

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 994**

21 Número de solicitud: 202031065

51 Int. Cl.:

A61L 2/16 (2006.01)

A61L 2/18 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

23.10.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.03.2021

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

03.08.2022

Fecha de concesión:

09.06.2023

45 Fecha de publicación de la concesión:

16.06.2023

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
Edificio EMPRENDIA - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**GARCIA GONZALEZ, Carlos Alberto;
SANTOS ROSALES, Victor;
MAGARIÑOS FERRO, Maria Beatriz y
ALVAREZ LORENZO, Carmen Isabel**

74 Agente/Representante:

TORRENTE VILASANCHEZ, Susana

54 Título: **Sistema para implantación por técnicas de esterilización**

57 Resumen:

Sistema para implantación por técnicas de esterilización. Sistema estéril para implantación comprendiendo una matriz polimérica termosensible que modifica su estructura en presencia de un gas comprimido o un fluido supercrítico, para dar lugar a un sólido o semisólido de porosidad superior al 60%.

ES 2 808 994 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN**Sistema para implantación por técnicas de esterilización****Sector de la técnica**

La invención se refiere a un sistema estéril para implantación. Más concretamente, el sistema
5 comprende una matriz que es termosensible y que modifica su estructura en presencia de un
gas comprimido o un fluido supercrítico. La invención también se dirige a un procedimiento
para la preparación de dichos sistemas.

Estado de la técnica

10 En medicina regenerativa se requiere disponer de implantes sintéticos que actúen como
andamiajes (scaffolds) tridimensionales guiando el crecimiento del tejido. Los poliésteres
son un grupo de polímeros biodegradables ampliamente utilizados para construir andamiajes
entre otras aplicaciones biomédicas. La poli(epsilon-caprolactona) (PCL) y el ácido
15 poli(D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA) son especialmente habituales, forman parte de
productos aprobados por la FDA y se degradan dando lugar a oligómeros y monómeros por
hidrólisis de sus enlaces éster en el medio acuoso del organismo. Las propiedades físicas y
mecánicas y la resistencia a la degradación de estos polímeros se pueden ajustar regulando
la relación de monómeros, el peso molecular y el grado de cristalinidad (*Makadia HK, Siegel*
20 *SJ, Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier.*
Polym 3, 1377-1397, 2011). El empleo de PLGA de baja viscosidad inherente es
especialmente adecuado para la regeneración de tejido óseo, ya que el tiempo de degradación
es de entre 8 a 10 semanas. Por otra parte, la completa degradación de la PCL implica
tiempos superiores a los 24 meses, siendo uno de los polímeros de preferencia para el
25 desarrollo de sistemas implantables de liberación prolongada de fármacos (*Dash T.K,*
Konkimalla V.B. Poly(-epsilon-caprolactone) based formulations for drug delivery and tissue
engineering: A review. J. Controlled Release, 2012, 158, 15-33). En comparación con otros
polímeros biodegradables, la PCL presenta mayor resistencia y elasticidad, siendo de
elección en la fabricación de andamiajes para regeneración de tejidos expuestos a esfuerzos
30 mecánicos moderados como tendón, cartílago y hueso (*Abedalwafa M, Wang F, Li C.*
Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: A
review. Rev. Adv. Mater. Sci, 2013, 34, 123-140).

Por otro lado, la esterilización de estos andamiajes es indispensable para su uso seguro *in vivo*, a fin de evitar complicaciones post-quirúrgicas ligadas a infecciones en la zona implantada con el andamiaje. El marco legal actual dictamina que el método de esterilización a utilizar debe cumplir con niveles de esterilidad SAL-6 frente a endosporas antes de su uso

5 (Rutala W.A, Weber D.J, and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. “Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008” Centers for Disease Control and Prevention. 2008); (ISO 14937:2009 Sterilization of health care products — General requirements for characterization of a sterilizing agent and the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices.

10 International Organization for Standardization, 2009). SAL-6 se define como la probabilidad de 10^{-6} , es decir, una en un millón, de que haya microorganismos viables presentes en el producto tras el tratamiento de esterilización. Se requieren bioindicadores para confirmar que se alcanzan estos niveles SAL-6, siendo las endosporas de bacterias la selección más usual para bioindicadores debido a su alta resistencia a la esterilización.

15 No existe un único proceso de esterilización adecuado para la esterilización de cualquier tipo de producto sanitario o tejido biológico. De hecho, son numerosos los productos sanitarios de nueva generación que no pueden llegar al mercado debido a la carencia de un tratamiento de esterilización adecuado para ellos. Además, los tratamientos convencionales de esterilización (calor/vapor, óxido de etileno y esterilización gamma) son ineficientes frente

20 a tejidos biológicos y numerosos materiales sintéticos de uso biomédico, particularmente en productos sanitarios con componentes poliméricos, debido a las altas temperaturas empleadas, cambios fisicoquímicos asociados a las técnicas de radiación y/o a la insuficiente capacidad de penetración de la técnica (White A, Burns D, Christensen TW, Effective terminal sterilization using supercritical carbon dioxide. J Biotechnol. 2006, 123 (4), 504-

25 15).

Se han reportado aproximaciones tecnológicas para el procesado de andamiajes porosos por espumado con gases comprimidos o fluidos supercríticos y para la esterilización con fluidos supercríticos de materiales que mantienen su integridad física tras dicho tratamiento. Sin embargo, técnicamente resulta muy difícil conseguir andamiajes poliméricos de poliésteres

30 mediante espumado con gases comprimidos o fluidos supercríticos que sean estériles.

Gases comprimidos o fluidos supercríticos en general, y el dióxido de carbono (CO₂) en particular, se emplean como agentes plastificantes en el procesado denominado como espumado asistido por CO₂ comprimido o espumado supercrítico para la producción de

scaffolds poliméricos sin uso de disolventes. El abanico de biopolímeros susceptibles de ser procesados mediante esta técnica es amplio y predominantemente con polímeros de medio y alto peso molecular, siendo recientemente extendido a polímeros de bajo peso molecular (viscosidad inherente por debajo de 0,5 dL/g) (Díaz-Gómez L, Yang F, Jansen J.A, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C, García-González CA. *Low viscosity-PLGA scaffolds by compressed CO₂ foaming for growth factor delivery*. *RSC Adv*, 2016, 6, 70510-70519).

El dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) está reconocido como un agente esterilizante capaz de inactivar formas vegetativas y, en menor medida endosporas, de virus y bacterias Gram-positivas y Gram-negativas preferentemente en suspensión frente a formas secadas por liofilización (Ribeiro N, Soares GC, Santos-Rosales V, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C, García-González CA, Oliveira AL, *A new era for sterilization based on supercritical CO₂ technology*, *J Biomed Mater Res*. 2020, 108 (2), 399-428); (Soares GC, Learmonth DA, Vallejo MC, Davila SP, González P, Sousa RA, et al. *Supercritical CO₂ technology: The next standard sterilization technique?* *Mater Sci Eng C*. 2019, 99:520–40). Se ha propuesto

el empleo de este tipo de tratamiento para la esterilización de materiales termosensibles como biopolímeros, materiales sensibles a degradación por hidrólisis, productos alimentarios, tejidos biológicos de implantación, fármacos, sistemas de liberación de fármacos y productos sanitarios sin impactar sobre la integridad del material y sobre las propiedades del material tras el tratamiento (US6149864A, US20070003432A1, EP1782839A1, US20090041620A1, EP1782839A1, US20040120852, US20140193552A1). Esta capacidad de esterilización del CO₂ supercrítico no es reproducible empleando otros fluidos supercríticos como tetrafluoroetano u otro fluido comprimido como nitrógeno (US6149864A), salvo en el caso de protóxido de nitrógeno (WO2019168428A1). Las principales variables de operación son la temperatura y la presión.

La temperatura ha de ser lo más moderada posible para no dañar los componentes del material a esterilizar, pero sin comprometer la eficacia del proceso de esterilización, proponiéndose valores en el rango de 25 a 135°C. La presión se selecciona en función de la temperatura del proceso de manera inversa y habitualmente en el rango de 69 a 276 bar. El empleo de agitación, ciclos de presión o una despresurización rápida hasta presión atmosférica o vacío pueden facilitar también el proceso de esterilización. La incorporación de aditivos, tales como peróxido de hidrógeno, etanol, ácido peracético, ácido acético y mezclas de estos en proporciones de 0.001 a 2.0 % en volumen respecto al volumen del autoclave de esterilización extiende la posibilidad de inactivación de bacterias en forma de endosporas a niveles SAL-2 y superiores mediante tratamiento supercrítico (Ribeiro N,

Soares GC, Santos-Rosales V, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C, García-González CA, Oliveira AL. *A new era for sterilization based on supercritical CO₂ technology*, *J Biomed Mater Res*. 2020, 108 (2), 399-428); (Dai Z, Ronholm J, Tian Y, Sethi B, Cao X. *Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications*. *J Tissue Eng*. 2016, 7, 204173141664881). La presencia residual de estos aditivos en los materiales tratados puede causar problemas de toxicidad o disconfort, por lo que se emplean muy bajos contenidos de aditivo (inferiores a 200 ppm de peróxido de hidrógeno) o, más frecuentemente, se realizan post-procesos de aireado o extracción para eliminar estos residuos (US20100080790A1). La presencia de agua también aumenta la capacidad de esterilización del CO₂ supercrítico. Las condiciones moderadas de temperatura y la excelente permeabilidad del scCO₂ hacen atractivo el empleo de este tratamiento para biomateriales en general y para biomateriales porosos en particular. Además, esta técnica de esterilización es capaz de preservar las propiedades fisicoquímicas del material para ciertos scaffolds poliméricos termosensibles empleados en medicina regenerativa (Bernhardt A, Wehrl M, Paul B, Hochmuth T, Schumacher M, et al. *Improved Sterilization of Sensitive Biomaterials with Supercritical Carbon Dioxide at Low Temperature*. *PLOS ONE*. 2015, 10 (6): e0129205); (Lanzalaco S, Campora S, Brucato V, Carfi Pavia F, Di Leonardo ER, Gherzi G, et al. *Sterilization of macroscopic poly(l-lactic acid) porous scaffolds with dense carbon dioxide: Investigation of the spatial penetration of the treatment and of its effect on the properties of the matrix*. *J Supercrit Fluids*. 2016, 111:83–90); (Scognamiglio F, Blanchy M, Borgogna M, Travan A, Donati I, Bosmans JWAM, et al. *Effects of supercritical carbon dioxide sterilization on polysaccharidic membranes for surgical applications*. *Carbohydr Polym*. 2017, 173:482–8); (Ruphuy G, Souto-Lopes M, Paiva D, Costa P, Rodrigues AE, Monteiro FJ, et al. *Supercritical CO₂ assisted process for the production of high-purity and sterile nano-hydroxyapatite/chitosan hybrid scaffolds*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018, 106(3):965–75). Niveles SAL-6 con *B. pumilus* como bioindicador tras esterilización supercrítica han sido únicamente descritos para temperaturas iguales o superiores a 60°C, adición de peróxido de hidrógeno (200 ppm) y presiones de 276 bar (US20100080790A1).

No obstante, la obtención de andamiajes de PCL, de PLGA, particularmente PLGA de baja viscosidad inherente, de mezclas de estos u otras composiciones conteniendo al menos uno de estos dos componentes tratados por esterilización supercrítica es difícil debido al efecto plastificante del CO₂ en las condiciones habituales de esterilización supercrítica. Bajo estas condiciones, la utilización de los polímeros termoplásticos antes señalados en productos

sanitarios se ve altamente restringida debido a cambios morfológicos y de estructura interna muy significativos tras el tratamiento de esterilización que dan lugar a productos de baja calidad o que no cumplen con la función que se les presupone.

De este modo, todavía existe la necesidad de proporcionar matrices porosas basadas en PCL, en PLGA de baja viscosidad inherente, en mezclas de estos o en otras composiciones conteniendo al menos uno de estos dos componentes y que sean estériles y con morfología externa a medida. Además, también existe la necesidad de un tratamiento de esterilización con CO₂ supercrítico de productos sanitarios, medicamentos, productos alimentarios, tejidos biológicos de implantación o componentes de estos, más eficaz en cuanto a tiempo de procesado y capaz de integrar la eliminación de los aditivos de esterilización durante dicho tratamiento sin necesidad de post-procesado.

Descripción breve de la invención

La presente invención se dirige a un procedimiento de esterilización que permite obtener resultados más controlados del producto final esterilizado. Más concretamente, se dirige a un procedimiento de esterilización mediante la integración de los procesos de espumado, moldeado y esterilización, todos ellos asistidos por un gas comprimido o un fluido supercrítico. Aún más concretamente, la esterilización tiene lugar en presencia de un gas comprimido o un fluido supercrítico en una etapa en discontinuo, otra con flujo continuo de un gas comprimido o un fluido supercrítico, y una última etapa de despresurización.

Así, en un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de esterilización para obtener una matriz porosa estéril, homogénea, de consistencia sólida o semisólida, de porosidad superior al 60%, que comprende ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) y/o poli(epsilon-caprolactona), que comprende:

- a) introducir una mezcla física de ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) y/o poli(epsilon-caprolactona) en el interior de un autoclave, y un aditivo de esterilización en concentraciones de entre 100 y 3000 ppm;
- b) calentar el sistema a una temperatura comprendida entre 20 y 40°C ;
- c) introducir en el autoclave un gas comprimido o fluido supercrítico a una presión de entre 40 y 300 bar y a una temperatura de entre 20 y 40°C, y mantener un modo de operación discontinuo en estas condiciones de presión y temperatura entre 5 minutos y 24 horas;

d) pasar un flujo continuo de CO₂ de 2 a 500 g/min a través del autoclave que se mantiene a una presión de entre 40 y 300 bar y a una temperatura de entre 20 y 40°C, entre 5 minutos y 24 horas; y

e) despresurizar de manera controlada a una velocidad de entre 1 y 25 bar/min hasta presión atmosférica.

Así, el procedimiento de la invención permite la obtención de un producto sanitario, medicamento, producto cosmético o de alimentación o componentes de estos en condiciones estériles.

Además, el procedimiento de la invención es especialmente adecuado para preparar una matriz porosa estéril que comprende ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico), y/o poli(epsilon-caprolactona), y que es homogénea, de consistencia sólida o semisólida y con una porosidad superior al 60%.

En una realización particular, el procedimiento descrito anteriormente se dirige a la obtención de una matriz porosa estéril, homogénea, de consistencia sólida o semisólida, de porosidad superior al 60%, que comprende ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) y/o poli(epsilon-caprolactona), donde el material a esterilizar de la etapa a) es una mezcla física de ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) y/o poli(epsilon-caprolactona), con la condición de que cuando el material a esterilizar de la etapa a) es una mezcla física de ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) con una viscosidad inherente inferior a 0,45 dL/g, o es una mezcla física de ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) con una viscosidad inherente inferior a 0,45 dL/g y poli(epsilon-caprolactona), el procedimiento además comprende:

- una etapa d') posterior a la etapa d) y anterior a la etapa e), que comprende pasar un flujo continuo de CO₂ líquido a una temperatura de 4°C o inferior, de 2 a 500 g/min a través del autoclave que se mantiene a una presión de entre 40 y 300 bar, entre 5 minutos y 24 horas; y

- una etapa e') que sustituye a la etapa e), que comprende la despresurización controlada a una velocidad de entre 1 y 19,5 bar/min con enfriamiento mediante la adición de un líquido comprimido, que es gaseoso a 25°C y 1 atmósfera de presión, a una temperatura de entre -196° y 19°C, hasta presión atmosférica.

En una realización particular, la adición del líquido comprimido en la etapa e') es continua o discontinua.

Además, las matrices porosas, implantes o andamiajes que se obtienen mediante el procedimiento de la invención presentan unas características especialmente adecuadas para la regeneración de tejido óseo y cartilaginoso. Dichas matrices, implantes o andamiajes son biodegradables, porosos, homogéneos, de consistencia sólida o semisólida y morfología externa modulable, características que lo hacen especialmente adecuado para medicina regenerativa.

Así, un segundo aspecto la invención se dirige a un implante o andamiaje obtenible según el procedimiento del primer aspecto de la invención.

El andamiaje según la invención es adecuado como un implante monolítico, para cesión controlada de las sustancias biológicamente activas en el lugar de aplicación. En una realización particular, los sistemas de la invención, implantes y andamiajes según se han descrito anteriormente, forman parte de un implante monolítico. En una realización particular, el sistema de la invención se puede obtener como un implante monolítico para cesión controlada en el lugar de aplicación sin efectos tóxicos.

Descripción de las figuras

Figura 1. Imágenes fotográficas y SEM de andamiajes de PCL procesado con CO₂ supercrítico a 39°C, 140 bar y adición de 1200 ppm de peróxido de hidrógeno durante etapas en discontinuo y de flujo de CO₂ comprimido en continuo durante a) 5 y 0 horas, b) 2,5 y 2,5 horas y c) 0 y 5 horas, respectivamente. Barras de escala: 5 mm (negro), 100 μm (blanco).

Figura 2. Imágenes fotográficas y SEM de andamiajes de a) PCL conteniendo Rhodamina B en proporción PCL:Rhodamina B 99,5:0,5 p/p, b) PCL conteniendo vancomicina hidrocloreuro en proporción PCL:vancomicina 95:5 p/p, c) PCL conteniendo almidón pregelificado y vancomicina hidrocloreuro en proporción PCL:almidón:vancomicina 85:10:5 en peso, con CO₂ supercrítico a 39°C, 140 bar y adición de 1200 ppm de peróxido de hidrógeno durante etapas en discontinuo y de flujo de CO₂ comprimido en continuo durante 2,5 y 2,5 horas, respectivamente. Barras de escala: 5 mm (negro), 100 μm (blanco).

Figura 3. Perfiles de cesión de vancomicina hidrocloreuro (medio PBS pH 7,4, 37°C, 60 rpm) correspondientes a andamiajes de i) PCL conteniendo vancomicina hidrocloreuro en proporción PCL:vancomicina 95:5 p/p, ii) PCL conteniendo almidón pregelificado y vancomicina hidrocloreuro en proporción PCL:almidón:vancomicina 85:10:5 en peso, tras adición de 1200 ppm de peróxido de hidrógeno y procesado con CO₂ supercrítico a 39°C,

140 bar durante etapas en discontinuo y de flujo de CO₂ comprimido en continuo durante 2,5 y 2,5 horas, respectivamente. Leyenda: PCL:vancomicina 95:5 p/p (rombo blanco), PCL:almidón:vancomicina 85:10:5 p/p (cuadrado negro).

Figura 4. Espectro de difracción de rayos X (A) y espectro infrarrojo (B) de vancomicina hidrocioruro i) sin tratar y ii) tras adición de 1200 ppm de peróxido de hidrógeno y procesado con CO₂ supercrítico a 39°C, 140 bar durante etapas en discontinuo y de flujo de CO₂ comprimido en continuo durante 2,5 y 2,5 horas, respectivamente. Leyenda: vancomicina hidrocioruro sin tratar (negro), vancomicina hidrocioruro tratado (gris)

Figura 5. Imágenes fotográficas y SEM de mezcla pulverulenta de PCL y PLGA de proporción en peso 50:50, tras tratamiento integrado de espumado y esterilización según condiciones de ejemplo 4. Barras de escala: 5 mm (negro), 100 µm (blanco).

Figura 6. Resultados de viabilidad celular (test WST-8) de fibroblastos tras 24 y 72 horas en contacto con el material estéril obtenido según las condiciones del ejemplo 4. El material se incubó con las células sin etapas previas de aireación. Leyenda: andamiaje de PCL/PLGA obtenido según condiciones de ejemplo 4 (negro), control negativo: células incubadas sin presencia del material (blanco).

Figura 7. Imágenes fotográficas de andamiajes de PCL y Rhodamina B en proporción PCL:Rhodamina B 99,5:0,5 p/p, tras tratamiento integrado de espumado y esterilización en moldes personalizados de PLLA de diferentes dimensiones según condiciones de ejemplo 8. Barra de escala: 0,5 mm.

Descripción detallada de la invención

Como se comentó anteriormente, la invención se refiere a un procedimiento de esterilización, que comprende:

- a) introducir el material a esterilizar en el interior de un autoclave, y un aditivo de esterilización en concentraciones de entre 100 y 3000 ppm;
- b) calentar el sistema a una temperatura comprendida entre 20 y 40°C;
- c) introducir en el autoclave un gas comprimido o fluido supercrítico a una presión de entre 40 y 300 bar y a una temperatura de entre 20 y 80°C, y mantener estas condiciones de presión y temperatura entre 5 minutos y 24 horas;

- d) pasar un flujo continuo de CO₂ de 2 a 500 g/min a través del autoclave que se mantiene a una presión de entre 40 y 300 bar y a una temperatura de entre 20 y 40°C, entre 5 minutos y 24 horas; y
- e) despresurizar de manera controlada a una velocidad de entre 1 y 25 bar/min hasta
5 presión atmosférica.

De este modo, el procedimiento de la invención permite esterilizar un material en condiciones adecuadas para tener un sistema estéril.

El procedimiento al que se refiere la invención tiene las ventajas de que requiere la incorporación de bajos contenidos de agentes de esterilización y que permite su eliminación
10 antes de la conclusión del procedimiento sin etapas de post-procesado, se lleva a cabo en un único paso, acelera el proceso de esterilización y las temperaturas de trabajo están comprendidas entre 20 y 40°C que son compatibles con la incorporación de componentes termosensibles como las sustancias biológicamente activas, además transcurre en condiciones respetuosas con el medioambiente, y supera las limitaciones actuales de empleo
15 de polímeros que pierden su integridad física tras el procesado y particularmente biopolímeros de baja viscosidad inherente como PLGA de viscosidad inherente inferior a 0,45 dL/g.

Además, el procedimiento al que se refiere la invención conduce a la obtención de productos en condiciones estériles mediante el empleo de fluido supercrítico junto a aditivos y reduce
20 los tiempos de esterilización frente a procesos de esterilización con CO₂ en discontinuo en las mismas condiciones de presión, temperatura y contenido en aditivos.

La expresión “sistema estéril” se refiere a aquel material que cumple con el requisito de esterilidad SAL-6 tras tratamiento de esterilización frente a los bioindicadores *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y/o *Bacillus pumilus*.

25 La expresión “condiciones estériles” se refiere a condiciones de esterilidad SAL-2 o superiores tras tratamiento de esterilización frente a los bioindicadores *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y/o *Bacillus pumilus*.

En una realización preferida, el aditivo de esterilización es peróxido de hidrógeno en proporciones de 1200 a 3000 ppm para alcanzar niveles SAL-6.

30 En una realización preferida, el aditivo de esterilización es peróxido de hidrógeno en proporciones de 600 a 1200 ppm para alcanzar niveles SAL-4.

En una realización preferida, el aditivo de esterilización es peróxido de hidrógeno en proporciones de 100 a 600 ppm para alcanzar niveles SAL-2.

Según la etapa a) del procedimiento, el material a esterilizar se introduce en el interior del autoclave, o se puede introducir en un recipiente a presión empleado al efecto, junto con los aditivos de esterilización. La introducción de los aditivos de esterilización, según la etapa a) del procedimiento, se puede realizar, por ejemplo, depositándolo bien directamente en el fondo del autoclave, bien con una gasa o compresa impregnada previamente con el aditivo antes del cierre del autoclave, bien a través de una línea específica de entrada al autoclave una vez cerrado y sometido a presión de vacío o atmosférica. Preferiblemente, no existe contacto físico entre el aditivo de esterilización y el material a procesar en esta etapa a). Alternativamente, el aditivo puede ser introducido en el autoclave ya cerrado y bajo presión.

En este procedimiento, el material de la etapa a) puede conservar su integridad física hasta el final del proceso, o bien perder su integridad física y de este modo el material de la etapa a) tiene una forma física diferente a la del sistema estéril obtenido.

El PLGA es un polímero sintético biodegradable de la familia de los poliésteres alifáticos, en concreto es un alfa-hidroxiácido copolímero de ácido poliláctico y ácido poliglicólico. El PLGA para la presente invención también incluye los copolímeros de ácido poliláctico y ácido poliglicólico con un grupo terminal seleccionado de entre hidroxilo, carboxilo y éster. El PLGA de la invención tiene una relación láctico:glicólico de entre 85:15 a 40:60, preferiblemente entre 75:25 a 50:50.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para la obtención de una matriz porosa, estéril, homogénea, de consistencia sólida o semisólida, de porosidad superior al 60%, dicha matriz comprende PCL y/o PLGA. Debido a la propia naturaleza de estos polímeros, la matriz obtenida es además biodegradable.

La expresión "matriz homogénea" se refiere a aquella matriz con uniformidad espacial en su estructura interna y uniformidad en su composición. En la matriz homogénea, obtenida mediante el procedimiento de la invención, no hay trazas de las morfologías pulverulentas propias de los materiales de partida como se demuestra en los ejemplos y en particular en los ejemplos 2 y 3 y figuras 1 y 2.

Cuando se emplea como material de partida, en la etapa a) los polímeros ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico), y/o poli(epsilon-caprolactona), estos polímeros se encuentran como una mezcla física. Esta mezcla física pierde su integridad a lo largo del procedimiento y como resultado cambia estructuralmente, de manera que el procedimiento permite obtener

una matriz porosa, estéril, homogénea, de consistencia sólida o semisólida, de porosidad superior al 60%, que está constituida por ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) y/o poli(epsilon-caprolactona). Para ello, la despresurización de la etapa e) debe de llevarse a cabo a una velocidad controlada de entre 1 y 50 bar/min hasta presión atmosférica.

- 5 El PLGA de viscosidad inherente inferior a 0,45 dL/g se degrada a una velocidad más adecuada que otros tipos de PLGA para la regeneración de hueso o de cartílago. Por este motivo, el tipo de PLGA preferido de la presente invención es aquel PLGA que tiene una viscosidad inherente inferior a 0,45 dL/g.

La “viscosidad inherente” se refiere a la medida del tiempo de flujo de una solución polimérica, generalmente en proporciones 0,1 % peso/volumen en cloroformo a 25°C, a través de un capilar estrecho respecto al tiempo de flujo del disolvente puro a través del mismo capilar y expresado por unidad de concentración del polímero. Se trata de un método reológico para determinar el peso molecular de un polímero y se expresa generalmente en unidades de decilitros por gramo.

- 15 Así, cuando el material a esterilizar de la etapa a) es una mezcla física de ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) con una viscosidad inherente inferior a 0,45 dL/g, o es una mezcla física de ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) con una viscosidad inherente inferior a 0,45 dL/g y poli(epsilon-caprolactona), el procedimiento además comprende:

20 - una etapa d’) posterior a la etapa d) y anterior a la etapa e), que comprende pasar un flujo continuo de CO₂ líquido a una temperatura de 4°C o inferior, de 2 a 500 g/min a través del autoclave que se mantiene a una presión de entre 40 y 300 bar, entre 5 minutos y 24 horas; y

25 - una etapa e’) que sustituye a la etapa e), que comprende la despresurización controlada a una velocidad de entre 1 y 19,5 bar/min con enfriamiento mediante la adición de un líquido comprimido, que es gaseoso a 25°C y 1 atmósfera de presión, a una temperatura de entre -196° y 19°C, hasta presión atmosférica.

Las etapas d’) y e’) están diseñadas particularmente para la obtención de sistemas que comprenden una matriz basada en PLGA de viscosidad inherente baja, en concreto de viscosidad inherente inferior a 0,45 dL/g, ya que evita los problemas encontrados en la técnica para este material sin control sobre su morfología externa e interna, con poros de 30 varios milímetros y que pierde su integridad mecánica haciéndolo inútil para su propósito como implante o andamiaje.

La invención tiene la ventaja de en una sola etapa procesar una mezcla física de los polímeros mencionados, para obtener una matriz como la definida anteriormente, y además esterilizarla en el mismo proceso. Por lo tanto, no es necesario disponer previamente de una matriz porosa y esterilizarla en una etapa posterior, sino que el proceso de preparación de la matriz porosa y su esterilización tienen lugar en un único proceso.

La expresión “mezcla física” se refiere a un material en polvo que opcionalmente puede ser mezclado con otros materiales en polvo mediante técnicas habituales de mezclado, como por ejemplo una mezcladora de paletas, una mezcladora planetaria o una mezcladora tipo turbula.

Además, esta mezcla física se puede verter en un molde. Una ventaja adicional de la invención es que el procedimiento permite obtener matrices con morfología externa modulable. La expresión “morfología externa modulable” se refiere a que el tamaño y la forma externa son adaptables a requerimientos concretos, por ejemplo adaptan su forma a la de un molde. Así, al incluir un molde en la etapa a) del procedimiento, éste puede modular la morfología externa del material final en lo que se refiere a sus dimensiones y forma, de manera que el material adquirirá la morfología del negativo del molde que lo contiene.

En una realización particular, la etapa a) del procedimiento incluye un molde, preferiblemente cuando el material a esterilizar es una mezcla física de ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) y/o poli(epsilon-caprolactona) se vierte en un molde en la etapa a).

En una realización preferida, en la etapa a) del procedimiento de la invención se adiciona además una sustancia biológicamente activa. En una realización particular, esta sustancia biológicamente activa forma parte de la mezcla física de los materiales de la etapa a).

El término “sustancia biológicamente activa” se refiere a cualquier sustancia que altera, promueve, acelera, prolonga, inhibe, activa o al menos afecta a los procesos biológicos o químicos que tienen lugar en seres humanos y animales. Cuando una o varias sustancias biológicamente activas se incorporan al sistema de la invención, éstas se encuentran dispersas a nivel molecular o particular. El sistema es adecuado para incorporar sustancias biológicamente activas independientemente de las características de solubilidad de las mismas. Debido a las características de los componentes del sistema y las condiciones de procesado, éste es especialmente adecuado para incorporar sustancias biológicamente activas termosensibles.

En una realización particular, las sustancias biológicamente activas se seleccionan entre hormonas, antiinflamatorios, antineoplásicos, agentes antimicrobianos y sustancias

morfogénicas para reparación de defectos óseos y otras aplicaciones en medicina regenerativa. En una realización más particular, la sustancia biológicamente activa es un antibiótico. Esta preparación está destinada a infecciones quirúrgicas durante el implante en tejidos blandos y huesos.

- 5 En otra realización particular, la proporción de sustancia biológicamente activa está comprendida entre el 0,1% y el 15% en peso respecto al PLGA, PCL o una mezcla de ambos o de al menos uno de estos dos biopolímeros.

En una realización particular, la temperatura empleada en las etapas b), c) y d) es igual o inferior a 40°C, para facilitar el procesado de materiales termosensibles, por ejemplo de moléculas biológicamente activas. Un regulador de temperatura puede permitir fijar la temperatura inicial de esterilización deseada en el autoclave, y facilitar así la realización de las etapas b), c) y d) del procedimiento.

El autoclave se presuriza a la presión deseada por adición de un gas comprimido o fluido supercrítico a presión, según la etapa c) del procedimiento, por ejemplo, a través de una bomba de líquido o un compresor. Alternativamente, aunque no preferentemente, la introducción del fluido supercrítico en el citado autoclave puede ser realizada en estado líquido o sólido.

En una realización preferida, en la etapa c) el fluido supercrítico o el gas comprimido se selecciona de entre dióxido de carbono, protóxido de nitrógeno o una mezcla de los mismos con nitrógeno, etanol o isopropanol. Este gas se introduce en el autoclave de manera discontinua, es decir, una vez alcanzada la presión deseada a la temperatura de operación no es necesario continuar introduciendo el gas. De este modo, la etapa c) permite poner en contacto el material a esterilizar con el aditivo de esterilización introducidos en la etapa a), con el fluido supercrítico o el gas comprimido seleccionado.

25 La velocidad de presurización del autoclave no es un parámetro crítico para este proceso. El proceso de consecución de la temperatura y presión deseada puede realizarse bien secuencialmente, bien de manera simultánea. En una realización particular, el tiempo de contacto entre el gas comprimido o fluido supercrítico y la mezcla es de entre 5 minutos y 24 horas. En una realización más particular, es de entre 15 minutos y 6 horas. En una realización preferida, es de entre 1 y 5 horas.

La presente invención emplea un medio de procesado en condiciones de gas comprimido o de fluido supercrítico. Un fluido está en condiciones supercríticas cuando su presión y temperatura están por encima de las de su punto crítico y se caracteriza por propiedades

intermedias entre las de un líquido y un gas. Ejemplos de fluidos que pueden ser utilizados con esta invención se seleccionan de entre dióxido de carbono (CO₂), protóxido de nitrógeno o una mezcla de los mismos con nitrógeno, etanol o isopropanol. La presente invención contempla el uso de estas sustancias por separado o en combinación, así como el empleo de
5 aditivos. En una realización particular de la invención, el gas comprimido o fluido supercrítico es el CO₂. El uso individual de CO₂ como medio de procesado es preferido por su capacidad plastificante, esterilizante y de espumado, su no inflamabilidad, bajo coste y su fácil eliminación del medio a la temperatura y presión ambiente. No habrá, por tanto, CO₂ residual en el producto final que pueda contribuir a problemas en su uso.

10 El término “dióxido de carbono supercrítico” hace referencia al dióxido de carbono en los rangos de condiciones de temperatura y presión anteriormente citadas, presión de entre 40 y 300 bar y a una temperatura de entre 20 y 80°C, que son satisfactorias en la presente invención.

En la etapa d), un flujo continuo de dióxido de carbono a una presión de entre 40 y 300 bar,
15 acelera el proceso de esterilización y elimina paulatinamente el aditivo de esterilización hasta niveles residuales en el material tratado.

La secuencia de las etapas c) y d) es beneficiosa para que tenga lugar la esterilización del material y además para eliminar los restos del aditivo de esterilización. De eliminarse la etapa c), tendría lugar una eliminación prematura y acelerada del aditivo de esterilización, y
20 el proceso no aseguraría la esterilización del material. En una realización preferida, las etapas c) y d) tienen lugar con agitación.

Un flujo continuo de dióxido de carbono a presión, según la etapa d) del procedimiento, acelera el proceso de esterilización. Dicho flujo puede ser suministrado, por ejemplo, por adición de dióxido de carbono a presión, a través de una bomba de líquido o un compresor
25 y controlado mediante una válvula micrométrica o un sistema backpressure de control manual o automático con lazo de control electrónico.

El dióxido de carbono empleado en la presente invención es sustancialmente puro, aunque la presencia de otros gases es tolerada, salvo que limiten la capacidad de esterilización, espumante o plastificante del dióxido de carbono.

30 En una realización preferida, la etapa d) tiene lugar con un flujo entre 2 y 50 g/min. Esta etapa sirve para eliminar paulatinamente el aditivo de esterilización hasta niveles residuales en el material tratado. Este flujo fue calculado para un autoclave de esterilización de 100 mL a 2 L de capacidad. Un experto en la materia es capaz de aumentar este caudal para

volúmenes de autoclave superiores, de manera que se obtengan tiempos medios de residencia del dióxido de carbono similares a los descritos anteriormente.

Para el caso de PLGA de viscosidad inherente inferior a 0,45 dL/g, la transición entre la etapa d) y la etapa d') se realiza por reducción de temperatura mediante aplicación de un flujo continuo de dióxido de carbono líquido. En una realización particular, la temperatura de la mezcla en el interior del autoclave está entre 10°C y 50°C, más particularmente entre 15°C y 45°C.

En una realización particular no es necesaria la etapa d') en continuo para obtener andamiajes porosos en condiciones estériles a partir de mezclas de PLGA de viscosidad inherente inferior a 0,45 dL/g y PCL a partir de una relación en peso PCL:PLGA del 50:50 p/p o fracción superior de PCL.

En otra realización particular, la proporción de PLGA o PCL está comprendida entre el 50% y el 99.9%.

El gas comprimido o fluido supercrítico en la etapa c), y el dióxido de carbono en la etapa d), interactúan con los polímeros actuando de plastificante y agente de hinchamiento, reduciendo así la temperatura de transición vítrea y/o la temperatura de fusión en el caso de que en la mezcla esté presente un poliéster sintético biodegradable. La cantidad de fluido absorbida durante el procesado y el consiguiente hinchamiento de la mezcla polimérica es proporcional a la temperatura y presión del medio de procesado.

La mezcla de la etapa e) se puede despresurizar y se puede enfriar de manera secuencial o conjunta para obtener el sistema estéril con consistencia sólida o semisólida y aspecto homogéneo. En el enfriamiento de manera secuencial, éste tiene lugar una vez alcanzada la presión atmosférica, mientras que en el enfriamiento de manera conjunta, la reducción de temperatura se inicia durante la despresurización. Durante la eliminación del dióxido de carbono, tiene lugar una inestabilidad termodinámica que conlleva la formación de volumen hueco (porosidad) por nucleación. Cuando el dióxido de carbono abandona la matriz, la temperatura de fusión o de transición vítrea aumenta por encima de la temperatura de trabajo y el andamiaje se vitrifica.

Durante la despresurización, según la etapa e) o e'), hasta presión atmosférica, la velocidad de desgasificación o despresurización influye en el tamaño de poro y la interconectividad del andamiaje final. La velocidad de enfriamiento durante la despresurización también influye en el tamaño de poro y la interconectividad del andamiaje final.

En una realización preferida, la velocidad de despresurización de la etapa e) se realiza de manera controlada en el rango de 1 a 50 bar/min, más preferiblemente en el rango de 3 a 25 bar/min, por ejemplo mediante una válvula micrométrica o un sistema backpressure de control manual o automático mediante lazo de control electrónico.

- 5 La resistencia a la expansión de los poros tras nucleación es muy baja para matrices poliméricas con componentes de baja viscosidad inherente (<0,45 dL/g), formándose poros muy grandes (superiores a un milímetro). En una realización particular, tras una despresurización parcial, se añade líquido comprimido frío. Esto permite enfriar el material y así reducir la viscosidad de la mezcla por descenso de temperatura y contener la expansión
- 10 de los poros. Dicho líquido comprimido ha de ser gaseoso a presión y temperatura ambiente. La adición del líquido comprimido durante la etapa e') se realiza bien de manera discontinua en el autoclave una vez reducida la presión en el autoclave a 25-50 bar, o bien de manera continua en el autoclave con un flujo de líquido comprimido durante toda la etapa.

En una realización según la invención, el líquido comprimido de la etapa e') es CO₂ líquido o N₂ líquido.

15

En una realización particular, la despresurización controlada en la etapa e') se realiza entre 1 a 19,5 bar/min, por ejemplo mediante una válvula micrométrica o un sistema backpressure de control manual o automático mediante lazo de control electrónico, para tener un mayor control sobre la distribución de tamaño de poro del material. Este procedimiento de la

20 invención está diseñado particularmente para la obtención de una matriz biodegradable, homogénea, de consistencia sólida o semisólida, de porosidad superior al 60% y morfología externa modulable por la forma y dimensiones del molde empleado, dicha matriz comprende PLGA de viscosidad inherente inferior a 0,45 dL/g, o una mezcla de PLGA de viscosidad inherente inferior a 0,45 dL/g y PCL.

25 Poniendo en práctica el procedimiento de la invención se obtienen sistemas estériles con una porosidad superior al 60% (ver ejemplos 2-5), que es una porosidad conveniente en implantes para la regeneración ósea. Para ello, es favorable emplear una matriz con propiedades texturales adecuadas para facilitar la adhesión, la penetración y la proliferación de células así como la neovascularización y difusión de gases y nutrientes a las células. Así,

30 resulta conveniente utilizar una matriz con porosidad análoga a la del hueso trabecular de entre 50 y 90%, preferiblemente próximo a su valor superior (*Karageorgiou V, Kaplan D, Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, Biomater. 2006, 26, 5474-5491*) (*Rezvan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR, Biodegradable and bioactive porous*

polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, Biomater. 2006, 27, 3413-3431).

Como resultado del procedimiento de la invención, se obtienen sistemas con poros cóncavos (ver ejemplos 2-5). Esta geometría de los poros es adecuada para la aplicación de los sistemas de la invención a regeneración de tejidos (*Zadpoor AA, Bone tissue regeneration: the role of scaffold geometry, Biomater. Sci., 2015, 3, 231-245*).

En una realización particular, la invención se refiere a una etapa adicional al procedimiento descrito, que comprende la formación de implantes: el sistema enfriado se puede dividir en porciones por corte. En una realización aún más particular, la eliminación de una película externa fina, densa y no porosa puede ser necesaria antes de ser utilizada para propósitos de implantación.

En una realización particular, el procedimiento según se ha descrito anteriormente da lugar además a la formación de un andamiaje como un implante monolítico. La invención proporciona un método para procesar materiales cuya integridad física y mecánica es modulable bajo las condiciones de procesado hasta obtener materiales porosos por espumado y, opcionalmente, de morfología externa a medida mediante el empleo de moldes. El procedimiento al que se refiere la invención se basa en que, simultáneamente con el proceso de esterilización, ocurre la fusión o el calentamiento de la mezcla polimérica por encima de la temperatura de transición vítrea de PLGA o de la temperatura de fusión del PCL, o de la mezcla polimérica conteniendo PLGA y PCL o de la mezcla conteniendo al menos uno de estos dos biopolímeros en el caso de que hubiese componentes adicionales como se ha descrito arriba.

Los sistemas obtenidos son adecuados como implantes capaces de proporcionar una cesión de sustancias biológicamente activas ajustables a requerimientos específicos.

En otro aspecto, la invención se refiere a un implante o un andamiaje obtenible según el procedimiento de la invención.

En otro aspecto, al uso del implante de la invención o del andamiaje de la invención, para la fabricación de un medicamento.

En una realización preferida, la invención se dirige al uso de un implante o un andamiaje como los definidos anteriormente para la cesión de sustancias biológicamente activas, y para la prevención de infecciones en la región de implantación.

A continuación, para una mejor comprensión de la invención se proporcionan los siguientes ejemplos, sin que éstos supongan una limitación a la invención.

Ejemplo 1. Eficacia del tratamiento de esterilización frente a endosporas de bacterias

La eficacia del tratamiento de esterilización fue evaluada empleando tiras de esporas
5 conteniendo 10^6 esporas de *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 7953) (Sigma-Aldrich, Inc.), *Bacillus pumilus* (ATCC 27142) (Sigma-Aldrich, Inc.) y *Bacillus atrophaeus* (cell line 9372) (Crosstex International, Inc.). Las tiras de esporas se pusieron dentro de bolsas de esterilización, se termosellaron para introducirlas en un autoclave de esterilización de acero inoxidable de 100 mL (Thar Process) equipado con agitación mecánica superior. Se añadió
10 H_2O_2 como aditivo en el fondo del autoclave antes de su cierre, en contenidos entre 600 y 1200 ppm según Tabla 1, y sin contacto físico con las tiras de esporas. El sistema se calienta a $39^\circ C$ y se presuriza con un flujo de CO_2 de 13,3 bar/min hasta alcanzar 140 bar. Dependiendo del ensayo y según Tabla 1, estas condiciones de procesado se mantuvieron en modo de operación en discontinuo (discontinuo en Tabla 1) y agitación de 700 rpm por un
15 cierto periodo de tiempo comprendido entre 0 y 5 horas o combinado con un posterior periodo con flujo continuo de CO_2 a 5 g/min (continuo en Tabla 1) a través del autoclave por un cierto periodo de tiempo comprendido entre 0 y 5 horas. Posteriormente el sistema se despresurizó hasta alcanzar la presión atmosférica a una velocidad de 3,2 bar/min.

La eficacia del proceso de esterilización y los niveles SAL-6 fueron evaluados
20 cualitativamente mediante evaluación visual de turbidez de las suspensiones de las tiras en 10 mL en medio líquido caldo de triptona-soja tras 7 y 14 días de incubación (Raypa Digital Incubators) en ausencia de agitación y a las temperaturas de incubación recomendadas ($37^\circ C$ para *B. pumilus* y *B. atrophaeus*, y $60^\circ C$ para *B. stearothermophilus*). Además, la ausencia de crecimiento bacteriano se comprobó mediante siembra de 1 mL de estas suspensiones
25 bacterianas tras 7 y 14 días de incubación en medio de cultivo agar triptona-soja y conteo de colonias microbianas formadas. El empleo de un cierto tiempo en dinámico con flujo de CO_2 redujo el tiempo del tratamiento para obtener niveles SAL-6 frente a ciertas especies del género *Bacillus* (Test #5 y #9, Tabla 1).

Tabla 1

Esterilización SAL-6 frente a endosporas						
Test	Modo operación	Tiempo (h)	Contenido	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
			H ₂ O ₂ (ppm)	<i>stearothermophilus</i>	<i>pumilus</i>	<i>atropheus</i>
#1	Discontinuo	2,5	600	-	-	Sí
#2	Discontinuo	5	600	Sí	-	Sí
#3	Discontinuo	5	1200	Sí	Sí	Sí
#4	Discontinuo	2,5	1200	Sí	Sí	Sí
#5	Discontinuo	2	1200	-	-	Sí
#6	Continuo	5	0	-	-	-
#7	Continuo	5	1200	Sí	Sí	Sí
#8	Continuo	2,5	1200	Sí	Sí	Sí
#9	Continuo	2	1200	Sí	-	Sí
#10	Combinado	2,5h discontinuo + 2,5h continuo	1200	Sí	Sí	Sí
#11	Combinado	2h discontinuo + 1h continuo	1200	Sí	Sí	Sí
#12	Combinado	2h discontinuo + 0,5h continuo	1200	-	-	Sí

Ejemplo 2. Esterilización y espumado de andamiajes de PCL mediante CO₂ comprimido.

5 Partículas de PCL fueron pesadas (1 g) y dosificadas en un molde cilíndrico (longitud= 24.6 mm, diámetro interno= 17 mm) de Teflon (Brand GmbH). El molde se colocó dentro de un autoclave de acero inoxidable de 100 mL (Thar Process). También se añaden 1200 ppm de peróxido de hidrógeno en el fondo del autoclave y sin contacto físico con el molde. El sistema se calienta a 39°C y se presuriza con un flujo de CO₂ de 13,3 bar/min hasta alcanzar 140 bar. Estas condiciones de procesado se mantuvieron bajo agitación de 700 rpm en modo combinado de operación primero en discontinuo y después en continuo con flujo de CO₂ a 5 g/min a través del autoclave por un periodo de a) 5 y 0 horas, b) 2,5 y 2,5 horas, y c) 0 y 5 horas, respectivamente. Posteriormente, el sistema se despresurizó hasta alcanzar la presión atmosférica a una velocidad de 3,25 bar/min. En el caso a), se encontraron residuos líquidos de H₂O₂ en el fondo del autoclave. En los casos b) y c) en los que se empleó una etapa de flujo continuo de CO₂, se obtuvo la matriz porosa seca y no se observaron restos líquidos de H₂O₂ en el autoclave.

Se observa (Figura 1) que en estas condiciones de procesado se obtienen en todos los casos materiales porosos de apariencia homogénea, 65-75% de porosidad total, con poros cóncavos y con morfología externa modulada por el molde que lo contiene, y así la estructura del material obtenido en los casos a), b) y c) es comparable. Por lo tanto, se demuestra que la etapa de flujo continuo de CO₂ empleada en los casos b) y c) no influye negativamente en la morfología de la matriz obtenida.

La obtención de niveles de esterilidad SAL-6 fue confirmada mediante la incorporación de tiras de bioindicadores de *B. pumilus*, *B. atrophaeus* y *B. stearothermophilus* en el autoclave y mediante monitorización de variables físicas (presión, temperatura y flujo de CO₂).

10 **Ejemplo 3.** Esterilización, moldeado y espumado de andamiajes de PCL con Rhodamina B, vancomicina hidrocloreuro y almidón pregelificado mediante CO₂ comprimido.

Se repiten las condiciones experimentales del ejemplo 2b para mezclas pulverulentas de i) PCL conteniendo Rhodamina B en proporciones 99,5:0,5 en peso, ii) PCL conteniendo vancomicina hidrocloreuro en proporciones 95:5 en peso, iii) PCL conteniendo almidón pregelificado y vancomicina hidrocloreuro en proporciones 85:10:5 en peso, y iv) vancomicina hidrocloreuro.

Se observa (Figura 2) para los casos i, ii y iii que a estas condiciones de procesado se obtienen materiales porosos de apariencia homogénea, 75-78 % de porosidad total, con poros cóncavos y con morfología externa modulada por el molde que lo contiene. Los rendimientos de carga del proceso son próximos al 100% según análisis gravimétrico.

Los perfiles de cesión de vancomicina presentan dos etapas diferenciadas (Figura 3). Una liberación inicial rápida tipo *burst* durante las primeras horas de cesión (*ca.* 4 horas), seguida de una liberación más lenta que se prolonga hasta alcanzar tiempos superiores a 14 días. La presencia del almidón pregelificado actúa como agente modulador de cesión, favoreciendo la liberación del fármaco desde la matriz polimérica. La vancomicina hidrocloreuro no se ve alterada respecto a su forma cristalina (Figura 4).

La obtención de niveles de esterilidad SAL-6 fue confirmada mediante la incorporación de tiras de bioindicadores de *B. pumilus*, *B. atrophaeus* y *B. stearothermophilus* en el autoclave y mediante monitorización de variables físicas (presión, temperatura y flujo de CO₂).

30 **Ejemplo 4.** Esterilización y espumado de andamiajes de PCL-PLGA de baja viscosidad inherente mediante CO₂ comprimido.

Una mezcla pulverulenta de PLGA:PCL en proporciones en peso 50:50 fue pesada (1 g) y dosificada en molde cilíndrico (longitud= 24.6 mm, diámetro interno=17 mm) de Teflon (Brand GmbH). El molde se coloca dentro de un autoclave de acero inoxidable de 100 mL (Thar Process) provisto de agitación (700 rpm). También se añaden 1200 ppm de peróxido de hidrógeno en el fondo del autoclave y sin contacto físico con el molde. El sistema se calienta a 39°C y se presuriza con un flujo de CO₂ de 13,3 bar/min hasta alcanzar 140 bar. Estas condiciones de procesamiento se mantuvieron en modo de operación en discontinuo por un periodo de tiempo de 2 horas, seguido de un flujo continuo de CO₂ a 5g/min durante 1 hora. Posteriormente el sistema se despresurizó hasta alcanzar la presión de 60 bar a una velocidad de 3,25 bar/min. Un flujo de CO₂ líquido a 4°C (20 g/min) durante 15 minutos redujo la temperatura del autoclave a 26°C. Tras mantener el autoclave a 60 bar y 26°C durante 60 minutos, el sistema se despresurizó hasta 38 bar a una velocidad de 20 bar/min y se añadió CO₂ líquido para aumentar la presión hasta 60 bar de nuevo. Se realizó este ciclo de despresurización hasta 38 bar y represurización con CO₂ líquido hasta 60 bar otras dos veces. Finalmente, el sistema se despresurizó hasta alcanzar la presión atmosférica a una velocidad de 20 bar/min.

Se observa (Figura 5) que en estas condiciones de procesamiento se obtienen sistemas estériles en forma de materiales porosos de apariencia homogénea, 71% de porosidad total, con poros cóncavos y con morfología externa modulada por el molde que lo contiene.

La obtención de niveles de esterilidad SAL-6 fue confirmada mediante la incorporación de tiras de bioindicadores de *B. pumilus*, *B. atrophaeus* y *B. stearothermophilus* en el autoclave y mediante monitorización de variables físicas (presión, temperatura y flujo de CO₂).

La presencia de H₂O₂ residual en el material tratado se evaluó de manera indirecta mediante un test de citotoxicidad. Siguiendo la norma ISO10993-5:2009, se emplearon fibroblastos como línea celular modelo. El material se puso en contacto directo con las células durante 72 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂. Las células expuestas al material presentaron idénticos niveles de viabilidad celular a los obtenidos en células sin contacto con material (controles) (Figura 6).

Ejemplo 8. Ensayos de espumado, moldeo externo y esterilización integrados de PCL con CO₂ comprimido empleando moldes personalizados

Ensayos realizados bajo las mismas condiciones experimentales que el ejemplo 3 para mezcla pulverulenta de PCL conteniendo Rhodamina B en proporciones 99,5:0,5 en peso, en moldes de PLA procesados en diferentes morfologías externas personalizadas mediante

ES 2 808 994 B2

manufactura aditiva mediante la técnica Fused Filament Fabrication (FFF). Se observa como tras el tratamiento los sistemas estériles de materiales porosos obtenidos son de apariencia homogénea, 70% de porosidad total, con poros cóncavos y con morfología externa modulada por el molde que lo contiene. El material obtenido se adapta a la forma del molde
5 independientemente de los ángulos de inclinación en el eje yz (Figura 7).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de esterilización para obtener una matriz porosa estéril, homogénea, de consistencia sólida o semisólida, de porosidad superior al 60%, que comprende ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) y/o poli(epsilon-caprolactona), que comprende:

- 5 a) introducir una mezcla física de ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) y/o poli(epsilon-caprolactona) en el interior de un autoclave, y un aditivo de esterilización en concentraciones de entre 100 y 3000 ppm;
- b) calentar el sistema a una temperatura comprendida entre 20 y 40°C;
- 10 c) introducir en el autoclave un gas comprimido o fluido supercrítico a una presión de entre 40 y 300 bar y a una temperatura de entre 20 y 40°C, y mantener un modo de operación discontinuo en estas condiciones de presión y temperatura entre 5 minutos y 24 horas;
- d) pasar un flujo continuo de CO₂ de 2 a 500 g/min a través del autoclave que se mantiene a una presión de entre 40 y 300 bar y a una temperatura de entre 20 y 40°C,
- 15 e) despresurizar de manera controlada a una velocidad de entre 1 y 25 bar/min hasta presión atmosférica,

con la condición de que si el material a esterilizar de la etapa a) es una mezcla física de ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) con una viscosidad inherente inferior a 0,45 dL/g, o es una

20 mezcla física de ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) con una viscosidad inherente inferior a 0,45 dL/g y poli(epsilon-caprolactona), el procedimiento además comprende:

- una etapa d') posterior a la etapa d) y anterior a la etapa e), que comprende pasar un flujo continuo de CO₂ líquido a una temperatura de 4°C o inferior, de 2 a 500 g/min a través del autoclave que se mantiene a una presión de entre 40 y 300 bar,
- 25 entre 5 minutos y 24 horas; y
- una etapa e') que sustituye a la etapa e), que comprende la despresurización controlada a una velocidad de entre 1 y 19,5 bar/min con enfriamiento mediante la adición de un líquido comprimido, que es gaseoso a 25°C y 1 atmósfera de presión, a una temperatura de entre -196° y 19°C, hasta presión atmosférica.

30 2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además la adición de una sustancia biológicamente activa en la etapa a).

ES 2 808 994 B2

3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el fluido supercrítico es dióxido de carbono.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde en la etapa a) el material está contenido en un molde.
- 5 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el aditivo de esterilización es peróxido de hidrógeno.
6. Implante o andamiaje caracterizado por ser una matriz porosa estéril, homogénea, de consistencia sólida o semisólida, de porosidad superior al 60%, que comprende ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) y/o poli(epsilon-caprolactona) obtenible según cualquiera de
10 las reivindicaciones 1-5.

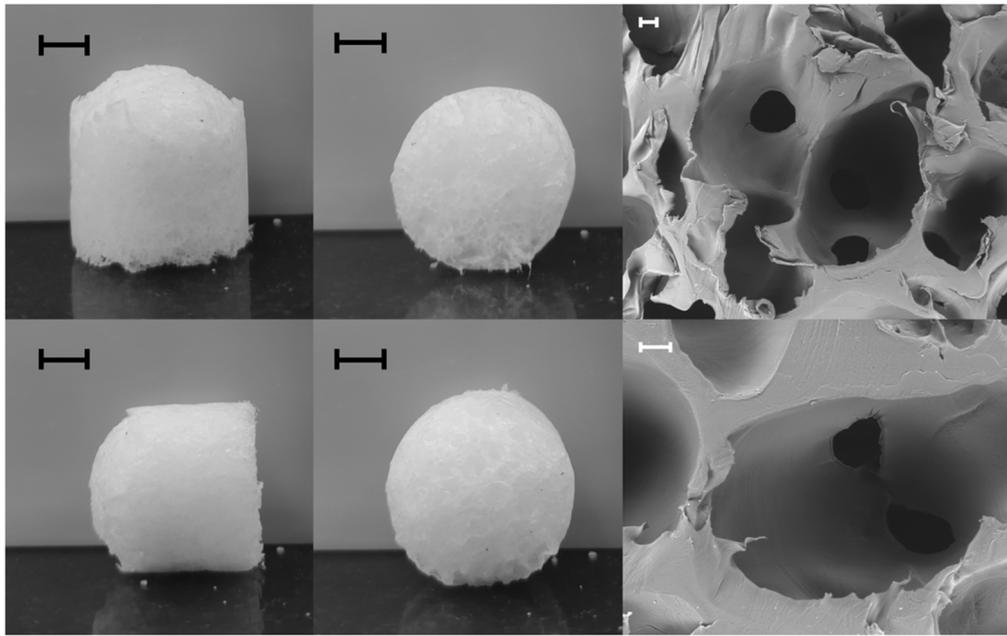


Figura 1 (a)

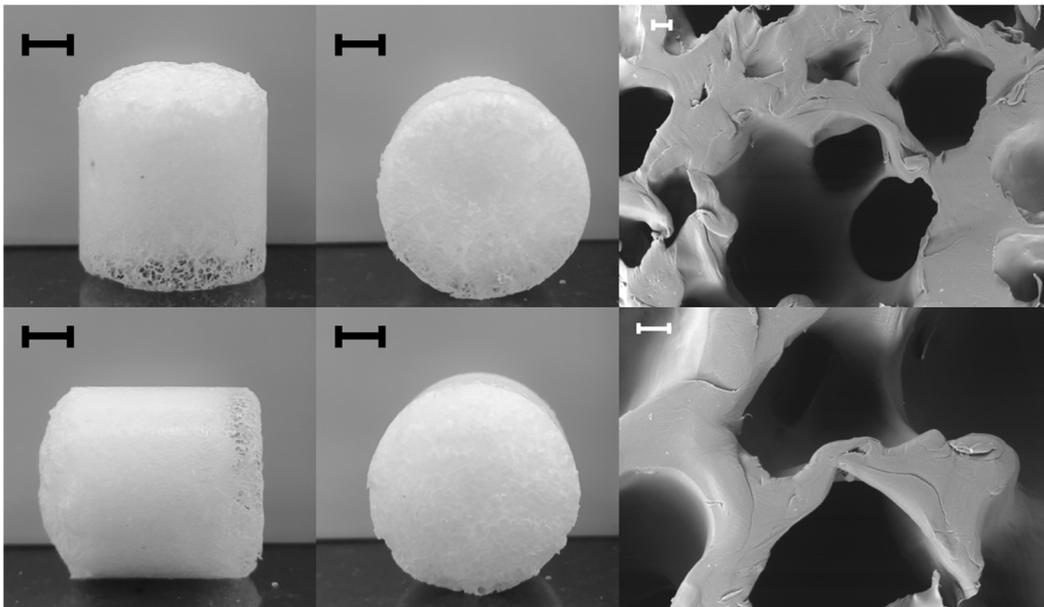


Figura 1 (b)

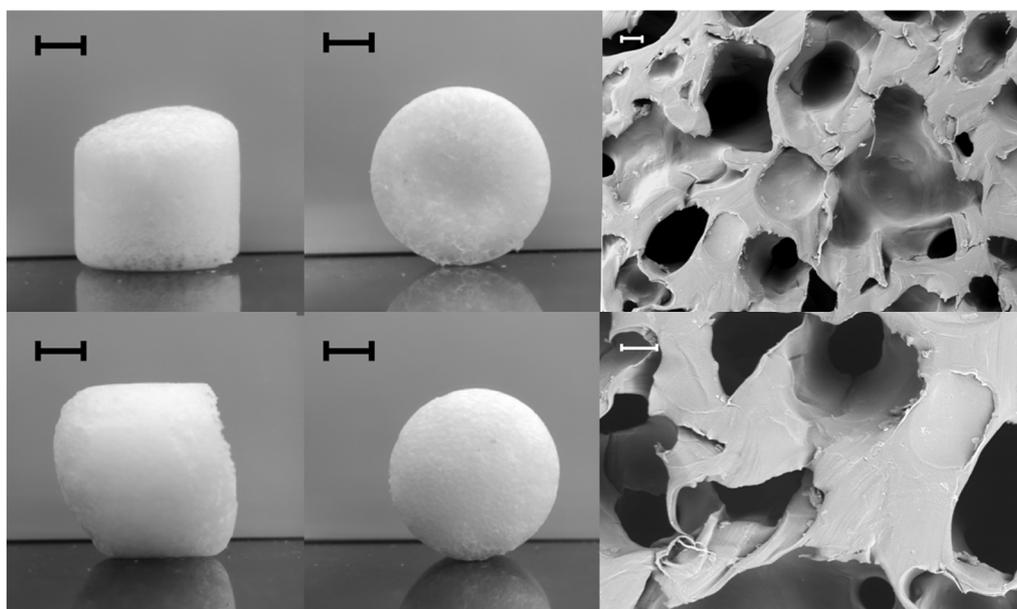


Figura 1 (c)

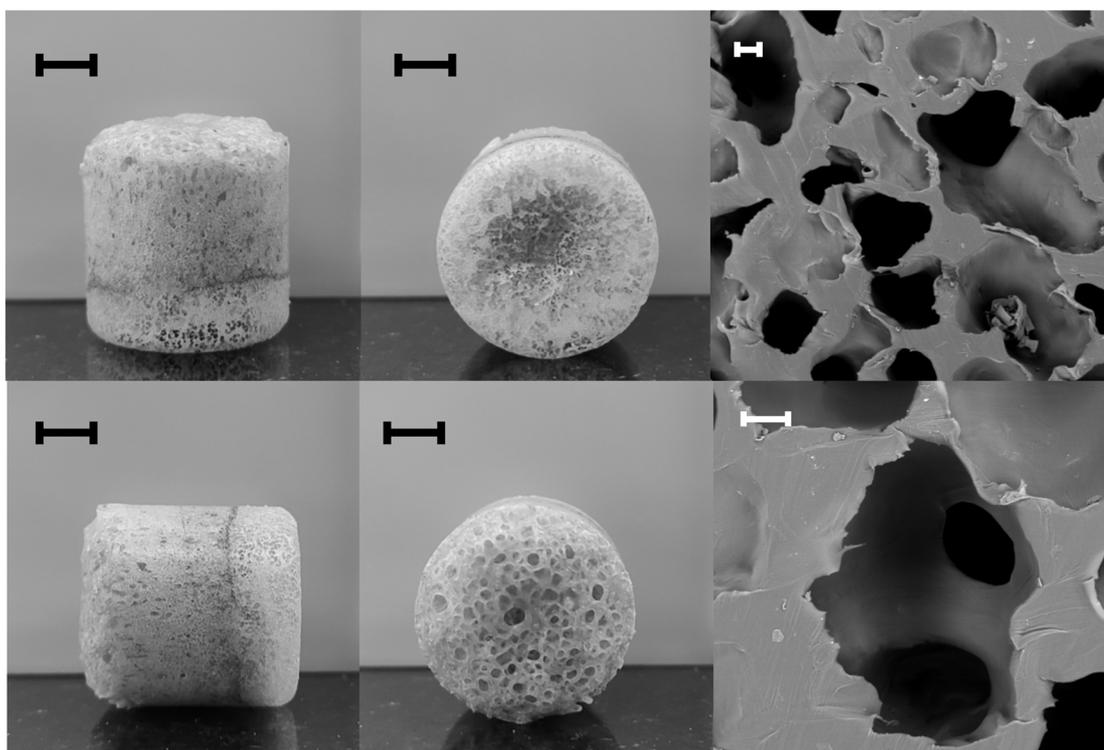


Figura 2 (a)

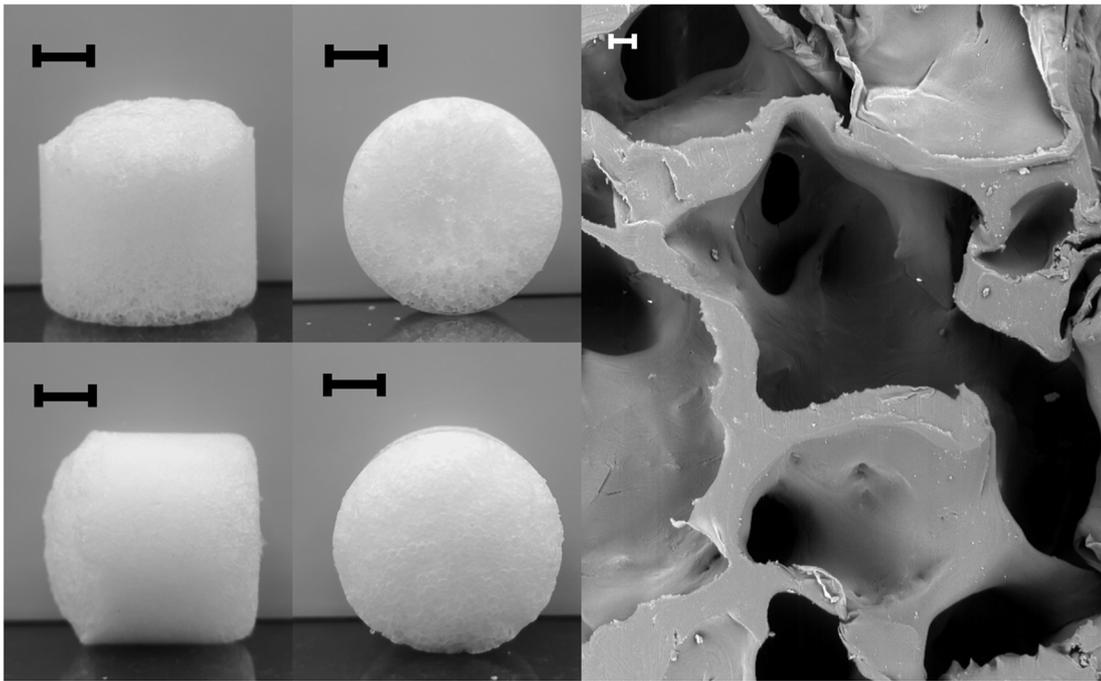


Figura 2 (b)

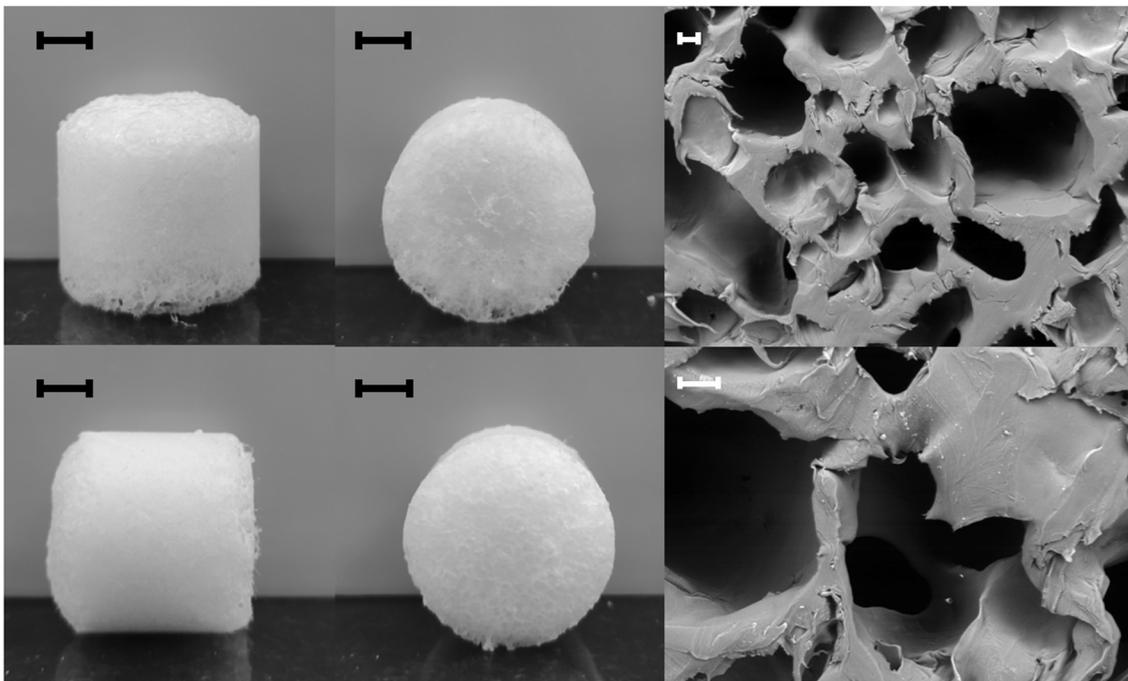


Figura 2 (c)

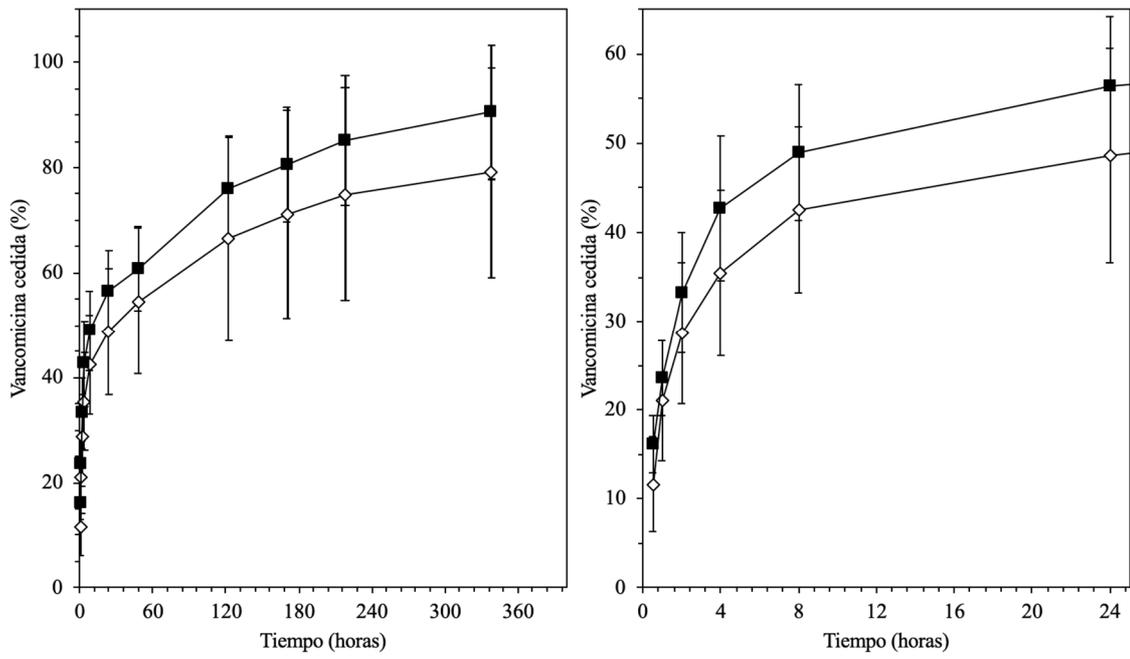


Figura 3

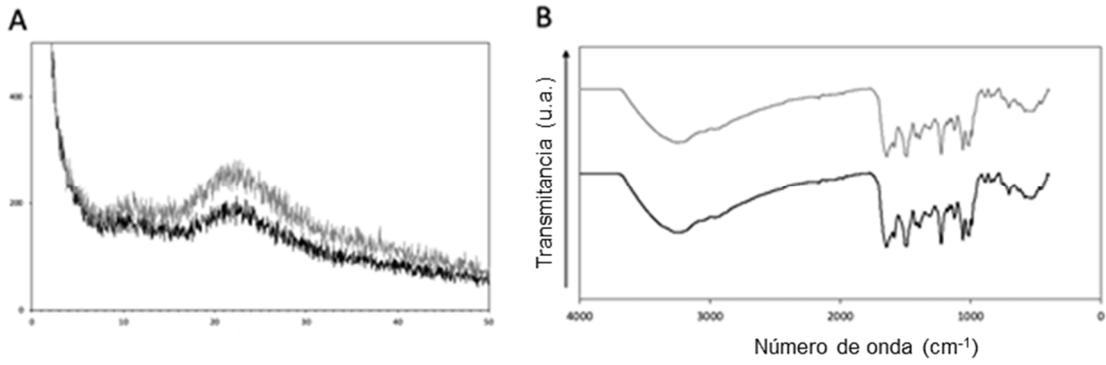


Figura 4

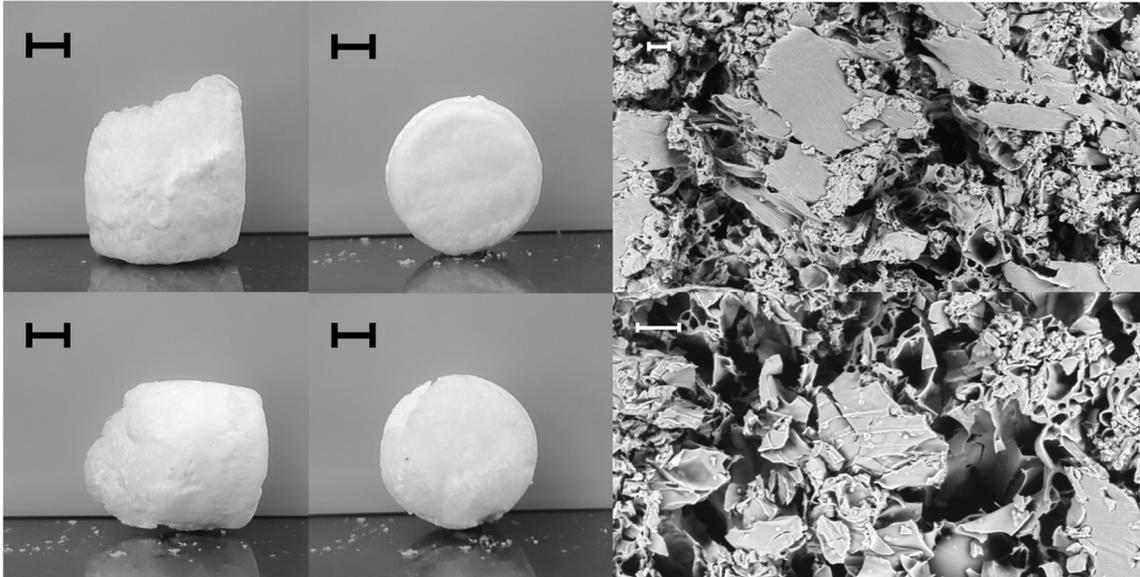


Figura 5

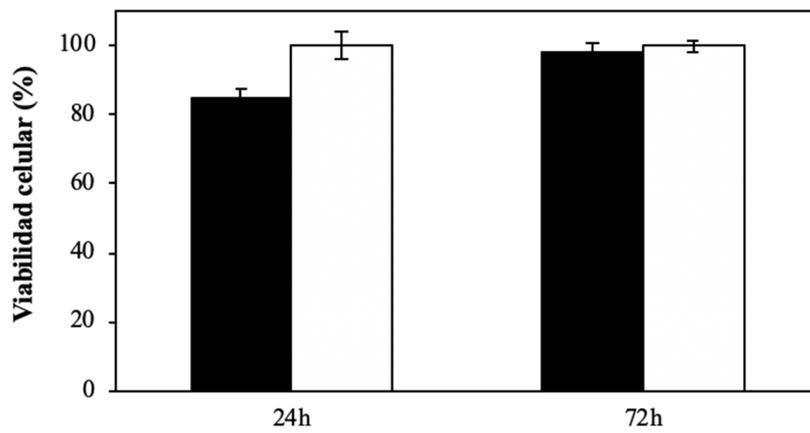


Figura 6

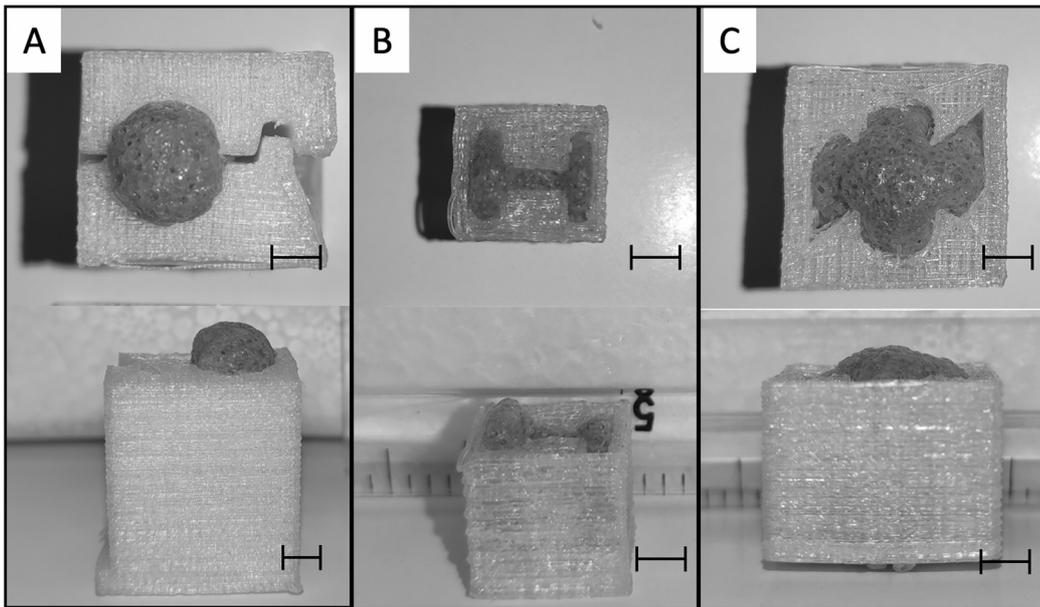


Figura 7