,6 [2d, 3H, -O-CO-CH(CH₃)-O- del PLA], δ 2,1 (s, 3H, -NH-CO-CH₃ del HA), δ 4,0 (m, 4H, -CH₂-CH₂- del PEG), δ 5,40 [m, 1 H, -O-COCH(CH₃)- del PLA].

55 **[0071]** Los tres diferentes derivados se denominan como los siguientes PEG-HA-PLA_(D), PEG-HA-PLA_(E) y PEG-HA-PLA_(F). El grado de derivatización (DD, en %) en el PEG de los derivados de PEG-HA-PLA se obtiene

comparando las integrales de los dos picos relativas a los protones atribuibles a la porción de $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ del PEG- NH_2 (δ 4,0), con la integral relativa a los protones (δ 2,1) atribuible al grupo $-\text{NHCOCH}_3$ perteneciente a los residuos de N-acetilglucosamina del HA, y aplicando después la fórmula:

$$5 \quad \text{DD} = (\text{n}^\circ \text{ de moles PEG} / \text{n}^\circ \text{ de moles de unidades de glucosamina}) \times 100$$

[0072] Los resultados del grado de derivatización para las tres mezclas de reacción diferentes son según se proporcionan en la Tabla 2:

10

Tabla 2

Muestra	DD (en %) en PLA	DD (en %) en PEG
PEG-HA-PLA _(D)	5	9
PEG-HA-PLA _(E)	7,2	9
PEG-HA-PLA _(F)	13,9	17,9

EJEMPLO 5

15

[0073] Este ejemplo describe la preparación de hidrogeles a partir de un derivado del HA de la invención, la incorporación de un antibiótico en dicho hidrogel y el uso de este último para recubrir una serie de muestras de un material usado para la elaboración de prótesis, y muestra los resultados de la liberación de antibiótico desde dichos recubrimientos.

20

[0074] Se produce un hidrogel con el derivado HA-PLA_(B) preparado según se describió en el ejemplo 3, dispersando 40 mg del derivado de partida HA-PLA_(B) en 0,9 ml de agua estéril (bidestilada) hasta que se forma un gel viscoso transparente. Por separado se prepara una disolución disolviendo 10 mg del conocido antibiótico vancomicina (en forma de un polvo para disoluciones de infusión intravenosa) en 0,1 ml de agua estéril y agitando el sistema hasta que la disolución se vuelve transparente; la disolución resultante de vancomicina tiene una concentración del 10 % p/v. Entonces se añaden 0,1 ml de la disolución de vancomicina al hidrogel de HA-PLA_(B), y la mezcla se agita durante unos pocos minutos para facilitar la incorporación del fármaco en el gel. El hidrogel antibacteriano así obtenido tiene una concentración del 4 % p/v del derivado del HA-PLA_(B), y del 1 % p/v de vancomicina. Este hidrogel antibacteriano se disemina después manualmente con un espátula para recubrir uniformemente la superficie completa de tres muestras iguales de titanio, teniendo cada una la forma de un disco circular con una superficie de aproximadamente 1 cm²; las tres muestras se pesan después de haber sido recubiertas con el hidrogel antibacteriano, de forma que la cantidad inicial de antibiótico cargado en cualquier muestra es conocida. Las muestras así preparadas se introducen entonces en tres vasos de precipitados por separado, que contienen cada uno 6 ml de DPBS a pH 7,4; la temperatura se mantiene a 37 °C a lo largo de la prueba. En momentos preestablecidos (en el intervalo de 2 - 96 horas), se toma una muestra de 1 ml de la disolución sobrenadante de cada disco y se determina la cantidad de fármaco liberado contenida en la misma mediante un análisis por HPLC (después de cada toma de muestra se restablece el volumen del sobrenadante de la disolución mediante la adición de un volumen de una disolución reciente de DPBS equivalente al volumen retirado con la muestra). Los resultados de la prueba de liberación se proporcionan en la Tabla 3, tanto como concentración media (con una indicación de la desviación estándar) del antibiótico en disolución (en mg/l) en un momento de muestreo dado, como cantidad acumulativa (en %) de antibiótico liberado con el tiempo con respecto a la cantidad inicial.

40

Tabla 3

Momento de muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (carga de vancomicina = 1 % p/v)	
	mg/l	%
2	316 ± 16	63
4	448 ± 23	89
24	470 ± 20	93
48	501 ± 16	100

45

[0075] Los resultados de la Tabla 3 muestran que el hidrogel antibacteriano producido según se ha descrito tarda aproximadamente 48 horas en liberar completamente el antibiótico; la siguiente tabla (Tabla 4) muestra la cantidad de antibiótico liberado por este hidrogel antibacteriano en los intervalos temporales transcurridos entre cada dos muestreos sucesivos:

Tabla 4

Intervalo entre muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (mg/l)
0 - 2	316
2 - 4	132
4 - 24	22
24 - 48	31

EJEMPLO 6

- 5 **[0076]** Se repitió el procedimiento del Ejemplo 5, usando en este caso una disolución de vancomicina preparada mediante la disolución de 20 mg del antibiótico en 0,1 ml de agua estéril, duplicando así la carga de vancomicina en el hidrogel antibacteriano. Los resultados de la liberación del antibiótico con el tiempo se presentan en la Tabla 5:

Tabla 5

Momento de muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (carga de vancomicina = 2 % p/v)	
	mg/l	%
2	478 ± 16,6	80
4	520 ± 9,0	87
24	593 ± 16,0	100

10

- [0077]** La cantidad de antibiótico liberada en los intervalos entre muestreos sucesivos se proporcionan en este caso en la tabla 6.

Tabla 6

Intervalo entre muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (mg/l)
0 - 2	478
2 - 4	42
4 - 24	73

15

EJEMPLO 7

- 20 **[0078]** Se repitió el Ejemplo 5, usando en este caso una disolución de NaOH en lugar de agua bidestilada para la preparación del hidrogel que contiene el HA-PLA_(B); esto se realiza con objeto de modificar cada grupo carboxílico del HA por la correspondiente sal de Na⁺, ya que ésta se une mejor al antibiótico (presente en forma de clorhidrato), prolongando así el periodo de liberación del mismo. Los resultados de la liberación del antibiótico con el tiempo para este hidrogel antibacteriano se presentan en la Tabla 7:

Tabla 7

Momento de muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (carga de vancomicina = 1 % p/v)	
	mg/l	%
2	165 ± 16	54,5
4	203 ± 3	67,5
24	275 ± 7	91
48	288 ± 5	95
72	301 ± 2	100

25

- [0079]** La cantidad de antibiótico liberada en los intervalos entre muestreos sucesivos para estas tres muestras se proporcionan en la tabla 8:

Tabla 8

Intervalo entre muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (mg/l)
0 - 2	165
2 - 4	38
4 - 24	72
24 - 48	13
48 - 72	13

EJEMPLO 8

- 5 **[0080]** Se repitió el Ejemplo 7, cargando en este caso el hidrogel con un 2 % p/v de vancomicina. Los resultados de la liberación del antibiótico para las tres muestras se proporcionan en la Tabla 9:

Tabla 9

Momento de muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (carga de vancomicina = 2 % p/v)	
	mg/l	%
2	380 ± 45	50
4	601 ± 9	73
24	643 ± 10	84,6
48	756 ± 16	100

- 10 **[0081]** Las cantidades de antibiótico liberadas en los intervalos entre muestreos sucesivos en este caso se proporcionan en la tabla 10:

Tabla 10

Intervalo entre muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (mg/l)
0 - 2	380
2 - 4	221
4 - 24	42
24 - 48	113

15 **EJEMPLO 9**

[0082] Se repitió el Ejemplo 8, con un hidrogel antibacteriano con una concentración de HA-PLA_(B) igual al 10 % p/v en lugar del 4 % p/v. Los resultados de la liberación del antibiótico con el tiempo para las tres muestras se indican en la Tabla 11:

20

Tabla 11

Momento de muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (carga de vancomicina = 2 % p/v)	
	mg/l	%
2	305 ± 16	47
4	433 ± 10	67
24	562 ± 25	87
48	640 ± 9	100

EJEMPLO 10

- 25 **[0083]** Se repitió el Ejemplo 5, usando en este caso el derivado HA-PLA_(C) preparado según se describió en el ejemplo 3. Se prepararon y se ensayaron dos hidrogeles antibacterianos, con una concentración igual al 4 % y al 6 % p/v del derivado del HA, respectivamente. Los resultados de la liberación del antibiótico se indican en la Tabla 12:

Tabla 12

Momento de muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (carga de vancomicina = 1 % p/v)			
	4 % p/v de HA-PLA _(C)		6 % p/v de HA-PLA _(C)	
	mg/l	%	mg/l	%
2	288 ± 5	72	203 ± 1	66
4	310 ± 0,8	78	255 ± 17	83
24	860 ± 18	91	296 ± 0,5	97
48	395 ± 4	100	298 ± 3,5	98
72	/	/	305 ± 3,5	100

5 **[0084]** La cantidad de antibiótico liberada en los intervalos entre muestras sucesivas para tres muestras preparadas con un 6 % p/v de HA-PLA_(C) se proporcionan en la tabla 13:

Tabla 13

Intervalo entre muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (mg/l)
0 - 2	203
2 - 4	52
4 - 24	41
24 - 48	2
48 - 72	7

EJEMPLO 11

10 **[0085]** Se repitió el Ejemplo 10 con un hidrogel antibacteriano que contiene HA-PLA_(C) a una concentración del 6 % p/v y vancomicina a una concentración del 2 %. Los resultados de la liberación del antibiótico se indican en la Tabla 14:

15

Tabla 14

Momento de muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (carga de vancomicina = 2 % p/v)	
	mg/l	%
2	299 ± 7	59
4	376 ± 9	74,3
24	482 ± 10	95,3
48	518 ± 8	100

[0086] Las cantidades de antibiótico liberadas en los intervalos entre muestras sucesivas se proporcionan en este caso en la tabla 15:

20

Tabla 15

Intervalo entre muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (mg/l)
0 - 2	299
2 - 4	77
4 - 24	106
24 - 48	36

EJEMPLO 12

[0087] Se repitió el Ejemplo 9, usando en este caso el HA-PLA_(C) en lugar del HA-PLA_(B) para la preparación del hidrogel. Los resultados de la liberación de antibiótico con el tiempo para este hidrogel antibacteriano se indican en la Tabla 16:

5

Tabla 16

Momento de muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (carga de vancomicina = 2 % p/v)	
	mg/l	%
2	350 ± 2	56,2
4	443 ± 12	73
24	530 ± 16	87
48	618 ± 7	99
72	632 ± 5	100

[0088] Las cantidades de antibiótico liberadas en los intervalos entre muestras sucesivas se proporcionan en este caso en la tabla 17:

10

Tabla 17

Intervalo entre muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (mg/l)
0 - 2	350
2 - 4	93
4 - 24	87
24 - 48	88
48 - 72	14

EJEMPLO 13

15

[0089] Este ejemplo es sobre la liberación de un antibiótico desde un hidrogel antibacteriano preparado con un derivado del HA obtenido injertando en la cadena de HA tanto un poliéster como PEG.

[0090] Se repitió el Ejemplo 5, usando el derivado PEG-HA-PLA_(D) preparado según se describió en el Ejemplo 4; sólo se ensaya el hidrogel antibacteriano a una concentración del 4 % p/v del derivado del HA. Los resultados de la liberación del antibiótico con el tiempo para tres muestras preparadas con este hidrogel antibacteriano se indican en la Tabla 18:

20

Tabla 18

Momento de muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (carga de vancomicina = 1 % p/v)	
	mg/l	%
2	212 ± 12	55
4	303 ± 3	80
24	340 ± 7	89
48	353 ± 4	93
72	379 ± 2	100

25

[0091] Las cantidades de antibiótico liberadas en los intervalos entre muestras sucesivas se proporcionan en este caso en la tabla 19:

Tabla 19

Intervalo entre muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (mg/l)
0 - 2	212
2 - 4	91
4 - 24	37
24 - 48	13
48 - 72	26

EJEMPLO 14

5

[0092] Se repitió el Ejemplo 13 usando un hidrogel antibacteriano con una concentración de vancomicina del 2 % p/v. Los resultados de la liberación del antibiótico con el tiempo para este hidrogel antibacteriano se indican en la Tabla 20:

10

Tabla 20

Momento de muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (carga de vancomicina = 2 % p/v)	
	mg/l	%
2	416 ± 5	54,1
4	614 ± 26	79
24	698 ± 15	89,9
48	720 ± 8	92
72	778 ± 10	100

[0093] Las cantidades de antibiótico liberadas en los intervalos entre muestras sucesivas para estas tres muestras se proporcionan en la tabla 21:

15

Tabla 21

Intervalo entre muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (mg/l)
0 - 2	416
2 - 4	198
4 - 24	84
24 - 48	22
48 - 72	58

EJEMPLO 15

20

[0094] Este ejemplo es sobre la liberación de un antibiótico desde un hidrogel antibacteriano preparado con un derivado del HA obtenido injertando un poliéster en un HA con un peso molecular mayor que el usado en los ejemplos previos.

25

[0095] Se repitió el procedimiento del Ejemplo 1, usando sin embargo como material de partida la sal sódica del HA con un MW de 1.500 kDa, no sometida previamente a una degradación en HCl. La sal de HA-TBA así producida se hace reaccionar con el PLA-NHS según se describe en el Ejemplo 3, con una proporción molar nominal entre el PLA-NHS y las unidades de N-acetil-D-glucosamina igual a 1,5; el grado de derivatización resultante es del 7 %. Este derivado, denominado HA-PLA_(G), se diluye después con agua bidestilada y se le añade una disolución de vancomicina, para obtener un hidrogel antibacteriano con una concentración de HA-PLA_(G) del 10 % p/v y con una concentración de vancomicina del 2 % p/v. Este hidrogel antibacteriano se usa para recubrir un disco de titanio que después se somete a una prueba de liberación de fármaco según se describe en el Ejemplo 5. Los resultados de la prueba se proporcionan en la Tabla 22:

30

Tabla 22

Momento de muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (carga de vancomicina = 2 % p/v)	
	mg/l	%
2	496 ± 5	80
4	508 ± 2	82
24	578 ± 1	93
48	611 ± 2	98
72	618 ± 12	100

[0096] Las cantidades de antibiótico liberadas en los intervalos entre muestras sucesivas para estas tres muestras se proporcionan en la tabla 23:

5

Tabla 23

Intervalo entre muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (mg/l)
0 - 2	496
2 - 4	12
4 - 24	70
24 - 48	33
48 - 72	7

EJEMPLO 16

10 **[0097]** Este ejemplo es sobre la liberación de otro antibiótico desde un hidrogel antibacteriano de la invención.

[0098] Se repitió un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 6, usando en este caso tobramicina en lugar de vancomicina para la preparación del hidrogel antibacteriano; sólo se ensaya el hidrogel antibacteriano a una concentración del 4 % p/v del derivado de HA.

15

[0099] El HA-PLA_(B) preparado como en el Ejemplo 3 se disuelve en agua bidestilada para obtener una disolución con una concentración del 6,67 % p/v. Se mezclan 0,6 ml de esta disolución con 0,4 ml de una disolución comercial de tobramicina con una concentración de 50 mg/ml, obteniendo un hidrogel antibacteriano con una concentración del 4 % p/v del HA-PLA_(B) y un 2 % p/v de tobramicina. Se recubren discos de titanio como en los ejemplos previos con este hidrogel antibacteriano. Los resultados de la liberación del antibiótico con el tiempo para estas tres muestras se indican en la Tabla 24:

20

Tabla 24

Momento de muestreo (horas)	Liberación de tobramicina (carga de tobramicina = 2 % p/v)	
	mg/l	%
2	332 ± 5	54
4	567 ± 10	92,6
24	606 ± 2	99
48	609 ± 2	99,5
72	612 ± 1	100

25 **[0100]** Las cantidades de antibiótico liberadas en los intervalos entre muestras sucesivas para estas tres muestras preparadas con tobramicina se proporcionan en la tabla 25:

Tabla 25

Intervalo entre muestreo (horas)	Liberación de tobramicina (mg/l)
0 - 2	332
2 - 4	235
4 - 24	39
24 - 48	3
48 - 72	3

EJEMPLO 17

5 **[0101]** Se repitió el Ejemplo 16, usando en este caso un hidrogel antibacteriano con una carga del derivado del HA del 6 % p/v cargado con tobramicina al 2 % p/v. El hidrogel antibacteriano se prepara mezclando 0,6 ml de una disolución al 10 % p/v del HA-PLA_(B) con 0,4 ml de la misma disolución comercial de tobramicina empleada en el ejemplo previo. Los resultados de la liberación del antibiótico con el tiempo para las tres muestras así obtenidas se proporcionan en la Tabla 26:

10

Tabla 26

Momento de muestreo (horas)	Liberación de tobramicina (carga de tobramicina = 2 % p/v)	
	mg/l	%
2	281 ± 21	58
4	397 ± 3	82
24	466 ± 1	96
48	471 ± 6	97
72	484 ± 6	100

[0102] Las cantidades de antibiótico liberadas en los intervalos entre muestras sucesivas para estas tres muestras preparadas con tobramicina se proporcionan en la tabla 27:

15

Tabla 27

Intervalo entre muestreo (horas)	Liberación de tobramicina (mg/l)
0 - 2	281
2 - 4	116
4 - 24	69
24 - 48	5
48 - 72	13

EJEMPLO 18

20 **[0103]** Se repitió el Ejemplo 12, usando tobramicina en lugar de vancomicina para la preparación del hidrogel antibacteriano. Este se obtiene mezclando 0,6 ml de una disolución del HA-PLA_(C) con una concentración del 6,67 % p/v con 0,4 ml de la disolución comercial de tobramicina del Ejemplo 16. Los resultados de la liberación del antibiótico con el tiempo para las tres muestras preparadas con este hidrogel antibacteriano se proporcionan en la Tabla 28:

25

Tabla 28

Momento de muestreo (horas)	Liberación de tobramicina (carga de tobramicina = 2 % p/v)	
	mg/l	%
2	252 ± 34	54
4	360 ± 41	78

Momento de muestreo (horas)	Liberación de tobramicina (carga de tobramicina = 2 % p/v)	
	mg/l	%
24	404 ± 16	87
48	444 ± 10	96
72	463 ± 13	100

[0104] Las cantidades de antibiótico liberadas en los intervalos entre muestras sucesivas para estas tres muestras preparadas con tobramicina se proporcionan en la tabla 29:

5

Tabla 29

Intervalo entre muestreo (horas)	Liberación de tobramicina (mg/l)
0 - 2	252
2 - 4	108
4 - 24	44
24 - 48	40
48 - 72	19

EJEMPLO 19

10 **[0105]** Este ejemplo es sobre la liberación combinada de dos antibióticos desde un hidrogel antibacteriano preparado con un derivado del HA obtenido injertando PLA en el HA.

15 **[0106]** Se prepara un hidrogel mediante el tratamiento del derivado HA-PLA_(B) (preparado según se describe en el ejemplo 3) con una disolución de NaOH como en el ejemplo 7. Este hidrogel se carga después tanto con vancomicina como con tobramicina siguiendo los procedimientos descritos en ejemplos 5 y 16, respectivamente, obteniendo un hidrogel antibacteriano con una concentración del 8 % p/v del derivado del HA, del 1 % p/v de vancomicina y del 1 % p/v de tobramicina. Este hidrogel antibacteriano se usa para recubrir tres muestras iguales de titanio, ensayadas subsiguientemente para comprobar la liberación de antibióticos siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 5. Los resultados de la liberación de los antibióticos con el tiempo se proporcionan en la Tabla 30:

20

Tabla 30

Momento de muestreo (horas)	8 % p/v de HA-PLA _(B) vancomicina = 1 % p/v, tobramicina = 1 % p/v			
	mg/l	%	mg/l	%
2	90 ± 22	26,8	81 ± 17	35,8
4	169 ± 6	50,4	89 ± 25	39,4
24	252 ± 17	75,2	198 ± 30	87,6
48	300 ± 20	89,5	219 ± 10	96,9
72	326 ± 10	97,3	226 ± 12	100
96	335 ± 1	100	/	/

EJEMPLO 20

25 **[0107]** Se repitió el Ejemplo 19, usando en este caso un hidrogel antibacteriano con una concentración del derivado del HA del 10 % p/v cargado con vancomicina y tobramicina, ambas al 2 % p/v. Los resultados de la liberación de los antibióticos con el tiempo se proporcionan en la Tabla 31:

Tabla 31

Momento de muestreo (horas)	10 % p/v de HA-PLA _(B) vancomicina = 2 % p/v, tobramicina = 2 % p/v			
	mg/l	%	mg/l	%
2	413 ± 7	56,6	385 ± 55	76,7
4	611 ± 34	83,8	389 ± 27	77,5
24	689 ± 34	94,5	475 ± 22	94,6
48	715 ± 22	98,1	502 ± 64	100
72	729 ± 27	100	/	/

[0108] Las cantidades de los dos antibióticos liberadas en los intervalos entre muestras sucesivas en este caso se proporcionan en la tabla 32:

5

Tabla 32

Intervalo entre muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (mg/l)	Liberación de tobramicina (mg/l)
0 - 2	413	385
2 - 4	198	4
4 - 24	78	86
24 - 48	26	27
48 - 72	14	/

EJEMPLO 21

10 **[0109]** Se repitió el Ejemplo 19, usando en este caso un hidrogel preparado con el derivado HA-PLA_(C) (preparado según se describió en el ejemplo 3) tratado con agua bidestilada en lugar de con una disolución de NaOH; el hidrogel antibacteriano final tiene una concentración del derivado del HA del 6 % p/v y unas concentraciones de vancomicina y de tobramicina iguales ambas al 1 % p/v. Los resultados de la liberación de los antibióticos con el tiempo se proporcionan en la Tabla 33:

15

Tabla 33

Momento de muestreo (horas)	6 % p/v de HA-PLA _(C) vancomicina = 1 % p/v, tobramicina = 1 % p/v			
	mg/l	%	mg/l	%
2	192 ± 7	48,5	151 ± 30	62,1
4	308 ± 52	77,7	176 ± 15	72,4
24	380 ± 33	95,9	243 ± 26	100
48	393 ± 21	99,2	/	/
72	396 ± 12	100	/	/

[0110] Las cantidades de los dos antibióticos liberadas en los intervalos entre muestras sucesivas en este caso se proporcionan en la tabla 34:

20

Tabla 34

Intervalo entre muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (mg/l)	Liberación de tobramicina (mg/l)
0-2	192	151
2-4	116	25
4-24	72	67
24-48	13	/

Intervalo entre muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (mg/l)	Liberación de tobramicina (mg/l)
48-72	3	/

EJEMPLO 22

5 [0111] Se repitió el Ejemplo 21, con la diferencia de que en este caso la concentración de los dos antibióticos se ha duplicado. Los resultados de la liberación de los antibióticos con el tiempo se proporcionan en la Tabla 35:

Tabla 35

Momento de muestreo (horas)	6 % p/v de HA-PLA _(C) vancomicina = 2 % p/v, tobramicina = 2 % p/v			
	mg/l	%	mg/l	%
2	258 ± 33	46,5	117 ± 59	29,7
4	426 ± 36	76,7	238 ± 31	60,5
24	500 ± 21	90,0	301 ± 7	76,6
48	555 ± 30	100	393 ± 12	100

10 [0112] Las cantidades de los dos antibióticos liberadas en los intervalos entre muestras sucesivas en este caso se proporcionan en la tabla 36:

Tabla 36

Intervalo entre muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (mg/l)	Liberación de tobramicina (mg/l)
0 - 2	258	117
2 - 4	168	121
4 - 24	74	63
24 - 48	55	92

EJEMPLO 23

15 [0113] Se repitió el Ejemplo 22, con las diferencias de que se usó el derivado PEG-HA-PLA_(D) (preparado según se describió en el ejemplo 4), y que su concentración en el hidrogel antibacteriano es del 4 % p/v. Los resultados de la liberación de los antibióticos con el tiempo se proporcionan en la Tabla 37:

Tabla 37

Momento de muestreo (horas)	4 % p/v de PEG-HA-PLA _(D) vancomicina = 2 % p/v, tobramicina = 2 % p/v			
	mg/l	%	mg/l	%
2	581 ± 95	80,0	359 ± 42	62,0
4	713 ± 42	98,2	396 ± 42	68,4
24	726 ± 20	100	579 ± 154	100

20 [0114] Las cantidades de los dos antibióticos liberadas en los intervalos entre muestras sucesivas en este caso se proporcionan en la tabla 38:

Tabla 38

Intervalo entre muestreo (horas)	Liberación de vancomicina (mg/l)	Liberación de tobramicina (mg/l)
0 - 2	581	359
2 - 4	132	37
4 - 24	13	183

25

Análisis de los resultados

[0115] La derivatización química del ácido hialurónico (HA) con poliésteres (en particular con ácido poliláctico, PLA) da lugar a la formación de copolímeros que, cuando entran en contacto con un medio acuoso (por ejemplo, agua bidestilada, una disolución fisiológica a pH 7,4 o una disolución de NaOH) pueden usarse para producir hidrogeles antibacterianos con prometedoras aplicaciones en el campo ortopédico. Estos hidrogeles antibacterianos se preparan de hecho fácilmente añadiendo simplemente los copolímeros de HA-poliéster a disoluciones acuosas o fisiológicas, son transparentes, fácilmente dispersables en una superficie (por ejemplo, una prótesis de titanio) y tienen la capacidad de incorporar y liberar de una forma prolongada los fármacos incorporados en ellos.

[0116] En particular, los ejemplos 5 hasta 15 muestran que los hidrogeles antibacterianos que contienen polímeros de HA-poliéster (en particular de HA-PLA) con diferentes grados de derivatización con el poliéster, posibles co-derivatizaciones con PLA y PEG, diferentes concentraciones del derivado del HA y diferentes concentraciones de vancomicina, liberan unas cantidades adecuadas del fármaco rápidamente tras el implante de la prótesis. Este resultado es muy importante ya que un buen efecto explosivo podría asegurar una acción eficaz del fármaco en las horas inmediatamente posteriores a la implantación de la prótesis, el periodo en el que es más probable el establecimiento de una infección bacteriana. Además, durante todo el periodo de liberación del fármaco, la concentración de antibiótico liberado por el hidrogel antibacteriano es siempre mayor que la concentración inhibitoria mínima (MIC), lo que asegura por lo tanto la eficacia del fármaco liberado en las proximidades de la prótesis; estos valores de la MIC son conocidos en la bibliografía y están, respectivamente, en el intervalo de 1,56 - 3,12 mg/l para la vancomicina (véase el artículo "In vivo study of hot compressing molded 50:50 poli (DL-lactide-co-glicolide) antibiotic beads in rabbits", Steve W. N. y col, Journal of Orthopaedic Research (2002) 20: 654 - 661) y de aproximadamente 1 mg/l para la tobramicina (véase el artículo "Evaluation of once daily tobramycin dosing in critically ill patients through Bayesian simulation", Peris-Marti J. F. y col, Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics (2004) 29: 65 - 70). Los ejemplos 16 - 18 y 19 - 23 muestran unos resultados similares, respectivamente, para la tobramicina sola y para la vancomicina y la tobramicina usadas en combinación.

[0117] Más detalladamente, puede apreciarse a partir de las pruebas que pueden obtenerse unos resultados particularmente buenos con el uso de una disolución de NaOH en lugar de agua pura para la producción del hidrogel (compárense, por ejemplo, los resultados de los ejemplos 5 y 7 para la vancomicina con los de los ejemplos 19 y 21 para el uso combinado de vancomicina y tobramicina). De forma análoga, se obtienen muy buenos resultados con el uso de los derivados obtenidos injertando en las cadenas del HA un poliéster (PLA) y polietilenglicol.

[0118] Otra tendencia general que se ha apreciado en los ejemplos es que una cantidad creciente del antibiótico cargado inicialmente en el hidrogel antibacteriano da lugar a un aumento en la velocidad de liberación del mismo; sin embargo, los niveles de antibiótico en disolución son siempre mayores que el valor de la MIC para los antibióticos.

REIVINDICACIONES

1. Un hidrogel antibacteriano que comprende agua, un derivado del ácido hialurónico y un agente antibacteriano, en el que:
- 5
- el derivado del ácido hialurónico comprende ácido hialurónico, o una sal del mismo, con un peso molecular comprendido entre 50.000 y 3.500.000 Da en las fracciones de N-acetil-D-glucosamina, en las que se han injertado cadenas de un poliéster biodegradable y biocompatible con un peso molecular comprendido entre 3.000 y 900.000 Da, en una cantidad tal que el derivado comprende entre 1 y 15 de dichas cadenas de poliéster por 100 unidades repetitivas de ácido D-glucurónico / N-acetil-D-glucosamina de ácido hialurónico;
 - la concentración de dicho derivado del ácido hialurónico o de la sal del mismo está comprendida entre el 1 y el 30 % p/v; y
 - el agente antibacteriano se elige de entre antibióticos, iones metálicos antifúngicos y sus combinaciones, y tiene una concentración comprendida entre el 0,001 % y el 80 % p/v.
- 15
2. Un hidrogel antibacteriano de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la concentración de dicho derivado del ácido hialurónico o de la sal del mismo está comprendida entre el 2 y el 10 %.
3. Un hidrogel antibacteriano de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho ácido hialurónico o una sal del mismo tiene un peso molecular comprendido entre 100.000 Da y 1.500.000 Da.
- 20
4. Un hidrogel antibacteriano de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho peso molecular está comprendido entre 200.000 Da y 300.000 Da.
- 25
5. Un hidrogel antibacteriano de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho poliéster se selecciona de entre ácido poliláctico con un peso molecular en el intervalo de entre 3.000 y 150.000 Da, ácido poliglicólico con un peso molecular en el intervalo de entre 1.000 y 900.000 Da, policaprolactona con un peso molecular en el intervalo de entre 3.000 y 900.000 Da, mezclas y copolímeros de los mismos.
- 30
6. Un hidrogel antibacteriano de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en dicho ácido hialurónico o en una sal del mismo se injertan adicionalmente cadenas de polietilenglicol.
- 35
7. Un hidrogel antibacteriano de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho polietilenglicol tiene un peso molecular en el intervalo de entre 400 Da y 20.000 Da.
- 40
8. Un hidrogel antibacteriano de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la proporción entre las unidades de ácido D-glucurónico en las que se injerta una cadena de polietilenglicol y el número total de dichas unidades presentes en la cadena del HA está comprendida entre el 5 y el 20 %.
- 45
9. Un hidrogel antibacteriano de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha agua se añade a dicho derivado del ácido hialurónico en forma de agua bidestilada o de una disolución de NaOH con una concentración de entre 0,075 y 0,75 M/l, o una disolución fisiológica.
- 50
10. Un hidrogel antibacteriano de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho agente antibacteriano es:
- un antibiótico seleccionado de entre daptomicina, tigeciclina, telavancina, cloranfenicol, ácido fusídico, bacitracina, rifampina, etambutol, estreptomina, isoniazida, y todos aquellos comprendidos en las siguientes familias antibacterianas: glucopéptidos (incluyendo, pero no se limitan a, teicoplanina, vancomicina, etc.), aminoglucósidos (incluyendo pero no se limita a, gentamicina, tobramicina, amicacina, netimicina, etc.), cefalosporinas (incluyendo, pero no se limitan a, cefazolina, cefoxitina, cefotaxima, cefuroxima, moxalactama, etc.), macrólidos (incluyendo, pero no se limitan a, eritromicina), oxazolidinonas (incluyendo, pero no se limitan a, linezolid), quinolonas, polimixinas, sulfonamidas, tetraciclinas y penicilinas; o
 - un antifúngico seleccionado de entre aquellos comprendidos en las familias de antifúngicos de polieno, antifúngicos de imidazol y de triazol, alilaminas, equinocandinas y griseofulvina; o
 - un metal seleccionado de entre formulaciones de plata y de nanoplatina, cinc, cobre, cobalto y níquel.
- 55
11. Un procedimiento para el uso del hidrogel antibacteriano de la reivindicación 1, **caracterizado por que** cuando el agente antibacteriano se aplica sobre una prótesis, esta operación se realiza mediante un procedimiento elegido de entre inmersión de la prótesis en el hidrogel, pulverización, extensión y cepillado.
- 60
12. Un kit para su uso en el procedimiento de la reivindicación 11, que comprende dos composiciones, siendo la primera un hidrogel formado por el derivado del HA y agua con una concentración del derivado del HA comprendida entre el 1 y el 35 % p/v, siendo o comprendiendo el segundo, el agente antibacteriano.
- 65
13. El kit de la reivindicación 12, en el que dicha concentración del derivado del HA está comprendida entre el 2 y el 10 % p/v.

14. El kit de la reivindicación 12, en el que dicha segunda composición comprende el agente antibacteriano, y es una disolución o una dispersión del último.

15. Una prótesis para su implante en el cuerpo humano o animal recubierta con un hidrogel antibacteriano según el procedimiento de la reivindicación 11.

5