(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 903 179**

(51) Int. CI.:

A61L 27/20 (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01)
A61L 27/26 (2006.01)
A61L 27/34 (2006.01)
A61L 29/08 (2006.01)
C08L 5/08 (2006.01)
C08L 77/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2017 PCT/EP2017/060378**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **09.11.2017 WO17191110**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2017 E 17720148 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.10.2021 EP 3452118**

(54) Título: **Recubrimientos de polipéptidos y ácido hialurónico**

(30) Prioridad:

02.05.2016 EP 16305509

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.03.2022

(73) Titular/es:

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ DE STRASBOURG (33.3%) y
PROTIP MEDICAL (33.3%)

(72) Inventor/es:

LAVALLE, PHILIPPE;
SCHAAF, PIERRE;
VRANA, NIHAL ENGIN y
MUTSCHLER, ANGELA

(74) Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

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

Recubrimientos de polipéptidos y ácido hialurónico

La presente invención se refiere a un recubrimiento polielectrolítico que comprende al menos una capa policatiónica que consiste en al menos un policatión que consiste en n unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1) y al menos una capa polianiónica que consiste en ácido hialurónico. El recubrimiento polielectrolítico tiene actividad biocida y, por tanto, la invención se refiere además al uso de dicho recubrimiento polielectrolítico para producir un dispositivo, en particular un dispositivo médico bacteriostático, más particularmente un dispositivo implantable, que comprende dicho recubrimiento polielectrolítico, y un procedimiento para preparar dicho dispositivo y un kit.

Las infecciones nosocomiales (también llamadas infecciones asociadas a la atención médica), la cuarta causa principal de enfermedad en los países industrializados, son un problema de salud importante. Año tras año, aumenta la implantación de prótesis y dispositivos médicos. Mientras tanto, la prevalencia de infecciones nosocomiales relacionadas con los implantes, que se informan en la literatura, está en constante aumento. Se sabe que la mitad de todas las infecciones nosocomiales en todo el mundo involucran un dispositivo médico. Por consiguiente, las infecciones más importantes adquiridas en el hospital, según la frecuencia y la posible gravedad, son las relacionadas con los procedimientos, por ejemplo, infecciones del sitio quirúrgico y dispositivos médicos, que incluyen la infección del tracto urinario en pacientes cateterizados, neumonía en pacientes intubados con un ventilador y bacteriemia relacionada con el uso de catéter.

Algunos factores clave para el aumento de las infecciones relacionadas con los dispositivos médicos son i) el envejecimiento de la población, ii) las bacterias resistentes a múltiples fármacos, iii) el escaso desarrollo de nuevas moléculas antibióticas diseñadas. En el caso de dispositivos médicos como los implantes, el sitio quirúrgico es una diana atractiva para los patógenos y conduce a complicaciones tempranas. Para prevenir tales infecciones asociadas con los implantes, es de particular interés un tratamiento local durante las primeras 6 horas posteriores a la implantación.

Para frenar esta tendencia se necesitan con urgencia recubrimientos y materiales innovadores, bioactivos e inteligentes para reducir las infecciones nosocomiales.

La deposición alterna de policationes y polianiones sobre un sustrato conduce generalmente a la formación de un recubrimiento, denominado recubrimiento polielectrolítico. Esos recubrimientos polielectrolíticos consisten en una estructura de múltiples capas y su espesor aumenta con la cantidad de etapas de deposición. Las posibles aplicaciones de este tipo de recubrimientos están muy extendidas y van desde dispositivos de almacenamiento de energía hasta recubrimientos antivaho y sustratos bioactivos. En esta última área, los recubrimientos antimicrobianos están recibiendo una gran atención debido a su importancia en la lucha contra las infecciones nosocomiales.

Una estrategia para los recubrimientos antimicrobianos consiste en el diseño de recubrimientos antiadherentes para inhibir la adhesión y el crecimiento de patógenos en el dispositivo. Estos recubrimientos anti-adherentes evitan así la formación de biopelículas. Sin embargo, dado que este procedimiento no inhibe el crecimiento del patógeno, el riesgo de colonización de otro sitio circundante es alto, en particular en el caso de personas frágiles e inmunodeprimidas.

Otra estrategia consiste en el diseño de recubrimientos bactericidas. Estos recubrimientos generalmente liberan agentes antimicrobianos, como antibióticos, que se incorporaron a la estructura del recubrimiento durante su fabricación o por difusión en el recubrimiento después de su fabricación. La liberación del compuesto activo puede desencadenarse, por ejemplo, mediante degradación enzimática del recubrimiento o mediante un cambio de pH. También puede tener lugar de forma natural debido a la hidrólisis de uno de los constituyentes de la película.

Estos son enfoques interesantes; sin embargo, el perfil de liberación *in situ* de los recubrimientos bactericidas debe controlarse perfectamente para evitar los efectos negativos de medicamentos administrados en sobredosis. Además, en la mayoría de los casos, la liberación es pasiva, lo que significa que los agentes antimicrobianos se administran en presencia o ausencia de bacterias. Para evitar estos inconvenientes, las estrategias de eliminación por contacto podrían ser más ventajosas y consistir en dañar las bacterias solo cuando entran en contacto con la superficie del material.

Los inventores de la presente invención han desarrollado recientemente un recubrimiento polielectrolítico mediante el uso de poli-L-arginina (PAR) como policatión y ácido hialurónico (HA) como polianión. Dicho recubrimiento se utilizó como un poderoso recubrimiento superficial con propiedades antimicrobianas y con propiedades inmunomoduladoras (Özçelik, H. y otros, 2015, Adv. Health. Mat, 4: 20126-2036). Sin embargo, en esta estrategia, se añadió además un péptido antimicrobiano para destruir eficazmente las bacterias, levaduras y hongos de forma concomitante. Además, la poli-L-arginina utilizada no era monodispersa, sino que el lote comercial de poli-L-arginina utilizado estaba compuesto por cadenas poliméricas con diferentes longitudes de cadena y un peso molecular de más de 70 000 (que corresponde a cadenas polipeptídicas que tienen más de 400 residuos de arginina).

Contrariamente a esto, en el contexto de la presente invención, los inventores seleccionaron cadenas de poli-L-arginina, poli-L-lisina o poli-L-ornitina bien definidas de 10 a 200 residuos, para fabricar los recubrimientos capa por capa con HA como polianión.

Los inventores demostraron sorprendentemente que esos recubrimientos mostraban una fuerte inhibición del crecimiento bacteriano de, por ejemplo, *S. aureus* y *M. luteus.* Estos resultados son inesperados y sorprendentes, en particular, porque algunos de estos polímeros mostraron actividad biocida en solución mientras que dicha actividad biocida se perdió cuando se utilizaron como recubrimiento en ausencia del polianión HA.

La actividad biocida contra *M. luteus* (ver la Figura 5) es además sorprendente e inesperada, porque *M. luteus* es deficiente en hialuronidasa. Los inventores demostraron así que la actividad biocida del recubrimiento polielectrolítico de la invención es independiente de la degradación de la capa de HA, lo que es contrario a los recubrimientos de la técnica anterior que requieren la degradación de la capa de HA.

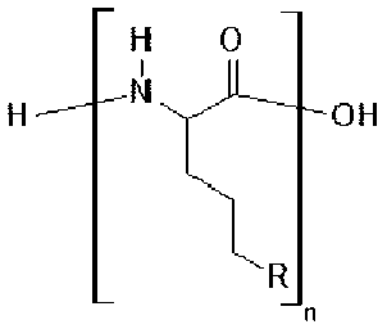
Además, a diferencia de otros recubrimientos, el mecanismo responsable de la actividad biocida del recubrimiento de la presente invención parece basarse en el contacto superficial de las bacterias con el recubrimiento.

Los inventores demostraron además que las moléculas de policatión se difunden dentro del recubrimiento y la actividad biocida parece depender de la difusión libre de las moléculas de policatión, porque la reticulación del recubrimiento reduce su función biocida (ver las Figuras 10 y 11).

Características de la invención

Por tanto, la presente invención se refiere a un recubrimiento polielectrolítico, que comprende:

(a) al menos una capa policatiónica que consiste en al menos un policatión que consiste en n unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1),



(1)

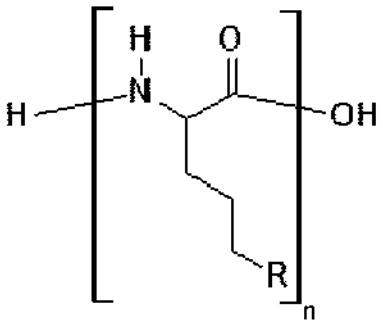
en la que

- n es un número entero comprendido entre 11 y 100, y
- cada grupo R, idéntico o diferente, se elige entre $-NH_2$, $-CH_2-NH_2$ y $-NH-C(NH)-NH_2$, y

(b) al menos una capa polianiónica que consiste en ácido hialurónico.

La presente invención se refiere, en particular, a un recubrimiento polielectrolítico, que comprende:

(a) al menos una capa policatiónica que consiste en n unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1),



(1)

en la que

- n es un número entero comprendido entre 11 y 100, y
- R se elige entre $-NH_2$, $-CH_2-NH_2$ y $-NH-C(NH)-NH_2$, y

(b) al menos una capa polianiónica que consiste en ácido hialurónico.

La presente invención también se refiere a un dispositivo que comprende el recubrimiento polielectrolítico de la invención.

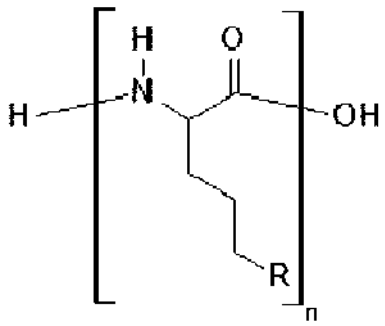
La presente invención se refiere además al uso del recubrimiento polielectrolítico de la invención para producir un dispositivo de la invención, en particular un dispositivo médico, más particularmente un dispositivo implantable.

La invención se refiere además a un procedimiento para preparar un dispositivo que comprende el recubrimiento polielectrolítico de la invención, el procedimiento comprende:

(a) proporcionar un dispositivo;

(b1) depositar sobre la superficie de dicho dispositivo

i) al menos una capa policatiónica que consiste en al menos un policatión que consiste en n unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1),



(1)

en la que

- n es un número entero comprendido entre 11 y 100, y
- cada grupo R, idéntico o diferente, se elige entre $-NH_2$, $-CH_2-NH_2$ y $-NH-C(NH)-NH_2$, y después

ii) al menos una capa polianiónica que consiste en ácido hialurónico, o

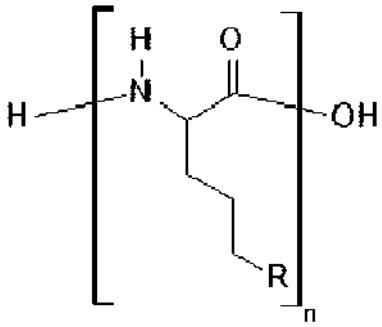
(b2) depositar sobre la superficie de dicho dispositivo ii) y después i) como se definió anteriormente, y opcionalmente repetir la etapa b1) y/o b2).

La invención se refiere además, en particular, a un procedimiento para preparar un dispositivo que comprende el recubrimiento polielectrolítico de la invención, el procedimiento comprende:

(a) proporcionar un dispositivo;

(b1) depositar sobre la superficie de dicho dispositivo

(i) al menos una capa policatiónica que consiste en n unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1),



(1)

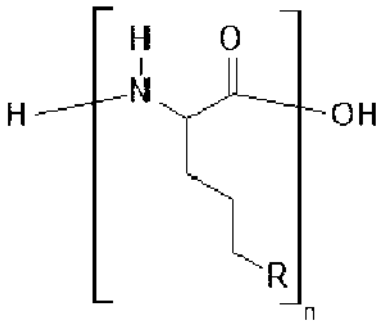
en la que

- n es un número entero comprendido entre 11 y 100, y
- R se elige entre $-NH_2$, $-CH_2-NH_2$ y $-NH-C(NH)-NH_2$, y después

ii) al menos una capa polianiónica que consiste en ácido hialurónico, o

(b2) depositar sobre la superficie de dicho dispositivo ii) y después i) como se definió anteriormente, y opcionalmente repetir la etapa b1) y/o b2).

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit que comprende a) al menos un material policatiónico que consiste en n unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1),



(1)

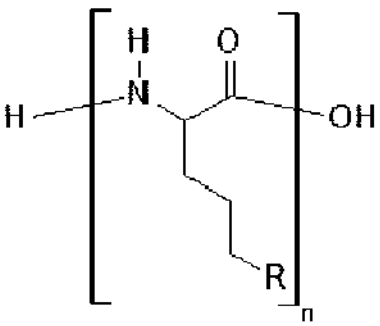
en la que

- n es un número entero comprendido entre 11 y 100, y
- cada grupo R, idéntico o diferente, se elige entre $-NH_2$, $-CH_2-NH_2$ y $-NH-C(NH)-NH_2$, y

b) al menos un material polianiónico que consiste en ácido hialurónico.

En un aspecto particular, la invención se refiere a un kit que comprende

a) al menos un material policatiónico que consiste en n unidades repetitivas de Fórmula (1),



(1)

en la que

- n es un número entero comprendido entre 11 y 100, y
- R se elige entre $-NH_2$, $-CH_2-NH_2$ y $-NH-C(NH)-NH_2$, y

b) al menos un material polianiónico que consiste en ácido hialurónico.

En el presente documento, pero no cubierto por las reivindicaciones, se describe un procedimiento para prevenir una infección bacteriana en un individuo que se somete a la implantación de un dispositivo implantable que comprende las etapas de proporcionar un dispositivo implantable como se define en la presente a continuación, e implantar dicho dispositivo implantable en el individuo en donde dicho dispositivo implantable previene una infección bacteriana.

Descripción de la invención

Recubrimiento polielectrolítico

Los inventores de la presente invención han demostrado que un recubrimiento polielectrolítico con poliarginina, poliornitina o polilisina como policatión y ácido hialurónico (HA) como polianión es un potente recubrimiento superficial con propiedades biocidas. Los inventores demostraron que, un recubrimiento polielectrolítico con poli-L-arginina (PAR), poli-L-ornitina (PLO) o poli-L-lisina (PLL) con, en particular, 30 residuos de arginina, ornitina o lisina, respectivamente, y el ácido hialurónico (HA) como polianión tiene fuertes actividades biocidas.

Los inventores demostraron además que un recubrimiento polielectrolítico con poliornitina con 100 residuos de ornitina y ácido hialurónico (HA) como polianión tiene una fuerte actividad biocida.

La expresión “polielectrolito”, como conocen los expertos en la técnica, se refiere a polímeros cuyas unidades repetidas portan un grupo electrolito. Los policationes y los polianiones son polielectrolitos. Por consiguiente, las capas polianiónicas y policatiónicas en el contexto de la invención pueden denominarse capas polielectrolíticas.

El policatión de Fórmula (1) consiste en n unidades repetitivas, donde dichas unidades repetitivas pueden ser idénticas o diferentes. De acuerdo con la invención, la unidad repetitiva del policatión tiene la fórmula $-NH-CH(CH_2-CH_2-CH_2-R)-C(=O)$. Para una unidad repetitiva dada, R es como se definió anteriormente y, por lo tanto, puede ser diferente para cada unidad.

De acuerdo con una realización preferida, el policatión de Fórmula (1) consiste en n unidades repetitivas en la que todos los grupos R son idénticos.

De acuerdo con una realización adicional, el policatión de Fórmula (1) consiste en n unidades repetitivas en la que los grupos R pueden ser diferentes.

Entre las n unidades, el policatión puede comprender i unidades de fórmula $-NH-CH(CH_2-CH_2-CH_2-NH_2)-C(=O)$, j unidades de fórmula $-NH-CH(CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2)-C(=O)$, y k unidades de fórmula $-NH-CH(CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(NH)-NH_2)-C(=O)$, en la que cada i, j, y k está comprendida entre 0 y n, y en la que i + j + k = n, con una distribución aleatoria de las unidades o con una distribución en bloques. La palabra "al menos" en "al menos un policatión" en la presente se refiere a al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 policationes que consisten en n unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1), preferentemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 policationes, preferentemente un policatión que consiste en n unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1).

"Un policatión que consiste en n unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1)” o sólo “n unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1)” como se define en la presente es un polímero cargado positivamente y también puede denominarse "material policatiónico". Por consiguiente, en una realización, el material policatiónico de n unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1) como se define en el contexto de la invención constituye al menos una capa policatiónica del recubrimiento polielectrolítico de la invención.

En una realización, la "n" de las n unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1) es un número entero comprendido entre 11 y 100, cuando R se elige entre $-NH_2$, $-CH_2-NH_2$ y $-NH-C(NH)-NH_2$.

En una realización adicional, n es un número entero comprendido entre 11 y 99, por ejemplo, n es un número entero comprendido entre 11 y 95, 15 y 95, 15 y 90, 15 y 85, 15 y 80, 15 y 75, 20 y 95, 20 y 90, 20 y 85, 20 y 80, 20 y 75, 25 y 95, 25 y 90, 25 y 85, 25 y 80, 25 y 75, 28 y 74, 28 y 72, 30 y 70, tal como 30, 50 y 70, cuando R se elige entre $-NH_2$, $-CH_2-NH_2$ y $-NH-C(NH)-NH_2$, preferentemente, cuando R se elige entre $-CH_2-NH_2$ y $-NH-C(NH)-NH_2$, con mayor preferencia, cuando R es $-NH-C(NH)-NH_2$.

En una realización adicional, n es un número entero comprendido entre 11 y 49, por ejemplo, n es un número entero comprendido entre 11 y 45, 15 y 45, 20 y 40, 21 y 39, 22 y 38, 23 y 37, 24 y 36, 25 y 35, 26 y 34, 27 y 33, 28 y 32, 29 y 31, cuando R se elige entre $-NH_2$, $-CH_2-NH_2$ y -NH-C(NH)-NH_2, preferentemente, cuando R se elige entre $-CH_2-NH_2$ y -NH-C(NH)-NH_2, con mayor preferencia, cuando R es -NH-C(NH)-NH_2.

En una realización particular, n es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 11, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 47, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, preferentemente, n es 30, 50 o 70, cuando R se elige entre $-NH_2$, $-CH_2-NH_2$ y -NH-C(NH)-NH_2, preferentemente, cuando R se elige entre $-CH_2-NH_2$ y -NH-C(NH)-NH_2, con mayor preferencia, cuando R es -NH-C(NH)-NH_2.

En una realización particular, n es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 11, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45 y 49, preferentemente, n es 30, cuando R se elige entre $-NH_2$, $-CH_2-NH_2$ y -NH-C(NH)-NH_2, preferentemente, cuando R se elige entre $-CH_2-NH_2$ y -NH-C(NH)-NH_2, con mayor preferencia, cuando R es -NH-C(NH)-NH_2.

En una realización particular, n es un número entero comprendido entre 11 y 150, por ejemplo entre 11 y 140, 11 y 130, 11 y 120, 11 y 120, 15 y 110, 15 y 100, 20 y 100, 22 y 95, 24 y 90, 26 y 80, 26 y 75, 26 y 70, 26 y 65, 26 y 55, 26 y 50, 26 y 45, 26 y 40, 26 y 35, 26 y 34, 27 y 33, 28 y 32, 29 y 31, cuando R es $-NH_2$. En una realización, n es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 11, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, preferentemente, n es 30 o 100, cuando R es $-NH_2$.

En una realización, n es un número entero como se definió anteriormente con la condición de que n no sea menor que 11 y n no sea mayor que 49, cuando R se elige entre $-NH_2$, $-CH_2-NH_2$ y -NH-C(NH)-NH_2, preferentemente, cuando R se elige entre $-CH_2-NH_2$ y -NH-C(NH)-NH_2, con mayor preferencia, cuando R es -NH-C(NH)-NH_2, preferentemente n no es menor que 15, 20 o 25 y n no es mayor que 45, 40 o 35, cuando R se elige entre $-NH_2$, $-CH_2-NH_2$ y -NH-C(NH)-NH_2, preferentemente, cuando R se elige entre $-CH_2-NH_2$ y -NH-C(NH)-NH_2, con mayor preferencia, cuando R es -NH-C(NH)-NH_2.

En una realización particular, n es un número entero como se definió anteriormente con la condición de que n no sea menor que 20 o 25 y n no sea mayor que 95 o 100, cuando R es -NH-C(NH)-NH_2.

En una realización particular, n es un número entero como se definió anteriormente con la condición de que n no sea menor que 20 o 25 y n no sea mayor que 45 o 40, cuando R es -NH-C(NH)-NH_2.

En una realización particular adicional, n es un número entero como se definió anteriormente con la condición de que n no sea menor que 20 o 25 y n no sea mayor que 45 o 40, cuando R es $-NH_2$.

En una realización particular adicional, n es un número entero como se definió anteriormente con la condición de que n no sea menor que 20 o 25 y n no sea mayor que 45 o 40, cuando R es $-CH_2-NH_2$.

La “unidad repetitiva” de Fórmula (1) también se puede llamar “unidad estructural” y en la presente se refiere a un aminoácido o residuo de aminoácido, en la que dicho aminoácido es ornitina cuando R es $-NH_2$, lisina cuando R es $-CH_2-NH_2$ o arginina, cuando R es -H-C(NH)-NH_2. Por consiguiente, "n unidades repetitivas de Fórmula (1)" también pueden denominarse "n residuos de aminoácidos de Fórmula (1)", más precisamente como n residuos de ornitina cuando R es $-NH_2$, n residuos de lisina cuando R es $-CH_2-NH_2$ o n residuos de arginina cuando R es -H-C(NH)-NH_2.

En una realización, las n unidades repetitivas de Fórmula (1) se polimerizan mediante la formación de un enlace peptídico. Por consiguiente, n unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1) o n residuos de aminoácidos de Fórmula (1) pueden denominarse polímero o polipéptido.

En algunas realizaciones, las unidades i, j y k como se definieron en la presente anteriormente se polimerizan mediante la formación de un enlace peptídico. Por consiguiente, el material policatiónico que comprende i unidades de fórmula -NH-CH($CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$)-C(=O), j unidades de fórmula -NH-CH($CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$)-C(=O), y k unidades de fórmula -NH-CH($CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(NH)-NH_2$)-C(=O), en donde cada i, j y k está comprendido entre 0 y n, y en donde i + j + k = n, con una distribución aleatoria de las unidades o con una distribución como bloque, puede denominarse copolímero.

Un “enlace peptídico”, también denominado enlace amida, es un enlace químico covalente formado entre el grupo carboxilo (COOH) de un aminoácido y el grupo amino (NH_2) de otro aminoácido, en donde se produce una molécula de agua.

De acuerdo con lo anterior, en algunas realizaciones, "n unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1)" pueden denominarse "poliornitina que tienen n residuos de ornitina" cuando R es $-NH_2$, "polilisina que tienen n residuos de lisina" cuando R es $-CH_2-NH_2$ o "poliarginina con que tienen n residuos de arginina" cuando R es -H-C(NH)-NH_2.

La "ornitina" es un aminoácido no proteinogénico que juega un papel en el ciclo de la urea. Poliornitina se refiere a un polímero con la unidad estructural ornitina. Poliornitina se refiere a poli-L-, poli-D- o poli-LD-ornitina. En el contexto de la presente invención, poliornitina se refiere en particular a poli-L-ornitina (PLO).

"Arginina" y "lisina" son α-aminoácidos que se utilizan en la biosíntesis de proteínas. Poliarginina y polilisina se refieren a un polímero con la unidad estructural arginina o lisina, respectivamente. Poliarginina o polilisina se refieren a poli-L-, poli-D- o poli-LD-arginina o lisina. En el contexto de la presente invención, poliarginina o polilisina se refieren, en particular, a poli-L-arginina (PAR) y poli-L-lisina (PLL), respectivamente.

"Poli-L-ornitina", "poli-L-lisina" y "poli-L-arginina" son polímeros sintéticos cargados positivamente (también denominados policationes) y se producen en forma de sal con un contraión. El contraión se puede seleccionar entre, pero no se limita a, clorhidrato, bromhidrato o trifluoracetato.

En un ejemplo, la poliarginina es clorhidrato de poli-L-arginina con CAS # 26982-20-7.

En un ejemplo, la poliornitina es bromhidrato de poli-L-ornitina con CAS # 27378-49-0 o clorhidrato de poli-L-ornitina con CAS # 26982-21-8.

En un ejemplo, la polilisina es triifluoracetato de poli-L-lisina, bromhidrato de poli-L-lisina con CAS # 25988-63-0 o clorhidrato de poli-L-lisina con CAS # 26124-78-7.

La poli-L-ornitina, poli-L-lisina y poli-L-arginina con un número definido de residuos de aminoácidos se pueden obtener comercialmente, por ejemplo, a través de Alamanda Polymers, EE. UU.

En un ejemplo, poli-L-arginina (PAR) tal como PAR10 (10 argininas (R), Mw = 2,1 kDa, PDI = 1); PAR30 (30 R, Mw = 6,4 kDa, PDI = 1,01), PAR50 (50 argininas (R), Mw = 9,6 kDa, PDI = 1,03); PAR70 (70 argininas (R), Mw = 13,4 kDa, PDI = 1,01), PAR100 (100 R, Mw = 20,6 kDa, PDI = 1,05) y PAR200 (200 R, Mw = 40,8 kDa, PDI = 1,06) se adquirieron de Alamanda Polymers, EE. UU.

En otro ejemplo, poli-L-ornitina (PLO) tal como PLO30 (30 R, Mw = 5,9 kDa, PDI = 1,03), PLO100 (100 R, Mw = 18,5 kDa, PDI = 1,03) y PLO250 (250 R, Mw = 44,7 kDa, PDI = 1,02) se adquirieron de Alamanda Polymers, EE. UU.

En otro ejemplo, poli-L-lisina (PLL) tal como PLL10 (10 R, Mw = 1,6 kDa), PLL30 (30 R, Mw = 5,4 kDa, PDI = 1,02), PLL100 (100 R, Mw = 17,3 kDa, PDI = 1,07), PLL250 (250 R, Mw = 39,5 kDa, PDI = 1,08) se adquirió de Alamanda Polymers, EE. UU.

Los expertos en la técnica conocen procedimientos para obtener polipéptidos que tienen n unidades repetitivas tales como poliarginina, polilisina o poliornitina con, por ejemplo, n = 30, e incluyen la polimerización por apertura de anillo de N-carboxianhídridos (NCA) de alfa-aminoácidos seguida de purificación. Generalmente, los polipéptidos se purifican después de la polimerización mediante precipitación en agua o, por ejemplo, en un no disolvente orgánico y, después de la desprotección de la cadena lateral de los aminoácidos, mediante diálisis. Todos los polímeros solubles en agua finalmente se liofilizan.

Los expertos en la técnica también conocen procedimientos para obtener copolímeros que tienen n unidades.

En una realización preferida, las n unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1) son monodispersas, es decir, el material policatiónico del que consiste la capa policatiónica es monodisperso. Los expertos en la técnica entenderán que si el material policatiónico del que consiste la capa policatiónica es monodisperso, la capa policatiónica también es monodispersa. Por consiguiente, en una realización, la capa policatiónica en el contexto de la presente invención es monodispersa.

"Monodisperso" en la presente se refiere a un polímero que consiste en las mismas moléculas que tienen la misma masa. Las cadenas poliméricas monodispersas sintéticas se pueden producir, por ejemplo, mediante procesos como la polimerización aniónica, un procedimiento que utiliza un catalizador aniónico para producir cadenas de longitud similar, por ejemplo, polimerización por apertura de anillos de N-carboxianhídridos de alfa-aminoácidos (NCA)). Sobre la base del índice de polidispersión (PDI) se puede concluir si una muestra de un polímero es monodispersa. Por consiguiente, en una realización, la monodispersión se expresa mediante el uso del índice de polidispersión (PDI).

En algunas realizaciones, cuando el al menos un policatión es más de un policatión, entonces el al menos un policatión puede ser polidisperso, es decir, el material policatiónico del que consiste la capa policatiónica es una mezcla de diferentes policationes y puede ser polidisperso. Los expertos en la técnica entenderán que si el material policatiónico del que consiste la capa policatiónica es polidisperso, la capa policatiónica también es polidispersa. Por consiguiente, en una realización, la capa policatiónica en el contexto de la presente invención es polidispersa.

"Polidisperso" en la presente se refiere a un polímero que consiste en diferentes moléculas que tienen una masa diferente.
El “índice de polidispersión (PDI)” o “índice de heterogeneidad”, o simplemente “dispersión”, es una medida de la distribución de la masa molecular en una muestra de polímero dada. El índice de polidispersión (PDI) se calcula dividiendo el peso molecular promedio en peso (M_w) por el peso molecular promedio en número (M_n). El PDI tiene un valor igual o mayor que 1, pero a medida que las cadenas de polímero se acercan a una longitud de cadena uniforme, el PDI se acerca a 1.

Por consiguiente, en una realización, el índice de polidispersión (PDI) es menor que 1,5, menor que 1,4, menor que 1,3, en particular entre 1 y 1,2, preferentemente entre 1 y 1,1, por ejemplo entre 1 y 1,05.

En una realización particular, el índice de polidispersión (PDI) de las n unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1), el material policatiónico o la capa policatiónica es menor que 1,5, menor que 1,4, menor que 1,3, en particular entre 1 y 1,2, preferentemente entre 1 y 1,1, por ejemplo entre 1 y 1,05.

Como conocen los expertos en la técnica, el PDI se puede medir mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), mediciones de dispersión de la luz tales como las mediciones de dispersión dinámica de la luz o espectrometría de masas tal como desorción/ionización láser asistida por una matriz (MALDI) o espectrometría de masas con ionización por electropulverización (ESI-MS).

En un ejemplo, el PDI se mide en los poliaminoácidos protegidos, típicamente, mediante cromatografía de permeación en gel (GPC) en, por ejemplo, DMF con LiBr 0,1 M a típicamente 60 °C o en los polipéptidos desprotegidos mediante, por ejemplo, GPC en tampón típicamente acuoso mediante el uso de, en ambos casos, una curva de calibración que se construyó a partir de patrones de PEG con polidispersión estrecha o calibración universal de TALLS. El peso molecular promedio se proporciona mediante TALLS o mediante espectroscopía de RMN de protones mediante el uso de la relación de integración de las unidades de repetición de aminoácidos con relación a los picos iniciadores incorporados.

El “ácido hialurónico (HA)", también conocido como hialuronano, es un polisacárido lineal (no ramificado) o glicosaminoglicano no sulfatado, compuesto de unidades de disacáridos repetidas de N-acetilglucosamina y glucuronato (unidos por enlaces glicosídicos β 1-3 y β 1-4). Por tanto, el ácido hialurónico (HA) es un polímero cargado negativamente (también denominado polianión) y, por lo tanto, en el contexto de la presente invención, también se denomina material polianiónico. Por lo tanto, dicho polímero cargado negativamente existe junto con un contraión en forma de sal. En el caso del hialuronato de sodio, el contraión es el sodio. Se distribuye ampliamente por los tejidos conectivo, epitelial y neural como parte de la matriz extracelular. Existen altas concentraciones en el humor vítreo y acuoso del ojo, el líquido sinovial, la piel y el cordón umbilical (gelatina de Wharton). El hombre promedio de 70 kg tiene aproximadamente 15 gramos de hialuronano en su cuerpo, un tercio del cual se metaboliza (se degrada y sintetiza) todos los días. Es una molécula conservada evolutivamente que se encuentra en los estreptococos del grupo A y C y *Pasteurella multocida*, así como en aves, mamíferos y animales de otros órdenes. En soluciones de peso molecular moderado a alto (500 000 a > 3 millones de Da) a bajas concentraciones, produce una viscosidad considerable a las soluciones acuosas. La hialuronidasa puede degradar el ácido hialurónico. El peso molecular (*Mw*) del hialuronano representa un promedio de todas las moléculas de la población y, por lo tanto, representa el promedio de masa molecular (promedio de peso molecular). En un ejemplo, el ácido hialurónico tiene un peso molecular de 150 kDa y se presenta en forma de hialuronato de sodio de Lifecore Biomed, EE. UU.

La “hialuronidasa” es una familia de enzimas que degradan el hialuronano. La enzima se encuentra en la mayoría de las especies animales y en muchos microorganismos. Existen varios tipos diferentes de hialuronidasa con diferente especificidad y cinética.

En una realización, el recubrimiento polielectrolítico puede comprender además una "sustancia farmacéutica activa".

En el contexto de la presente descripción, el término “sustancia farmacéutica activa” se refiere a compuestos o entidades que alteran, inhiben, activan o afectan de cualquier otra manera eventos biológicos. Por ejemplo, la sustancia incluye, entre otras, sustancias antineoplásicas, agentes antiinflamatorios, inmunosupresores, moduladores de la interacción célula-matriz extracelular que incluyen inhibidores del crecimiento celular, anticoagulantes, agentes antitrombóticos, inhibidores de enzimas, analgésicos, agentes antiproliferativos, sustancias antimicóticas, sustancias citostáticas, factores de crecimiento, hormonas, esteroides, sustancias no esteroides y antihistamínicos. Ejemplos de grupos de indicación son, sin limitarse a ellos, sustancias analgésicas, antiproliferativas, antitrombóticas, antiinflamatorias, antimicóticas, antibióticas, citostáticas, inmunosupresoras, así como factores de crecimiento, hormonas, glucocorticoides, esteroides, sustancias no esteroides, sustancias genéticamente o metabólicamente activas para el silenciamiento y la transfección, anticuerpos, péptidos, receptores, ligandos y cualquier derivado farmacéuticamente aceptable de estos. Los ejemplos específicos de los grupos anteriores son paclitaxel, estradiol, sirolimus, eritromicina, claritromicina, doxorrubicina, irinotecán, gentamicina, dicloxacilina, quinina, morfina, heparina, naproxeno, prednisona, dexametasona.

En una realización, la "sustancia farmacéutica activa" es el material policatiónico como se definió en la presente anteriormente.

En una realización, el recubrimiento polielectrolítico de la invención es biocompatible.

El término “biocompatible”, como se usa en el contexto de la invención, pretende describir un recubrimiento que no provoca una respuesta perjudicial sustancial *in vivo.*

En una realización, el recubrimiento polielectrolítico de la invención tiene propiedades inmunomoduladoras.

"Propiedades inmunomoduladoras" en la presente se refiere a inhibir la vía proinflamatoria.

En otras palabras, en una realización adicional, el recubrimiento polielectrolítico de la invención tiene un efecto inhibidor sobre la producción de citocinas proinflamatorias.

Las “citocinas proinflamatorias” son producidas predominantemente por macrófagos activados y están involucradas en la regulación positiva de reacciones inflamatorias. A diferencia de las citocinas antiinflamatorias, que promueven la curación y reducen la inflamación, las citocinas proinflamatorias actúan para empeorar la enfermedad.

Por consiguiente, las citocinas proinflamatorias en el contexto de la invención son liberadas por células inmunitarias, tales como macrófagos, en particular, por una subpoblación de macrófagos primarios humanos. Las citocinas proinflamatorias son, por ejemplo, pero no se limitan a, TNF-α, CCL18 y CD206.

La activación de macrófagos se puede dividir en dos categorías. Los macrófagos M1, o macrófagos activados por la vía clásica, que se activan durante la inflamación inicial, pero que su presencia a largo plazo puede resultar en inflamación crónica y los macrófagos M2, o macrófagos activados por la vía alternativa, que tienen un papel importante en la remodelación y cicatrización de los tejidos. Un desequilibrio en la activación de los macrófagos da como resultado el desarrollo del tipo 1 (M1) de manera pronunciada y prolongada. TNF-α es una citocina específica de M1, CCL18 y CD206 son citocinas específicas de M2.

Como se mencionó anteriormente en la presente, los inventores de la presente invención demostraron sorprendentemente que el recubrimiento polielectrolítico de la invención tiene actividad biocida.

Por consiguiente, en una realización, el recubrimiento polielectrolítico de la invención tiene actividad biocida.

“Actividad biocida” en la presente se refiere a destruir, impedir, volver inofensivo o ejercer un efecto de control sobre cualquier organismo dañino. Una actividad biocida en la presente se refiere, por ejemplo, a una actividad antimicrobiana.

“Actividad antimicrobiana” en la presente se refiere a actividad antiséptica, antibiótica, antibacteriana, antivírica, antifúngica, antiprotozoaria y/o antiparasitaria, preferentemente actividad antibacteriana.

Por consiguiente, en una realización, el recubrimiento polielectrolítico de la invención tiene actividad antibacteriana y/o actividad bacteriostática.

En una realización, la actividad antibacteriana y/o bacteriostática se dirige contra al menos una bacteria.

“Actividad bacteriostática” en la presente se refiere a evitar que las bacterias se reproduzcan, aunque no necesariamente las mata, en otras palabras, la actividad bacteriostática en la presente se refiere a inhibir el crecimiento de bacterias. Por consiguiente, la actividad bacteriostática puede expresarse, por ejemplo, en % de inhibición del crecimiento de al menos una bacteria.

La “inhibición del crecimiento de al menos una bacteria” en el contexto de la presente invención, puede ser más del 70 %, por ejemplo, más del 75, más del 80 %, típicamente, más del 82, 84, 86, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 %.

Por consiguiente, en una realización, el recubrimiento polielectrolítico de la invención tiene más del 70 % de inhibición del crecimiento de al menos una bacteria, más particularmente, más del 75 %, más del 80 %, típicamente, más del 82, 84, 86, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 % de inhibición del crecimiento de al menos una bacteria.

La “al menos una bacteria” en la presente se refiere a bacterias de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más especies de bacterias.

En una realización, la al menos una bacteria es un patógeno ESKAPE.

Los "patógenos ESKAPE" son la principal causa de infecciones nosocomiales en todo el mundo y se describen, por ejemplo, en Biomed Res Int. 2016; 2016: 2475067. En una realización, el término "patógenos ESKAPE" se refiere a una bacteria seleccionada del grupo constituido por *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacter.*
En una realización, la al menos una bacteria es una bacteria grampositiva o una bacteria gramnegativa, preferentemente una bacteria grampositiva.

En una realización, la bacteria gramnegativa es una Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii, Stenotrophomonas maltophilia, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, especies de Enterobacter o bacteria Legionella, preferentemente, Escherichia coli o Pseudomonas aeruginosa.

En una realización, la bacteria grampositiva es una bacteria *Staphylococcus, Micrococcus* o *Enterococcus*.

Las bacterias del género "Staphylococcus" son cocos grampositivos estacionarios, no formadores de esporas, positivos a catalasas, negativos a oxidasas, agrupados en racimos similares a uvas. Observados por Pasteur en 1879 en el pus de furúnculo, los estafilococos deben su nombre a Ogsten (1881) que los aisló en abscesos crónicos agudos. Las bacterias del género "Staphylococcus", tales como, por ejemplo, S. *aureus, S. epidermidis, S. capitis, S. caprae, S. haemolyticus, S. lugdunensis, S. schleiferi, S. simulans* y *S. warneri* son los principales agentes de infecciones sobre materiales extraños, por ejemplo, en las infecciones de prótesis articulares.

Por consiguiente, en una realización, el Staphylococcus se selecciona de S. aureus, S. epidermidis, S. capitis, S. caprae, S. haemolyticus, S. lugdunensis, S. schleiferi, S. simulans y S. warneri, preferentemente S. aureus y S. epidermidis, con mayor preferencia S. aureus.

Generalmente se piensa que las bacterias del género *"Micrococcus*" son un organismo saprotrófico o comensal, aunque puede ser un patógeno oportunista, particularmente en hospederos con sistemas inmunitarios deprimidos, como los pacientes con VIH. Los *micrococos* están generalmente presentes en la microflora de la piel y el género rara vez está relacionado con enfermedades. Sin embargo, en casos raros, se ha producido la muerte de pacientes inmunodeprimidos por infecciones pulmonares causadas por Micrococcus. Los micrococos pueden estar implicados en otras infecciones, como bacteriemia recurrente, choque séptico, artritis séptica, endocarditis, meningitis y neumonía cavitante, en particular en pacientes inmunodeprimidos.

En una realización, el *Micrococcus* es una bacteria *M. luteus.*

Las bacterias del *género "Enterococcus*" son la causa de importantes infecciones clínicas como infecciones del tracto urinario, bacteriemia, endocarditis bacteriana, diverticulitis y meningitis.

En una realización, el *Enterococcus* es un *Enterococcus* resistente a la vancomicina*,* como *E. faecalis* o *E. faecium.*

La actividad bacteriostática o el % de inhibición del crecimiento se puede demostrar, por ejemplo, en un ensayo antibacteriano como se describe en la presente en la sección "procedimientos" en la presente a continuación. Las cepas que pueden usarse en tal ensayo antibacteriano pueden ser, por ejemplo, *M. luteus* o *S. aureus.*

Como se menciona en la introducción de la presente descripción anteriormente, en una aplicación típica, el recubrimiento polielectrolítico de la presente invención tiene como objetivo particular prevenir infecciones nosocomiales relacionadas con implantes y dispositivos médicos. En dicho contexto, el riesgo de infección es especialmente alto durante las 6 horas posteriores a la implantación.

Por consiguiente, en una realización, el recubrimiento polielectrolítico de la presente invención tiene una actividad bacteriostática dentro de las primeras 24 horas después de la implantación, por ejemplo dentro de las primeras 12 horas, primeras 9 horas, primeras 6 horas después de la implantación.

Como se menciona adicionalmente en la introducción, los recubrimientos antibacterianos tienen un amplio campo de aplicaciones. Por consiguiente, en una realización, el recubrimiento polielectrolítico de la invención tiene una actividad antiincrustante.

"Incrustación" o "bioincrustación" o "incrustación biológica" en la presente se refiere a la acumulación de microorganismos sobre una superficie húmeda.

“Antiincrustación”, por lo tanto, en la presente descripción se refiere a inhibir la acumulación de microorganismos sobre una superficie húmeda.

El recubrimiento polielectrolítico de la presente invención se construye típicamente mediante el uso de una técnica de deposición capa por capa (LbL) como se describe en más detalle en la sección "Procedimiento para preparar un dispositivo" en la presente más adelante. Sobre la base de la estructura capa por capa, el recubrimiento

polielectrolítico también puede referirse como "multicapa polielectrolítica (PEM)", "película polielectrolítica" o "matriz polielectrolítica".

Cada una de las capas polielectrolíticas tiene su carga. La capa policatiónica y la capa polianiónica forman ambas una red polielectrolítica o una estructura polielectrolítica principal. Las capas polielectrolíticas se atraen entre sí mediante interacciones electrostáticas. Otras fuerzas de atracción se basan en interacciones hidrófobas, de van der Waals y de enlaces de hidrógeno.

En general, durante la deposición LbL, un dispositivo, tal como, por ejemplo, un dispositivo médico o un dispositivo implantable, se sumerge de un lado a otro entre baños diluidos de soluciones polielectrolíticas cargadas positiva y negativamente. Durante cada inmersión se adsorbe una pequeña cantidad de polielectrolito y la carga superficial se invierte, lo que permite la acumulación gradual y controlada de capas de policatión-polianión reticuladas electrostáticamente. Es posible controlar el espesor de tales recubrimientos hasta la escala de un solo nanómetro.

Por consiguiente, el recubrimiento polielectrolítico de la invención incluye típicamente capas polielectrolíticas sustancialmente ordenadas de capas polielectrolíticas cargadas de forma alterna.

En una realización, una única capa polielectrolítica, tal como una capa policatiónica o polianiónica, tiene un espesor de 1 nm a 10 nm. El espesor de la capa policatiónica y/o polianiónica depende de las condiciones de recubrimiento y del material polielectrolítico utilizado.

En una realización, el recubrimiento polielectrolítico generalmente tiene un espesor que es sustancialmente más grueso que el espesor de una única capa polielectrolítica del recubrimiento polielectrolítico. En una realización, el recubrimiento polielectrolítico puede tener un espesor de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 100 000 nm. El espesor del recubrimiento polielectrolítico depende de las condiciones del recubrimiento, la cantidad y el material polielectrolítico utilizado para las capas polielectrolíticas.

Los espesores de un recubrimiento polielectrolítico obtenido pueden evaluarse, por ejemplo, mediante el uso de microscopía confocal. Por lo tanto, por ejemplo, se depositan 100 µl de PLL-FITC (poli-L-lisina marcada con isotiocianato de fluoresceína, una sonda fluorescente verde) (típicamente 0,5 $mg.mL^{-1}$ en tampón Tris-NaCl) sobre la parte superior de un recubrimiento polielectrolítico, por ejemplo, un recubrimiento polielectrolítico $(PAR30/HA)_{24}$. Después de 5 minutos y la difusión de PLL-FITC a través de todo el recubrimiento polielectrolítico, típicamente se realiza una etapa de enjuague con tampón Tris-NaCl. Las observaciones de los recubrimientos se pueden realizar con un microscopio confocal, como el microscopio Zeiss LSM 710 (Heidelberg, Alemania), mediante el uso de un objetivo 20× (Zeiss, Plan Apochromat).

Como se describió anteriormente, el recubrimiento polielectrolítico se puede formar de una manera autoensamblada para producir una estructura capa por capa (LbL).

El término “capa” en las expresiones "capa policatiónica" o "capa polianiónica" en la presente se refiere a una cantidad de policationes o polianiones como se definió en la presente anteriormente, por ejemplo, depositados sobre, por ejemplo, la superficie de un dispositivo, en donde dicho dispositivo es como se define en la presente más adelante en la sección "dispositivo" y puede ser, preferentemente, un dispositivo médico o un dispositivo implantable. Como entenderán los expertos en la técnica, en el contexto de la invención, una capa policatiónica puede consistir en varias capas del mismo material policatiónico, y una capa polianiónica puede consistir en varias capas del mismo material polianiónico.

En algunas realizaciones, “al menos una capa policatiónica” y/o “al menos una capa polianiónica” en el contexto de la invención se refiere a al menos 1, 5, 10, 15, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500 capas policatiónicas y/o capas polianiónicas.

En algunas realizaciones, “al menos una capa policatiónica” y/o “al menos una capa polianiónica” en el contexto de la invención se refiere a al menos 1, 5, 10, 15, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 capas policatiónicas y/o capas polianiónicas.

En algunas realizaciones, “al menos una capa policatiónica” y/o “al menos una capa polianiónica” se refiere a 1 a 500 capas policatiónicas y/o polianiónicas, por ejemplo, 1 a 400, 1 a 300, 1 a 200, 1 a 100, 1 a 90, 1 a 80, 1 a 70, 1 a 60, 5 a 60, 10 a 60, 20 a 60, preferentemente 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 capas.

En algunas realizaciones, “al menos una capa policatiónica” y/o “al menos una capa polianiónica” se refiere a 1 a 100 capas policatiónicas y/o polianiónicas, por ejemplo 1 a 90, 1 a 80, 1 a 70, 1 a 60, 1 a 50, 1 a 40, 1 a 35, 1 a 30, tal como 5 a 40, 10 a 40, 15 a 40, 20 a 40 capas, preferentemente 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 capas.

En determinadas realizaciones, la cantidad de capas policatiónicas y la cantidad de capas polianiónicas es la misma.

En determinadas realizaciones, las capas policatiónicas y polianiónicas son capas alternas, en particular capas polielectrolíticas cargadas alternas.

Por consiguiente, en una realización, el recubrimiento polielectrolítico comprende de 1 a 60 capas policatiónicas y/o de 1 a 60 capas polianiónicas.
En una realización particular, el recubrimiento polielectrolítico comprende de 18 a 60 capas policatiónicas y/o de 18 a 60 capas polianiónicas, con mayor preferencia el recubrimiento polielectrolítico comprende de 18 a 50 capas policatiónicas y/o de 18 a 50 capas polianiónicas.

En una realización particular, el recubrimiento polielectrolítico comprende de 18 a 60 capas policatiónicas y/o de 18 a 60 capas polianiónicas, con mayor preferencia el recubrimiento polielectrolítico comprende de 18 a 40 capas policatiónicas y/o de 18 a 40 capas polianiónicas.

En un ejemplo, como se describe con más detalle más adelante, es posible cubrir la superficie de un objeto con una capa policatiónica, lavar el objeto y cubrirlo de nuevo con una capa policatiónica. Estas etapas pueden repetirse varias veces para obtener una capa policatiónica de un espesor específico que, por tanto, consiste en varias capas policatiónicas. Como entenderán los expertos en la técnica, este procedimiento también se puede utilizar para obtener una capa polianiónica de un cierto espesor que, por tanto, está constituida por varias capas polianiónicas.

En un ejemplo, el recubrimiento polielectrolítico consiste en 24 capas de poliarginina que tiene 30 residuos de arginina (PAR30) y 24 capas de HA, por lo que dicho recubrimiento se denominará en la presente $(PAR30/HA)_{24}$. En el mismo ejemplo, la primera capa es una capa policatiónica que consiste en PAR30, seguida de una primera capa del polianión HA, seguida de una segunda capa policatiónica que consiste en PAR30 y seguida de una segunda capa polianiónica que consiste en HA. Las capas se alternan hasta la 24ª capa policatiónica que consiste en PAR30 y la 24ª capa polianiónica que consiste en HA.

En otro ejemplo, el recubrimiento polielectrolítico consiste en 48 capas de poliarginina que tiene 30 residuos de arginina (PAR30) y 24 capas de HA, por lo que dicho recubrimiento se denominará en la presente $(PAR30/HA)_{48}$. En el mismo ejemplo, la primera capa es una capa policatiónica que consiste en PAR30, seguida de una primera capa del polianión HA, seguida de una segunda capa policatiónica que consiste en PAR30 y seguida de una segunda capa polianiónica que consiste en HA. Las capas se alternan hasta la 48ª capa policatiónica que consiste en PAR30 y la 48ª capa polianiónica que consiste en HA.

En un aspecto adicional de la invención, el recubrimiento polielectrolítico también puede, por ejemplo, comenzar con una capa polianiónica en la superficie de un objeto y terminar con una capa polianiónica, en ese caso la cantidad de capas policatiónicas y polianiónicas es diferente. Preferentemente, el recubrimiento polielectrolítico comienza con una capa polianiónica cuando la superficie del objeto está cargada positivamente.

En otro aspecto de la invención, el recubrimiento polielectrolítico también puede, por ejemplo, comenzar con una capa policatiónica en la superficie de un objeto y terminar con una capa policatiónica; en ese caso, la cantidad de capas policatiónicas y polianiónicas también es diferente. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, la cantidad de capas policatiónicas y la cantidad de capas polianiónicas son diferentes. Preferentemente, el recubrimiento polielectrolítico comienza con una capa policatiónica cuando la superficie del objeto está cargada negativamente.

En un ejemplo, el recubrimiento polielectrolítico consiste en 25 capas de poliarginina que tiene 30 residuos de arginina y 24 capas de HA, por lo que dicho recubrimiento se denominará $(PAR30/HA)_{24}$-PAR30.

En determinadas realizaciones, diferentes capas polielectrolíticas consisten en el mismo material policatiónico o en diferentes materiales policatiónicos como se define en la presente. Por ejemplo, el recubrimiento polielectrolítico puede comprender 12 capas que consisten en poliarginina que tiene 30 residuos de arginina y 12 capas que consisten en poliornitina que tiene 30 residuos de ornitina y 24 capas que consisten en HA.

Los inventores de la presente invención observaron un crecimiento exponencial de la frecuencia normalizada con la cantidad de etapas de deposición para la fabricación de los recubrimientos polielectrolíticos con PAR30, PAR100 o PAR200 y HA mediante el uso de microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), como se explica con más detalle en los ejemplos y la Figura 1. Los inventores demostraron además que el aumento exponencial del espesor con la cantidad de etapas de deposición se relaciona con la difusión, dentro y fuera del recubrimiento completo, de al menos un polielectrolito que constituye la multicapa. Los inventores demostraron además mediante el uso de experimentos de blanqueo que el polímero policatiónico contenido en el recubrimiento es móvil y, por tanto, difunde dentro de todo el recubrimiento, como se demuestra en la Figura 14.

Por consiguiente, en una realización, el recubrimiento polielectrolítico de la invención provocó un "crecimiento exponencial", como se denomina en la bibliografía, de la frecuencia normalizada con la cantidad de etapas de deposición.

En una realización adicional, las n unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1) como se definió en la presente anteriormente son móviles y/o difusas dentro del recubrimiento polielectrolítico.

Los inventores han demostrado que el acoplamiento covalente de las al menos dos capas polielectrolíticas con carga opuesta reduce la actividad bacteriostática del recubrimiento.
Por consiguiente, en una realización, la al menos una capa policatiónica y la al menos una capa polianiónica no se acoplan covalentemente.

Dispositivo

Las infecciones estafilocócicas sobre material extraño se diferencian de las infecciones convencionales por la disposición de las bacterias en forma de biopelícula.

"Biopelícula" es una estructura tridimensional compleja que se conecta al material extraño y en la que las células bacterianas están embebidas en una matriz extracelular de polisacáridos denominada capa mucosa o glicocálix. Esta estructura específica puede estar formada por bacterias de la misma especie o de diferentes especies. En comparación con sus congéneres vivos en forma libre (o 'planctónica'), estas bacterias se encuentran en un estado de inactividad indicado por un bajo nivel de actividad metabólica. Debido a la actividad metabólica reducida, las bacterias en forma de biopelícula son, por ejemplo, más resistentes a cualquier tratamiento antibacteriano.

La problemática de las biopelículas no se limita al campo médico. Las biopelículas son omnipresentes y se encuentran en sistemas de agua acuáticos e industriales, así como en una gran cantidad de entornos. Las biopelículas pueden colonizar con avidez las superficies de una amplia variedad de artículos del hogar, como inodoros, lavabos, juguetes, tablas de cortar y encimeras de cocinas y baños. Las biopelículas también pueden ocurrir en la industria de producción de alimentos, ya sea en latas o en las máquinas que se utilizan a lo largo de las líneas de producción. En las instalaciones de tratamiento de agua y aguas residuales, las biopelículas (bioincrustaciones) también son problemáticas: causan corrosión de metales, mayor riesgo de contaminación de los productos, disminución de la calidad del agua y reducción de la eficacia del intercambio de calor, por ejemplo, para tableros y encimeras en cocinas y baños.

Por consiguiente, un recubrimiento antibacteriano es una ventaja para dispositivos en muchas aplicaciones diferentes.

Como se describió anteriormente, los inventores de la presente invención desarrollaron un recubrimiento polielectrolítico que tiene una actividad biocida, en particular dentro de las primeras 72 horas cuando se pone en contacto con una solución que contiene bacterias, en particular dentro de las primeras 48 horas cuando se pone en contacto con una solución que contiene bacterias, con mayor preferencia las primeras 24, las primeras 12, las primeras 6 horas cuando se pone en contacto con una solución que contiene bacterias. Por tanto, el recubrimiento polielectrolítico de la presente invención inhibe el crecimiento de una bacteria y, por tanto, evita que las bacterias formen una biopelícula en la superficie de un dispositivo que comprende el recubrimiento polielectrolítico de la invención.

Los inventores demostraron, por ejemplo, que los recubrimientos $(PAR/HA)_{24}$ construidos con PAR30, PAR50, PAR100 y PAR30 después de 24/48 o 72 horas de incubación muestran una inhibición total de las bacterias lo que demuestra su eficacia durante 3 días y tres contaminaciones sucesivas. Los inventores descubrieron además que el período de tiempo de la actividad biocida de los recubrimientos de la invención aumenta con la cantidad de capas. Por consiguiente, el período de tiempo de la actividad biocida del recubrimiento de la presente invención aumenta con la cantidad de capas utilizadas.

Los inventores demostraron además que ni el secado ni la esterilización de los recubrimientos de la invención modificaron la actividad antimicrobiana del recubrimiento. Por consiguiente, no se midió ningún cambio en la actividad bactericida total incluso después de la esterilización.

Por lo tanto, los expertos en la técnica entenderán que debido a la actividad bacteriostática del recubrimiento polielectrolítico de la invención, dicho recubrimiento polielectrolítico es, en particular, adecuado para producir un dispositivo que comprende dicho recubrimiento polielectrolítico.

Por consiguiente, la presente invención se refiere además a un dispositivo que comprende un recubrimiento polielectrolítico de la invención.

Un “dispositivo” en la presente se refiere a un objeto que comprende al menos una superficie.

En una realización, el recubrimiento polielectrolítico cubre al menos una parte de la superficie de dicho dispositivo.

En una realización, la superficie del dispositivo de la presente invención comprende, consiste en, o consiste al menos parcialmente en metal como titanio, plástico como silicona, cerámica u otros materiales como madera.

En una realización adicional, la superficie del dispositivo de la presente invención existe en cualquier tipo de arquitectura según el material utilizado, en consecuencia, los expertos en la técnica entenderán que la superficie puede ser una superficie plana, o una superficie irregular, una superficie irregular de este tipo existe, por ejemplo, en superficies de materiales porosos tales como espumas o fibras en general. En algunos ejemplos, la superficie también puede comprender o consistir en micropartículas o nanopartículas.

Dado que el dispositivo comprende el recubrimiento polielectrolítico de la invención, los expertos en la técnica entenderán que, por lo tanto, las características asociadas con dicho recubrimiento polielectrolítico que además se definieron anteriormente en la sección "recubrimiento polielectrolítico" también se refieren a dicho dispositivo.

Por consiguiente, en una realización, el dispositivo de la invención tiene actividad biocida, en donde la actividad biocida es como se definió anteriormente en la sección "recubrimiento polielectrolítico" en la presente descripción.

En un aspecto de la invención, el dispositivo de la invención tiene más del 70 % de inhibición del crecimiento de al menos una bacteria, más particularmente, más del 75 %, más del 80 %, típicamente más del 82, 84, 86, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 % de inhibición del crecimiento de al menos una bacteria. El % de inhibición del crecimiento de al menos una bacteria es como se definió en la presente anteriormente en la sección "recubrimiento polielectrolítico".

En una realización adicional, el dispositivo de la presente invención tiene actividad bacteriostática dentro de las primeras 72 horas después de la implantación, por ejemplo dentro de las primeras 48 horas, 24 horas, 12 horas, las primeras 9 horas y las primeras 6 horas después de la implantación.

En una realización preferida, el dispositivo de la presente invención tiene actividad bacteriostática dentro de las primeras 24 horas después de la implantación, por ejemplo, dentro de las primeras 12 horas, las primeras 9 horas y las primeras 6 horas después de la implantación.

Además, en una realización, el dispositivo de la invención tiene actividad antiincrustante. En una realización adicional, el dispositivo de la invención tiene actividad antibacteriana y/o actividad bacteriostática.

Por consiguiente, en una realización, el dispositivo que comprende un recubrimiento polielectrolítico de la invención es un dispositivo bacteriostático y/o un dispositivo resistente a las incrustaciones. Bacteriostático es como se definió en la presente anteriormente en la sección "recubrimiento polielectrolítico".

El recubrimiento polielectrolítico de la invención y el dispositivo de la invención se pueden esterilizar y almacenar fácilmente sin perjudicar el recubrimiento y sus propiedades.

Los expertos en la técnica entenderán además que, debido a la actividad bacteriostática del recubrimiento polielectrolítico de la invención, dicho recubrimiento polielectrolítico es, en una realización, particularmente adecuado para producir un dispositivo médico, preferentemente un dispositivo implantable.

Un “dispositivo médico” en la presente se refiere a un instrumento, aparato, implemento, máquina, artilugio, implante, reactivo in vitro u otro artículo similar o relacionado, que incluye una parte de un componente o accesorio que, por ejemplo, está destinado a ser utilizado en el diagnóstico de una enfermedad u otras afecciones, o en la cura, mitigación, tratamiento o prevención de una enfermedad, en un individuo como se define a continuación en la presente, o que tiene la intención de afectar la estructura o cualquier función del cuerpo de un individuo, y que no logre ninguno de sus propósitos principales previstos a través de la acción química dentro o sobre el cuerpo del hombre u otros animales y que no depende de ser metabolizado para lograr cualquiera de sus propósitos principales previstos. En un ejemplo, un dispositivo médico se refiere a un dispositivo utilizado para la cicatrización de heridas, como vendas, por ejemplo, vendas adhesivas o apósitos. En otro ejemplo, un dispositivo médico se refiere a artículos sanitarios.

Un dispositivo médico en la presente puede estar destinado a usarse en un individuo.

El término “individuo”, “paciente” o “sujeto” se refiere a un mamífero humano o no humano, preferentemente un ratón, gato, perro, mono, caballo, ganado (es decir, vaca, oveja, cabra, búfalo), incluidos el sexo masculino y femenino, adultos y jóvenes.

Por consiguiente, en una realización, el dispositivo médico en el contexto de la invención puede ser un instrumento médico.

En una realización, un instrumento médico se puede seleccionar del grupo que consiste en un martillo de percusión, plexímetro, termómetro, detector de cuerpo extraño, estetoscopio, espéculos, fórceps, otoscopio o cualquier accesorio de estos, sondas, retractores, bisturí, tijeras quirúrgicas, instrumentos para huesos, cucharas cortantes, agujas de sutura y clips para heridas.

En una realización, el dispositivo médico es un dispositivo implantable.

El “dispositivo implantable” de la presente invención se refiere a una pieza de equipo o mecanismo que se coloca dentro del cuerpo de un individuo para cumplir un propósito especial o realizar una función especial.

Un dispositivo implantable, en el contexto de la presente invención, puede ser, por ejemplo, un dispositivo protésico o, por ejemplo, un dispositivo implantado para administrar medicamentos, nutrición u oxígeno, controlar las funciones corporales o proporcionar soporte a órganos y tejidos. Los dispositivos implantables pueden colocarse de forma permanente o pueden retirarse una vez que ya no sean necesarios. Por ejemplo, las endoprótesis o los implantes de cadera están destinados a ser permanentes. Pero los puertos de quimioterapia o los tornillos para reparar huesos rotos se pueden quitar cuando ya no sean necesarios.

En una realización, el dispositivo implantable se selecciona del grupo que comprende catéteres, derivaciones arteriovenosas, implantes mamarios, monitores cardíacos y de otro tipo, implantes cocleares, desfibriladores, implantes dentales, implantes maxilofaciales, implantes del oído medio, neuroestimuladores, dispositivos ortopédicos, marcapasos y cables, implantes de pene, dispositivos protésicos, articulaciones de reemplazo, implantes espinales, prótesis de voz, corazones artificiales, lentes de contacto, dispositivo de fijación de fracturas, bombas de infusión, dispositivo de presión intracraneal, lentes intraoculares, dispositivos intrauterinos, prótesis articulares, válvulas protésicas, dispositivos ortopédicos, materiales de sutura, endoprótesis urinarias, dispositivos de asistencia vascular, injertos vasculares, derivaciones vasculares y endoprótesis vasculares, y vasos artificiales de tipo permanente o transitorio.

En una realización preferida, el dispositivo implantable se selecciona del grupo que comprende catéteres, desfibriladores, dispositivos protésicos, válvulas protésicas, articulaciones de reemplazo, dispositivos ortopédicos, marcapasos, injertos vasculares, derivaciones vasculares, endoprótesis vasculares y dispositivos intrauterinos, preferentemente catéteres, dispositivos ortopédicos, marcapasos y dispositivos protésicos.

Un “catéter” en la presente se refiere a un dispositivo médico tubular para su inserción en canales, vasos, pasajes o cavidades corporales con fines diagnósticos o terapéuticos, líquidos y medicación, pero también en el drenaje de fluidos corporales tales como orina o líquidos abdominales; angioplastia, angiografía y ablación con catéter; administración de gases como oxígeno y agentes anestésicos volátiles y hemodiálisis.

Una “derivación” se refiere típicamente a un tubo estrecho de metal o plástico que desvía la sangre de una parte a otra.

Una “endoprótesis” se refiere típicamente a un tubo de plástico o metal corto y estrecho a menudo en forma de una malla que se inserta en el lumen de un vaso anatómico como una arteria o conducto biliar, especialmente para mantener abierto un pasaje previamente bloqueado.

Una “válvula protésica” es, por ejemplo, una válvula cardíaca protésica.

Procedimiento para preparar un dispositivo de la invención

La presente invención se refiere además a un procedimiento para preparar un dispositivo de la invención que en la presente se refiere como el procedimiento de la invención.

El dispositivo de la invención puede comprender diferentes materiales como se especificó en la presente anteriormente, por consiguiente, la al menos una superficie del dispositivo que se va a cubrir con el recubrimiento polielectrolítico puede comprender diferentes materiales como se especificó en la presente anteriormente. Los expertos en la técnica entenderán que dichos materiales difieren en su carga superficial. Las superficies cargadas positivamente son, por ejemplo, las superficies que consisten en polímeros basados en grupos amino. Las superficies cargadas negativamente son, por ejemplo, las superficies que consisten en polímeros basados en grupos carboxílicos. Los expertos en la técnica entenderán además que una superficie cargada positivamente se cubrirá primero con una capa polianiónica y después con una capa policatiónica, en donde una superficie cargada negativamente se cubrirá primero con una capa policatiónica y después con una capa polianiónica. Las dos etapas de deposición consecutivas pueden repetirse después tantas veces como sea necesario.

En un ejemplo, un dispositivo de la invención se prepara mediante la deposición, por ejemplo sobre su superficie de SiO_2, de 24 bicapas de PAR/HA $(PAR30/HA)_{24}$ con el uso, por ejemplo, de un robot de inmersión automatizado, como el robot de inmersión automatizado de Riegler & Kirstein GmbH, Berlín, Alemania. Por lo tanto, la superficie del dispositivo típicamente se lava primero, por ejemplo, con una solución Hellmanex® II a 2 %, H_2O y etanol y se seca con flujo de aire. Las soluciones de polielectrolitos tales como PAR y HA se preparan, por ejemplo, mediante la disolución de PAR y HA típicamente a 0,5 $mg.mL^{\cdot 1}$ en tampón esterilizado que contiene típicamente NaCl 150 mM y, por ejemplo, 10 mM de tris(hidroximetil)-aminometano (TRIS, Merck, Alemania), típicamente a pH 7,4. La superficie del dispositivo se sumerge alternativamente en las soluciones del policatión y polianión y se enjuaga ampliamente en

tampón NaCl-Tris entre cada etapa. Después de la preparación, el recubrimiento, típicamente, se seca con flujo de aire y después se sumerge en tampón NaCl-Tris y se almacena a 4 °C antes de su uso.

La expresión “depositar en la superficie de dicho dispositivo al menos una capa policatiónica” y “depositar en la superficie de dicho dispositivo al menos una capa polianiónica” de la etapa b1) i) y ii) o b2) ii) y i) se refiere en la presente a poner en contacto la superficie de dicho dispositivo con una solución policatiónica en el caso de la etapa b1) i) o b2 i) o poner en contacto la superficie de dicho dispositivo con una solución polianiónica en el caso de la etapa b1) ii) o b2 ii).

La “superficie de dicho dispositivo” en la presente se refiere a al menos una superficie, dicha al menos una superficie puede estar cubierta parcialmente por el recubrimiento polielectrolítico de la invención. La al menos una superficie es preferentemente una superficie.

Una “solución policatiónica” o “solución polianiónica” en la presente se refiere a una solución que comprende material policatiónico o material polianiónico como se definió en la presente anteriormente en la sección "recubrimiento polielectrolítico". En el contexto de la presente invención, típicamente una “solución policatiónica” y una “solución polianiónica” pueden denominarse solución polielectrolítica.

“Poner en contacto”, como se usa en la presente, se refiere típicamente a rociar, sumergir, sumir o verter.

Por consiguiente, en una realización, para "depositar las capas polielectrolíticas de acuerdo con la etapa (b1) y/o (b2)", se puede rociar una solución polielectrolítica, por ejemplo, sobre la superficie de un dispositivo sobre la que se va a formar el recubrimiento polielectrolítico.

Alternativamente, o en combinación, la superficie de dicho dispositivo se puede sumergir o introducir en una solución polielectrolítica o se puede verter una solución polielectrolítica sobre la superficie del sustrato.

Por consiguiente, en una realización, la al menos una capa policatiónica se deposita sobre la superficie del dispositivo en la etapa b1) i) al poner en contacto la superficie de dicho dispositivo con una solución policatiónica que comprende n unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1) como se definió en la presente anteriormente.

Por consiguiente, en una realización, la al menos una capa polianiónica se deposita sobre la superficie del dispositivo en la etapa b1) ii) al poner en contacto la superficie de dicho dispositivo con una solución polianiónica que comprende HA.

Se entenderá que las etapas b1) y/o b2) pueden repetirse tantas veces como sea necesario por parte del experto en la técnica para obtener un dispositivo que comprende un recubrimiento polielectrolítico con la cantidad de capas polielectrolíticas, en particular capas policatiónicas y polianiónicas alternantes, como se definió en la presente anteriormente en la sección "recubrimiento polielectrolítico". Será evidente para los expertos en la técnica que el pH puede influir en la deposición de los polielectrolitos.

Por consiguiente, en una realización, dicha "solución policatiónica" y/o "solución polianiónica" en el contexto de la invención pueden comprender además un tampón.

Un "tampón" es una solución acuosa que consiste en una mezcla de un ácido débil y su base conjugada o una base débil y su ácido conjugado. Su pH cambia muy poco cuando se le agrega una pequeña cantidad de ácido o base fuerte y, por lo tanto, se usa para prevenir cambios en el pH de una solución. Las soluciones tampón se utilizan como un medio para mantener el pH a un valor casi constante en una amplia variedad de aplicaciones químicas. Los tampones usados en el contexto de la invención pueden ser, por ejemplo, PBS (solución salina tamponada con fosfato) o TRIS (tris(hidroximetil)aminometano).

En una realización, dicha "solución policatiónica" y/o "solución polianiónica" en el contexto de la invención tiene un pH que varía de 4 a 9, preferentemente 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9 y típicamente, un pH que varía de 5 a 8, 5,5 a 8, 6 a 8, 6,5 a 8, 7 a 8, preferentemente 7 a 8, en particular 7, 7,2, 7,4, 7,6, 7,8, 8, por ejemplo 7,4.

Además, será evidente para los expertos en la técnica que la deposición de los polielectrolitos puede verse influida por la interacción entre los polielectrolitos cargados y la superficie cargada sobre la que se depositarán los polielectrolitos, y la interacción entre los polielectrolitos cargados entre sí. Estas interacciones pueden controlarse al menos parcialmente mediante la fuerza iónica de la solución.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, la fuerza iónica de la solución polielectrolítica, usada en la etapa (b1) o (b2) del procedimiento de la invención, se ajusta en determinadas realizaciones para aumentar la cantidad de polielectrolitos depositados.

Por consiguiente, en una realización, dicha "solución policatiónica" y/o "solución polianiónica" en el contexto de la invención pueden comprender además iones.

Un "ion" es un átomo o molécula en el que el número total de electrones no es igual al número total de protones, lo que le da al átomo o molécula una carga eléctrica neta positiva (catión) o negativa (anión). Un ion que consiste en un solo átomo es un ion atómico o monoatómico; si consiste en dos o más átomos, es un ion molecular o poliatómico. Los iones se diferencian además según la carga que portan. Por lo tanto, un ion puede ser un ion monovalente o bivalente (a veces denominado ion divalente) o iones polivalentes. Los iones pueden ser, sin limitación, F^-, Cl^-, I^-, NH_4^+, SO_4^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^+.

Generalmente, los iones se pueden añadir en forma de tampón, como se definió en la presente anteriormente, o en forma de sal, como por ejemplo NaCl.

Por ejemplo, las soluciones de polielectrolitos tales como PAR y HA se prepararon típicamente, por ejemplo, mediante la disolución de PAR y HA típicamente a 0,5 $mg.mL^{-1}$ en tampón esterilizado que contenía típicamente NaCl 150 mM y, por ejemplo, 10 mM de tris(hidroximetil)-aminometano (TRIS, Merck, Alemania), típicamente a pH 7,4.

Entre las deposiciones de las capas polielectrolíticas se puede realizar al menos una etapa de lavado o también denominada de enjuague en una solución sin polielectrolitos para eliminar el material polielectrolítico no ensamblado.

Por consiguiente, en una realización, el procedimiento de la invención comprende además al menos una etapa de lavado después de la etapa i) y/o ii) de b1) o b2).

En una realización, para el lavado, se puede usar una solución sin polielectrolitos. Dicha solución puede ser agua o cualquier otra solución que parezca adecuada para el experto en la materia. En una realización, el lavado se realiza con el uso de un tampón, por ejemplo tampón NaCl-Tris. En un ejemplo, dicho tampón NaCl-Tris comprende NaCl 150 mM y Tris 10 mM a un pH de 7,4.

Alternativamente, o además de eso, en una realización, se puede realizar una etapa o etapas de secado.

Por consiguiente, en una realización, el procedimiento de la invención comprende además al menos una etapa de secado después de la etapa i) y/o ii) de b1) o b2) y/o la etapa de lavado de la reivindicación.

El "secado" se puede realizar mediante cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica, tal como calentamiento de aire, secado con aire natural, secado dieléctrico, flujo de aire, preferentemente flujo de aire. En un ejemplo, el flujo de aire se refiere a la purga con gas nitrógeno.

En una realización, después de una etapa de secado, la misma solución polielectrolítica que se usó inmediatamente antes de la etapa de secado se puede depositar nuevamente en la superficie, ya que el secado puede conducir a una exposición parcial de las cargas o lados de unión de la capa polielectrolítica subyacente, por lo tanto, dicha etapa de secado también puede denominarse etapa de secado intermedia. Al aplicar una secuencia de este tipo, la carga de un polielectrolito particular, puede incrementarse aún más.

Por consiguiente, en una realización cuando el procedimiento de la invención comprende además al menos una etapa de secado, se puede repetir la etapa anterior i) o ii) de b1) o b2) y/o la etapa de lavado.

Generalmente, se pone en contacto una solución polielectrolítica con la superficie y se deja secar la superficie durante un tiempo determinado, por ejemplo de 10 a 60 segundos mediante purga, por ejemplo, con gas nitrógeno. Posteriormente, la misma solución polielectrolítica se vuelve a poner en contacto con la superficie.

En determinadas realizaciones, se lleva a cabo al menos una etapa de lavado y/o secado entre dos etapas de deposición consecutivas.

Los inventores han demostrado que el acoplamiento covalente de las al menos dos capas polielectrolíticas con carga opuesta reduce la actividad bacteriostática del recubrimiento.

Por consiguiente, en una realización, el procedimiento de la invención no contiene una etapa para acoplar covalentemente la al menos una capa policatiónica con la al menos una capa polianiónica.

En una realización, el procedimiento de la invención comprende además una etapa (c) en donde el recubrimiento polielectrolítico obtenido en las etapas (a) y (b1) o (b2) del procedimiento como se definió anteriormente puede empaparse adicionalmente con una sustancia farmacéutica activa. La sustancia farmacéutica es como se definió anteriormente en la sección "Recubrimiento polielectrolítico" en la presente.

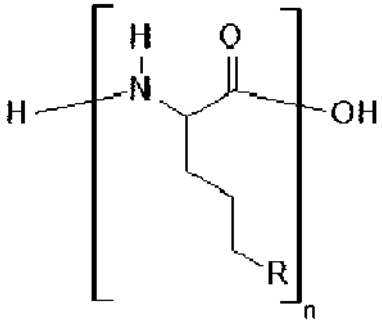
En una realización particular, el procedimiento para preparar un dispositivo es un procedimiento para preparar un dispositivo implantable.

Por consiguiente, en una realización, la invención se refiere a un procedimiento para preparar un dispositivo implantable que comprende un recubrimiento polielectrolítico, el procedimiento comprende:

(a) proporcionar un dispositivo implantable;

(b1) depositar sobre la superficie de dicho dispositivo implantable

(i) al menos una capa policatiónica que consiste en al menos un policatión que consiste en n unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1),



(1)

en la que

- n es un número entero comprendido entre 11 y 100, y
- cada grupo R, idéntico o diferente, se elige entre $-NH_2$, $-CH_2-NH_2$ y $-NH-C(NH)-NH_2$, y después

ii) al menos una capa polianiónica que consiste en ácido hialurónico, o

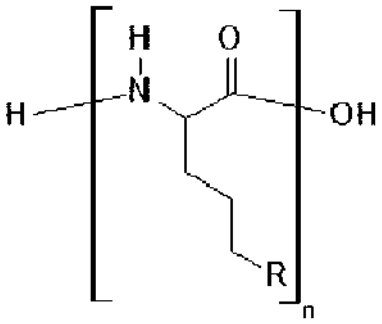
(b2) depositar sobre la superficie de dicho dispositivo implantable ii) y después i) como se definió anteriormente, y opcionalmente repetir la etapa b1) y/o b2).

Por consiguiente, en una realización particular, la invención se refiere a un procedimiento para preparar un dispositivo implantable que comprende un recubrimiento polielectrolítico, el procedimiento comprende:

(a) proporcionar un dispositivo implantable;

(b1) depositar sobre la superficie de dicho dispositivo implantable

(i) al menos una capa policatiónica que consiste en n unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1),



(1)

en la que

- n es un número entero comprendido entre 11 y 100, y
- R se elige entre $-NH_2$, $-CH_2-NH_2$ y $-NH-C(NH)-NH_2$, y después

ii) al menos una capa polianiónica que consiste en ácido hialurónico, o

(b2) depositar sobre la superficie de dicho dispositivo implantable ii) y después i) como se definió anteriormente, y opcionalmente repetir la etapa b1) y/o b2).

Como se describió en la presente anteriormente en la sección "Dispositivo", la superficie del dispositivo de la presente invención comprende, consiste o consiste al menos parcialmente en metal como titanio, plástico como silicona, cerámica u otros materiales como madera. Estas superficies pueden estar cargadas, tal como cargadas positiva o negativamente. Como resultado, los expertos en la técnica comprenderán que un dispositivo que comprende una superficie que, por ejemplo, está cargada negativamente, puede cubrirse primero con una capa catiónica.

En algunas realizaciones, el dispositivo puede someterse a un tratamiento de superficie antes del procedimiento para preparar un dispositivo implantable con el fin de tener una superficie cargada.

Por consiguiente, la superficie del dispositivo proporcionada en la etapa a) puede estar cargada, tal como cargada positivamente o cargada negativamente, en donde la superficie es como se definió en la presente anteriormente en la sección "Dispositivo".

Alternativamente, en algunas realizaciones, el procedimiento para preparar un dispositivo implantable puede comprender una etapa (a2) de cargar la superficie de dicho dispositivo implantable.

El experto en la técnica conoce procedimientos para cargar las superficies de un dispositivo, tales procedimientos incluyen la adsorción de iones, la protonación/desprotonación y la aplicación de un campo eléctrico externo. El experto en la técnica sabe además, por ejemplo, que la carga superficial prácticamente siempre aparece en la superficie de un dispositivo cuando se coloca en un líquido. La mayoría de los líquidos contienen iones, positivos (cationes) y negativos (aniones). Estos iones interactúan con la superficie del dispositivo. Esta interacción puede conducir a la adsorción de algunos de ellos en la superficie. Si el número de cationes adsorbidos excede el número de aniones adsorbidos, la superficie tendrá una carga eléctrica neta positiva, y si el número de aniones adsorbidos excede el número de cationes adsorbidos, la superficie tendrá una carga eléctrica negativa neta.

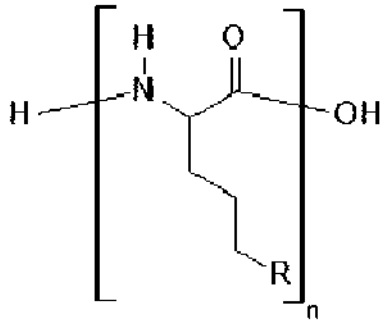
Uso

En una realización, la invención se refiere al uso del recubrimiento polielectrolítico de la invención para producir un dispositivo de la invención, en particular un dispositivo resistente a las incrustaciones y/o un dispositivo bacteriostático.

En una realización adicional, la invención se refiere al uso del recubrimiento polielectrolítico de la invención para producir un dispositivo médico o un dispositivo implantable.

Kit

La invención proporciona además un kit que comprende a) al menos un material policatiónico que consiste en n unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1),



(1)

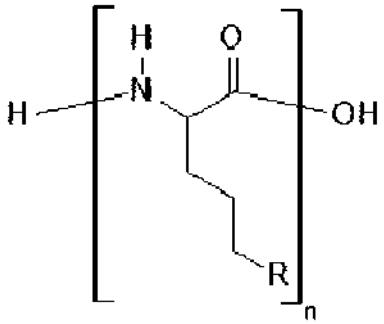
en la que

- n es un número entero comprendido entre 11 y 100, y
- cada grupo R idéntico o diferente se elige entre $-NH_2$, $-CH_2-NH_2$ y $-NH-C(NH)-NH_2$, y

b) al menos un material polianiónico que consiste en ácido hialurónico.

En particular, la invención proporciona además un kit que comprende

a) al menos un material policatiónico que consiste en n unidades repetitivas de Fórmula (1),



(1)

en la que

- n es un número entero comprendido entre 11 y 100, y
- R se elige entre $-NH_2$, $-CH_2-NH_2$ y $-NH-C(NH)-NH_2$, y

b) al menos un material polianiónico que consiste en ácido hialurónico.

En una realización, el kit comprende además instrucciones con respecto al uso del material policatiónico y polianiónico. Estas instrucciones pueden, por ejemplo, describir un procedimiento para preparar un dispositivo implantable como se definió en la presente anteriormente.

"n", "R" y las "unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1)" son como se definieron en la presente anteriormente en la sección "Recubrimiento polielectrolítico".

La expresión "al menos" en "al menos un material policatiónico" o en "al menos un material polianiónico" en la presente se refiere a al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 materiales policatiónicos.

En una realización, el kit comprende

a) al menos un material policatiónico que consiste en poliarginina con 11 a 95, 15 a 95, 15 a 90, 15 a 85, 15 a 80, 15 a 75, 20 a 95, 20 a 90, 20 a 85, 20 a 80, 20 a 75, 25 a 95, 25 a 90, 25 a 85, 25 a 80, 25 a 75, 28 a 74, 28 a 72, 30 a 70 residuos de arginina, preferentemente poli-L-arginina, con mayor preferencia poli-L-arginina con 30 residuos de L-arginina, 50 residuos de L-arginina o 70 residuos de L-arginina, y/o
b) al menos un material policatiónico que consiste en polilisina con 11 a 99 residuos de arginina, preferentemente con 11 a 95, 15 a 90, 20 a 85, 20 a 80, 25 a 75, 25 a 70, 25 a 65 25 a 60, 25 a 55, 25 a 50, 25 a 40, 25 a 35, preferentemente poli-L-lisina, con mayor preferencia poli-L-lisina con 30 residuos de L-lisina, y/o
c) al menos un material policatiónico que consiste en poliornitina con 11 a 150 residuos de ornitina, preferentemente con 11 a 140, 11 a 130, 11 a 120, 11 a 120, 15 a 110, 15 a 100, 15 a 95, 15 a 90, 15 a 80, 15 a 75, 20 a 70, 10 a 65, 20 a 55, 20 a 50, 20 a 45 residuos de ornitina, preferentemente poli-L-ornitina, con mayor preferencia, poli-L-ornitina con 30 residuos de L-lisina, y
d) al menos un material polianiónico que consiste en ácido hialurónico.

En una realización, el kit comprende

a) material policatiónico que consiste en poliarginina con 15 a 45 residuos de arginina, preferentemente poli-L-arginina, con mayor preferencia, poli-L-arginina con 30 residuos de L-arginina, y/o
b) material policatiónico que consiste en polilisina con 15 a 45 residuos de lisina, preferentemente poli-L-lisina, con mayor preferencia poli-L-lisina con 30 residuos de L-lisina, y/o
c) material policatiónico que consiste en poliornitina con 15 a 120 residuos de ornitina, preferentemente poli-L-ornitina, con mayor preferencia poli-L-ornitina con 30 residuos de L-lisina, y

al menos un material polianiónico que consiste en ácido hialurónico.

Procedimientos y usos terapéuticos

Las infecciones, como las infecciones por *estafilococos*, sobre material extraño asociado con la formación de biopelículas tienen una serie de características que las distinguen por completo de las infecciones tisulares convencionales. Estas infecciones suelen ser paucibacilares (con pocas bacterias) y fácilmente polimicrobianas. Las bacterias tienen un metabolismo muy lento que las mantiene en un estado cercano a la latencia y los genes que expresan son diferentes a los activados en formas planctónicas. El estado de latencia de las bacterias y la presencia

de la biopelícula reducen significativamente la reacción inflamatoria y la atracción de células inmunitarias en el sitio de la infección. Por último, por las mismas razones, las bacterias están en gran parte protegidas de la acción de los antibióticos. Por tanto, es importante prevenir dicha formación de biopelículas, en particular, en el cuerpo de un individuo, por ejemplo después de un trasplante.

El recubrimiento polielectrolítico o el dispositivo implantable en el contexto de la presente invención tienen una actividad biocida, en particular dentro de las primeras 72 horas posteriores a la implantación, en particular dentro de las primeras 48 horas posteriores a la implantación, con mayor preferencia las primeras 24, las primeras 12, las primeras 6 horas después de la implantación. El recubrimiento polielectrolítico o dispositivo implantable en el contexto de la presente invención inhibe por tanto el crecimiento de una bacteria y así evita que se forme una biopelícula de la superficie de dicho recubrimiento o dispositivo implantable y así evita una infección bacteriana.

Por consiguiente, en la presente se describe, pero no está cubierto por las reivindicaciones, un procedimiento para prevenir una infección bacteriana en un individuo que se somete a la implantación de un dispositivo implantable que comprende las etapas de proporcionar un dispositivo implantable como se definió en la presente anteriormente, e implantar dicho dispositivo implantable en el individuo, en donde dicho dispositivo implantable previene una infección bacteriana.

En una realización, proporcionar un dispositivo implantable se refiere a preparar un dispositivo implantable de acuerdo con el procedimiento de la invención.

El individuo es como se definió en la presente anteriormente en la sección "Dispositivo".

En una realización, la infección bacteriana es una infección nosocomial.

Una “infección nosocomial”, también denominada infección adquirida en el hospital (HAI) en la presente, se refiere a una infección que se contrae del entorno o del personal de un centro sanitario. La infección se propaga al paciente susceptible en el entorno clínico por varios medios, en particular por dispositivos implantables. Las bacterias grampositivas implicadas en la "infección nosocomial" son, por ejemplo, *Staphylococcus aureus.* Las bacterias gramnegativas implicadas en la "infección nosocomial" son, por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii, Stenotrophomonas maltophilia, Escherichia coli, Legionella.*

Por consiguiente, en una realización, la infección nosocomial es una infección causada por al menos una bacteria como se definió anteriormente en la sección "Recubrimiento polielectrolítico" en la presente descripción.

Como se especifica con más detalle en la sección "Dispositivo", la infección bacteriana en forma de biopelícula difiere de las infecciones convencionales.

Por consiguiente, en una realización, la infección bacteriana es una infección por biopelícula.

Una “infección por biopelícula” en la presente se refiere a una infección bacteriana con bacterias formadoras de biopelícula. Las bacterias formadoras de biopelículas son, por ejemplo, pero no se limitan a, bacterias grampositivas como *Staphylococcus* y especies gramnegativas como *Escherichia coli* o *Pseudomonas aeruginosa.*

Cualquier combinación de las realizaciones anteriores forma parte de la invención.

A lo largo de la presente solicitud, el término "que comprende” debe interpretarse como que abarca todas las características mencionadas específicamente, así como las opcionales, adicionales, no especificadas. Como se usa en la presente, el uso del término "que comprende” también describe la realización en la que no están presentes características distintas de las características específicamente mencionadas (es decir, "que consiste en"). Además, el artículo indefinido "un" o "una" no excluye una pluralidad. El mero hecho de que se mencionen determinadas medidas en reivindicaciones dependientes diferentes entre sí no indica que una combinación de estas medidas no pueda utilizarse ventajosamente.

La invención se describirá ahora con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos.

Si bien la invención se ha ilustrado y descrito en detalle en la descripción anterior, los ejemplos deben considerarse ilustrativos o ejemplares y no restrictivos.

EJEMPLOS

1. Ejemplo 1

1.1 Material

Los recubrimientos polielectrolíticos de múltiples capas se han construido con los siguientes polielectrolitos. Los policationes de poli(clorhidrato de l-arginina) (PAR) se adquirieron de Alamanda Polymers, EE. UU. Los diferentes polímeros de PAR utilizados difieren de la cantidad de arginina por cadena: PAR10 10 argininas (R), Mw = 2,1 kDa, PDI = 1); PAR30 (30 R, Mw = 6,4 kDa, PDI = 1,01), PAR100 (100 R, Mw = 20,6 kDa, PDI = 1,05) y PAR200 (200 R, Mw = 40,8 kDa, PDI = 1,06). Se adquirió poli(clorhidrato de L-ornitina) (PLO) de Alamanda Polymers, EE. UU. Los diferentes polímeros de PLO utilizados difieren de la cantidad de ornitina por cadena: PLO30 (30 R, Mw = 5,9 kDa, PDI = 1,03), PLO100 (100 R, Mw = 18,5 kDa, PDI = 1,03) y PLO250 (250 R, Mw = 44,7 kDa, PDI = 1,02). Se adquirió poli(clorhidrato de L-lisina) (PLL) tal como PLL30 (30 R, Mw = 5,4 kDa, PDI = 1,02) de Alamanda Polymers, EE.UU.

El ácido hialurónico (HA, Mw = 150 kDa) usado como polianión era de Lifecore Biomed, EE. UU.

1.2 Procedimientos

Seguimiento de la fabricación de recubrimientos multicapa: Se siguió la fabricación del recubrimiento o la película mediante el uso de una microbalanza de cristal de cuarzo in situ (QCM-D, E1, Q-Sense, Suecia). El cristal de cuarzo se excita en su frecuencia fundamental (aproximadamente 5 MHz), así como en el tercer, quinto y séptimo sobretonos (denotados por v = 3, v = 5, v = 7 correspondientes respectivamente a 15, 25 y 35 MHz). Los cambios en las frecuencias de resonancia (Δf) se miden en estas cuatro frecuencias. Un aumento de Δf/v suele estar asociado a un aumento de la masa acoplada al cuarzo. PAR (es decir, PAR10, PAR30, PAR50, PAR100 o PAR200) y HA se disolvieron a 0,5 $mg.ml^{-1}$ en tampón esterilizado que contenía NaCl 150 mM y tris(hidroximetil)-aminometano 10 mM (TRIS, Merck, Alemania) a pH 7,4. Las soluciones polielectrolíticas se inyectaron sucesivamente en la celda de QCM que contenía el cristal de cuarzo y PAR fue el primer polielectrolito depositado. Se adsorbieron durante 8 min y después se realizó una etapa de enjuague de 5 min con tampón NaCl-Tris.

Fabricación de $(PAR/HA)_{24}$ con robot de inmersión: Para la construcción de 24 bicapas de PAR/HA ($(PAR30/HA)_{24}$) se utilizó un robot de inmersión automatizado (Riegler & Kirstein GmbH, Berlín, Alemania). Los portaobjetos de vidrio (12 mm de diámetro) se lavaron primero con una solución de Hellmanex® II a 2 %, H_2O, y etanol y se secaron con flujo de aire. Las soluciones de polielectrolitos se prepararon como se describió anteriormente para los experimentos de QCM. Los portaobjetos de vidrio se sumergieron alternativamente en soluciones de policatión y polianión y se enjuagaron extensamente en tampón NaCl-Tris entre cada etapa. Después de la construcción, los recubrimientos se secaron con flujo de aire y después se sumergieron en tampón NaCl-Tris y se almacenaron a 4 °C antes de su uso. Los espesores de los recubrimientos obtenidos se evaluaron mediante la deposición de 100 µl de PLL-FITC(poli-L-lisina marcada con isotiocianato de fluoresceína, una sonda fluorescente verde) (0,5 $mg.ml^{-1}$ en tampón Tris-NaCl) en la parte superior de los recubrimientos de múltiples capas de PAR/HA. Después de 5 minutos y la difusión de PLL-FITC a través de todo el recubrimiento, se realizó una etapa de enjuague con tampón Tris-NaCl. Las observaciones de los recubrimientos se realizaron con un microscopio confocal microscopio Zeiss LSM 710 (Heidelberg, Alemania) mediante el uso de un objetivo 20× (Zeiss, Plan Apochromat).

24 bicapas de PLL/HA ($PLL30/HA)_{24}$ y 24 bicapas de PLO/HA (es decir $(PLO30/HA)_{24}$, $(PLO100/HA)_{24}$ y $(PLO250/HA)_{24}$) se prepararon de forma análoga, en donde PLO o PLL se disolvieron a 0,5 $mg.ml^{-1}$ en tampón esterilizado que contenía NaCl 150 mM y tris(hidroximetil)-aminometano 10 mM (TRIS, Merck, Alemania) a pH 7,4.

Ensayos antibacterianos:

- Se utilizaron cepas de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus,* ATCC 25923) para evaluar las propiedades antibacterianas de las muestras de prueba. La cepa bacteriana se cultivó aeróbicamente a 37 °C en un medio de caldo Mueller Hinton (MHB) (Merck, Alemania), pH 7,4. Una colonia se transfirió a 10 mL de medio MHB y se incubó a 37 °C durante 20 horas, para proporcionar una densidad final de 10^6 $CFU.ml^{-1}$. Para obtener bacterias en la fase logarítmica media de crecimiento, la absorbancia a 620 nm del cultivo durante la noche se ajustó a 0,001.

Los portaobjetos de vidrio recubiertos con $(PAR/HA)_{24}$ con PAR10, PAR30, PAR100, se esterilizan mediante el uso de luz UV durante 15 minutos, después se lavan con tampón NaCl-Tris. Después del lavado, cada portaobjetos de vidrio se depositó en placas de 24 pocillos con 300 µl de *S. aureus,* A_{620} = 0,001, y se incubó durante 24 horas a 37 °C.

Para el control negativo, los portaobjetos de vidrio sin recubrimiento se incubaron directamente con S. *aureus* mediante el uso de un procedimiento similar.

Para el control positivo, se añadieron tetraciclina (10 $\mu g.ml^{-1}$) y cefotaxima (0,1 $\mu g.ml^{-1}$) en una solución de *S. aureus* en contacto con los portaobjetos de vidrio sin recubrir.

Para cuantificar el crecimiento o inhibición de bacterias después de 24 horas, se midió la absorbancia del sobrenadante a 620 nm.

El ensayo se realizó de manera similar para portaobjetos de vidrio recubiertos con $(PLL30/HA)_{24}$, $(PLO30/HA)_{24}$, $(PLO100/HA)_{24}$ y $(PLO250/HA)_{24}$.

El ensayo antibacteriano para *M. Luteus, E. Coli y P. aeruginosa* se realizó de forma análoga al ensayo bacteriano descrito para *Staphylococcus aureus* descrito anteriormente.

Ensayo de bacterias vivas/muertas: para evaluar el estado de las bacterias que se encuentran en la superficie, se utilizó el kit de vitalidad BacLight™ RedoxSensor™ CTC (ThermoFischer Scientific Inc., Francia). Este kit proporciona reactivos eficaces para evaluar el estado y vitalidad de las bacterias. El kit contiene cloruro de 5-ciano-2,3-ditolil tetrazolio (CTC), que se ha utilizado para evaluar la actividad respiratoria de S. aureus. De hecho, las bacterias sanas absorberán y reducirán el CTC en un producto de formazán rojo fluorescente e insoluble. Las bacterias muertas o con una actividad respiratoria lenta no reducirán el CTC y, en consecuencia, no producirán un producto rojo fluorescente. Finalmente, este kit proporciona una estimación semicuantitativa de bacterias sanas frente a las no saludables. La tinción de ácido nucleico fluorescente verde SYTO® 24 (ThermoFischer Scientific Inc., Francia) se utiliza para contar todas las bacterias. Se prepara una solución de CTC 50 mM y Syto 24 0,001 mM en agua pura. Cada portaobjetos de vidrio se lavó con tampón de solución salina tamponada con fosfato, pH = 7,4 (PBS), después se agregaron 270 µl de PBS y 30 µL de la solución CTC/Syto 24. Las placas se incubaron durante 30 minutos a 37 °C, protegidas de la luz. Cada superficie se observó con microscopía confocal (microscopio Zeiss LSM 710, Heidelberg, Alemania), mediante el uso de un objetivo 63×, sumergido en aceite. La longitud de onda de excitación/emisión de las tinciones fue de 450/630 nm para CTC y 490/515 nm para Syto 24.

Prueba de citotoxicidad: se cultivaron fibroblastos humanos (CRL-2522 de ATCC/LGC Standards, Francia) a 37 °C en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM, ACC/LGC) con un 10 % de suero bovino fetal (FBS, Gibco/ThermoFicher Scientific Inc)., Francia) y 1 % de penicilina estreptomicina (Pen Strep, Life Technologies/ThermoFicher Scientific Inc., Francia). Se incubaron 50 000 células en cada pocillo de una placa de 24 pocillos durante 24 horas. Los portaobjetos de vidrio recubiertos con $(PAR/HA)_{24}$ se incubaron simultáneamente en placas de 6 pocillos con 1 ml de medio. Después de 24 horas, se retiró el medio de los pocillos que contenían células y se reemplazó por el sobrenadante que estuvo en contacto con las multicapas durante 24 horas. Los fibroblastos humanos se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Después, se eliminó el sobrenadante y se incubó con un 10 % de AlamarBlue (ThermoFischer Scientific Inc., Francia) durante 2 horas. La viabilidad celular se determinó mediante la medición de la fluorescencia de la resofurina producida (longitud de onda de excitación/emisión = 560/590 nm). Las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con solución de PFA al 4 % durante 10 minutos, y después se lavaron de nuevo dos veces con PBS. Se preparó una solución de faloidina en tampón PBS con 1 % de albúmina de suero bovino (BSA). La solución de tinción se colocó sobre las células fijadas durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavó dos veces con tampón PBS. Se preparó una solución de DAPI y se colocó sobre las células en las mismas condiciones que se describieron anteriormente. Las imágenes de fluorescencia se capturaron mediante el uso de Nikon Elipse Ti-S con objetivo 63× PL APO (1,4 NA) equipado con cámara digital Nikon (DS-Q11MC con software NIS-Elements, Nikon, Francia), y procesado con Imaged (http://rsb.info.nih.gov/ij/). La longitud de onda de excitación/emisión para la rodamina faloidina fue 540/565 nm y para DAPI 350/470 nm.

Microscopía con lapso de tiempo: los portaobjetos de vidrio recubiertos con $(PAR/HA)_{24}$ se esterilizaron mediante el uso de luz UV durante 15 minutos, después se lavaron con tampón NaCl-Tris. Después del lavado, cada portaobjetos de vidrio se montó en una cámara Ludin (Life Imaging Services, Suiza) a 37 °C, 5 % de CO_2, con 1 mL µl de S. aureus (usado como se describió anteriormente, con A_{620} = 0,001), teñido con Syto 24 durante el cultivo. La secuencia de lapso de tiempo se realizó durante 24 horas con un microscopio Nikon TIE equipado con un objetivo 60× PL Apo en aceite (1,4 NA) y una cámara sCMOS Andor Zyla (Andor Technology LtD. Reino Unido), se utilizó con el software Nikon NIS-Elements Ar (Nikon, Francia). Se adquirieron imágenes de contraste de fase y fluorescencia cada 5 min durante 24 horas. Las imágenes se procesaron con Imaged.

Dicroísmo circular: Los espectros de dicroísmo circular (CD) se registraron mediante el uso de un espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco Corporation, Reino Unido) como un promedio de 3 exploraciones obtenidas mediante el uso de una cubeta de cuarzo de 0,1 mm de longitud de trayectoria a 22 °C de 180 a 300 nm con paso de datos de 0,1 nm y una velocidad de exploración de 20 nm/min. Todos los espectros se corrigieron restando los espectros del tampón. Los espectros para cada PAR se obtuvieron a una concentración de 2 $mg.ml^{-1}$ en tampón NaCl-Tris. Todos los datos de CD se expresaron como elipticidad media por residuo.

Marcaje fluorescente de PAR: para marcar las cadenas de PAR, se incubó PAR (15 $mg.ml^{-1}$ en tampón de $NaHCO_3$ 100 mM pH 8,3) con isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma Aldrich, Francia) en una relación molar 1:2 de PAR/FITC a temperatura ambiente durante 3 horas. Esta solución se dializó frente a 1 L de agua a 4 ºC con un casete de diálisis Slide-A-Lyser (Thermo Fischer Scientific Inc, EE. UU.), valor de corte = 3500 MWCO. A continuación, se produjo PAR-FITC y se almacenó en alícuotas de 2 ml (0,5 $mg.ml^{-1}$ en tampón NaCl-Tris).

Experimentos de liberación: Para el primer experimento, se construyó un recubrimiento multicapa $(PAR30/HA)_{24}$ mediante el uso de PAR-FITC. Los experimentos de liberación se realizaron a 37 °C durante 24 horas en presencia de medio MHB o una solución de S. aureus/MHB (A_{620} = 0,001). Se agregaron 300 µl de aceite mineral en la parte superior del sobrenadante para evitar cualquier evaporación durante el seguimiento. La liberación de PAR-FITC en

solución se realizó mediante la medición de la fluorescencia del sobrenadante a lo largo del tiempo con un espectrofluorímetro (espectrofluorímetro SAFAS Genius XC, Mónaco) con una longitud de onda de excitación/emisión de 488/517 nm. Se estudiaron tres muestras por cada condición.
Para el segundo experimento, se incubó una película multicapa $(PAR30/HA)_{24}$ a 37 °C con dos condiciones: A) con 300 µl de solución de S. aureus A620 = 0,001 y B) 300 µl de MHB solamente. Después de 24 horas, se tomó el sobrenadante en contacto con el LbL y se incubó con una nueva solución de S. aureus para obtener un A620 final = 0,001. Después de 24 horas a 37 °C, se midió la absorbancia a 620 nm. Se estudiaron tres muestras por cada condición.

Experimentos de recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueo (FRAP): El coeficiente de difusión, D, y la proporción de moléculas móviles, p, se midieron para las multicapas $(PAR/HA)_{24}$ que contienen PAR-FITC mediante la realización de experimentos de fotoblanqueo (FRAP, recuperación de fluorescencia después del fotoblanqueo).

Se introdujo un portaobjetos de vidrio recubierto con la multicapa en un portamuestras construido en el laboratorio y se sumergió en 200 µl de tampón Tris-NaCl. Unas regiones circulares (4,4 µm de radio y denominada "R4" en una imagen de 35 µm × 35 µm o 10,6 µm de radio y denominada "R10" en una imagen de 85 µm × 85 µm) se expusieron durante 700 ms a la luz láser ajustada a su máxima potencia (λ = 488 nm). Después, se observó la recuperación de la fluorescencia en el área blanqueada a lo largo del tiempo. Las observaciones se realizaron con un microscopio Zeiss LSM 710 (Heidelberg, Alemania) mediante el uso de un objetivo 20× (Zeiss, Plan Apochromat).

Reticulación de $(PAR30/HA)_{24}$: la reticulación se realizó al sumergir las películas de $(PAR30/HA)_{24}$ en una solución que contenía EDC(100 mM) y N-hidroxisuccinimida (10 mM) en NaCl (0,15 M) durante 15 horas a 4 °C. Las películas se enjuagaron 2 veces con una solución de NaCl (0,15 M). Las películas se sumergieron en una solución de etanolamina (1 M) durante 40 minutos a 4 °C para neutralizar todas las funciones carboxilatos que no habían reaccionado. Las películas se enjuagaron con una solución de NaCl y la solución tampón NaCl-Tris se utilizó para la última etapa de enjuague.

1.3 Resultados

Para probar la fabricación de los recubrimientos de PAR/HA, se utilizó una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM). La Figura 1 corresponde a la deposición capa por capa controlada con QCM para varios pesos moleculares de PAR (10, 30, 100 o 200 residuos correspondientes a la notación PAR10, PAR30, PAR100 o PAR200 respectivamente). En una primera aproximación, se sabe que el aumento de la frecuencia normalizada podría estar relacionado con un aumento de la masa o espesor depositado (REF). Se observó un crecimiento exponencial de la frecuencia normalizada con la cantidad de etapas de deposición para la fabricación de los recubrimientos con PAR30, PAR100 o PAR200. Para las cadenas de PAR más grandes se registró el crecimiento más importante. En el caso de PAR_{10} el incremento en la frecuencia normalizada con la cantidad de deposiciones es el más débil, sin embargo ya se observó un crecimiento exponencial (Figura 1). Finalmente, a pesar de la corta longitud de este polipéptido, el crecimiento capa por capa fue eficaz.

Previamente se demostró un comportamiento opuesto para la fabricación de recubrimientos multicapa con quitosano/HA con varios MW de quitosano (Richert 2004, Langmuir). Se observó un crecimiento exponencial de los recubrimientos para todos los MW utilizados de quitosano, sin embargo, la fabricación del recubrimiento fue más rápida cuando la masa de las cadenas de quitosano fue menor. Este comportamiento se relacionó con las propiedades de difusión de las cadenas de quitosano en los recubrimientos: las cadenas más cortas deberían difundirse más a través del recubrimiento, lo que debería conducir a un mayor incremento en el aumento de la masa después de cada deposición de las capas. Sin embargo, en el presente estudio, las condiciones experimentales son diferentes ya que se seleccionó un homopolipéptido como policatión en lugar de un polisacárido y el intervalo de longitud de su cadena fue menor.

Después, se observaron recubrimientos con 24 bicapas ($(PAR/HA)_{24}$) con microscopía confocal. Para marcar de forma fluorescente los recubrimientos, se añadió poli(lisina)-FITC como la última capa encima de los recubrimientos. Las imágenes de la sección transversal de los recubrimientos fabricados con PAR de diferentes cantidades de residuos muestran bandas gruesas con un marcaje verde a lo largo de toda la sección del recubrimiento (Figura 2). Esto indica que los recubrimientos producidos se depositaron de manera homogénea sobre la superficie en todas las condiciones (para PAR con 10 a 200 residuos).

A continuación, se evaluaron las propiedades antimicrobianas de las multicapas $(PAR/HA)_{24}$ para PAR de diferente cantidad de residuos. Las películas se probaron contra una bacteria grampositiva, S. aureus, una cepa bien conocida por su asociación con infecciones nosocomiales y más particularmente con infecciones relacionadas con implantes. Por ejemplo, en el caso de los implantes ortopédicos, S. aureus junto con S. epidermis están involucrados en el 70 % de las infecciones (Biomaterials 84, 2016, 301). S. aureus se incubó durante 24 horas a 37 °C en presencia de medio MHB en los recubrimientos $(PAR/HA)_{24}$. Las bacterias se incubaron a alta densidad en las superficies durante 24 horas a 37 °C en presencia de medio MHB. El crecimiento normalizado de los patógenos (%)

se estimó mediante la comparación de la absorbancia a 620 nm en presencia de películas multicapa en comparación con el control positivo (sin películas multicapa y en presencia de antibióticos en el medio) y el control negativo (sin películas multicapa y en ausencia de antibióticos en el medio). No se observó una inhibición significativa para las películas construidas con PAR10, PAR50, PAR100 y PAR200. Sin embargo, para PAR30 (30 residuos), se observó más del 95 % de inhibición del crecimiento bacteriano después de 24 horas. Esto sugiere que PAR30 afecta fuertemente la viabilidad de S. aureus. Debe señalarse que el efecto del peso molecular es extremadamente llamativo y hasta ahora nunca se había observado tal efecto sobre la funcionalidad de la película multicapa, cualquiera que sea esta función (ver la Figura 3).

Para evaluar con mayor precisión la salud de las bacterias en contacto con las superficies, se verificó la actividad respiratoria de *S. aureus* mediante el uso de cloruro de 5-ciano-2,3-ditolil tetrazolio (CTC). Las bacterias sanas absorberán y reducirán el CTC a un producto de formazán rojo fluorescente e insoluble y las bacterias que están muertas no reducirán el CTC y, en consecuencia, no producirán el producto fluorescente (datos no mostrados). Se observó claramente una inhibición total de bacterias en las superficies (PAR30/HA) y era extremadamente raro encontrar un área con pocas bacterias (datos no mostrados). Comparativamente, las superficies PAR10, PAR100 o PAR200 no impidieron la adhesión y el crecimiento bacteriano, se encontró una densidad similar de bacterias sanas en comparación con las superficies no tratadas. Este resultado sobresaliente está en total correlación con la inhibición del crecimiento en el sobrenadante descrita anteriormente, donde PAR30 fue también el único recubrimiento fuertemente eficaz contra las bacterias.

Con el fin de dilucidar si la inhibición del crecimiento bacteriano de los recubrimientos de $(PAR/HA)_{24}$ se limita únicamente a *S. aureus,* se ensayó adicionalmente la inhibición del crecimiento bacteriano de $(PAR30/HA)_{24}$ frente a otras bacterias grampositivas y gramnegativas. Por consiguiente, se evaluaron las propiedades antimicrobianas de una multicapa $(PAR30/HA)_{24}$ para la cepa de *S. aureus* resistente a metilina, *M. Luteus, E. coli* y *P. aeruginosa.* El resultado mostrado en la Figura 16 demuestra que el recubrimiento tiene una actividad antibacteriana contra diferentes bacterias gramnegativas y grampositivas.

En este contexto, los inventores querían saber si la actividad antibacteriana se limita a los recubrimientos multicapa (PAR/HA) descritos en la presente o si un recubrimiento que comprende como policatión otro polipéptido también demostraría la misma actividad antibacteriana. Los inventores de la presente invención evaluaron además las multicapas $(PLL/HA)_{24}$ y $(PLO/HA)_{24}$ para PLL y PLO de diferente cantidad de residuos. Sorprendentemente, como se puede concluir de las Figuras 4, 6, 9, 10 y 17, también las multicapas $(PLL/HA)_{24}$ y $(PLO/HA)_{24}$ mostraron una alta inhibición del crecimiento para *A. aureus* y *M. Luteus.*

A continuación, los inventores de la presente invención quisieron dilucidar más el mecanismo subyacente que confiere a los recubrimientos de la invención la fuerte propiedad inhibidora en la superficie y en el sobrenadante. Como ejemplo, se siguió investigando el recubrimiento $(PAR30/HA)_{24}$. Por consiguiente, se determinó la concentración inhibidora mínima (MIC) de PAR en solución mediante el uso de un ensayo bacteriano como se describe en la Sección Experimental. Para concentraciones de hasta 0,04 $mg.ml^{-1}$, todas las PAR (PAR10, PAR30, PAR100 o PAR200) inhibieron totalmente el crecimiento de *S. aureus* (Figura 11). Sin embargo, cuando las concentraciones de PAR disminuyeron, se observó una discrepancia entre PAR: se registró una inhibición total del crecimiento de *S. aureus* para todas las PAR a concentraciones de 0,03 $mg.ml^{-1}$ excepto para la más larga, es decir, PAR200 donde se midió solo una inhibición parcial (aproximadamente el 45 %). Finalmente, para PAR a concentraciones de 0,01 $mg.ml^{-1}$, se mostró una inhibición del 100 % solo para PAR_{30}. Las cadenas de PAR más largas o más cortas (PAR10, PAR100 o PAR200) inhiben solo parcialmente (menos del 40 %) el crecimiento de *S. aureus.* Esto sugiere que PAR30 es más eficaz en solución. Este razonamiento es válido cuando los valores de concentración de PAR se expresan en masa ($mg.ml^{-1}$), por lo que se relaciona con la cantidad de monómeros de arginina. Sin embargo, cuando el gráfico se construye con las concentraciones en pM (y por lo tanto es proporcional en la cantidad de cadenas), lo que significa que la concentración se relaciona con la cantidad de cadenas, se pueden realizar diferentes interpretaciones. A concentraciones bajas, las cadenas más largas son más eficaces: a 1 pM, PAR100 y PAR200 inhiben totalmente el crecimiento bacteriano, mientras que para un efecto similar, PAR30 debe estar a aproximadamente 2 pM. Finalmente, los inventores concluyeron a partir de estos resultados que todas las cadenas de PAR son eficaces en solución para inhibir el crecimiento de *S. aureus.* Para una masa determinada de PAR, PAR30 es la más eficaz. Además, los valores de MIC_{100} obtenidos para PAR30, PAR100 o PAR200 varían en concentraciones muy bajas (entre 1 y 2 pM), lo que es notable cuando se compara con péptidos antimicrobianos bien conocidos (por ejemplo, 30 pM para cateslytin con S. aureus, ver *Adv. Fund. Mater.* 2013, *23,* 4801-4809). Por lo tanto, PAR es un poderoso candidato para luchar contra *S. aureus.* Sin embargo, incluso si hay diferencias en las MIC de las PAR de longitud diferente, no difieren en órdenes de magnitud y, por lo tanto, no parecen estar, al menos únicamente, en el origen del sorprendente efecto del peso molecular observado en las multicapas de PAR/HA.

Para abordar las conformaciones de las cadenas de PAR y comprobar si las cadenas de PAR30 tienen una estructura secundaria específica que podría explicar sus propiedades inhibitorias en comparación con las cadenas más largas o más cortas, se realizaron experimentos de dicroísmo circular (CD). En primer lugar, estructuras secundarias de cadenas de PAR en solución tampón NaCl/TRIS (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, pH 7,4) (datos no mostrados). Todos los espectros de CD de las cadenas de PAR (PAR10, PAR30, PAR100 y PAR200) muestran un mínimo negativo único a aproximadamente 200 nm característico de una conformación de espiral aleatoria en

solución. En una segunda etapa, se registró la conformación de PAR en los recubrimientos multicapa de PAR/HA (datos no mostrados). Sorprendentemente, los espectros de los recubrimientos muestran perfiles totalmente diferentes: no se observaron más mínimos a 200 nm, sin embargo, se registró un mínimo a aproximadamente 10 y otro a aproximadamente 222 nm, excepto para $(PAR10/HA)_{24}$, que presenta un mínimo negativo único a 200 nm (espiral aleatoria). Probablemente no se puedan atribuir a cadenas de HA, ya que se sabe que en solución a pH 7,4 tienen una conformación desordenada (Zahouani, ACS Applied Materials, 2016, en prensa). Además, el espectro PAR/HA corresponde más probablemente a cadenas en conformaciones de α-hélice caracterizadas por estos dos mínimos. Esto indica que las cadenas de PAR deberían cambiar de una conformación de espiral en solución a una α-hélice en el recubrimiento. Se observó previamente un comportamiento similar para la fabricación LbL con polilisina y poli(ácido glutámico) (Boulmedais F. y otros, Langmuir, 2002, 18, 4523). Curiosamente, se sabe que los péptidos antimicrobianos no ordenados adoptan una conformación de α-hélice cuando interactúan con la membrana bacteriana y este mecanismo es un punto clave en su mecanismo de acción (Porcellini F. y otros, 2008, *Biochemistry,* 47, 5565 y Lugardon K y otros, 2001, *J Biol Chem.,* 276(38): 35875). Aquí, en los recubrimientos polielectrolíticos de múltiples capas, las cadenas de PAR ya adoptan una conformación de α-hélice muy probablemente debido a las interacciones entre PAR y HA y la alta concentración local de PAR. Este mecanismo puede ser útil para luchar más rápido y de manera más eficiente contra las bacterias invasoras.

Pero, debido a que las películas construidas con diferentes longitudes de las cadenas de PAR presentan espectros similares, la estructura secundaria de las cadenas de PAR no puede explicar el sorprendente efecto del peso molecular sobre la propiedad bactericida de las películas de PAR30/HA.

En vista de la ausencia de propiedades específicas de PAR30 en solución en comparación con cadenas de PAR más cortas o más largas, las capacidades antimicrobianas de las películas PAR30/HA deberían estar relacionadas con la propiedad de la película por sí misma. En este contexto, investigamos si la propiedad bactericida de la película se debe a la liberación de cadenas de PAR30 de la multicapa a la solución o si es necesario que las bacterias entren en contacto con la película para destruirlas. Para ello se realizaron dos tipos de experimentos. Con el uso de cadenas de PAR30 marcadas con fluorescencia, primero determinamos la liberación de cadenas de PAR30 en la solución que contiene únicamente medio MH con y sin S. aureus. La Figura 13 muestra una curva típica de la cinética de liberación. De hecho, se observó un proceso de liberación lento en una escala de tiempo del orden de 24 horas, pero evidentemente resulta que incluso después de 24 horas, la concentración de PAR30 alcanzada en solución se encuentra significativamente por debajo de la concentración MIC correspondiente: la PAR30 liberada tiene una concentración de aproximadamente 0,18 µM después de 24 horas, mientras que la MIC90 es de aproximadamente 2 µM. Además, cuando el sobrenadante, después de 24 horas de contacto con la película, se puso en contacto con la suspensión que contenía bacterias a una concentración final idéntica a experimentos anteriores, no se observó absolutamente ninguna inhibición del crecimiento bacteriano, lo que confirma que no se alcanzó la MIC en el sobrenadante (Figura 15). Finalmente, también realizamos un experimento en el que las bacterias se pusieron en contacto con una película de $(PAR30/HA)_{24}$ durante 24 horas. Se inhibió totalmente el crecimiento de bacterias. El sobrenadante de este experimento se retiró y se puso en contacto con una nueva suspensión de bacterias. Aquí de nuevo, el crecimiento de las bacterias no se inhibió más (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que la liberación de las cadenas de PAR30 de la película en el sobrenadante no puede ser el origen del efecto bactericida. Finalmente, podemos plantear la hipótesis de que el efecto bactericida está directamente relacionado con el contacto de la bacteria con la película de PAR30/HA que actúa como una multicapa que mata por contacto.

Después, los inventores investigaron si la actividad bactericida de la multicapa de PAR30/HA se relaciona con la movilidad de estas cadenas en las películas. De hecho, se sabe que el carácter exponencial de una multicapa se relaciona con la capacidad de difusión de al menos uno de sus constituyentes dentro y fuera de la película durante cada etapa de deposición. Primero determinaron la movilidad de las diferentes cadenas, PAR10, PAR30, PAR100 y PAR200 en la multicapa de $(PAR/HA)_{24}$ mediante el procedimiento FRAP. La Figura 14 muestra la evolución de la fluorescencia normalizada en el área blanqueada en función de la raíz cuadrada del tiempo. De estas curvas se puede deducir el porcentaje de cadenas inmóviles en la escala de tiempo de los experimentos. Parece claro que más del 80 % de las cadenas de PAR10 y PAR30 son móviles y que solo el 60 % y el 20 % de PAR100 y PAR200 respectivamente son móviles (datos no mostrados). La fracción de cadenas móviles disminuye drásticamente cuando la longitud de la cadena aumenta de 30 a 100 o 200 residuos.

Los inventores también reticularon las multicapas de PAR30/HA mediante el uso de un procedimiento estándar de reticulación de EDC-NHS entre los grupos amino y carboxílico. Después de la reticulación, encontramos que la proporción de cadenas inmóviles medidas por FRAP aumenta (datos no mostrados). Cuando una película de este tipo se puso en contacto con S. aureus, solo se observó una inhibición del crecimiento bacteriano del 30 % después de 24 horas de contacto. Estos resultados sugieren que el porcentaje de cadenas de PAR móviles en la multicapa es un parámetro importante que controla su propiedad bactericida de la película (Figura 11).

Finalmente, mediante el uso de microscopía confocal, los inventores también investigaron la estructura de la película después de 24 horas de contacto con bacterias (datos no mostrados). Para este propósito, las películas se construyeron mediante la incorporación de cadenas de PAR30 marcadas con fluorescencia. Se encontró que después de 24 horas de contacto, la película ya no es homogénea pero aparecen áreas no fluorescentes. Debido a

que estas áreas tienen una forma suave, sugieren una reorganización de la película. Tal comportamiento no se observa en ausencia de bacterias donde las películas permanecen homogéneas. Tal reorganización podría ser consecutiva a la disminución de las cadenas de PAR en la película y sugerir el siguiente mecanismo bactericida: cuando las bacterias entran en contacto con la multicapa, las membranas negativas de las bacterias actúan como superficies de atracción fuerte para las cadenas de PAR. De este modo, las membranas bacterianas absorben las cadenas de PAR móviles de la película y se desestabilizan. Las cadenas de gran peso molecular tienen un poder de desestabilización de la membrana más fuerte que las de menor peso molecular, como proviene de las MIC determinadas en solución. Las cadenas de PAR10 son 10 veces menos activas que las cadenas de PAR100 o PAR200, pero las cadenas de PAR30 son solo 2 veces menos activas que las cadenas de PAR100 o PAR200. Sin embargo, en una película se puede suponer que la concentración de monómeros de arginina es bastante independiente del peso molecular de las cadenas de PAR. Por tanto, la concentración de cadenas disminuye cuando aumenta el peso molecular de los polielectrolitos. Por ejemplo, la concentración de cadenas de PAR30 en la película debería ser 3 veces mayor que la de PAR100. Además, las cadenas de PAR10 son móviles en el orden del 90 % mientras que solo el 70 % de las cadenas de PAR100 son móviles. Esto conduce a 4 veces más cadenas de PAR10 que PAR100 en la película. Podría haber otros factores que expliquen la mayor propensión de las películas de PAR/HA construidas con PAR30 a ser fuertemente bactericidas, pero la movilidad de las cadenas es sin duda importante.

En resumen, los inventores de la presente invención han descubierto que los recubrimientos multicapa que comprenden PAR, PLL o PLO como policatión y HA como polianión presentan un fuerte efecto antimicrobiano contra *S. aureus, M. Luteus, E. coli* y *P. aeruginosa.* Este efecto depende sorprendentemente del peso molecular de las cadenas polipeptídicas. Este efecto se explica por la concentración de móviles en las multicapas y su poder para matar bacterias en función del peso molecular. Estos resultados abren el camino a un nuevo tipo de aplicaciones de multicapas polielectrolíticas, en particular de multicapas antibacterianas, donde la función puede ser ajustada por el peso molecular de los polielectrolitos.

2. Ejemplo 2 (los ejemplos con 150 unidades de arginina son ejemplos de referencia)

2.1 Material

Los recubrimientos polielectrolíticos de múltiples capas se han fabricado mediante el uso de los polielectrolitos descritos en la presente anteriormente en la sección . Se utilizaron además los siguientes polielectrolitos: Se adquirieron policationes de poli(clorhidrato de l-arginina) (PAR) de Alamanda Polymers, EE. UU. Los diferentes polímeros de PAR utilizados difieren de la cantidad de arginina por cadena: PAR50 (50 argininas (R), Mw = 9,6 kDa, PDI = 1,03); PAR70 (70 argininas (R), Mw = 13,4 kDa, PDI = 1,01), PAR150 (150 argininas (R), Mw = 29 kDa, PDI = 1,04).

2.2 Procedimientos

Los procedimientos utilizados son los descritos en la presente anteriormente en la sección correspondiente del párrafo 1.2.

2.3 Resultados

2.3.1 Efecto de la cantidad de residuos de arginina sobre la actividad antimicrobiana de PAR/HA: recubrimientos con PAR30, PAR50, PAR70, PAR100 y PAR150 después de 24 horas de incubación

Se han probado PAR con 30, 50, 100 y 150 residuos para confirmar los resultados previos y obtener resultados complementarios. Las mediciones se realizaron con un portaobjetos de vidrio recubierto con $(PAR/HA)_{24}$ (es decir, 24 capas de PAR que alternan con 24 capas de HA) y se colocaron en una placa de 24 pocillos, como se describió previamente (Chem. Mater. 2016, 28, 8700). Se depositaron 300 µl de *S. aureus* a una concentración de 8,105 UFC•ml^{-1} en cada pocillo y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Después se midió la absorbancia del sobrenadante a 620 nm.

PAR50/HA versus PAR30/HA con 24 bicapas

Las películas de PAR50/HA construidas con 24 bicapas muestran un efecto bactericida completo sobre las bacterias (Figuras 19 y 20). Además, las observaciones con microscopio confocal mediante el uso del marcaje con CTC/Syto24 muestran principalmente la ausencia de bacterias en los recubrimientos (datos no mostrados).

PAR50/HA versus PAR30/HA con 48 bicapas

El aumento de la cantidad de bicapas de 24 a 48 muestra resultados similares: la inhibición del crecimiento de *S. aureus* es total, para recubrimientos basados en PAR50 o PAR30 (Figuras 21 y 22). Estos resultados se confirmaron con observaciones con microscopía confocal: no se observaron bacterias en los recubrimientos de PAR50/HA o los recubrimientos de PAR30/HA.

PAR100/HA y PAR150/HA versus PAR30/HA con 24 bicapas

Los recubrimientos de PAR100/HA construidos con 24 bicapas muestran una actividad antimicrobiana total (Figura 23). Por otro lado, los recubrimientos de PAR150/HA no inhibieron las bacterias, el recubrimiento no es efectivo en absoluto. Las observaciones de microscopía confocal confirman estos resultados, no se observaron bacterias en los recubrimientos de PAR100/HA y PAR30/HA, pero se pudieron visualizar muchas bacterias en los recubrimientos de PAR150/HA.

PAR10/HA versus PAR30/HA con 24 bicapas

Los recubrimientos de PAR10/HA con 24 bicapas inhiben totalmente las bacterias en el sobrenadante (Figura 24). Como controles, los recubrimientos de PAR50/HA y PAR30/HA confirman su actividad antimicrobiana como se describió anteriormente. Se podrían obtener resultados similares a partir de la observación de superficies con microscopía confocal.

PAR70/HA versus PAR30/HA con 24 bicapas

Las bacterias en el sobrenadante donde se coloca un recubrimiento de PAR70/HA son inhibidas totalmente (Figura 25). Esto se confirmó por experimentos con microscopía confocal.

2.3.2 Actividad antimicrobiana a largo plazo de los recubrimientos de PAR/HA: PAR10, PAR30, PAR50, PAR100 y POR30 después de 24/48 o 72 horas de incubación

PAR30/HA versus POR30/HA con 24 bicapas después de 24/48 o 72 horas de incubación

No se registró ninguna bacteria después de 24, 48 o 72 horas en el sobrenadante cuando se usaron los recubrimientos de $(PAR30/HA)_{24}$ o $(POR30/HA)_{24}$ (Figura 26 a 28). Se pueden obtener conclusiones similares cuando las superficies se visualizan con un microscopio confocal.

PAR10/HA, PAR50/HA y PAR100/HA con 24 bicapas después de 24/48 o 72 horas de incubación

Se realizaron experimentos similares con recubrimientos de PAR10/HA, PAR50/HA y PAR100/HA. Después de 24 horas, no se midieron bacterias (Figura 29) en el sobrenadante para ambos recubrimientos. Los recubrimientos de PAR50/HA o PAR100/HA a las 48 horas, los recubrimientos de PAR10/HA no es más efectivo, el crecimiento de *S. aureus* está a un nivel comparable al de superficies sin recubrimientos (Figura 30). Se obtienen resultados similares a las 72 horas cuando las bacterias están vivas con un recubrimiento de PAR10/HA pero muertas con los recubrimientos de PAR50/HA o PAR100/HA (Figura 31). Todos estos resultados se confirmaron con observaciones de microscopio confocal.

2.3.3 Almacenamiento y esterilización de recubrimientos de PAR/HA

Almacenamiento de recubrimientos de PAR/HA

Para comprobar si los procedimientos de secado y almacenamiento de los recubrimientos de PAR/HA permiten mantener o no la actividad antimicrobiana, se probó un recubrimiento de $(PAR30/HA)_{24}$ después de secarlo (enjuague con agua pura y secado a temperatura ambiente) y almacenarlo a 4 °C durante 1 o 7 días (Figuras 32 y 33). No se observó ningún cambio en la actividad antimicrobiana después de estos dos procesos, absolutamente ninguna bacteria pudo crecer en el sobrenadante de los pocillos que contenían los recubrimientos. Esto indica que las películas probablemente sean estables después de un procedimiento de secado y el almacenamiento durante varios días no modificó sus propiedades.

Esterilización de los recubrimientos de PAR/HA

La actividad de los recubrimientos de $(PAR30/HA)_{24}$ se ha probado después de un procedimiento de secado y una esterilización en autoclave siguiendo los ciclos regulares utilizados para la esterilización de dispositivos médicos (30 minutos con ciclos a 121 °C) (Figura 34). Este protocolo de esterilización no modificó la actividad antimicrobiana del recubrimiento; no se midió ningún cambio en la actividad bactericida total.

2.4 Conclusiones

Finalmente, se pueden extraer varias conclusiones de estos estudios:

- Los recubrimientos de $(PAR/HA)_{24}$ construidos con PAR10, PAR30, PAR50, PAR70, PAR100 muestran una actividad antimicrobiana total contra *S. aureus* después de 24 horas de inoculación. Sin embargo, en nuestros estudios preliminares anteriores, PAR10 y PAR100 no siempre estaban activos con 24 horas. Probablemente esto

se deba a que PAR10 y PAR100 corresponden a longitudes de cadena en el límite de valores que son efectivos. Por el contrario, PAR30 y PAR50 siempre muestran una actividad antimicrobiana total en nuestros experimentos (se han realizado al menos más de 10 experimentos individuales para ambos). Los recubrimientos de $(PAR150/HA)_{24}$ nunca muestran alguna actividad antimicrobiana después de 24 horas de incubación de *S. aureus.*

- Los recubrimientos de $(PAR/HA)_{24}$ construidos con PAR30, PAR50, PAR100 y POR30 después de 24/48 o 72 horas de incubación muestran una inhibición total de las bacterias lo que demuestra su eficacia durante 3 días y tres contaminaciones sucesivas. Por el contrario, PAR10 deja de ser activo después de la tercera inoculación (72 horas).

- Los recubrimientos de $(PAR/HA)_{24}$ se pueden almacenar a 4 °C durante varios días después del secado sin que se pierda su actividad. Además, la aplicación del protocolo de esterilización estándar utilizado para los dispositivos médicos puede aplicarse a los recubrimientos $(PAR/HA)_{24}$, se mantendrán las propiedades antimicrobianas de la actividad del recubrimiento.

Figuras

Figura 1: Gráfico que demuestra la fabricación de un recubrimiento multicapa (PAR/HA) sobre un cristal recubierto de SiO_2 seguido de QCM. Se utilizan varios pesos moleculares de PAR (10, 30, 100 o 200 residuos correspondientes a la notación PAR10, PAR30, PAR100 o PAR200 respectivamente) en asociación con HA. Evolución de la frecuencia normalizada -Δfv/v (para v = 3) en función de la cantidad de capas adsorbidas. Se observó un crecimiento exponencial de la frecuencia normalizada con la cantidad de etapas de deposición para la fabricación de los recubrimientos con PAR30, PAR100 o PAR200. Para las cadenas de PAR más grandes se registró el crecimiento más importante. En el caso de PAR10, el incremento en la frecuencia normalizada con el número de deposiciones es el más débil, sin embargo ya se observó un crecimiento exponencial.

Figura 2: Imagen que muestra las imágenes de microscopía confocal de las secciones de recubrimientos de PAR/HA (x,z). Observación por microscopía confocal de las secciones de recubrimientos de PAR/HA (x, z) para las fabricaciones de los recubrimientos de PAR/HA de un recubrimiento multicapa (PAR/HA) sobre un cristal revestido de SiO_2 seguido de QCM. Se comparó la fabricación de recubrimientos multicapa (PAR/HA) con PAR de varios pesos moleculares, es decir, PAR10 PAR30, PAR100 o PAR200. Estas imágenes indican que los recubrimientos obtenidos se depositaron de manera homogénea sobre la superficie en todas las condiciones (para PAR con 10 a 200 residuos).

Figura 3: Gráfico que demuestra la inhibición del crecimiento de *S. aureus* mediante el uso de los recubrimientos de PAR de la invención. Se muestra el crecimiento normalizado de *S. aureus* (%) obtenido en un sobrenadante después de 24 horas en contacto con recubrimientos multicapa de $(PAR/HA)_{24}$ compuestos de poli-L-arginina con varias cantidades de residuos. Cada valor corresponde al valor medio de 3 experimentos y las barras de error corresponden a las desviaciones estándar. El crecimiento de *S. aureus* es de aproximadamente 80 % para $(PAR10/HA)_{24}$, 75 % para $(PAR100/HA)_{24}$, aproximadamente 90 % para $(PAR200/HA)_{24}$ y menos del 5 % para $(PAR30/HA)_{24}$ lo que muestra así una fuerte inhibición del crecimiento de más del 95 % para $(PAR30/HA)_{24}$

Figura 4: Gráfico que demuestra la inhibición del crecimiento de *S. aureus* mediante el uso de los recubrimientos de PLL de la invención. Se muestra el crecimiento normalizado de *S. aureus* (%) obtenido en un sobrenadante después de 24 horas (J + 1), después de 2 días y después de 3 días en contacto con recubrimientos multicapa de $(PLL30/HA)_{24}$. El recubrimiento se puso en contacto con una nueva suspensión de S. *aureus* después de cada 24 horas. Cada valor corresponde al valor medio de 3 experimentos y las barras de error corresponden a las desviaciones estándar. El crecimiento de S. *aureus* es inferior al 5 % para $(PLL30/HA)_{24}$ después de 1 y 2 días, lo que muestra así una fuerte inhibición del crecimiento de más del 95 % para $(PLL30/HA)_{24}$ en las primeras 48 horas.

Figura 5: Gráfico que demuestra la inhibición del crecimiento de *M. luteus* mediante el uso del recubrimiento $(PAR30/HA)_{24}$. Se muestra el crecimiento normalizado de M. luteus (%) observado en un sobrenadante después de 20 horas en contacto con recubrimientos multicapa de $(PAR30/HA)_{24}$. Cada valor corresponde al valor medio de 3 experimentos y las barras de error corresponden a las desviaciones estándar. El crecimiento de *M. luteus* es inferior al 2 % para $(PAR30/HA)_{24}$, lo que muestra una fuerte inhibición del crecimiento de más del 98 % para $(PAR30/HA)_{24}$.

Figura 6: Gráfico que demuestra la inhibición del crecimiento de *S. aureus* mediante el uso de recubrimientos de PAR30 o PLL30 en ausencia del polianión HA. Se muestra el crecimiento normalizado de S. aureus (%) obtenido en un sobrenadante después de 24 horas en contacto con una capa policatiónica de PLL30 o PAR30 en ausencia de una capa de polianión HA. El recubrimiento se puso en contacto con una nueva suspensión de *S. aureus* durante 24 horas. Cada valor corresponde al valor medio de 3 experimentos y las barras de error corresponden a las desviaciones estándar. El crecimiento de S. *aureus* es aproximadamente 65 % para PLL30 y aproximadamente 100 % para PAR30, lo que muestra así solo una ligera inhibición del crecimiento del 35 % para PLL30 y ninguna inhibición del crecimiento para PAR30.

Figura 7: Gráfico que demuestra la inhibición del crecimiento de *S. aureus* mediante el uso de $(PAR200/HA)_{24}$-PAR30 de la invención. Se añadió una capa final PAR30 sobre el recubrimiento multicapa de $(PAR200/HA)_{24}$ para producir así el recubrimiento multicapa de $PAR200/HA)_{24}$ - PAR30. Se muestra el crecimiento normalizado de *S. aureus* (%) obtenido en un sobrenadante después de 24 horas en contacto con los recubrimientos multicapa de $(PAR200/HA)_{24}$-PAR30. Cada valor corresponde al valor medio de 3 experimentos y las barras de error corresponden a las desviaciones estándar. El crecimiento de *S. aureus* es inferior al 1 % para $(PAR200/HA)_{24}$ - PAR30, lo que muestra una fuerte inhibición del crecimiento de más del 99 % para $(PAR200/HA)_{24}$ -PAR30

Figura 8: Gráfico que demuestra la inhibición del crecimiento de *M. Luteus* mediante el uso de $(PAR200/HA)_{24}$ - PAR30 de la invención. Se añadió una capa final PAR30 sobre el recubrimiento multicapa de $(PAR200/HA)_{24}$ para producir así el recubrimiento multicapa de $(PAR_{200}/HA)_{24}$ - PAR_{30}. Se muestra el crecimiento normalizado de *M. Luteus* (%) observado en un sobrenadante después de 24 horas en contacto con recubrimientos multicapa de $PAR200/HA)_{24}$ - PAR30. Cada valor corresponde al valor medio de 3 experimentos y las barras de error corresponden a las desviaciones estándar. El crecimiento de *M. luteus* es inferior al 1 % para $(PAR200/HA)_{24}$ - PAR30, lo que muestra así una fuerte inhibición del crecimiento de más del 99 % para $(PAR200/HA)_{24}$ -PAR30.

Figura 9: Gráfico que demuestra la inhibición del crecimiento de *S. aureus* mediante el uso de los recubrimientos de PLO de la invención. Se muestra el crecimiento normalizado de *S. aureus* (%) obtenido en un sobrenadante después de 24 horas en contacto con recubrimientos multicapa de $(PLO/HA)_{24}$ compuestos de poli-L-ornitina con diferente cantidad de residuos. $(PLO30/HA)_{24}$ y $(PLO100/HA)_{24}$. Cada valor corresponde al valor medio de 3 experimentos y las barras de error corresponden a las desviaciones estándar. El crecimiento de *S. aureus* es aproximadamente del 80 % para $(PLO250/HA)_{24}$, menos del 5 % para $(PLO100/HA)_{24}$ y menos del 3 % para $(PLO30/HA)_{24,}$ lo que muestra una fuerte inhibición del crecimiento de más del 95 % para $(PLO100/HA)_{24}$ y $(PLO30/HA)_{24}$.

Figura 10: Gráfico que demuestra la inhibición del crecimiento de *S. aureus* mediante el uso de $(PLL_{30}/HA)_{24}$ o $(PLL_{30}/HA)_{24}$ reticulado. $(PLL30/HA)_{24}$ se reticuló mediante el uso de EDC/NHS con EDC 0,5 M y NHS 0,1 M durante 15 h a 4 ºC. Los grupos carboxilo que no habían reaccionado se neutralizaron mediante el uso de etanolamina. El crecimiento normalizado de *S. aureus* (%) se midió en un sobrenadante después de 24 horas en contacto con recubrimientos multicapa de $(PLL_{30}/HA)_{24}$ o $(PLL_{30}/HA)_{24}$ reticulado. El crecimiento de *S. aureus* es de aproximadamente un 65 % para $(PLL_{30}/HA)_{24}$ reticulado y menos del 18 % para $(PLL30/HA)_{24,}$ lo que demuestra que la reticulación reduce significativamente la actividad biocida del recubrimiento.

Figura 11: Gráfico que demuestra la inhibición del crecimiento de *S. aureus* mediante el uso de $(PAR_{30}/HA)_{24}$ o $(PAR_{30}/HA)_{24}$ reticulado. $(PAR30/HA)_{24}$ se reticuló mediante el uso de EDC/NHS con EDC 0,5 M y NHS 0,1 M durante 15 horas a 4 ºC. Los grupos carboxilo que no habían reaccionado se neutralizaron mediante el uso de etanolamina. El crecimiento normalizado de *S. aureus* (%) se midió en un sobrenadante después de 24 horas en contacto con los recubrimientos multicapa de $(PAR_{30}/HA)_{24}$ o $(PAR_{30}/HA)_{24}$ reticulado. El crecimiento de *S. aureus* es de aproximadamente 65 % para $(PAR30/HA)_{24}$ reticulado y menos del 5 % para $(PLL30/HA)_{24,}$ lo que demuestra que la reticulación reduce la actividad biocida del recubrimiento.

Figura 12: Gráfico con la concentración inhibitoria mínima (MIC_{100}) de PAR soluble con 10, 30, 100 o 200 residuos de arginina. Se midió en solución la concentración mínima inhibidora (MIC_{100}) que conduce a una inhibición del 100 % de *S. aureus.* Se analizó PAR con 10, 30, 100 o 200 residuos de arginina. Para las concentraciones de hasta 0,04 $mg.ml^{-1}$, todas las PAR (PAR_{10}, PAR_{30}, PAR_{100} o PAR_{200}) inhibieron totalmente el crecimiento de *S. aureus*

Figura 13: Gráfico que muestra los resultados de los experimentos de liberación. Los experimentos de liberación se realizaron como se describe en la sección anterior "Experimentos de liberación" en la presente. El recubrimiento multicapa de $(PAR30FITC/HA)_{24}$ con PAR-FITC se pone en contacto después con medio MHB o una solución de S.aureus/MHB (A_{620} = 0,001). La liberación de PAR-FITC se registró a lo largo del tiempo. Se estudiaron tres muestras por cada condición.

Figura 14: Gráfico que demuestra la proporción de PAR móvil (%) en el recubrimiento de $(PAR/HA)_{24}$ de acuerdo con el MW. El coeficiente de difusión, D, y la proporción de moléculas móviles, p, se midieron para las multicapas $(PAR/HA)_{24}$ que contienen PAR-FITC mediante la realización de experimentos de fotoblanqueo (FRAP, Recuperación de fluorescencia después del fotoblanqueo) como se describió anteriormente en la sección " experimentos de recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueo (FRAP)".

Figura 15: Gráfico que demuestra que la concentración de PAR30 que difunde desde el recubrimiento hacia una solución es insuficiente para inhibir eficazmente el crecimiento de *S. aureus*. Crecimiento normalizado de *S. aureus* después de 24 horas en contacto con un medio incubado con una película multicapa $(PAR30/HA)_{24}$. Medio A) con 300 µl de solución de S. aureus A620 = 0,001 y B) 300 µl de MHB solamente. No se observó inhibición del crecimiento de las bacterias.

Figura 16: Gráfico que demuestra la inhibición del crecimiento de diferentes bacterias mediante el uso de $(PAR_{30}/HA)_{24}$ Crecimiento normalizado de las bacterias después de 24 horas en contacto con vidrio cubierto con el recubrimiento $(PAR30/HA)_{24}$. El crecimiento de las bacterias se inhibe en más del 90 % para *S. aureus, S. aureus* resistente a metilicina, *M. Luteus, E. Coli* y *P. aeruginosa.*

Figura 17: Gráfico que demuestra la inhibición del crecimiento de *S. aureus* mediante el uso de los recubrimientos de PLL de la invención. Se muestra el crecimiento normalizado de *S. aureus* (%) obtenido en un sobrenadante después de 24 horas en contacto con recubrimientos multicapa de $(PLL/HA)_{24}$ compuestos de poli-L-lisina con diferente cantidad de residuos es decir, $(PLL10/HA)_{24}$, $(PLL30/HA)_{24}$, $(PLL100/HA)_{24}$ y $(PLO250/HA)_{24}$. Cada valor corresponde al valor medio de 3 experimentos y las barras de error corresponden a las desviaciones estándar. El crecimiento de *S. aureus* es menos del 3 % para la combinación de vidrio y antibióticos y menos del 6 % para $(PLL30/HA)_{24}$ mientras que el crecimiento bacteriano es de aproximadamente 75 % para $(PLO250/HA)_{24}$; aproximadamente el 85 % para $(PLL100/HA)_{24}$ y aproximadamente el 90 % para $(PLL10/HA)_{24}$.

Figura 18: Gráfico que demuestra la inhibición del crecimiento de *S. aureus* a lo largo del tiempo mediante el uso de $(PAR30/HA)_{24}$. Se muestra el crecimiento normalizado de *S. aureus* (%) obtenido en un sobrenadante después de 1 día, 2 días y tres días en contacto con el recubrimiento multicapa $(PAR30/HA)_{24}$. El recubrimiento se puso en contacto con una nueva suspensión de *S. aureus* después de cada 24 horas. Cada valor corresponde al valor medio de 3 experimentos y las barras de error corresponden a las desviaciones estándar. El crecimiento de *S. aureus* es inferior al 5 % para $(PAR30/HA)_{24}$ después de 1 y 2 días, lo que muestra así una fuerte inhibición del crecimiento de más del 95 % para $(PAR30/HA)_{24}$ en las primeras 48 horas. Después de los 3 días, la actividad inhibidora se reduce.

Figuras 19 y 20: Gráfico que demuestra la inhibición del crecimiento de *S. aureus* mediante el uso de los recubrimientos de PAR de la invención. Evaluación de las actividades antimicrobianas en el sobrenadante de recubrimientos $(PAR50/HA)_{24}$ y comparación con $(PAR30/HA)_{24}$ y los controles (vidrio sin recubrimientos indicado como "Vidrio" o "vidrio + antibióticos"). Cada experimento se realiza con 3 portaobjetos de vidrio y a) y b) corresponden a 2 experimentos independientes similares. La condición "Medio" significa pocillos sin bacterias, solo se mide la DO del medio. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar.

Figuras 20 y 21: Gráfico que demuestra la inhibición del crecimiento de *S. aureus* mediante el uso de los recubrimientos de PAR de la invención. Evaluación de las actividades antimicrobianas en el sobrenadante de recubrimientos $(PAR50/HA)_{48}$ y comparación con $(PAR30/HA)_{48}$ y los controles (vidrio sin recubrimientos indicado como "Vidrio" o "vidrio + antibióticos"). Cada experimento se realiza con 3 portaobjetos de vidrio y a) y b) corresponden a 2 experimentos independientes similares. La condición "Medio" significa pocillos sin bacterias, solo se mide la DO del medio. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar.

Figura 23: Gráfico que demuestra la inhibición del crecimiento de *S. aureus* mediante el uso de los recubrimientos de PAR de la invención. Evaluación de las actividades antimicrobianas en el sobrenadante de recubrimientos $(PAR100/HA)_{24}$ $(PAR150/HA)_{24}$ y comparación con $(PAR30/HA)_{24}$ y los controles (vidrio sin recubrimientos indicado como "Vidrio" o "vidrio + antibióticos"). Cada experimento se realiza con 3 portaobjetos de vidrio. La condición "Medio" significa pocillos sin bacterias, solo se mide la DO del medio. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar.

Figura 24: Gráfico que demuestra la inhibición del crecimiento de *S. aureus* mediante el uso de los recubrimientos de PAR de la invención. Evaluación de las actividades antimicrobianas en el sobrenadante de recubrimientos $(PAR10/HA)_{24}$ y comparación con $(PAR50/HA)_{24}$ y $(PAR30/HA)_{24}$ y los controles (vidrio sin recubrimientos señalado como "Vidrio" o "vidrio + antibióticos"). Cada experimento se realiza con 3 portaobjetos de vidrio. La condición "Medio" significa pocillos sin bacterias, solo se mide la DO del medio. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar.

Figura 25: Gráfico que demuestra la inhibición del crecimiento de *S. aureus* mediante el uso de los recubrimientos de PAR de la invención. Evaluación de las actividades antimicrobianas en el sobrenadante de recubrimientos $(PAR70/HA)_{24}$ y comparación con los controles (vidrio sin recubrimientos indicado como "Vidrio" o "vidrio + antibióticos"). Cada experimento se realiza con 3 portaobjetos de vidrio. La condición "Medio" significa pocillos sin bacterias, solo se mide la DO del medio. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar.

Figuras 26, 27 y 28: Gráfico que demuestra la inhibición del crecimiento de *S. aureus* mediante el uso de los recubrimientos de PAR de la invención a lo largo del tiempo. Evaluación de las actividades antimicrobianas en el sobrenadante de recubrimientos $(PAR30/HA)_{24}$ $(POR30/HA)_{24}$ y comparación con los controles (vidrio sin recubrimientos indicado como "Vidrio" o "vidrio + antibióticos") después de la incubación de S. aureus durante 24, 48 o 72 horas. En t = 0, 24 horas y 48 horas, se realiza una nueva inoculación con bacterias. Cada experimento se realiza con 3 portaobjetos de vidrio. La condición "Medio" significa pocillos sin bacterias, solo se mide la DO del medio. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar.

Figuras 29, 30 y 31: Gráfico que demuestra la inhibición del crecimiento de *S. aureus* mediante el uso de los recubrimientos de PAR de la invención a lo largo del tiempo. Evaluación de las actividades antimicrobianas en el sobrenadante de recubrimientos $(PAR10/HA)_{24}$, $(PAR50/HA)_{24}$, $(PAR100/HA)_{24}$ y comparación con los controles (vidrio sin recubrimientos indicado como "Vidrio" o "vidrio + antibióticos") después de la incubación de S. aureus durante 24, 48 o 72 horas. En t = 0, 24 horas y 48 horas, se realiza una nueva inoculación con bacterias. Cada experimento se realiza con 3 portaobjetos de vidrio. La condición "Medio" significa pocillos sin bacterias, solo se mide la DO del medio. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar.

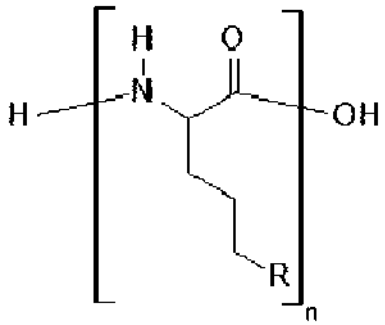
Figuras 32 y 33: Gráfico que demuestra la inhibición del crecimiento de *S. aureus* después de exponer los recubrimientos de PAR de la invención a diferentes condiciones de almacenamiento. Evaluación de las actividades antimicrobianas en el sobrenadante de recubrimientos $(PAR30/HA)_{24}$ previamente secados y almacenados a 4 °C durante 1 día (a) o 7 días y comparación con los controles (vidrio sin recubrimientos indicado como "Vidrio" o "vidrio + antibióticos"). Cada experimento se realiza con 3 portaobjetos de vidrio. La condición "Medio" significa pocillos sin bacterias, solo se mide la DO del medio. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar.

Figura 34: Gráfico que demuestra la inhibición del crecimiento de *S. aureus* después de exponer los recubrimientos de PAR de la invención a diferentes condiciones de almacenamiento. Evaluación de las actividades antimicrobianas en el sobrenadante de recubrimientos $(PAR30/HA)_{24}$ previamente esterilizados en autoclave y comparación con los controles (vidrio sin recubrimientos indicado como "Vidrio" o "vidrio + antibióticos"). Cada experimento se realiza con 3 portaobjetos de vidrio. La condición "Medio" significa pocillos sin bacterias, solo se mide la DO del medio. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar.

REIVINDICACIONES

1. Un recubrimiento polielectrolítico, que comprende:

(a) al menos una capa policatiónica que consiste en al menos un policatión que consiste en n unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1),



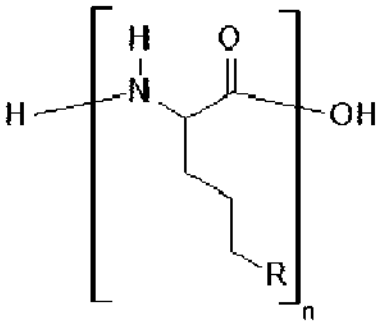
(1)

en la que

- n es un número entero comprendido entre 11 y 100, y
- cada grupo R, idéntico o diferente, se elige entre $-NH_2$, $-CH_2-NH_2$ y $-NH-C(NH)-NH_2$, y

(b) al menos una capa polianiónica que consiste en ácido hialurónico.

2. El recubrimiento polielectrolítico, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la al menos una capa policatiónica consiste en n unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1),



(1)

en la que

- n es un número entero comprendido entre 11 y 100, y
- R se elige entre $-NH_2$, $-CH_2-NH_2$ y $-NH-C(NH)-NH_2$.

3. El recubrimiento polielectrolítico, de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que R de Fórmula (1) es $-NH-C(NH)-NH_2$.

4. El recubrimiento polielectrolítico, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que n es de 15 a 95, preferentemente de 15 a 75.

5. El recubrimiento polielectrolítico, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende de 1 a 500 capas policatiónicas, preferentemente de 1 a 60 capas policatiónicas.

6. El recubrimiento polielectrolítico, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende de 1 a 500 capas polianiónicas, preferentemente de 1 a 60 capas polianiónicas.

7. Un dispositivo que comprende un recubrimiento polielectrolítico, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

8. El dispositivo, de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el recubrimiento polielectrolítico cubre al menos una parte de la superficie de dicho dispositivo.

9. El dispositivo, de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho dispositivo es un dispositivo implantable.

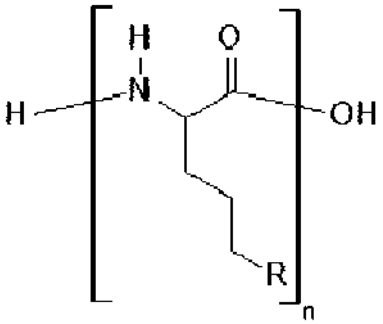
10. El dispositivo implantable, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, en el que el dispositivo implantable se selecciona del grupo que comprende catéteres, derivaciones arteriovenosas, implantes mamarios, monitores cardíacos y de otro tipo, implantes cocleares, desfibriladores, implantes dentales, implantes maxilofaciales, implantes de oído medio, neuroestimuladores, dispositivos ortopédicos, marcapasos y cables, implantes de pene, dispositivos protésicos, articulaciones de reemplazo, implantes de columna, prótesis de voz, corazones artificiales, lentes de contacto, dispositivo de fijación de fracturas, bombas de infusión, dispositivo de presión intracraneal, lentes intraoculares, dispositivos intrauterinos, prótesis de articulaciones, válvulas cardíacas mecánicas, dispositivos ortopédicos, materiales de sutura, endoprótesis urinarias, dispositivo de asistencia vascular, injertos vasculares, derivaciones vasculares y endoprótesis vasculares, y vasos artificiales de tipo permanente o transitorio.

11. Un procedimiento para preparar un dispositivo que comprende un recubrimiento polielectrolítico, comprendiendo el procedimiento:

(a) proporcionar un dispositivo;

(b1) depositar sobre la superficie de dicho dispositivo

(i) al menos una capa policatiónica que consiste en al menos un policatión que consiste en n unidades repetitivas que tienen la Fórmula (1),



(1)

en la que

- n es un número entero comprendido entre 11 y 100, y
- cada grupo R, idéntico o diferente, se elige entre $-NH_2$, $-CH_2-NH_2$ y $-NH-C(NH)-NH_2$, y después

ii) al menos una capa polianiónica que consiste en ácido hialurónico, o

(b2) depositar sobre la superficie de dicho dispositivo ii) y después i) como se definió anteriormente, y opcionalmente repetir la etapa b1) y/o b2).

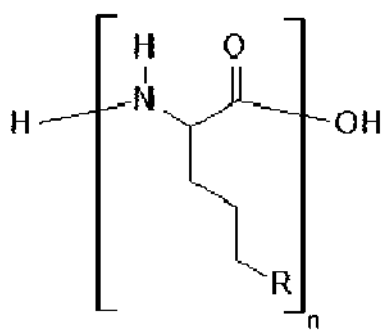
12. El procedimiento para preparar un dispositivo, de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende además al menos una etapa de lavado después de la etapa i) y/o ii) de b1) o b2).

13. El procedimiento para preparar un dispositivo, de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, que comprende además al menos una etapa de secado después de la etapa i) y/o ii) de b1) o b2) y/o la etapa de lavado de la reivindicación 12.

14. Uso de un recubrimiento polielectrolítico, de acuerdo con la reivindicación 1 a 6, para producir el dispositivo como se define en las reivindicaciones 7 a 10.

15. Un kit que comprende

a) al menos un material policatiónico que consiste en n unidades repetitivas de Fórmula (1),



(1)

en la que

- n es un número entero comprendido entre 11 y 100, y
- cada grupo R, idéntico o diferente, se elige entre $-NH_2$, $-CH_2-NH_2$ y $-NH-C(NH)-NH_2$, y

b) al menos un material polianiónico que consiste en ácido hialurónico.

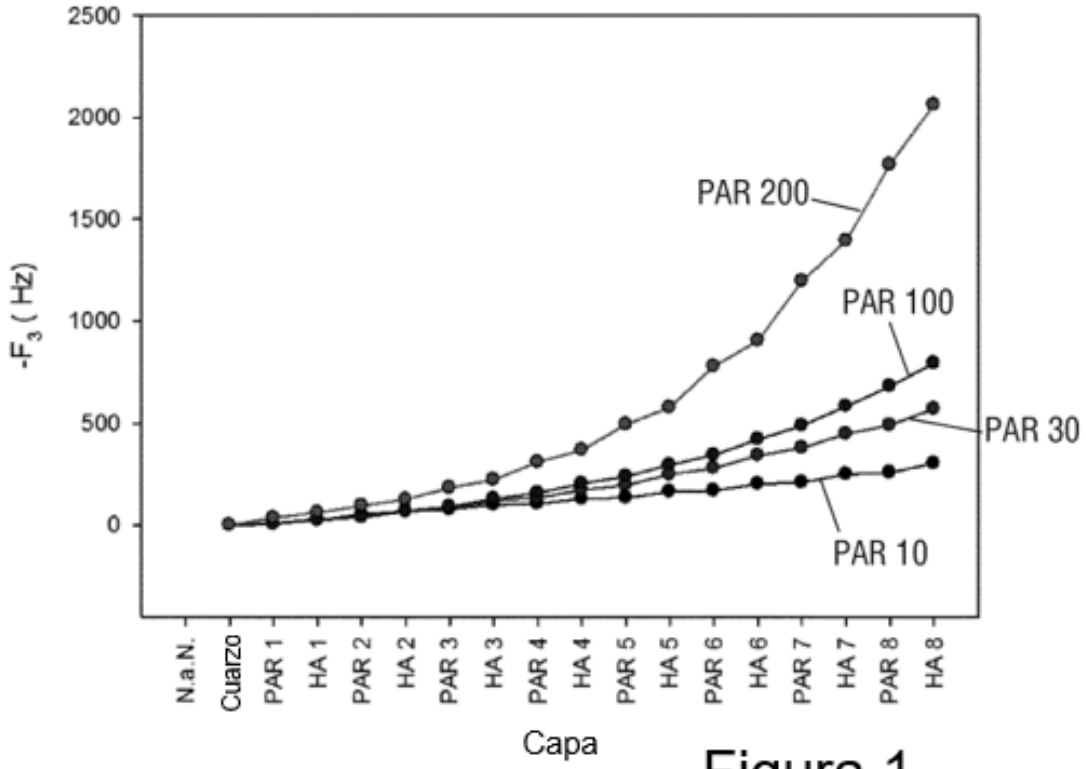


Figura 1

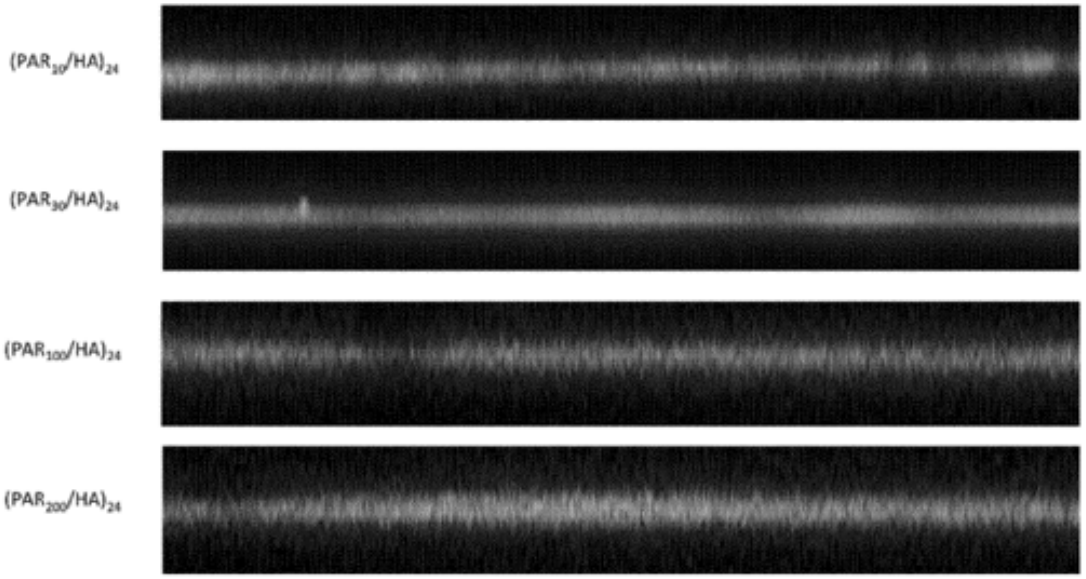


Figura 2

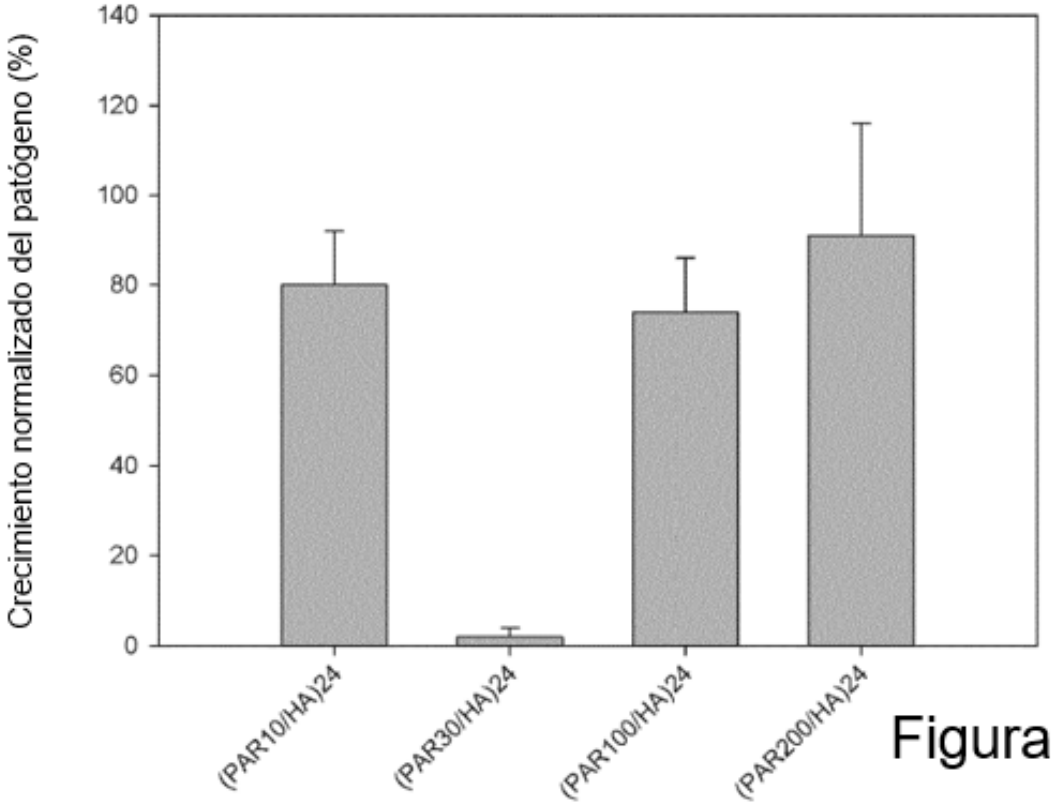


Figura 3

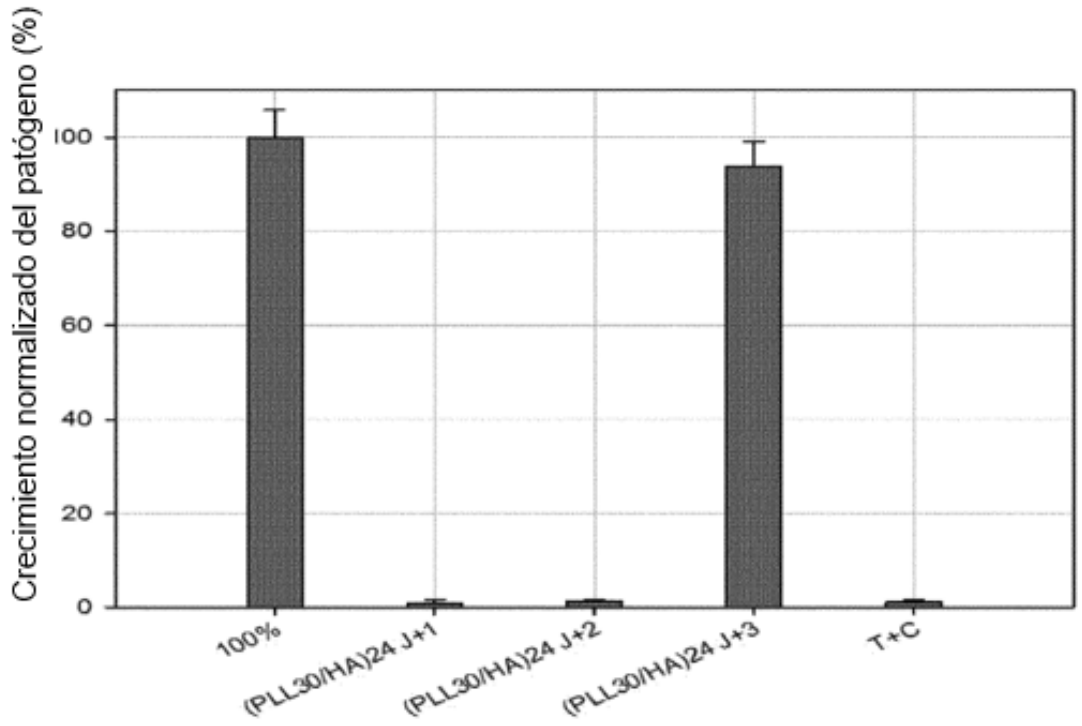


Figura 4

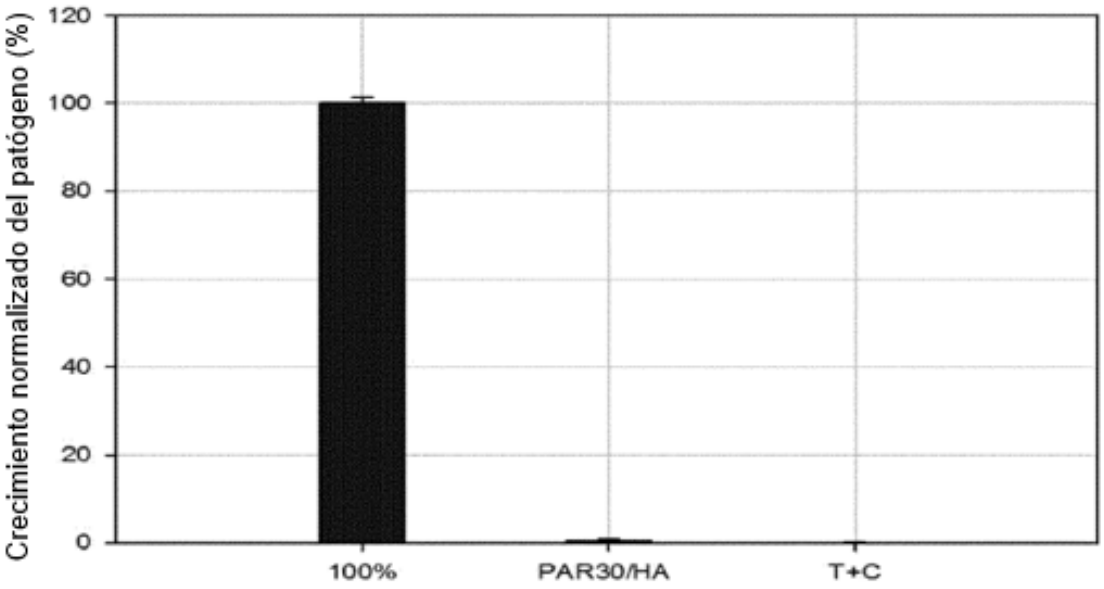


Figura 5

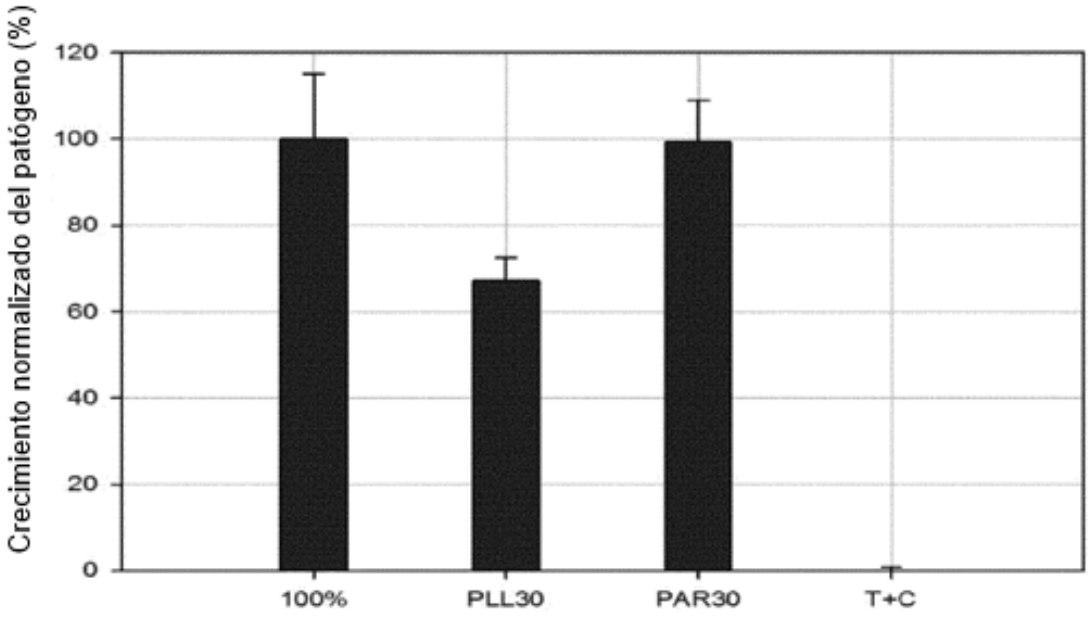


Figura 6

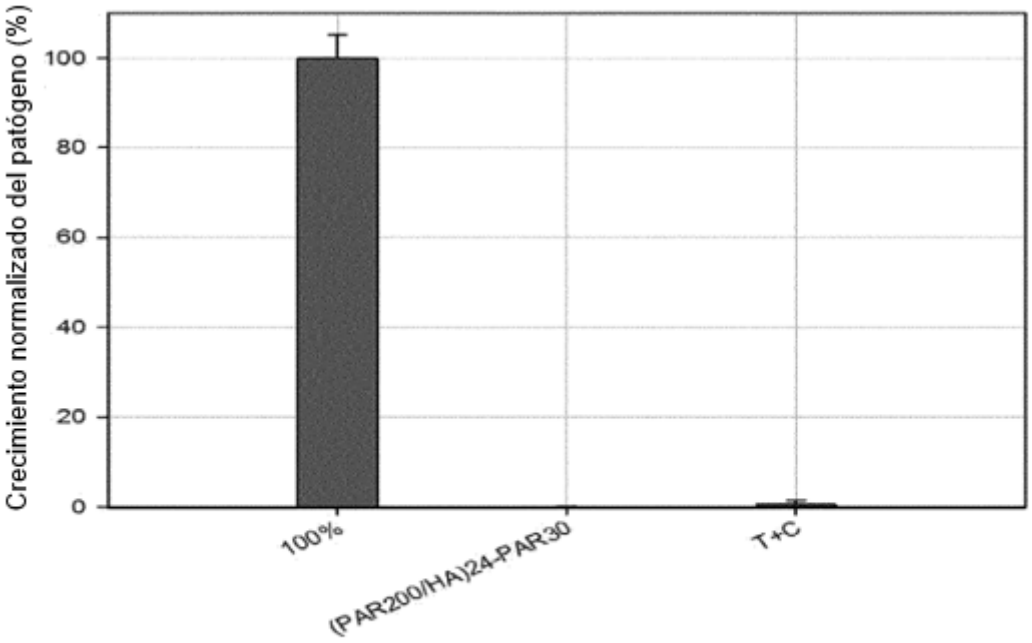


Figura 7

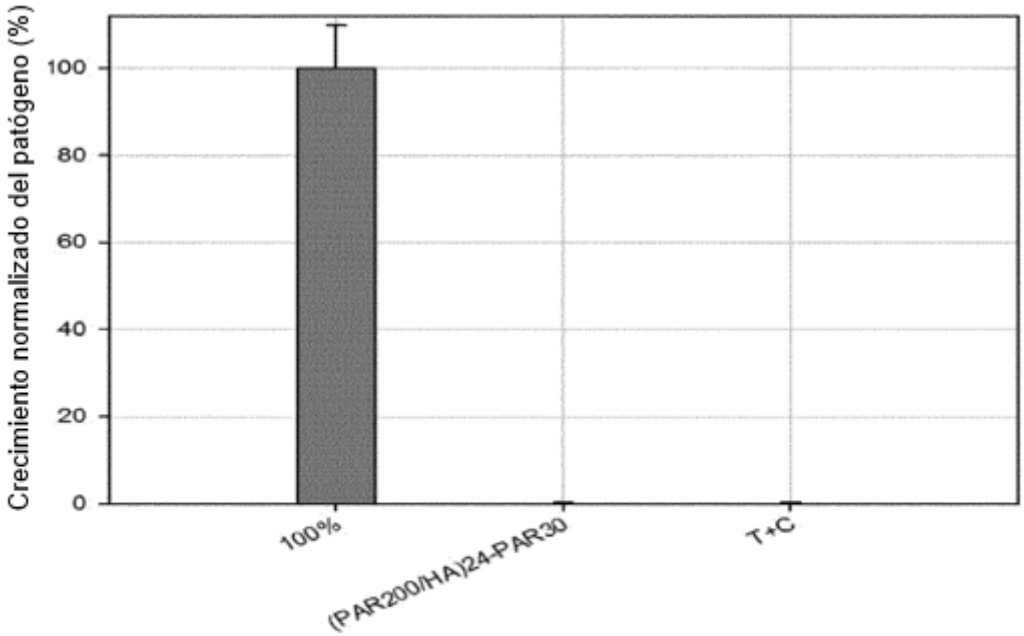


Figura 8

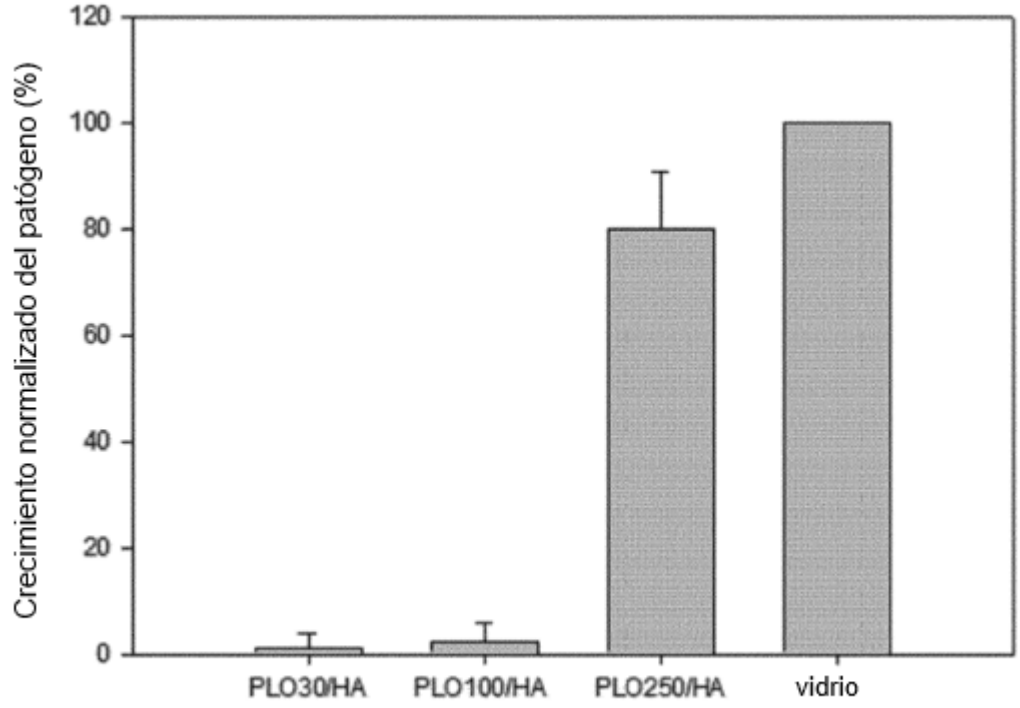


Figura 9

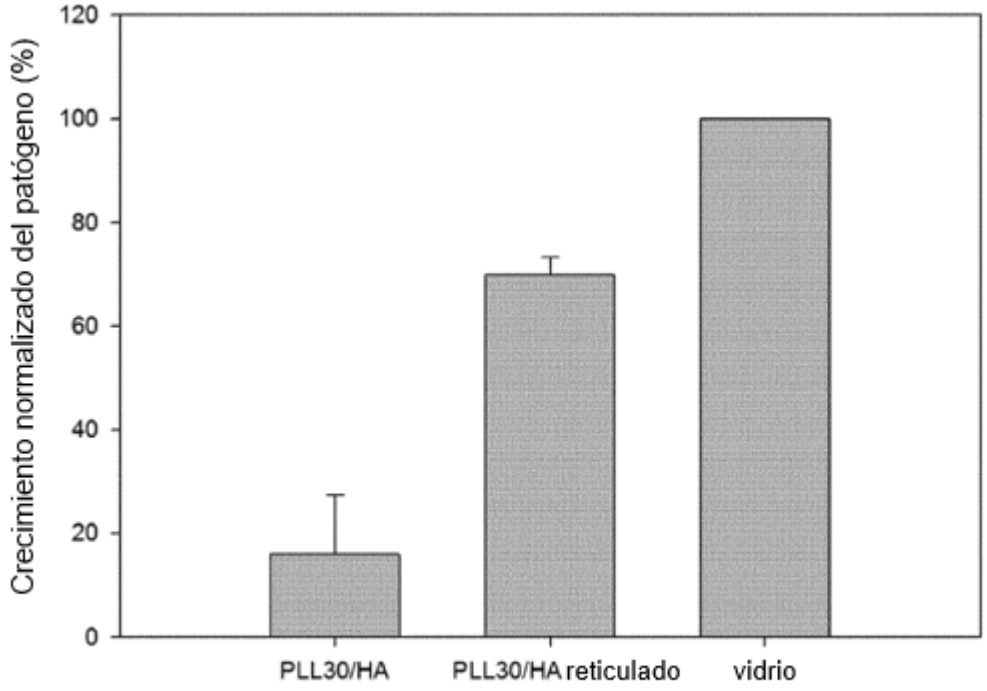


Figura 10

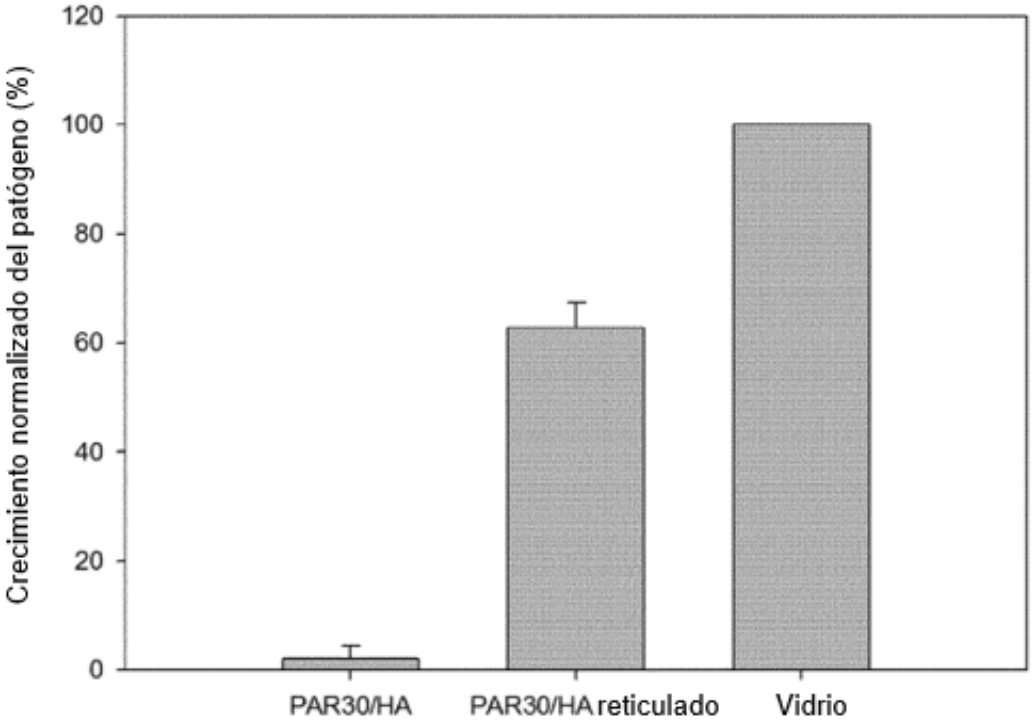


Figura 11

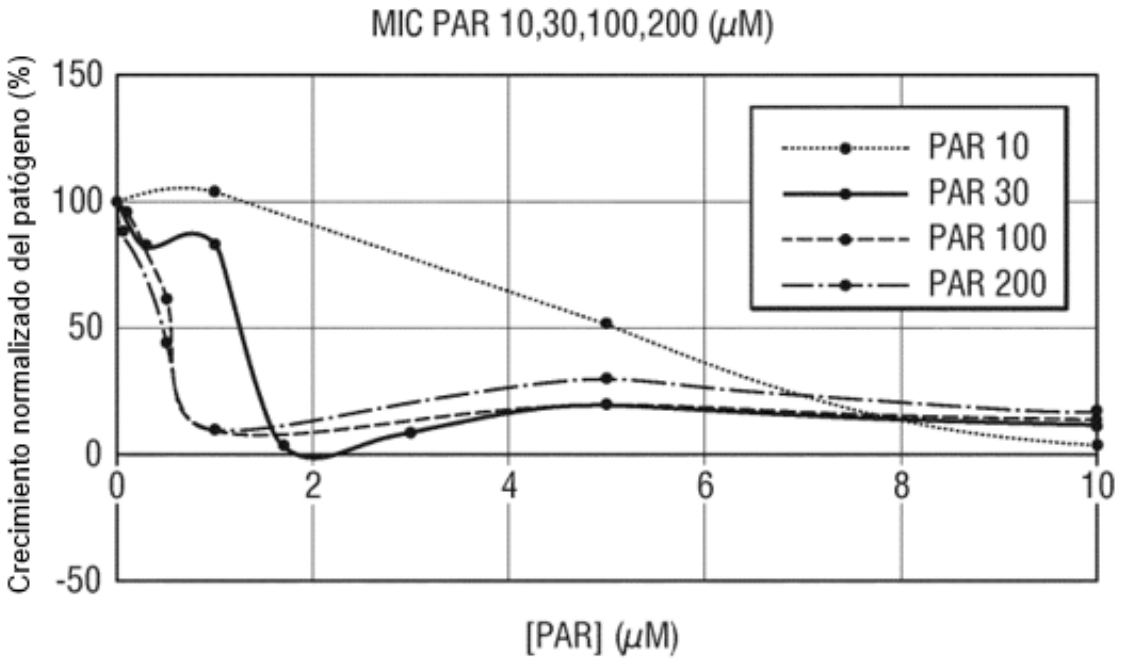


Figura 12

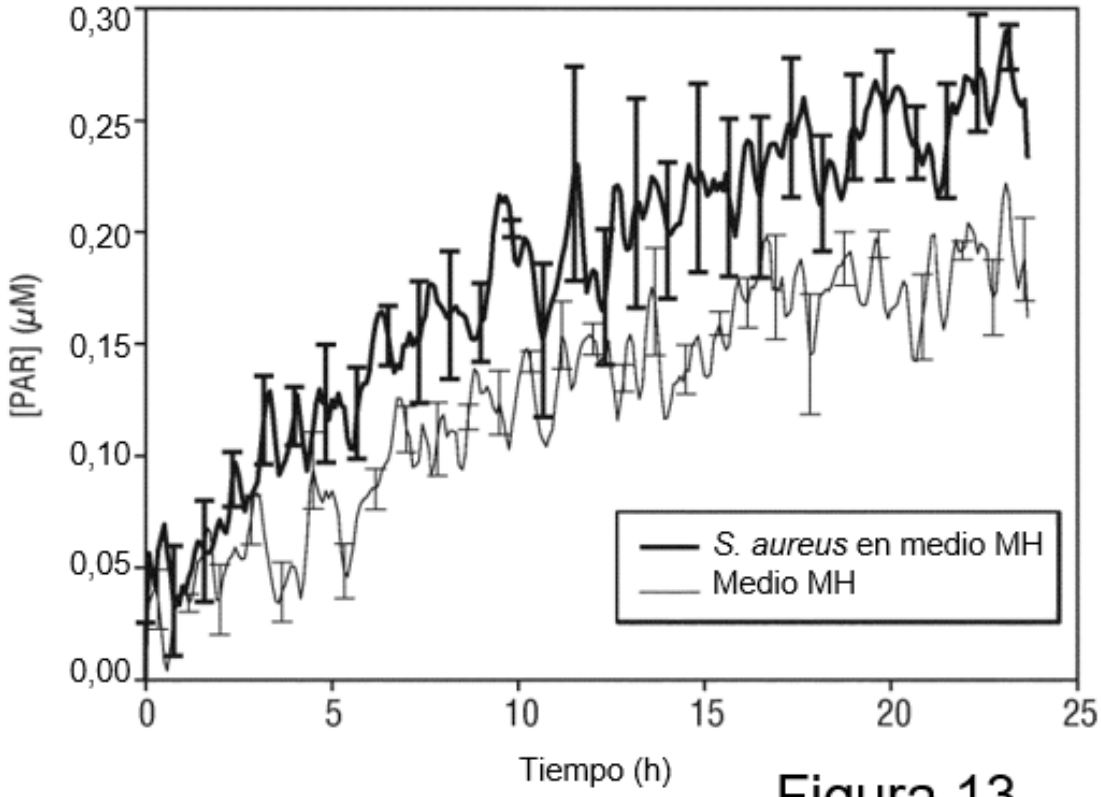


Figura 13

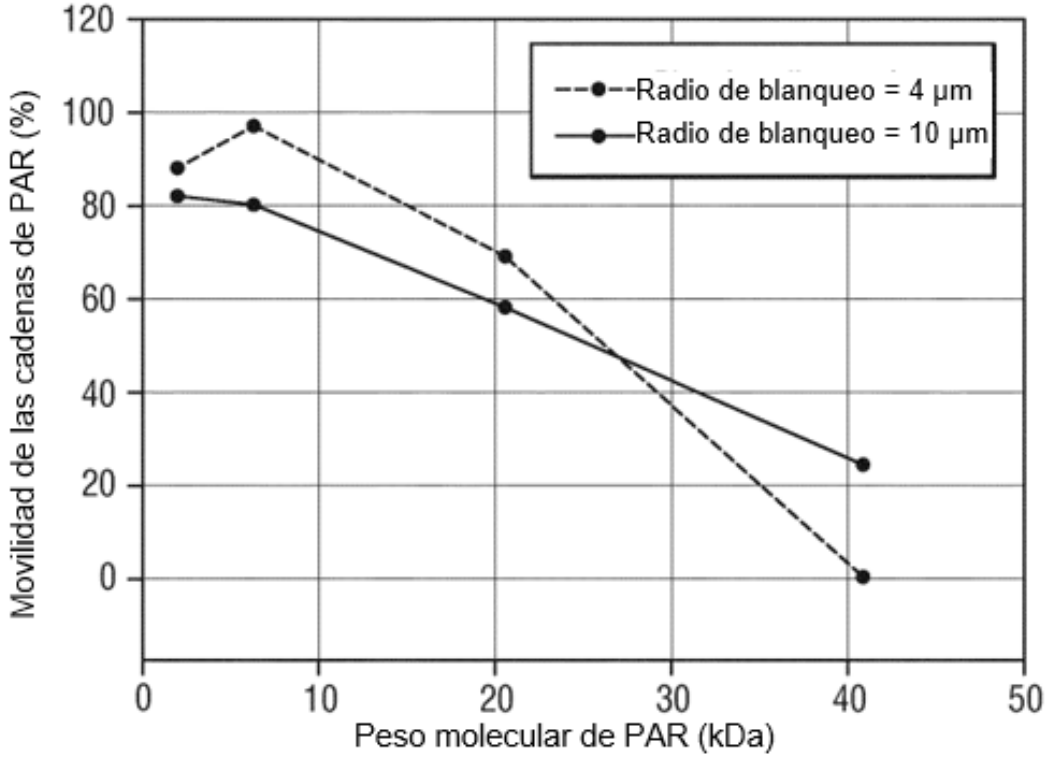


Figura 14

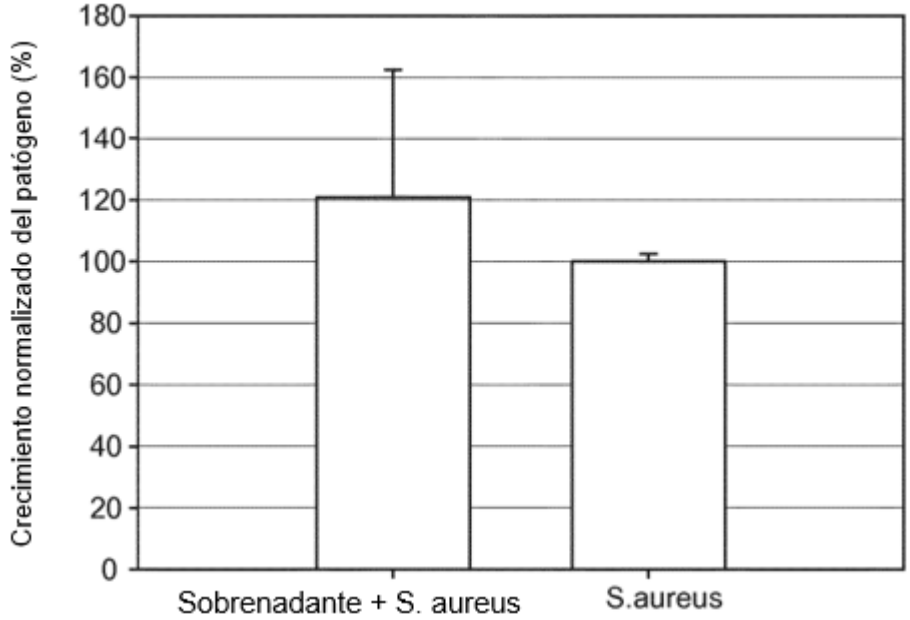


Figura 15

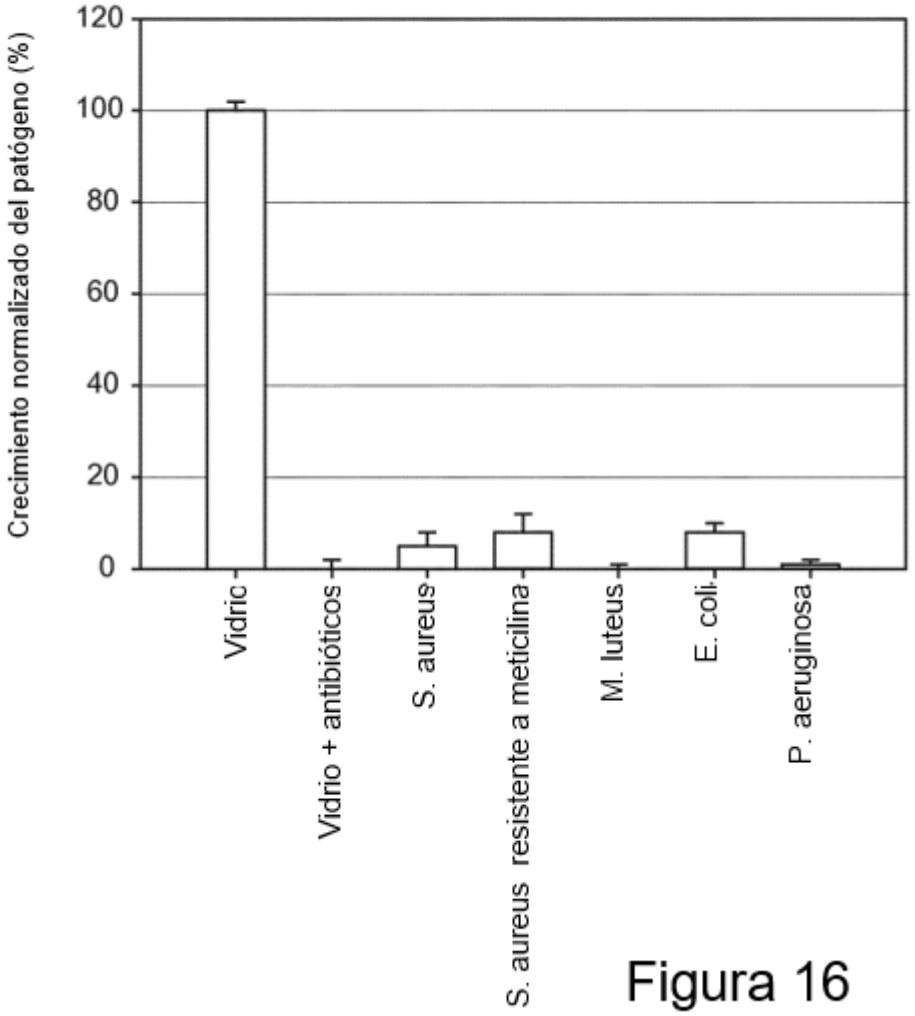


Figura 16

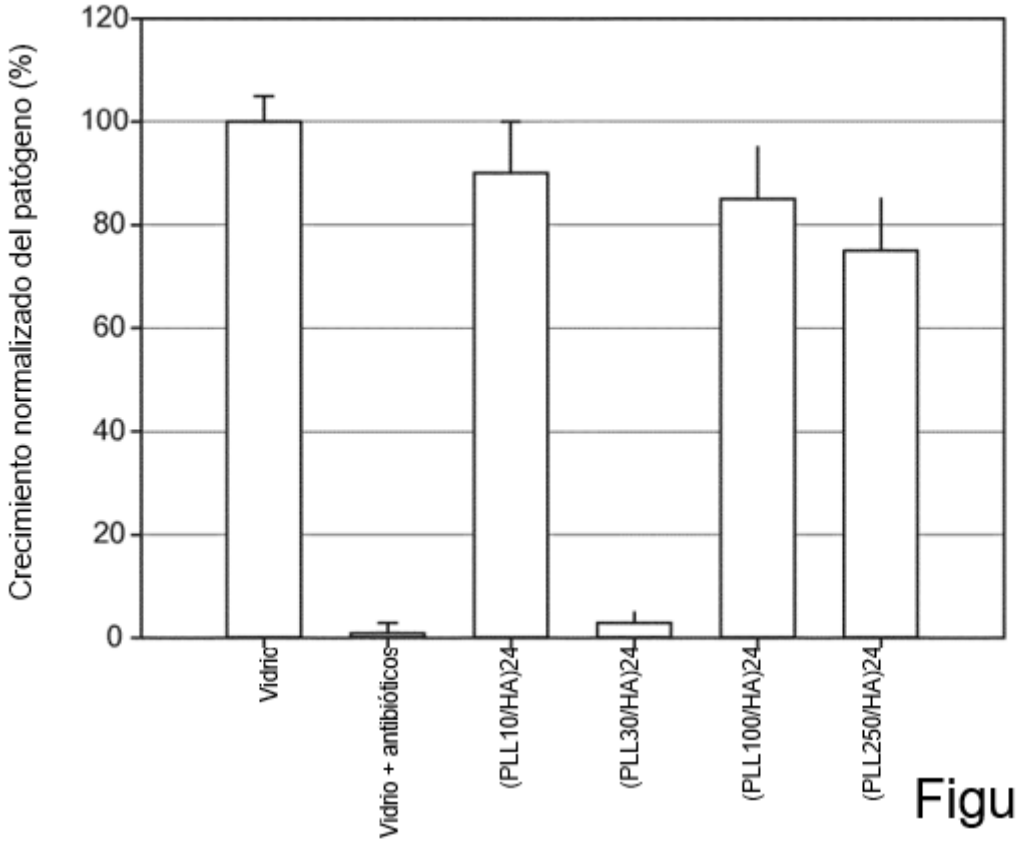


Figura 17

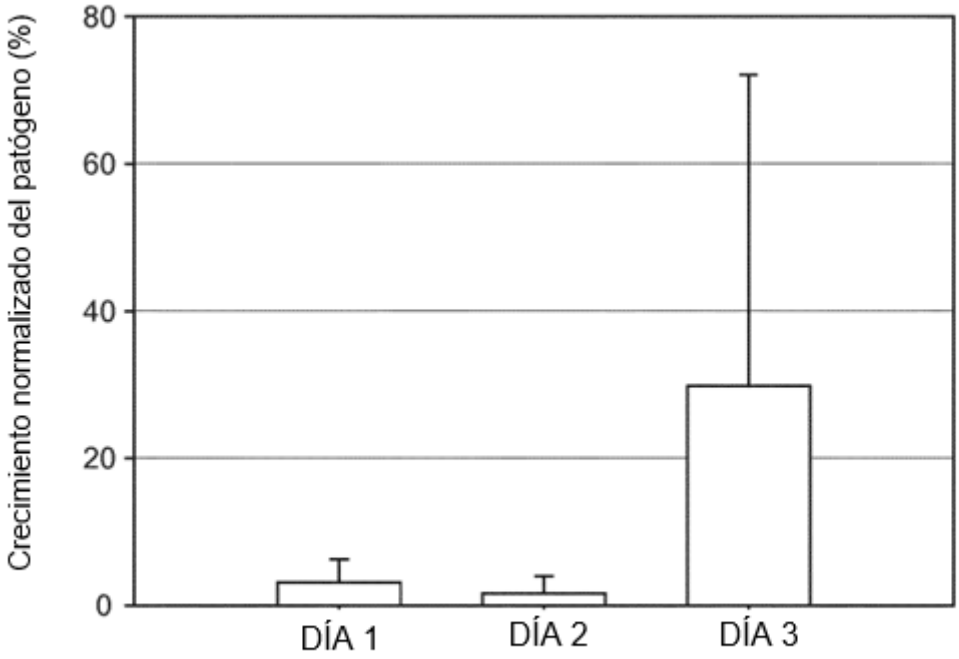


Figura 18

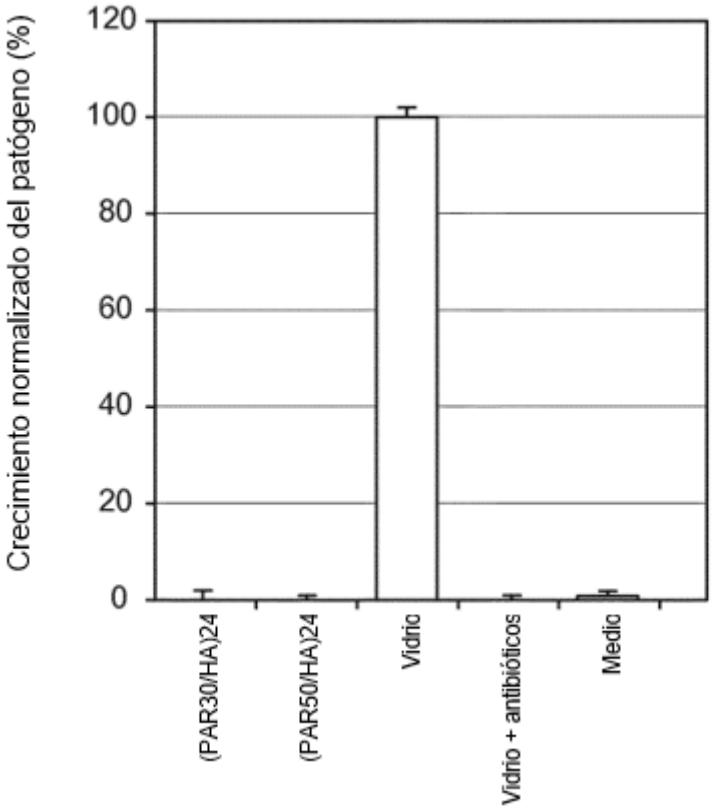


Figura 19

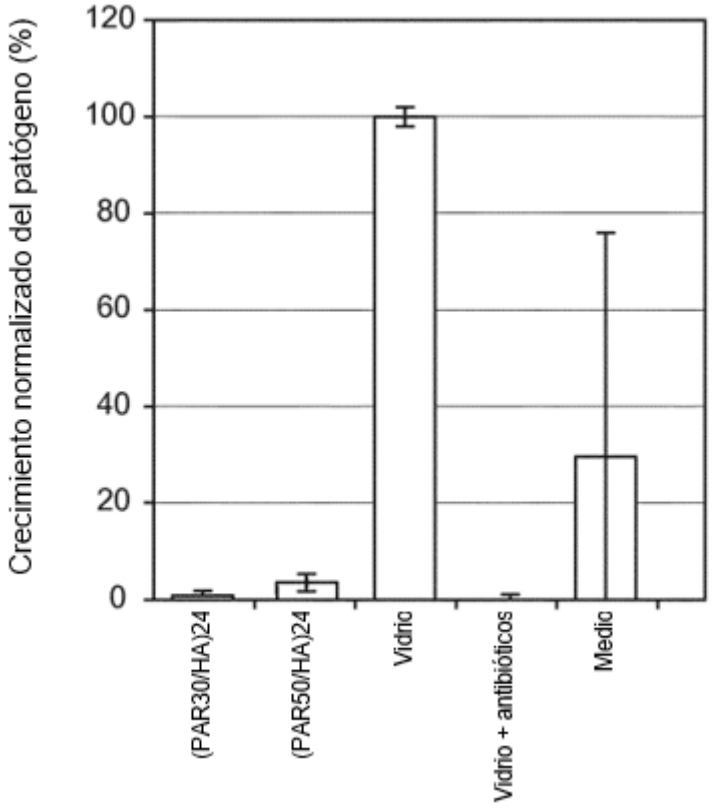


Figura 20

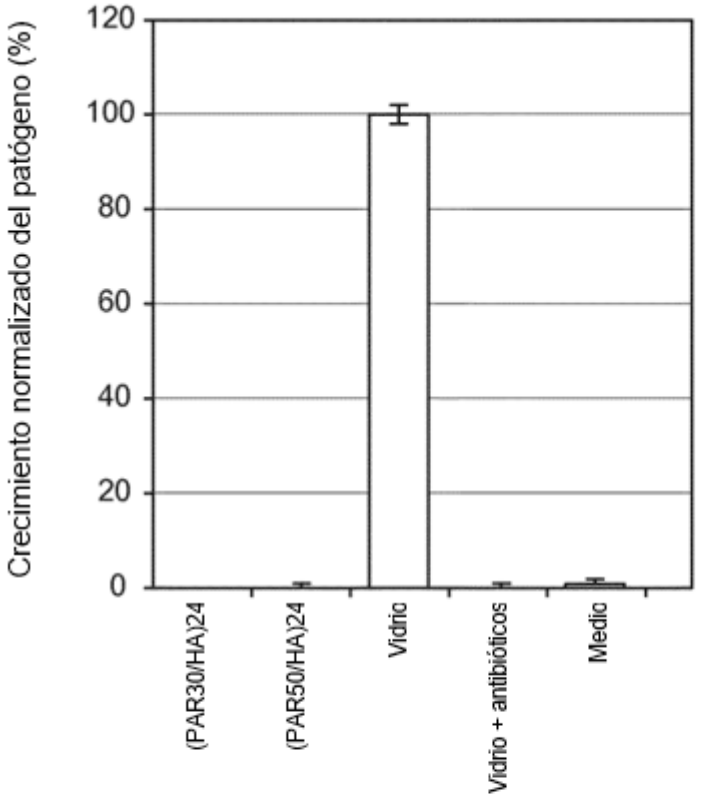


Figura 21

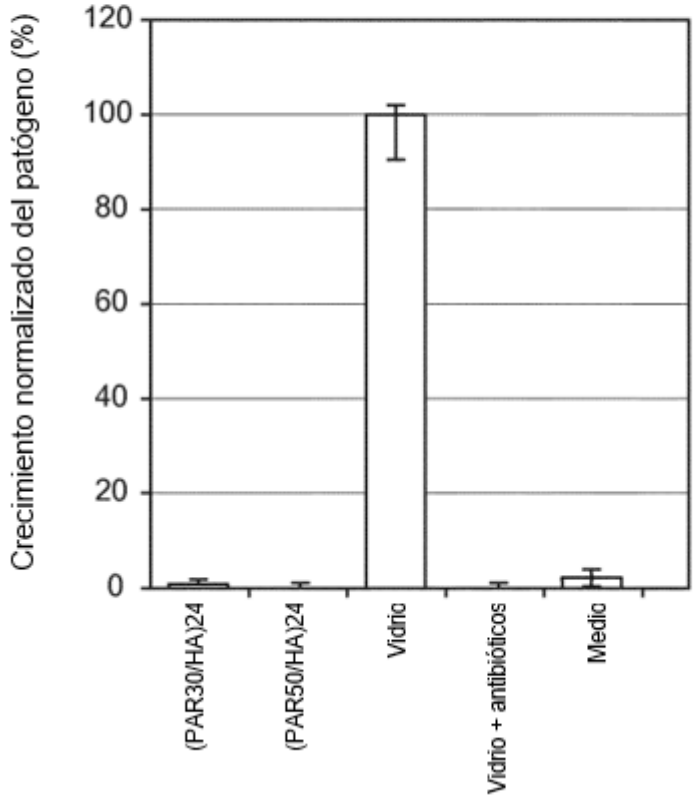


Figura 22

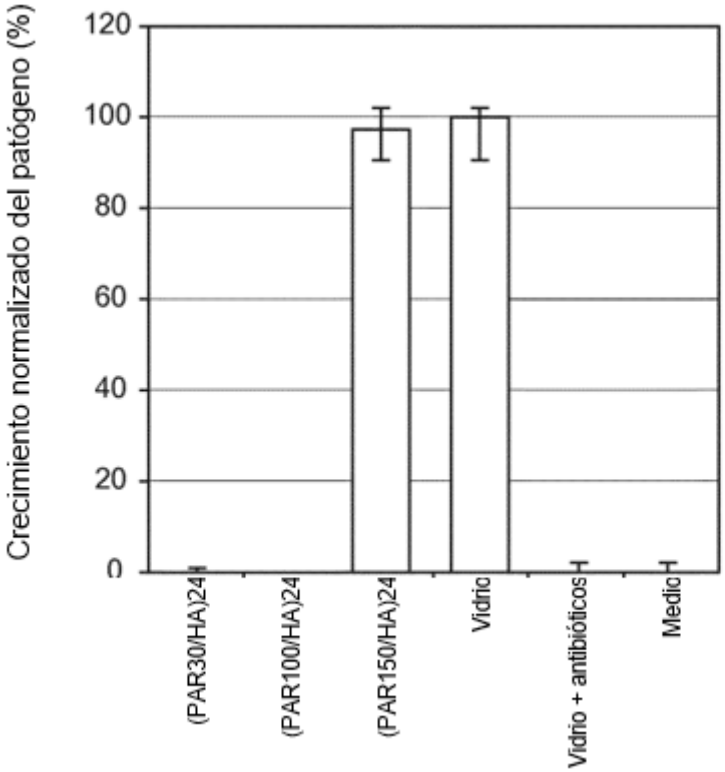


Figura 23

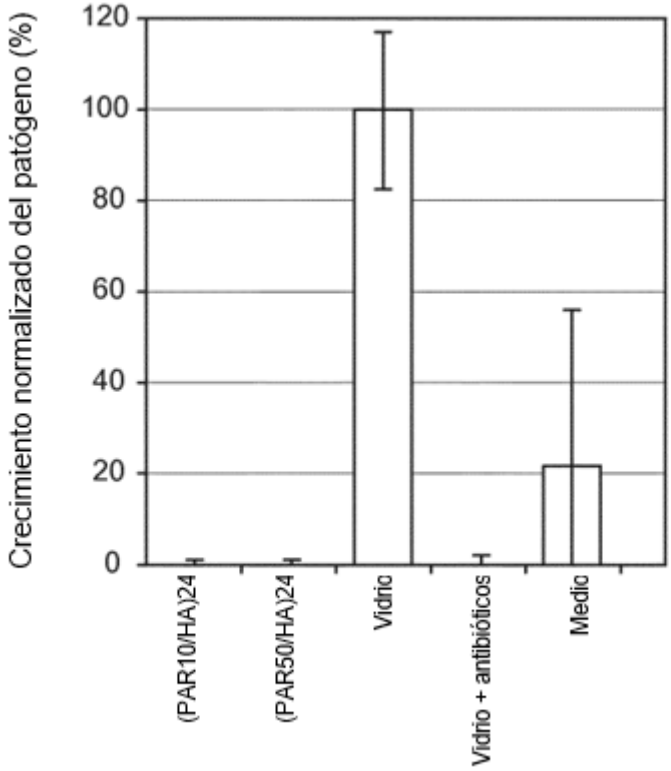


Figura 24

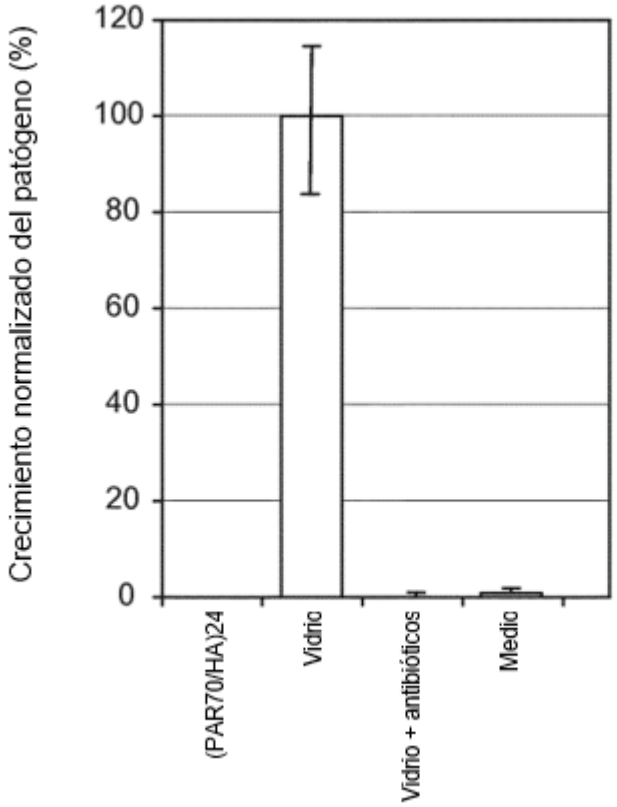


Figura 25

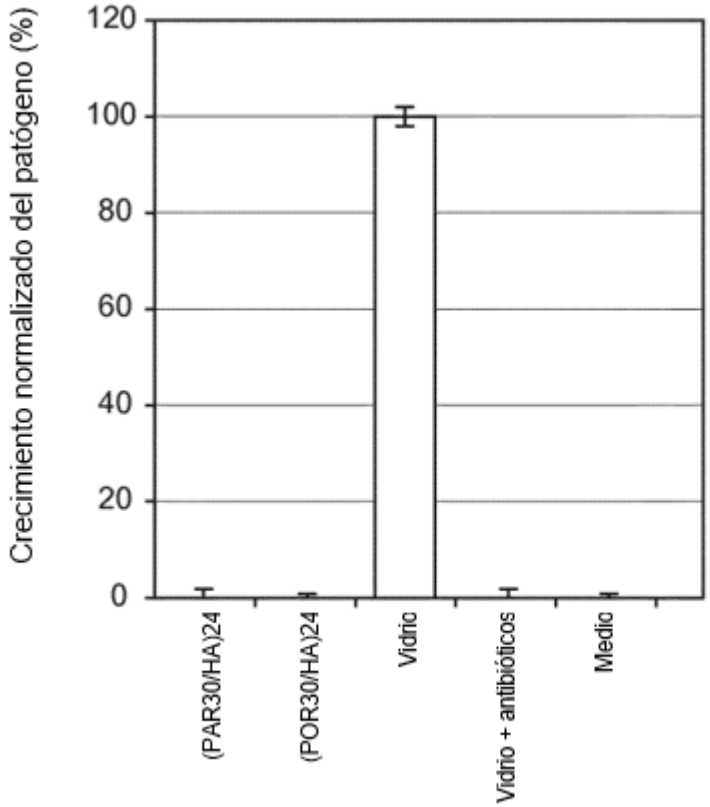


Figura 26

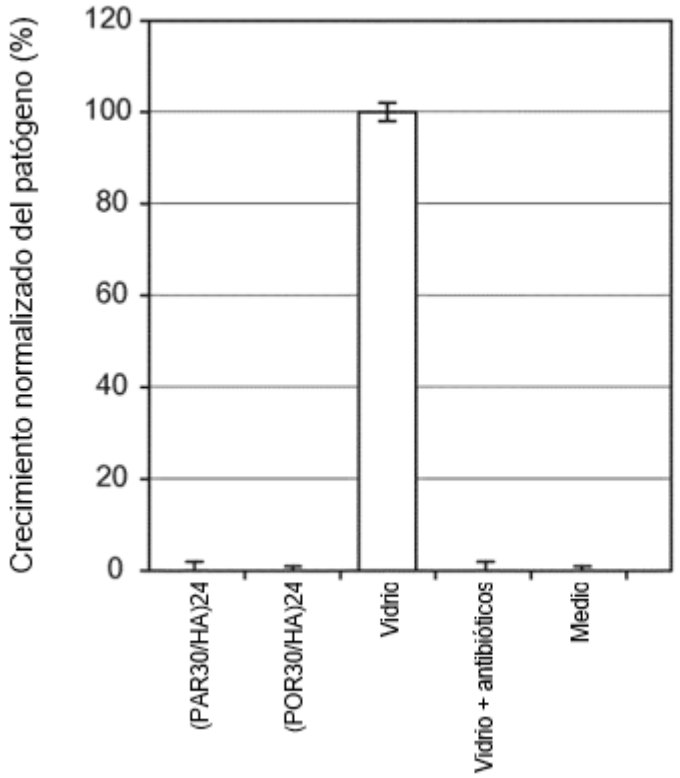


Figura 27

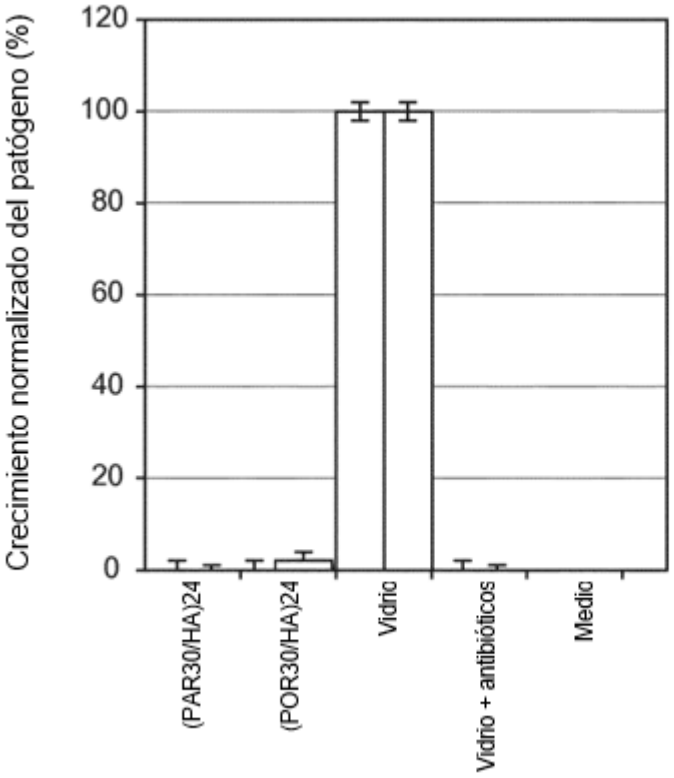


Figura 28

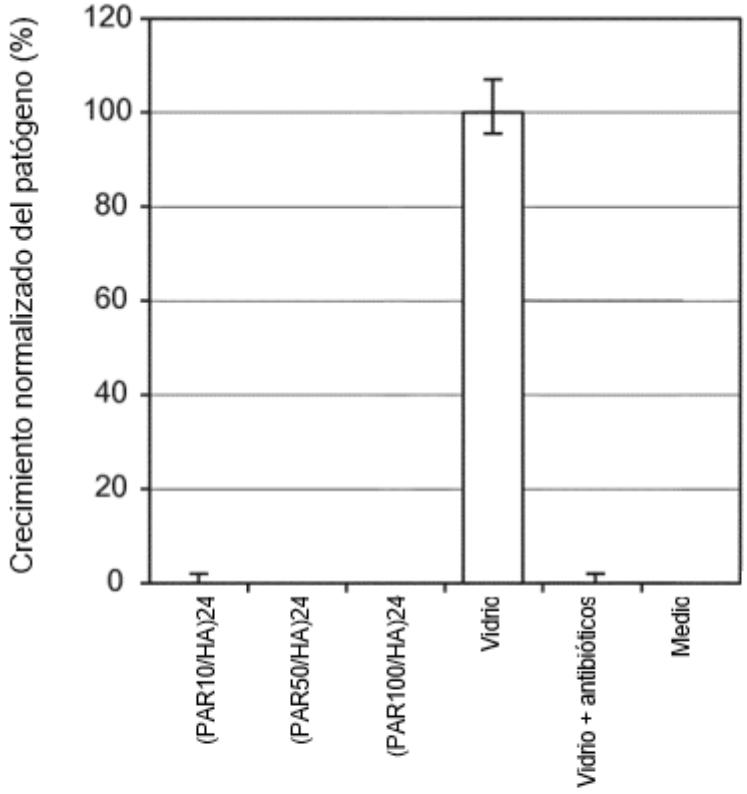


Figura 29

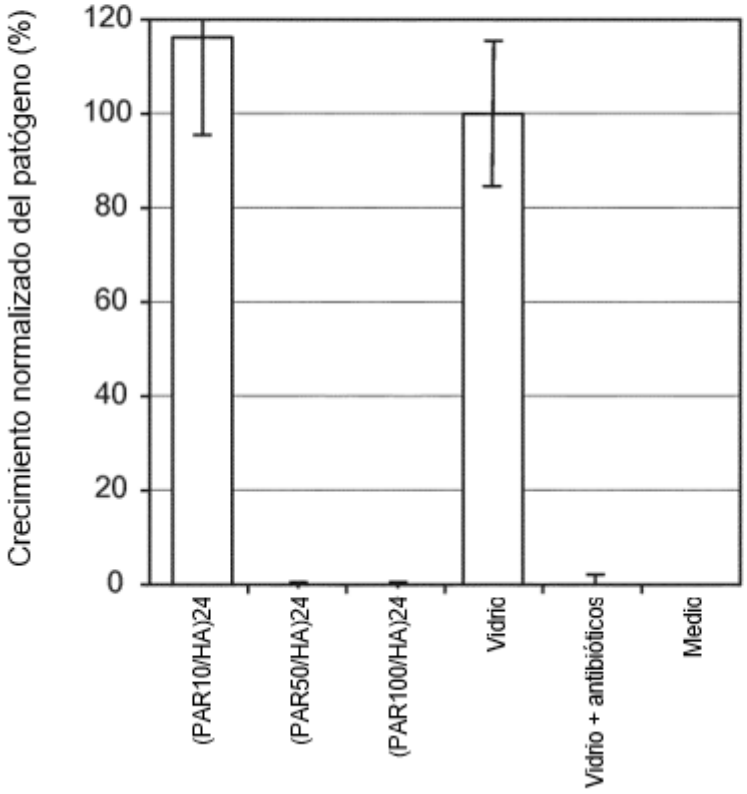
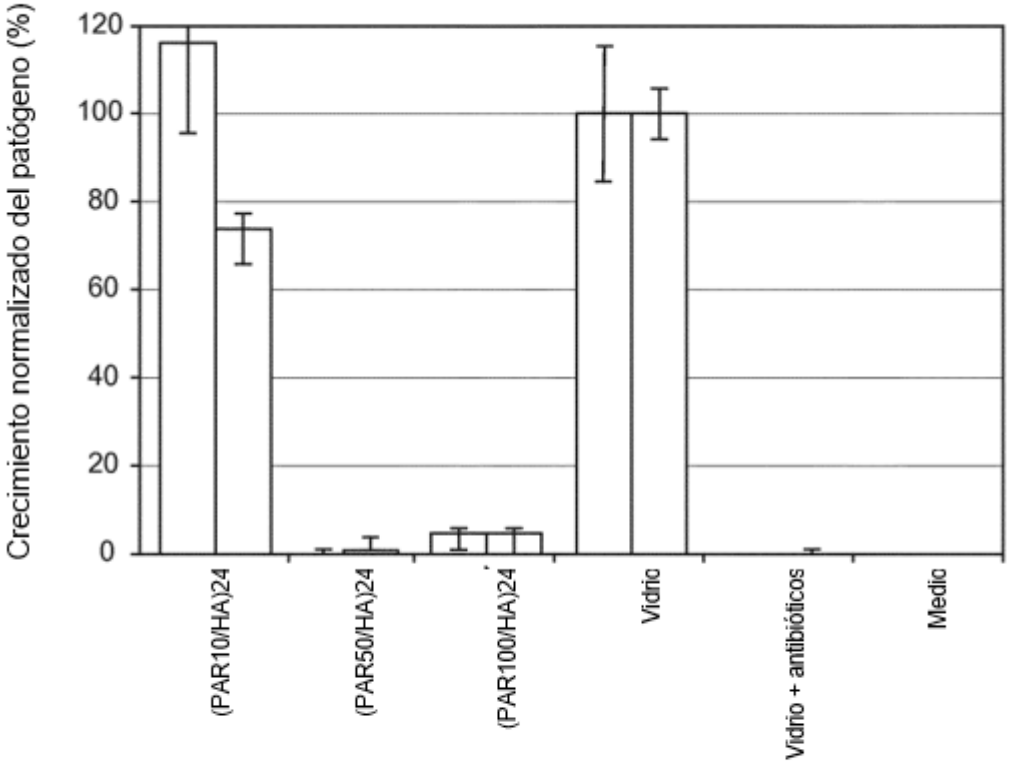


Figura 30

Figura 31



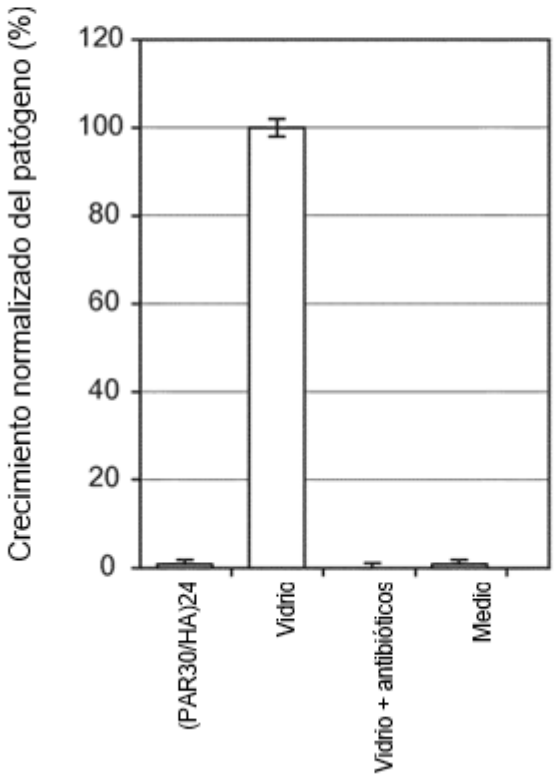


Figura 32

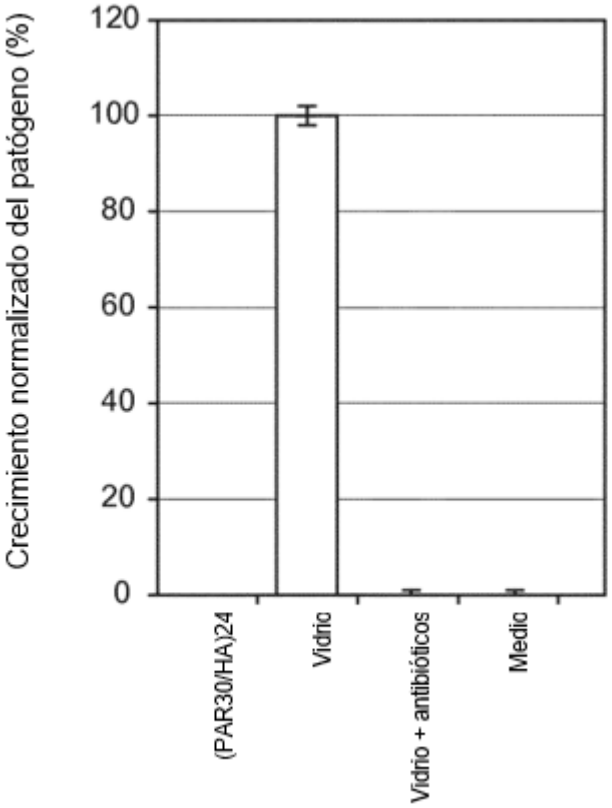


Figura 33

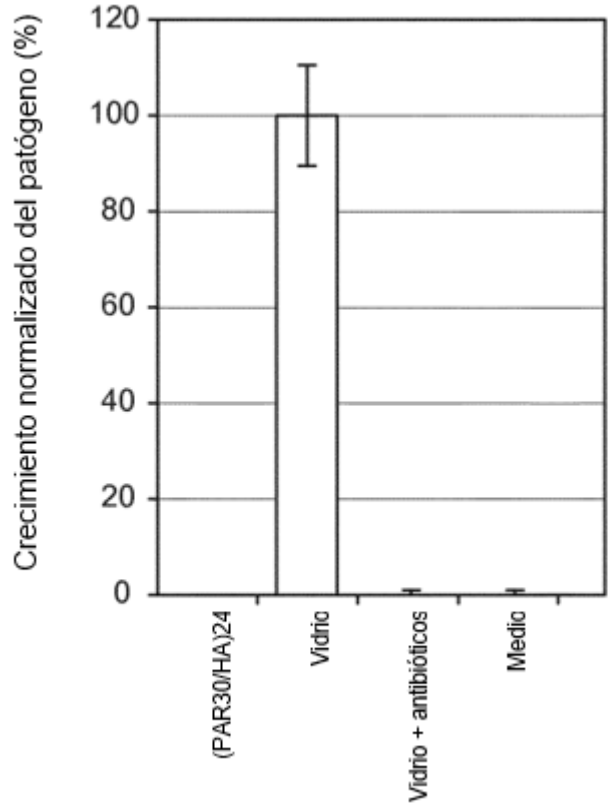


Figura 34