

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 447**

51 Int. Cl.:

A61L 27/52 (2006.01)
A61L 27/20 (2006.01)
A61L 27/24 (2006.01)
A61L 27/26 (2006.01)
A61L 27/34 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2011** **E 11731084 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014** **EP 2560694**

54 Título: **Dispositivo implantable con propiedades antibacterianas y superficie multifuncional**

30 Prioridad:

22.04.2010 IT MI20100688

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

16.03.2015

73 Titular/es:

NOBIL BIO RICERCHE S.R.L. (100.0%)
Via della Stella 64
25062 Concesio (BS), IT

72 Inventor/es:

BOLLATI, DANIELE;
MORRA, MARCO;
CASSINELLI, CLARA y
CASCARDO, GIOVANNA

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 531 447 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

Dispositivo implantable con propiedades antibacterianas y superficie multifuncional

- 5 La presente invención se refiere a un dispositivo de implantación cuya superficie combina actividad antibacteriana para prevenir infecciones periprotésicas y capacidad de osteointegración mejorada.

Antecedentes de la invención

- 10 En la ortopedia, la infección periprotésica (IPP) es una consecuencia devastadora de la inserción de implantes. Actualmente, la incidencia de IPP oscila del 1 al 5 %, con valores incluso mayores para pacientes de alto riesgo y para aquellos que han sufrido un traumatismo. Además, aproximadamente el 73 % de las revisiones de operaciones se llevan a cabo tras una infección bacteriana peri-implante. El coste social y económico de estas intervenciones es considerablemente alto. La etiología de la IPP es compleja y depende de la capacidad de las especies bacterianas a eludir la respuesta del tejido huésped, normalmente mediante la formación de una biopelícula. En realidad, una vez insertado, el dispositivo de implante se recubre por proteínas del suero. Este proceso va seguido de interacciones con las especies de células y la regeneración o reparación del tejido en casos con curso positivo. En presencia de especies bacterianas, la superficie del implante puede someterse a la adhesión bacteriana y formación de una biopelícula. En particular, dentro de la biopelícula las bacterias se protegen por el sistema de inmunovigilancia y por el efecto de antibióticos sistémicos. De este modo, la colonización puede propagarse, con las consecuencias perjudiciales conocidas en el campo de la infección periprotésica. Se desarrollaron una serie de sistemas para la liberación local de antibióticos, tanto de cementos como de capas micrométricas de polímeros biodegradables depositados sobre la superficie de los dispositivos, con el objetivo de luchar contra la IPP. Sin embargo, tras completarse la liberación, los sistemas porosos de este tipo pueden servir de sitio protegido para la adhesión bacteriana y la formación de biopelículas.

- Recientemente se han presentado artículos de bibliografía en los que un antibiótico, vancomicina, se unió covalentemente a la superficie de dispositivos de implante hechos de titanio y condujo la actividad bactericida contra especies bacterianas que pertenecen al género *Staphylococci* (Chemistry & Biology, vol. 12, 1041-1048, 2005, Vancomycin Covalently Bonded to Titanium Beads Kills *Staphylococcus aureus*; Journal Orthopedic Research, 25, 858-866, 2007, Vancomycin Covalently Bonded to Titanium Alloy Prevents Bacterial Colonization).

- La inmovilización de la vancomicina sobre la superficie de dispositivos de implante o de liberación local de los mismos son, para estas aplicaciones, procesos de gran interés. La vancomicina constituye un potente fármaco para tratar infecciones por bacterias Gram-positivas, que son considerablemente las causas más comunes de infecciones periprotésicas. El mecanismo de acción de la vancomicina proporciona el bloqueo de la síntesis de la capa de peptidoglicanos de las paredes celulares de las bacterias Gram-positivas por medio del enlace terminal de L-Lys-D-Ala-D-Ala del peptidoglicano naciente. De este modo, la vancomicina previene la reticulación que se requiere para la estabilidad osmótica. El concepto de vancomicina que se une firmemente, de por sí soluble en agua, a la superficie de los dispositivos de implante supera la visión del simple sistema de liberación. En realidad, en este caso hay una alta concentración local de un fármaco firmemente unido a la interfase entre el dispositivo de implante y el entorno externo. Esta barrera farmacológica estable previene la formación de colonias bacterianas sobre la superficie del dispositivo de implante, previniendo así la aparición de IPP. Como se describe por Chapiro y colaboradores en el artículo Selfprotective Smart Orthopedic Implants, Expert Rev. Med. Devices, 2007 Jan;4(1):55-64, sistemas de este tipo pueden conducir a una nueva generación de dispositivos de implante, que están auto-protegidos contra riesgos de infección bacteriana debido a sus propiedades superficiales.

- Sin embargo, el proceso de unir vancomicina a la superficie del dispositivo hecho de titanio descrito en estos artículos comprende diferentes etapas, que son bastante complejas desde un punto de vista práctico y no fácilmente adaptable a la producción industrial, que lo hace poco adecuado para dispositivos de una dimensión dada y geometría compleja.

- MATSUNO HIROAKI Y COL.: "Antibiotic-containing hyaluronic acid gel as an antibacterial carrier: Usefulness of sponge and film-formed HA gel in deep infection", JOURNAL OF ORTHOPAEDIC RESEARCH, vol. 24, nº 3, 6 de enero de 2006 (06-01-2006), páginas 321-326, desvela: una prótesis de cadera de titanio implantable que va a implantarse en el cuerpo humano, en la que la superficie de dicho dispositivo está recubierta con un complejo de ácido hialurónico (HA) y una vancomicina (indefinida). El HA está reticulado y tiene un MW de 2000 kDa.

- CHUANG H F Y COL.: "Polyelectrolyte multilayers for tunable release of antibiotics", BIOMACROMOLECULES JUNE 2008 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY US, vol. 9, nº 6, 14 de mayo de 2008 (14-05-2008), páginas 1660-1668, desvela:

- una prótesis implantable que va a implantarse en el ser humano, en la que la superficie de dicho dispositivo se graba por plasma y a continuación se recubre capa a capa con polietilendiamina y un complejo de ácido hialurónico (HA) de 1760 kDa y una gentamicina. La capa de recubrimiento tiene un espesor de 680, 590 o 320 nm. La gentamicina se libera de una manera controlada.

Obviamente, la provisión, en condiciones compatibles con un contexto productivo, de dispositivos protésicos de implante que pueden explotar la acción farmacológica de la vancomicina constituiría un paso considerable al frente en el sector, con implicaciones científicas, sociales y económicas considerables. Idealmente, el proceso podría acompañar la inmovilización/liberación de vancomicina para proporcionar otras propiedades superficiales considerables, tales como el aumento de la velocidad de osteointegración. En realidad, la rápida regeneración del tejido óseo, garantizando la ocupación de la superficie disponible del dispositivo implantado, reduce las probabilidades de colonización superficial por células bacterianas, completando el efecto protector antibacteriano debido a la vancomicina. Este concepto permitiría la actual provisión de dispositivos con superficies multifuncionales, es decir, superficies también que realizan, además de la función obvia de soporte de los componentes tisulares, por ejemplo:

- la función de estimular la regeneración/reparación del tejido

- la función de protección antibacteriana.

Estudios llevados a cabo por el presente inventor han revelado ahora la posibilidad de implementar prácticamente los conceptos previamente mencionados como se describen en el presente documento más adelante.

Sumario de la invención

Un primer alcance de la presente invención es proporcionar un dispositivo implantable que va a implantarse en un cuerpo humano o animal, en el que al menos una parte de la superficie de dicho dispositivo está recubierta con un complejo de ácido hialurónico y antibiótico de glucopéptido y en el que dicho ácido hialurónico tiene un peso molecular promedio comprendido entre 400.000 y 1.000.000 Da.

Un segundo alcance de la presente invención es proporcionar un gel de colágeno que comprende el complejo de ácido hialurónico con un antibiótico de glucopéptido, como tal o liofilizado, en el que dicho ácido hialurónico tiene un peso molecular promedio comprendido entre 400.000 y 1.000.000 Da.

Un tercer alcance de la presente invención es proporcionar un método para obtener un dispositivo implantable según la primera realización o un gel según la segunda realización, que comprende la etapa de formar dicho complejo de ácido hialurónico con dicho antibiótico de glucopéptido haciendo que dicho ácido hialurónico se ponga en contacto con una disolución de dicho antibiótico de glucopéptido, en presencia de un agente de condensación o de reticulación.

La presente invención considera el proceso de obtener un dispositivo de implante en el cuerpo humano o animal que puede combinar la inmovilización de un antibiótico, en particular vancomicina, de una manera y eficaz, con la estimulación de las células osteogénicas y garantizar el aumento de la velocidad de osteointegración. La rápida formación de tejido óseo, con ocupación relativa de la superficie disponible del dispositivo implantado, reduce las probabilidades de colonización superficial por células bacterianas y así constituye un efecto sinérgico con el efecto antibiótico de la vancomicina. Según el proceso objeto de la invención, así se proporcionan dispositivos con superficies multifuncionales, es decir, superficies que ejercen, además de la función obvia de soportar los componentes tisulares, también las funciones mencionadas de estimular la regeneración/reparación del tejido y protección antibacteriana.

La presente invención se basa en la sorprendente observación de que la vancomicina, un compuesto soluble en agua, si está presente en una disolución acuosa con la molécula de ácido hialurónico en presencia de agentes de reticulación/condensación, forma un compuesto/precipitado con dicho ácido hialurónico. A partir de tal observación, se ha desarrollado un proceso que reproduce estos acontecimientos sobre la superficie de dispositivos de implante. El proceso proporciona, al principio, el enlace de la molécula de ácido hialurónico con una superficie adecuadamente funcionalizada (con métodos conocidos en la bibliografía); a continuación, la superficie recubierta con ácido hialurónico se incuba en una disolución acuosa de vancomicina en presencia de agentes de reticulación en concentración adecuada. Sorprendentemente, se observa gradualmente sobre la superficie la formación de precipitados de ácido hialurónico/vancomicina, también observables macroscópicamente debido a la formación gradual de una capa "opaca" que recubre homogéneamente y recubre la superficie entera, un acontecimiento que no se produce si la superficie no se hubiera recubierto previamente con ácido hialurónico.

Sin limitarse a una teoría particular, se considera que este comportamiento es al menos parcial debido a la interacción iónica entre las cargas negativas presentes en la molécula de ácido hialurónico y los grupos amino positivamente cargados de vancomicina. Sin embargo, dado que la formación de dicha capa opaca solo se produce en presencia de agentes de reticulación dados, la interacción también podría ser debida a diferentes factores físicos y químicos, inesperadamente relacionados con la estructura molecular del ácido hialurónico.

Por brevedad, en la presente solicitud de patente, tales precipitados o compuestos de un antibiótico de glucopéptido, en particular vancomicina, y ácido hialurónico deben definirse como "complejos de ácido hialurónico/antibiótico de glucopéptido" o específicamente "complejos de ácido hialurónico/vancomicina", sin implicar que el enlace típico de

un complejo se forme necesariamente.

Además, se descubrió sorprendentemente que el uso de diferentes pesos moleculares de ácido hialurónico (HA) influye considerablemente en la formación de dicho precipitado de HA /vancomicina: en este caso, se observó que

recubrir una superficie con HA con bajos pesos moleculares (comprendidos entre 5000 Da y 80000 Da) no es eficaz en "capturar", en la etapa de tratamiento posterior, una cantidad de moléculas de vancomicina equivalentes a la capturada cuando la superficie está recubierta con ácido hialurónico con mayor peso molecular. Además, el máximo rendimiento en el proceso de captura no aumenta a medida que aumenta el peso de ácido hialurónico, pero revela un "pico" o desarrollo en campana.

Además, el uso de otros polisacáridos, entre ellos heparina, sulfato de condroitina, quitosano, ácido algínico, pectinas, tiene el efecto de reducir la cantidad de vancomicina funcional que está unida sobre la superficie (en algunos casos reducir la estabilidad de la misma, en otros la actividad farmacológica).

Sorprendentemente, el compuesto/precipitado incorporado en la capa superficial se libera si se expone a entornos acuosos fisiológicos, preservando la acción farmacológica de la vancomicina. La liberación total de vancomicina no es inmediata, como se esperaría debido a la alta solubilidad de la vancomicina en disoluciones acuosas, pero el efecto sigue durante varias semanas, ofreciendo un recubrimiento de antibiótico interfacial prolongado.

El ácido hialurónico se deposita sobre la superficie del dispositivo que va a recubrirse usando diferentes métodos que permiten pretratar la superficie que va a recubrirse con plasma de alilamina o disolución acuosa de polietilenimina, con grupos amino que pueden permitir el enlace covalente con los grupos carboxilo del ácido hialurónico.

Según una realización preferida, la superficie que va a tratarse puede recubrirse con una única capa de moléculas de colágeno, preferentemente en formas fibriladas: los grupos amino de los residuos de aminoácidos de la molécula de colágeno pueden unirse a los grupos carboxilo del ácido hialurónico. La funcionalización de las superficies con colágeno también permite aumentar las propiedades "osteoinductivas" de la superficie: en realidad, se observó que tal modificación puede dirigir la diferenciación de células mesenquimatosas humanas hacia la línea osteogénica.

El proceso previamente descrito es versátil y no está limitado por el tipo de dispositivo. Puede así aplicarse tanto sobre dispositivos metálicos tales como tornillos hechos de titanio para fijar fracturas, para prótesis, sobre dispositivos poliméricos, tanto biodegradables como permanentes, y sobre dispositivos cerámicos, por ejemplo, hidroxiapatita u otras formas de fosfatos de calcio, incluso en forma de polvos y gránulos similares a partículas como se usa para rellenos de cavidades óseas.

El proceso de la invención puede aplicarse sobre cuerpos moldeados basándose en materiales naturales tales como esponjas o andamiajes basados en colágeno o polímeros naturales o materiales cerámicos. También puede aplicarse a suspensiones de material orgánico nanoestructurado, tal como fibrillas de colágeno con diámetro más pequeño de un micrómetro.

En el caso de aplicación a suspensiones de colágeno o materiales en suspensión nanoestructurados, la interacción objeto de la presente invención conduce a la formación de un gel. Este gel - basado en colágeno y que contiene vancomicina y ácido hialurónico - puede usarse como tal o en formas liofilizadas y reconstituirse si se usa como material de relleno en el sitio de fijación de un dispositivo implantable, realizando tanto la acción típica de osteointegración de colágeno y ácido hialurónico como la actividad antibacteriana del antibiótico también en la región que rodea el implante.

Así, estos procesos permiten proporcionar un recubrimiento de vancomicina en ácido hialurónico sobre la superficie de los dispositivos o materiales, implementando el concepto de barrera farmacológica de liberación lenta a la interfase dispositivo/tejido. Además, la modificación superficial de los dispositivos de implante con ácido hialurónico aumenta la tendencia del material a la osteointegración, como se describe, por ejemplo, por Morra y col. en el artículo Covalently-Linked Hyaluronan Promotes Bone Formation around Ti Implants in a Rabbit Model, publicado en Journal of Orthopedic Research, 27:657-663, 2009 y en la solicitud de patente WO 2006/038056 A1.

Así, los métodos previamente descritos permiten proporcionar dispositivos de implante que no solo tienen características de osteointegración óptimas y mejoradas, sino que también proporcionan las características auto-protectoras y bactericidas de la vancomicina, traduciendo prácticamente el concepto de superficie multifuncional. Además, el método de la presente invención permite prolongar la multifuncionalidad de la superficie, ejemplificada por la presencia simultánea de la composición química bioactiva con acción osteogénica (enlace de ácido hialurónico) y acción farmacológica (liberación de vancomicina), añadiendo la posibilidad de controlar la topografía superficial mediante procesos de rugosificación. Con respecto a esto, debe tenerse en cuenta que en el campo de los implantes dentales el proceso de osteointegración se facilita por la acción de la topografía superficial sobre las células osteogénicas, como se ejemplifica por el concepto de "Modulation of osteogenesis via implant surface design", descrito por Boyan, B.D., Schwartz, Z., en: Davies J. E. editor. Bone Engineering, Toronto, EM Squared, 232-239, 2000. Este concepto ha sido tan satisfactorio hasta el punto de que implantes dentales con superficie lisa

ya no están disponibles en el mercado, teniendo todos en su lugar una topografía superficial rugosa. En la ortopedia, por ejemplo en la fijación de fracturas por medio de tornillos hechos de titanio, este concepto no pudo ser explotado debido al miedo a ofrecer, rugosificando la superficie, superficies que pudieran ser explotadas para la adhesión y colonización bacteriana. La presente invención permite en su lugar proporcionar una capa osteogénica superficial de ácido hialurónico conforme (es decir, que no altera la topografía de la superficie, adaptándose a ella), que también pueden explotar la rugosificación de la topografía superficial en la que la liberación de vancomicina previene la colonización bacteriana de la irregularidad y aspereza de la superficie.

Descripción de la invención

La presente invención considera en particular un dispositivo de implantación en el cuerpo humano o animal, en el que al menos una parte de la superficie de dicho dispositivo está recubierta con un "compuesto de ácido hialurónico con un antibiótico de glucopéptido.

En una realización, el antibiótico de glucopéptido es vancomicina.

La idea es unir una capa de ácido hialurónico a las superficies de interés (mediante los métodos conocidos en la técnica), a continuación incubar tales superficies con una disolución de vancomicina en presencia de agentes de condensación, en particular N-hidroxisuccinimida (NHS) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), presentes simultáneamente: se forma una capa "opaca", que indica la interacción entre el ácido hialurónico previamente unido y la vancomicina sobre la superficie después de algunas horas. Esta capa opaca no se forma en ausencia de ácido hialurónico unido a la superficie, funcionalizada o no funcionalizada, y no se forma en ausencia de NHS/EDC. De aquí en adelante debe hacerse referencia a "complejos de ácido hialurónico con vancomicina", en la que el término "complejo" comprende cualquier tipo de interacción química/física o simplemente física entre el ácido hialurónico y la vancomicina, que incluye interacciones por enlace de hidrógeno, y/o interacciones de van der Waals y/o interacciones electrostáticas, etc., que se obtienen mediante la precipitación de vancomicina o co-precipitación de ácido hialurónico y vancomicina en presencia de reticulación o agentes de condensación y en condiciones particulares (pH y concentración de las disoluciones).

En una realización, la superficie entera del dispositivo de implantación está recubierta con dicho complejo de ácido hialurónico/antibiótico de glucopéptido unido a la superficie que tiene un. Alternativamente, parte del dispositivo está recubierto con ácido hialurónico, y la formación de los complejos con vancomicina solo se produce en esta área.

El dispositivo de implantación según la invención puede estar hecho de metal (por ejemplo, acero, titanio o aleaciones del mismo con otros metales) o hecho de material plástico (tal como, por ejemplo, poliestireno) compatible para aplicaciones sobre el cuerpo humano o animal, o hecho de material cerámico, tanto en forma del dispositivo como granulado/polvo.

En una realización, el dispositivo consiste en un tornillo de implante dental, preferentemente hecho de titanio o aleaciones del mismo, posiblemente del tipo transmucoso, o un tornillo, preferentemente hecho de titanio o aleaciones del mismo, para fijación espinal o esquelética, o para la fijación de fracturas, o un disco intervertebral, preferentemente hecho de titanio, aleaciones del mismo o aleaciones de cobalto-cromo o hecho de aleaciones metálicas comúnmente usadas para estas aplicaciones. La superficie del dispositivo hecho de titanio puede ser lisa (comúnmente denominada "labrada") o preferentemente rugosificada según métodos conocidos en la técnica, en particular mediante chorreo con arena, usando alúmina, óxidos de titanio u otros agentes de chorreo con arena, tratamiento de rugosificación usando ácidos, o tratamiento de rugosificación electroquímico.

En una realización, el proceso de inmovilización del complejo de ácido hialurónico con el antibiótico de glucopéptido sobre un dispositivo implantable según la invención proporciona la introducción de grupos amino funcionales sobre la superficie del dispositivo. El ácido hialurónico se une covalentemente a los grupos amino superficiales, mediante los métodos conocidos en la técnica, y ejerce su acción de "captura" de la vancomicina con formación de los complejos en presencia de EDC y NHS en la siguiente etapa. El peso molecular promedio del ácido hialurónico comprende entre 400.000 y 1 millón de Da. El enlace del ácido hialurónico con la superficie aminada puede producirse mediante los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando EDC/NHS, o tratando ácido hialurónico con ácido peryódico y posterior aminación reductora, o como se describe en el documento WO 2006/038056 A1. La capa así obtenida puede tener un espesor comprendido entre 0,1 y 1000 nanómetros, preferentemente entre 1 y 20 nm.

Los grupos amino pueden depositarse sobre la superficie del dispositivo implantable según los métodos ampliamente conocidos en el sector. La técnica que proporciona la introducción del sustrato que tiene grupos amino funcionales sobre la superficie del dispositivo implantable mediante deposición de plasma de moléculas que llevan los grupos amino es particularmente ventajosa. Ejemplos típicos de moléculas usadas para este fin son alilamina, alquilaminas tales como hexilamina o heptilamina y, generalmente, moléculas orgánicas que tienen funciones amino que presentan las características de volatilidad requeridas en el estado de plasma. La deposición de plasma de amina se produce en las siguientes condiciones: presión comprendida entre 80 y 300 mTorr, potencia de descarga comprendida entre 5 y 200 W, tiempo de deposición entre 1 ms y 300 s. La deposición de plasma también puede

producirse en condiciones de plasma pulsado, con ciclos de plasma activos e inactivos comprendidos entre 1 y 100 ms, para minimizar la fragmentación molecular y mantener la mayor densidad posible de los grupos amino. El tratamiento por deposición de plasma de aminos puede ir precedido de otros tratamientos con plasma, por ejemplo, usando plasma de aire u oxígeno para limpiar la superficie y aumentar la adhesión con el sustrato.

Otro método para recubrir el dispositivo implantable con un sustrato que contiene grupos amino consiste en adsorber polietilenimina (PEI) sobre la superficie del dispositivo, por ejemplo, de una disolución acuosa al 0,2 %, durante 2 horas, a temperatura ambiente. También el uso de silanos, por ejemplo 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES), o compuestos análogos, se encuentra dentro de los métodos comunes de funcionalización superficial.

También es posible funcionalizar la superficie del dispositivo implantable con grupos carboxilo mediante deposición de plasma de ácido acrílico/metacrílico.

Además, es posible funcionalizar la superficie con moléculas naturales, posiblemente bioactivas, que son irreversiblemente adsorbidas sobre la superficie y tienen grupos amino/carboxílicos adecuados para el posterior enlace de ácido hialurónico y complejos del mismo con vancomicina. Ejemplos típicos que se encuentran dentro de esta categoría son colágeno y otras moléculas de proteína de la matriz extracelular, tales como laminina, fibronectina, vitronectina. Según esta realización, el dispositivo de implantación según la invención comprende una primera capa de colágeno adsorbido, en un monómero o forma fibrilada, al que está unido ácido hialurónico, según el proceso descrito, preferentemente mediante EDC/NHS, o mediante aminación reductora. Esto va seguido de formación de complejos de ácido hialurónico/vancomicina, mediante exposición a vancomicina y disoluciones de agentes de reticulación o de condensación. La funcionalización con colágeno se realiza preferentemente con una disolución al 0,3 % de colágeno en ácido acético 10 mM y un volumen igual de tampón fosfato a 37 °C durante 8 horas.

El método previamente descrito también puede realizarse sobre colágeno en suspensión, conduciendo a la formación - en el medio acuoso - de un precipitado de complejo de colágeno fibrilado, ácido hialurónico y antibiótico de glucopéptido (tal como vancomicina), que puede separarse, lavarse y secarse parcialmente para obtener un gel. Este gel basado en colágeno y que contiene dicho antibiótico de glucopéptido y ácido hialurónico puede usarse como tal o en formas liofilizadas y reconstruirse si se usa, como material de relleno en el sitio de fijación de dicho dispositivo implantable, realizando tanto la acción de osteointegración típica del colágeno y el ácido hialurónico, además de la actividad antibacteriana del antibiótico también en la región que rodea el implante.

Otro objetivo de la invención es un kit que comprende un dispositivo de implantación sobre el cuerpo humano o animal, en el que al menos una parte de la superficie de dicho dispositivo está recubierta con un complejo de ácido hialurónico con un antibiótico de glucopéptido, y un gel de colágeno fibrilado con dicho complejo de ácido hialurónico/antibiótico de glucopéptido.

Los siguientes ejemplos describen la invención.

Ejemplo 1. Interacción de ácido hialurónico-vancomicina.

Este ejemplo muestra que hay una interacción sorprendente entre la vancomicina y el ácido hialurónico.

Se prepara una disolución al 0,1 % (peso/volumen) de ácido hialurónico HW (peso molecular 800 kDa, Lifecore) en agua milliQ y una disolución al 0,5 % de vancomicina en agua milliQ. La disolución de ácido hialurónico se añade gradualmente a la última disolución y se observa un aumento gradual de la turbidez de la disolución hasta la formación de partículas en suspensión (signo de fuerte interacción entre HA y vancomicina). Si se añaden dos agentes de condensación, N-hidroxisuccinimida y posteriormente etil-carbodiimida, a la mezcla, la disolución se vuelve instantáneamente transparente. Sin embargo, después de 15 horas, la mezcla se vuelve muy turbia, con la presencia de precipitados en suspensión: probablemente los agentes de condensación pueden unir los grupos amino de vancomicina a los grupos carboxilo del ácido hialurónico. Tales precipitados se recogieron, se lavaron con agua milliQ y posteriormente se analizaron bajo IR: la Figura 1 muestra los espectros con respecto a vancomicina (puntos), ácido hialurónico (guiones) y el precipitado formado mediante el método descrito (continuo). En este espectro hay señales de vancomicina y señales de ácido hialurónico, que confirman la interacción entre las dos moléculas.

Ejemplo 2. Interacción de ácido hialurónico-vancomicina.

Este ejemplo muestra la función fundamental de agentes de condensación en la interacción entre vancomicina y ácido hialurónico.

Se repite el experimento previo usando disoluciones de ácido hialurónico y vancomicina a concentraciones muy bajas (hasta 10 veces menores): en estos casos, la adición de ácido hialurónico a una disolución de vancomicina no produce una turbidez inmediata de la mezcla, que sigue transparente. Sin embargo, añadiendo las mismas cantidades de los agentes de condensación usados en el experimento previo y dejando en incubación durante

aproximadamente 15 horas, la disolución se vuelve turbia (aunque a un menor grado con respecto a los grandes precipitados formados en el experimento previo), demostrando que la interacción de HA-vancomicina está algo "estimulada" por la presencia de agentes de condensación.

Se prepararon disoluciones con alta concentración de vancomicina en agua (1 %) y HA en agua (0,5 %) con el objetivo de observar posibles diferencias entre la interacción de HA-vancomicina que se produce en presencia o en ausencia de agentes de condensación. Tales disoluciones se mezclaron y el precipitado inmediatamente formado se recogió, se lavó y se analizó bajo IR. A continuación se comparó el espectro con respecto a este precipitado con aquel con respecto al precipitado que se forma en presencia de agentes de condensación.

La Figura 2 muestra - mediante una línea de puntos y continua - los espectros de HA y vancomicina respectivamente, mientras que la línea discontinua larga muestra el espectro del precipitado de HA-vancomicina en presencia de agentes de condensación y la línea discontinua corta muestra el espectro del precipitado en ausencia de agentes de condensación.

Hay dos señales importantes presentes en el espectro en la línea discontinua larga y no en la línea discontinua corta: la primera es a 1550 cm⁻¹, que podría ser la señal de la amida secundaria (torsión NH₂ y tensión CN); la segunda es a 840 cm⁻¹ y podría ser la señal de aminas alifáticas y la torsión OCN. Estas dos señales, únicamente presentes en el espectro del precipitado formado en presencia de agentes de condensación (pero que en realidad no pertenecen a los agentes de condensación), podría indicar enlaces diferentes de aquellos que se derivan de la interacción electrostática simple, tales como enlaces covalentes, interacciones específicas u otras interacciones formadas en tal precipitado.

La posible existencia de una fuerte interacción entre el ácido hialurónico y la vancomicina ha allanado el camino hacia nuevos experimentos de modificación superficial. Tales experimentos consisten en unir covalentemente el ácido hialurónico a una superficie adecuadamente funcionalizada, a continuación incubar la superficie anteriormente mencionada en una disolución de vancomicina en presencia de agentes de condensación, de manera que proporcionen directamente la misma reacción observada en la disolución sobre la superficie.

Ejemplo 3. Interacción de HA-vancomicina sobre una superficie.

Este ejemplo muestra que el proceso observado en disolución también se produce directamente sobre la superficie de un material.

Se prepararon superficies de poliestireno del siguiente modo:

- tratamiento con plasma de aire durante 20 segundos

- incubación con disolución de polietilenimina (PEI) al 0,5 % en agua durante 2 horas

- lavado con agua milliQ (3 veces)

- incubación de las superficies de poliestireno durante la noche con disolución de ácido hialurónico de 800 kDa 0,2 % (Lifecore) en agua milliQ, en presencia de 5 mg/cm³ de NHS y 7,5 mg/cm³ de EDC

- lavado con agua milliQ (2 veces)

- incubación con disolución al 0,7 % de vancomicina en agua durante la noche, en presencia de 5 mg/cm³ de NHS y 7,5 mg/cm³ de EDC.

- lavado con agua milliQ (3 veces)

Al final del tratamiento sobre las superficies de poliestireno así preparadas se observa una capa delgada opaca muy homogénea, derivada de la interacción producida entre el ácido hialurónico unido sobre la superficie en la primera etapa de reacción y la vancomicina añadida en la segunda etapa de reacción. Las superficies de poliestireno tratadas del mismo modo, pero en ausencia de NHS y EDC durante la segunda incubación en disolución de vancomicina, son perfectamente transparentes, de ahí que se confirme la importancia de los agentes de condensación.

Ejemplo 4 - Proceso de recubrimiento de un tornillo de implante hecho de titanio con ácido hialurónico y vancomicina.

Algunos tornillos de implante hechos de titanio, con una longitud de 13 mm y anchura de 4 mm, se tratan del siguiente modo:

muestra 1: sin tratamiento (muestra de Ti)

muestra 2: funcionalización superficial usando PEI, y unión de HA como en el Ejemplo 3 (muestra de Ti-HA).

muestra 3: una muestra tratada como en el punto 2 se sometió posteriormente a incubación con una disolución al 0,7 % de vancomicina en agua durante la noche, en presencia de 5 mg/cm³ de NHS y 7,5 mg/cm³ de EDC, y posterior lavado con agua milliQ (muestra de Ti-HA-VXL)

Las muestras así obtenidas se sometieron posteriormente a análisis de XPS (espectroscopía fotoelectrónica de rayos X) para evaluar la composición química de la superficie. Se analizó una muestra de vancomicina, obtenida dejando que se evapore una disolución de vancomicina en agua milliQ sobre un sustrato de plástico a lo largo del mismo como referencia. Se obtuvieron los siguientes resultados, expresados en porcentaje de átomos y recordando que el análisis de XPS no mide la presencia de átomos de hidrógeno:

Muestra	C	O	N	Ti	Cl
Vancomicina	77,8	15,9	4,6		1,7
Ti	34,8	46,4	0,4	18,4	
Ti-HA	69,0	24,4	6,3	0,3	
Ti-HA-VXL	69,5	23,2	5,8	0,6	0,9

La molécula de vancomicina se caracteriza, para fines analíticos con respecto a esta evaluación, por la presencia del heteroelemento Cl (dos átomos en un compuesto que también comprende O, C y N con peso molecular de aproximadamente 1450 Da). La presencia de Cl, en un porcentaje atómico inferior al 2 %, se muestra en realidad por el análisis de XPS, como se indica en la tabla, en la línea que indica el análisis de vancomicina. Las superficies del tornillo de Ti y del tornillo de Ti-HA se caracterizan por los valores de composición en línea con las expectativas, como es observable de la bibliografía del sector.

La composición de la superficie de la muestra de Ti-HA-VXL es diferente de la de Ti-HA debido a la presencia de Cl, de ahí la introducción de la molécula de vancomicina sobre la superficie.

Ejemplo 5 - Ejemplo de la importancia del peso molecular del ácido hialurónico sobre la liberación de vancomicina de superficies modificadas mediante el presente proceso.

Se prepararon superficies de poliestireno modificadas con diferentes pesos moleculares de HA y a continuación con la disolución de vancomicina en presencia de NHS y EDC para observar la especificidad de la reacción de HA-vancomicina. Se usaron HA LW (10 kDa), HA MW (aproximadamente 70 kDa), HA HW (880 kDa) y HA HHW (aproximadamente 2000 kDa). Así, las superficies se funcionalizaron primero con polietilenimina (disolución al 0,5 % en agua durante 2 horas); a continuación se realizó la incubación durante la noche con las disoluciones de HA con diferente peso molecular en presencia de NHS y EDC. Posteriormente se llevó a cabo el lavado en agua y a continuación las superficies se incubaron durante la noche con una disolución al 0,8 % de vancomicina en agua en presencia de 5 mg/ml de NHS y 7,5 mg/ml de EDC.

La opacidad de la superficie se observó únicamente con el peso HW de HA, aún cuando para HA MW y HA HHW los pocillos no parecieron perfectamente transparentes: así, hay una cierta especificidad, aunque solo dimensional, en la interacción entre vancomicina y HA HW.

Al final del lavado, las superficies se incubaron en PBS para realizar el análisis de liberación de vancomicina con el tiempo mediante HPLC. El diagrama en la Figura 3 muestra la cantidad de vancomicina liberada por las diferentes superficies con el tiempo (un mes): puede observarse que la superficie modificada con HA HW libera una mayor cantidad de antibiótico con respecto a aquellas modificadas con los otros pesos moleculares.

Ejemplo 6 - Influencia del proceso de funcionalización sobre la cantidad de vancomicina liberada por superficies modificadas mediante el presente proceso.

Se planeó el tratamiento de dos placas de 6 pocillos de poliestireno con HA + VXL (VXL = vancomicina y agentes de condensación EDC-NHS), pero funcionalizando las superficies con PEI (polietilenimina) o con colágeno fibrilado para verificar si la funcionalización con colágeno fibrilado produce algún cambio en la tasa de liberación de vancomicina de las superficies de poliestireno. Las placas de 6 pocillos se trataron con plasma como en el ejemplo previo, a continuación los pocillos se incubaron con una disolución de PEI al 0,5 % en agua durante 2 horas o con una disolución al 0,3 % de colágeno en ácido acético 10 mM y un volumen igual de PBS a 37 °C durante 8 horas.

Antes de la etapa de funcionalización, las superficies se trataron con una disolución al 0,2 % de HA HW en presencia de NHS y EDC durante la noche, a continuación se lavaron con agua milliQ y se incubaron con una disolución al 0,75 % de vancomicina en agua en presencia de NHS y EDC durante la noche. Al final de tal incubación, las superficies se lavaron con agua milliQ y se secaron.

Se realizó la etapa de liberación en PBS a 37 °C, con la medición de la cantidad liberada a las 4 horas, 24 horas, 4 días, 12 días y 21 días mediante HPLC. Todos los tiempos revelaron que las superficies modificadas con colágeno liberan una mayor cantidad de antibiótico con respecto a aquellas funcionalizadas con PEI. El diagrama en la Figura 4 muestra la curva acumulada de la liberación de vancomicina de las superficies diferentemente funcionalizadas: puede observarse que, en cada momento de tiempo, las superficies funcionalizadas con colágeno fibrilado liberan una mayor cantidad de vancomicina.

Este ejemplo indica que, por sorpresa y motivos no completamente claros, la etapa de funcionalización superficial, en particular las especies moleculares usadas para la funcionalización superficial, influye en la cantidad total de vancomicina “capturada” de la superficie recubierta con ácido hialurónico y/o la cantidad de vancomicina que puede liberar la superficie recubierta con ácido hialurónico. Yendo más allá de la importancia de esta observación desde un punto de vista funcional, el resultado confirma que el fenómeno observado no es un efecto general de la acción de EDC-NHS sobre la vancomicina en disolución, pero está unido de una manera sorprendente e inesperada a la estructura molecular de la superficie.

Ejemplo 7 - Verificación de las propiedades mejoradas de estimulación del comportamiento osteogénico de células mesenquimatosas.

Con el fin de evaluar la respuesta de las células mesenquimatosas al proceso de recubrimiento y así verificar si lo último también puede tener efectos sobre la osteogénesis, se cultivaron células mesenquimatosas sobre las siguientes superficies, provistas sobre placas con micro-pocillos para cultivos celulares:

- plástico para cultivos celulares (control)

- plástico para cultivos funcionalizado con PEI y posterior enlace covalente de ácido hialurónico de 800 kDa (HA)

- plástico para cultivos funcionalizado con PEI y posterior enlace covalente de ácido hialurónico de 800 kDa, seguido de formación de complejos de HA-vancomicina como se ha descrito en el ejemplo previo (HA-VXL)

Se adquirieron células mesenquimatosas de médula ósea humana de Lonza Milano srl en forma sin diferenciar. Como se sabe, según estímulos externos, estas células pueden diferenciarse a lo largo de algunas trayectorias diferentes, que incluyen la osteogénica. Las células se cultivaron en un medio osteogénico y la expresión de algunos genes responsables de la formación de tejido óseo de los mismos se evaluó mediante análisis de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). Los datos se informan en la siguiente tabla, en la que “=” significa expresión equivalente a la del control, “+” expresión hasta 5 veces superior a la del control, “++” expresión superior a 5 veces la del control.

Se obtuvieron los siguientes resultados, después de 10 días de cultivo:

Gen	HA	HA-VXL
Fosfatasa alcalina	=	+
RunX2	+	+
Osteocalcina	+	+
Sialoproteína ósea	++	++
Proteína-2 morfogenética ósea (BMP-2)	++	++

Estos datos confirman que el recubrimiento con HA estimula la expresión de genes ligados a la formación de tejido óseo, confirmando los datos *in vivo* citados en la bibliografía referentes al efecto del enlace covalente de capas superficiales de HA sobre la osteointegración (Morra y col., Covalently-Linked Hyaluronan Promotes Bone Formation around Ti Implants in a Rabbit Model, publicado en Journal of Orthopedic Research, 27:657-663, 2009). En particular, tanto el factor de transcripción RunX2, que controla la diferenciación celular, como en particular la proteína BMP-2 y BSP (sialoproteína ósea) se expresan significativamente en exceso sobre HA y HA-VXL con respecto al control, e indican un proceso osteogénico extremadamente significativo. La presencia de los complejos con vancomicina no altera sustancialmente las ventajas de HA (por el contrario, otro gen muy importante, la fosfatasa alcalina, parece expresarse más sobre HA-VXL con respecto a HA), confirmando que también este tipo de superficie es pro-osteogénica. Esta es una propiedad muy importante, que combinada con la liberación peculiar del antibiótico, está en la base de la generación y diseño de dispositivos multifuncionales.

Ejemplo 8 - Verificación de la eficiencia antibacteriana de tornillos de implante obtenidos según el presente proceso.

Se realizaron pruebas de aureola de inhibición en cultivos de *Staphylococcus epidermidis* con el objetivo de demostrar la acción antibacteriana de la presente invención. Se proporcionan implantes recubiertos con HA y con HA-VXL mediante los métodos descritos previamente. A continuación, estos implantes, junto con los controles negativos (implantes no tratados), se incubaron en un medio de agar semi-sólido junto con la mezcla bacteriana en

una placa de Petri a 37 °C. Las bacterias deben proliferar y, en el caso de una superficie con propiedades antibacterianas (con liberación de antibiótico), debe formarse una aureola de inhibición, es decir, un área sin bacterias que rodea el implante, alrededor del implante. Los resultados de este experimento confirmaron que el tratamiento desarrollado tiene actividades antibacterianas: en realidad, alrededor de los implantes de HA + VXL se observa la aureola de inhibición, que no se forma alrededor de los implantes de control. La Figura 5 representa una imagen que explica el experimento, con los implantes de control en la parte superior (solo titanio a la izquierda, Ti recubierto con HA a la derecha) y los tratados en la parte inferior (HA-VXL, dos réplicas), alrededor de las cuales se observa claramente la aureola de inhibición.

Los implantes así tratados se recogieron posteriormente y una vez más se sumergieron en un agar que contenía bacterias para verificar si mantendrían su actividad antibacteriana: en realidad, la aureola de inhibición se forma alrededor de los implantes tratados en esta segunda incubación, incluso teniendo un diámetro ligeramente más pequeño con respecto al formado la primera vez. También ocurrió lo mismo en el caso de una tercera incubación.

Así, las superficies de los implantes de HA-VXL revelan las mayores características osteogénicas del ácido hialurónico, como se muestra por el Ejemplo 7, con las que se combinan las propiedades antibacterianas reveladas por los resultados ejemplificados por la fotografía indicados en la Figura 5. Así, este ejemplo confirma la naturaleza multifuncional de la superficie obtenida según el presente proceso, y la ventaja funcional de la misma con respecto al dispositivo convencional (tornillo hecho de titanio) y con respecto al dispositivo recubierto con HA descrito en la materia.

Ejemplo 9 - Realización de un tornillo de fijación de fractura hecho de titanio, con superficie rugosificada y recubrimiento con ácido hialurónico-vancomicina.

Se usa un tornillo hecho de titanio de grado 5 para la fijación de fracturas para la demostración de la preparación de un dispositivo de implante con superficie multifuncional, que tiene las siguientes propiedades:

- superficie rugosa y que garantiza el aumento del área superficial

- superficie bioactiva mediante enlace con ácido hialurónico tras la funcionalización mediante adsorción de colágeno fibrilado

- superficie antibacteriana mediante la liberación de la vancomicina presente en complejos con ácido hialurónico unido a la superficie.

La porción apical (cabeza) del tornillo se produce mediante enmascaramiento y el tornillo se somete a un proceso de chorreo con arena durante 40 segundos en una máquina de chorreo con arena Norblast, usando óxidos de titanio como agente de enarenado. A continuación, el tornillo se somete a un proceso de tratamiento con ácidos, según protocolos comúnmente usados por esta empresa para tratar implantes dentales, y a continuación se somete al proceso en cuestión como en el Ejemplo 7 y 8.

La superficie rugosificada del tornillo tiene un área superficial, y así una superficie de contacto, más del 70 % superior a la de un tornillo convencional.

REIVINDICACIONES

- 1.- Dispositivo implantable para implantarse en un cuerpo humano o animal, en el que al menos una parte de la superficie de dicho dispositivo está recubierta con un complejo de ácido hialurónico y antibiótico de glucopéptido y en el que dicho ácido hialurónico tiene un peso molecular promedio comprendido entre 400.000 y 1.000.000 Da.
- 2.- Dispositivo implantable según la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo está hecho de acero, titanio o aleaciones del mismo con otros metales o de material plástico, que son adecuados para aplicaciones sobre el cuerpo humano o animal, o está hecho de materiales cerámicos, tales como hidroxiapatita u otras formas de fosfatos de calcio, incluso en forma de polvos y gránulos similares a partículas usados como rellenos de cavidades óseas.
- 3.- Dispositivo implantable según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho dispositivo consiste en un tornillo de implante dental, preferentemente hecho de titanio o aleaciones del mismo, posiblemente de tipo transmucoso, o de un tornillo, preferentemente hecho de titanio o aleaciones del mismo, para fijación espinal o esquelética, o consiste en un disco intervertebral, preferentemente hecho de titanio, aleaciones del mismo o aleaciones de cobalto-cromo o hecho de aleaciones metálicas que se usan comúnmente para estas aplicaciones.
- 4.- Dispositivo implantable según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho antibiótico de glucopéptido es vancomicina.
- 5.- Dispositivo implantable según las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho ácido hialurónico se inmoviliza sobre la superficie de dicho dispositivo.
- 6.- Dispositivo según la reivindicación 5, en el que la superficie de dicho dispositivo está aminada.
- 7.- Dispositivo según la reivindicación 5, en el que la superficie de dicho dispositivo comprende grupos carboxilo obtenidos por deposición de plasma de ácido acrílico/metacrílico.
- 8.- Dispositivo según la reivindicación 5, en el que la superficie de dicho dispositivo está funcionalizada con colágeno o moléculas de proteína de la matriz extracelular, preferentemente elegidas de entre laminina, fibronectina y vitronectina, en el que sobre la superficie de dicho dispositivo se adsorbe colágeno en una forma de monómero o fibrilada.
- 9.- Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho complejo de ácido hialurónico con un antibiótico de glucopéptido puede obtenerse tratando dicho ácido hialurónico con una disolución de dicho antibiótico de glucopéptido en presencia de un agente de condensación o de reticulación.
- 10.- Dispositivo según la reivindicación 9, en el que dicho agente de condensación o de reticulación es N-hidroxisuccinimida/1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.
- 11.- Gel de colágeno que comprende dicho complejo de ácido hialurónico con un antibiótico de glucopéptido, como tal o liofilizado, en el que dicho complejo de ácido hialurónico con dicho antibiótico de glucopéptido es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 12.- Gel según la reivindicación 11, que va a usarse como material de relleno alrededor de un implante de prótesis ósea.
- 13.- Kit que comprende un dispositivo implantable como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un gel como se define en la reivindicación 11 o 12.
- 14.- Método para obtener un dispositivo implantable según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un gel según la reivindicación 11 o 12, que comprende la etapa de formar dicho complejo de ácido hialurónico con dicho antibiótico de glucopéptido haciendo que dicho ácido hialurónico se ponga en contacto con una disolución de dicho antibiótico de glucopéptido, en presencia de un agente de condensación o de reticulación.
- 15.- Método según la reivindicación 14, en el que dicho agente de condensación o de reticulación es N-hidroxisuccinimida/1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.
- 16.- Método según la reivindicación 14 o 15, en el que la superficie de dicho dispositivo implantable se amina de antemano mediante deposición de plasma superficial de una amina elegida entre alilamina, hexilamina o heptilamina o mediante deposición de disolución de polietilenimina o ácido acrílico/metacrílico o mediante tratamiento empleando silanos, tales como 3-aminopropiltrietoxisilano.
- 17.- Método según la reivindicación 16, en el que dicho ácido hialurónico se inmoviliza sobre dicha superficie aminada mediante condensación con N-hidroxisuccinimida/1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, o por tratamiento de ácido hialurónico con peryodato y posterior aminación reductora.

18.- Método según la reivindicación 14 o 15, en el que la superficie de dicho dispositivo se funcionaliza de antemano con colágeno.

5 19.- Método según la reivindicación 14 o 15, que comprende la formación de un precipitado de colágeno en suspensión acuosa que comprende dicho complejo de ácido hialurónico con dicho antibiótico de glucopéptido, su separación y secado parcial para obtener un gel.

20.- Dispositivo de implante antibacteriano y osteoinductivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

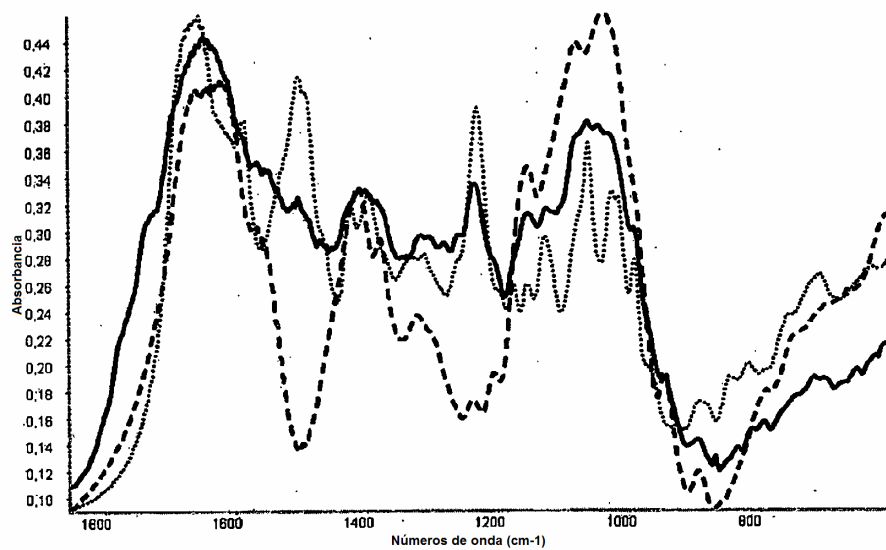


FIG. 1

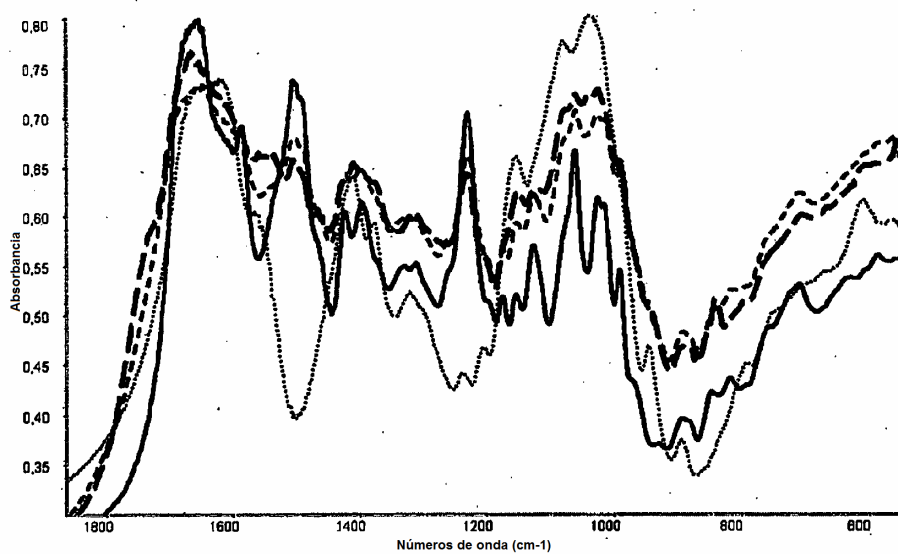


FIG. 2

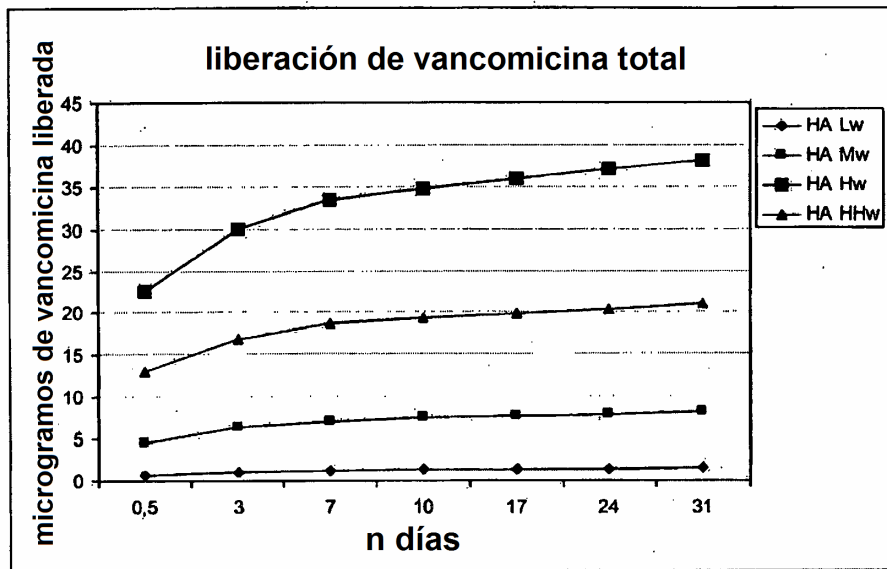


FIG. 3

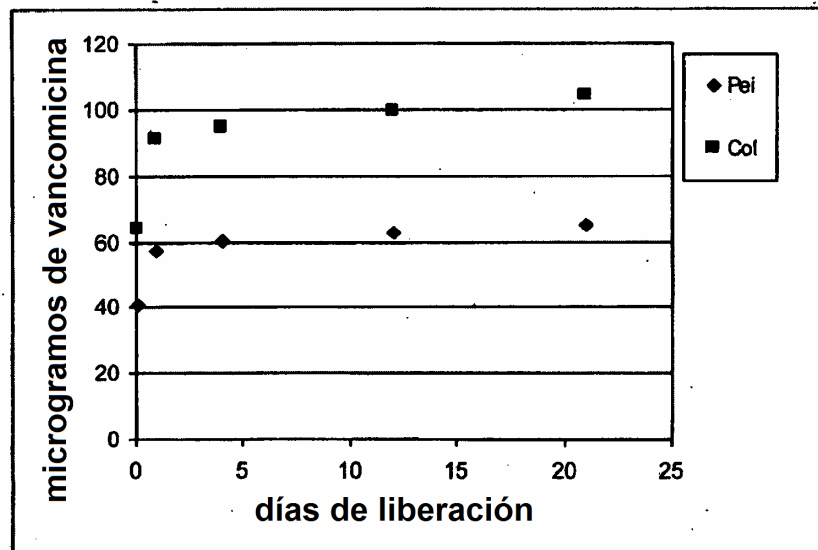


FIG. 4

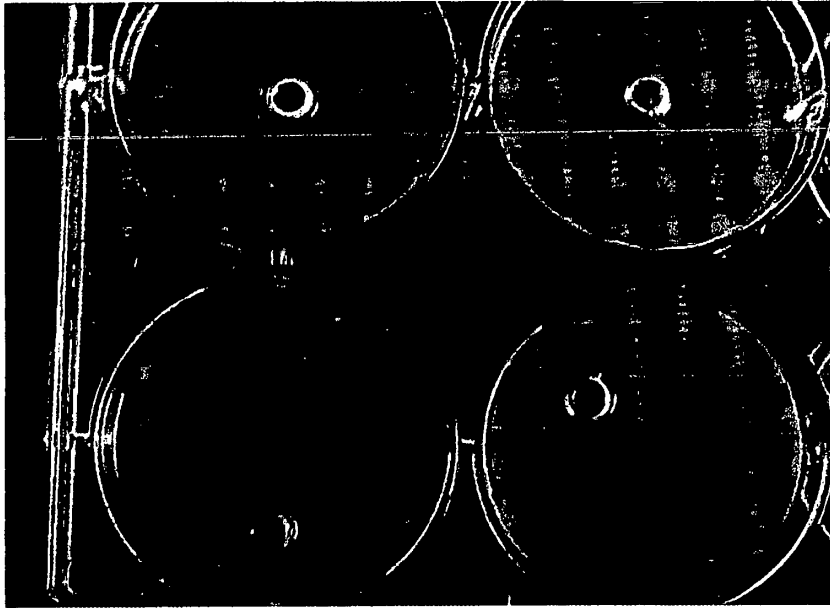


FIG. 5