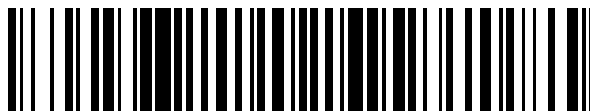


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 918 000**

21 Número de solicitud: 202230220

51 Int. Cl.:

A61B 17/56 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

16.03.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

13.07.2022

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

28.02.2024

Fecha de concesión:

13.03.2024

45 Fecha de publicación de la concesión:

20.03.2024

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(85.0%)**

AVENIDA DE SENECA, 2

28040 MADRID (Madrid) ES y

FUNDACION PARA LA INVESTIGACION

BIOMEDICA DEL HOSPITAL GREGORIO

MARAÑON (15.0%)

72 Inventor/es:

SERRANO LOPEZ, Dolores Remedios;

YUSTE SOSA, Ivan;

LUCIANO DE LEÓN, Francis Cristina;

BALLESTEROS PAPANTONAKIS, María Paloma;

GONZALEZ BURGOS, Elena;

SANZ RUIZ, Pablo y

RIBED SANCHEZ, Almudena

54 Título: **IMPLANTES PERSONALIZADOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA PARA PREVENIR Y TRATAR INFECCIONES ÓSEAS**

57 Resumen:

Implantes personalizados con actividad antimicrobiana para prevenir y tratar infecciones óseas.

Los actuales tratamientos de infecciones de localización quirúrgica causadas por hongos o bacterias con antibióticos y antifúngicos, suelen estar basados en la administración intravenosa prolongada o el uso de cementos de polimetilmetacrilato tras retirar la prótesis y limpiar los tejidos circundantes, lo cual hace necesario otro proceso quirúrgico. Sin embargo, sería más deseable un sistema de administración que evite una alta exposición corporal al antimicrobiano y que el paciente deba someterse a una nueva cirugía.

La presente invención describe implantes impresos en 3D con polímeros biocompatibles y biodegradables que comprenden fármacos con una liberación inmediata — sostenida con un perfil hemolítico reducido, que son fácilmente adheribles a las prótesis, presentan un buen perfil de eficacia in vitro frente a diferentes cepas de hongos y bacterias y pueden ser esterilizados mediante la acción de luz UV debido a su fino grosor.

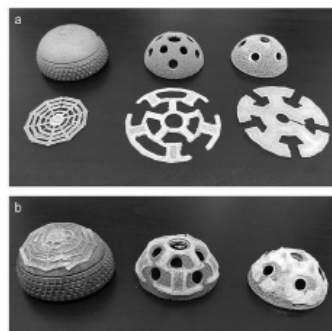


Figura 1

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).

ES 2 918 000 B2

DESCRIPCIÓN

Implantes personalizados con actividad antimicrobiana para prevenir y tratar infecciones óseas

5 Sector de la técnica

La presente invención se encuadra en el campo técnico de la fabricación de medicamentos de administración parenteral con aplicación en traumatología para el tratamiento y la prevención de infecciones óseas. De forma más concreta, se refiere al diseño y fabricación de implantes personalizados impresos en 3D cargados con fármacos antimicrobianos.

Antecedentes de la invención

Las cirugías ortopédicas frecuentemente involucran la colocación de un cuerpo extraño, como una articulación protésica, componentes articulares u otros para estabilizar estructuras óseas o reparar fracturas. Estos implantes pueden facilitar la infección, ya sea por contaminación directa o por diseminación hematógena de microorganismos. La infección de localización quirúrgica (ILQ) representa el 30% de todas las causas de infecciones relacionadas con la atención sanitaria (IRAS).

Actualmente, los tratamientos más comunes empleados para tratar estas infecciones son la administración de antibióticos durante periodos de tiempo prolongados y el uso de cementos de polimetilmetacrilato (PMMA) cargados con antibióticos, tras retirar los implantes y limpiar los tejidos circundantes. Los cementos cargados con antibióticos consiguen, en una primera fase, una alta concentración local temprana de antibióticos que es seguida por una segunda fase en la que los fármacos se liberan lentamente durante varios días e incluso meses.

Se han desarrollado cementos de PMMA cargados con un único antibiótico (como vancomicina, gentamicina, ciprofloxacino, entre otros). Los PMMA cargados con dos antibióticos se encuentran, actualmente, en fase de ensayos clínicos y la interacción en la liberación de fármacos sigue siendo un desafío sin resolver. Por otra parte, hasta la fecha no hay disponible comercialmente un cemento de PMMA cargado con un antifúngico, lo cual limita su aplicación en el tratamiento de infecciones causadas por hongos a este nivel. Los principales inconvenientes ligados al uso de cementos cargados con antimicrobianos son que, para ciertos fármacos (especialmente los lipofílicos), la administración del fármaco desde el cemento óseo es insuficiente después de la cirugía, lo cual da lugar a una liberación de antibiótico muy baja y, por tanto, a un alto riesgo de resistencia a microorganismos. Una segunda limitación es el hecho de que las propiedades biomecánicas de la articulación pueden alterarse al incorporar el fármaco y la resistencia a la compresión del cemento se reduce, comprometiendo la vida del paciente. Con el objeto de salvar estos inconvenientes, se han propuesto otras alternativas como el uso de taurolidina para tratar infecciones óseas (EP0139534), la administración parenteral de partículas poliméricas recubiertas de antibióticos (US2010/0291220), la liberación sostenida de iones plata mediante un implante (US9248254) o la aplicación in situ de microesferas biodegradables que liberan un antibiótico de forma controlada (US8986737). Pero en la mayoría de los casos, sigue existiendo un problema de bioadhesión a la prótesis articular, problemas de osteointegración y citotoxicidad y bajo control en la liberación del antibiótico, sin existir ninguna terapia dual que actúe frente a bacterias y hongos.

Por todo ello, sigue existiendo la necesidad de estrategias novedosas para reducir las IRAS mediante sistemas versátiles con capacidad de contener más de un antibiótico o combinar antibióticos y antimicóticos para cubrir un amplio espectro de infecciones. Estos sistemas no deben alterar las propiedades biomecánicas de la articulación e, idealmente, deben poder

colocarse externamente en la parte superior de la prótesis con grosor milimétrico, de manera que no obstaculicen el procedimiento quirúrgico.

Explicación de la invención

5

La presente invención describe un sistema de liberación inmediata-controlada con acción antibacteriana y antimicótica individual o combinada para el tratamiento de IRAS. Estas formulaciones constituyen una solución al problema clínico de la falta de medicamentos disponibles para el tratamiento y la profilaxis de infecciones de prótesis articular causadas por

10 agentes patógenos exógenos o aquellos que forman parte de la flora microbiana de la piel del paciente y que, durante el acto quirúrgico, contaminan las prótesis implantadas.

De forma más concreta, se presenta un sistema de liberación controlada de fármacos de administración parenteral basado en un implante de morfología en tela de araña o similar, fabricado mediante impresión 3D, con un perfil de liberación complementario (liberación

15 inmediata-sostenida) para prevenir y tratar infecciones, tanto agudas como retardadas en el tiempo. Se ha seleccionado la anfotericina B (AmB) como antifúngico modelo, que actualmente se utiliza como *gold-standard* para el tratamiento de las infecciones fúngicas sistémicas, y vancomicina como agente antibacteriano de amplio espectro; estos pueden ser administrados

20 directamente durante el acto quirúrgico.

Un primer aspecto de la invención se refiere al diseño y fabricación de implantes parenterales en forma de tela de araña (*spiderwebs*) adaptados de forma personalizada al componente acetabular o cotilo de prótesis como cadera, rodilla o válvulas cardiacas, por ejemplo. Estos

25 implantes tienen unas dimensiones milimétricas y están compuestos de materiales biocompatibles y biodegradables (por ejemplo alcohol polivinílico polietilenglicol, policaprolactona o mezcla de ellos). El diseño de la red facilita la osteointegración, al contener espacios de al menos, 100 μm . Además, tienen capacidad adhesiva tras la humectación en medios acuosos, pudiendo ser adheridos sobre las prótesis articulares en minutos. Las redes

30 permiten conseguir una buena liberación inmediata (*burst effect*) combinada con un perfil sostenido de liberación de agentes antimicrobianos (especialmente durante las primeras 24 h post-implantación) presentando una óptima eficacia anti-infecciosa, tanto frente a hongos como frente a bacterias. Dichas redes, además, pueden esterilizarse mediante luz UV sin que esto

35 dañe su estructura o composición, debido a su fino grosor.

Las redes pueden fabricarse mediante cualquier técnica de impresión 3D, especialmente técnicas de deposición de material fundido conocidas como FDM (*Fused Deposition Modeling*) o mediante extrusión directa de polvo. En el primer caso se utilizan filamentos previamente fabricados mediante extrusión en caliente con polímeros biocompatibles; una vez impresa la red,

40 esta se carga mediante difusión pasiva con los agentes anti-infecciosos. En el caso de la extrusión directa, se parte del excipiente y fármaco en estado pulverulento previamente mezclado y homogeneizado. Las redes también pueden fabricarse mediante técnicas con láser como la estereolitografía y el sinterizado láser.

45 Breve descripción de los dibujos

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha

50 representado lo siguiente:

Figura 1. Diseños de los implantes en forma de red, impresos en 3D y su adhesión a la prótesis: (a) Implantes fabricados mediante FDM adaptados a la geometría de diferentes tipos de cotilo hechos a base de alcohol polivinílico (PVA) parcialmente saponificado (> 94,8%) con fragmentos de polietilenglicol (PEG); (b) redes adheridas a la superficie de los cotos tras su humectación previa con agua.

Figura 2. Implantes impresos en 3D mediante extrusión directa de polvo consistente en una mezcla de policaprolactona (PCL) y PEG: (a) redes impresas con un 70% de PCL y un 30% de PEG; (b) redes impresas con un 80% de PCL y un 20% de PEG; (c) redes impresas con un 90% de PCL y un 10% de PEG.

Figura 3. Proceso de carga mediante difusión pasiva con vancomicina y AmB de las redes fabricadas mediante FDM.

Figura 4. Efecto de la esterilización mediante luz UV en el contenido de AmB y vancomicina en un implante impreso en 3D para redes cargadas con vancomicina, cargadas con AmB o cargadas con vancomicina y AmB, antes de haber sido expuestas a luz UV y después de 20 minutos de exposición. (a) redes cargadas con vancomicina; (b) efecto en la vancomicina para redes cargadas con vancomicina y AmB. (c) redes cargadas con AmB; (d) efecto en la AmB para redes cargadas con vancomicina y AmB. Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) están expresadas mediante *.

Figura 5. Liberación de los principios activos tras la adhesión de la red al cotilo de la prótesis y su posterior inmersión en medio fisiológico (PBS, pH = 7, 4): (a) implantes cargados sólo con vancomicina; (b) implantes cargados solo con AmB; (c) vancomicina liberada en implantes cargados con vancomicina y AmB; (d) AmB liberada en implantes cargados con vancomicina y AmB.

Figura 6. Toxicidad hemolítica de implantes cargados solo con vancomicina (Implante V), vancomicina disuelta en DMSO, implantes cargados solo con AmB (Implante A), AmB disuelta en DMSO, implantes cargados con ambos fármacos (Implante V + A), vancomicina y AmB en DMSO, e implantes sin cargar. Se expresa el porcentaje de hemólisis observado a la máxima concentración evaluada con cada fármaco en los implantes, en comparación con concentraciones similares de principio activo disuelto en DMSO.

Figura 7. Actividad *in vitro* antifúngica de los implantes cargados con AmB y AmB disuelta en DMSO frente a diferentes especies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*). Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0, 5$) están expresadas mediante *. Un halo de inhibición superior a 1,5 cm indica que el microorganismo es susceptible al fármaco; sin embargo, un halo inferior a 1 cm de diámetro indica que el microorganismo es resistente al fármaco de acuerdo con las guías CLSI (*Clinical Laboratory Standard Institute*). Halos de inhibición intermedios indican que el microorganismo es susceptible dependiendo de la dosis utilizada.

Figura 8. Actividad *in vitro* antibacteriana frente a *Staphylococcus epidermis* de discos comerciales de vancomicina (control, 30 μ g), de la red cargada con vancomicina, la red sin cargar (control), la red cargada con DMSO; y DMSO puro como control 100%. Las diferencias estadísticas significativas ($p < 0, 5$) están expresadas mediante*. Un halo de inhibición superior a 1,5 cm indica que el microorganismo es susceptible al fármaco según las guías CLSI.

Realización preferente de la invención

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

5 **Ejemplo 1.** Este ejemplo se refiere al diseño e impresión 3D de los implantes a partir de un filamento siguiendo el método FDM (Figura 1).

10 En primer lugar, se toman las medidas de diferentes cotilos para, posteriormente, poder hacer un diseño que se ajuste a cada uno de ellos mediante un programa de CAD (*Computer Aided Design*), como *Tinkercad* o *Solid Works*. En el caso de cotilos totalmente sólidos, se diseña una estructura en forma de tela de araña con varios brazos que permiten una mejor adhesión al cotilo y con cierta separación entre las fibras de las redes, al menos 100 μm , para asegurar la posterior osteointegración.

15 Para imprimir los implantes en 3D se puede emplear cualquier impresora FDM y en este caso se ha utilizado una impresora *Hyrel 3D Engine SR* (Georgia, USA), con una boquilla de extrusión de apertura 0,5 mm; se utiliza un filamento compuesto de alcohol polivinílico (PVA) parcialmente saponificado (>94,8%) con fragmentos de polietilenglicol (PEG). La temperatura del extrusor (MK1-250) osciló en el rango de 210-215°C y la temperatura de la plataforma se mantiene en 20 70°C para asegurar una buena adhesión del diseño 3D a la misma.

La altura de la red se optimizó en 1 mm para favorecer la carga de fármaco en su interior.

25 En la Figura 1 se aprecia cómo la red diseñada e impresa se ajusta perfectamente a las dimensiones del cotilo, lo cual demuestra que puede ser personalizada para cualquier prótesis en base a las necesidades del paciente.

30 **Ejemplo 2.** Este ejemplo se refiere a la adhesión de los implantes a sus respectivos cotilos (Figura 1).

35 Para adherir los implantes de PVA y PEG descritos en el ejemplo 1, estos se sumergen durante unos segundos en agua desionizada, hasta que adquieren textura pegajosa. Posteriormente, se colocan sobre el cotilo ejerciendo una leve presión (consiguiendo así que se adapten a la superficie convexa del mismo) y manteniendo la presión hasta que se fije por completo. Esto pone de manifiesto el carácter adhesivo a la superficie del cotilo de las redes fabricadas en cuestión de minuto, lo que es de especial interés para poder ser implantadas en el tiempo más breve posible durante una operación quirúrgica.

40 **Ejemplo 3.** Este ejemplo se refiere al diseño a impresión 3D de los implantes a partir de una mezcla de polímeros pulverulentos utilizando la tecnología de impresión 3D de extrusión directa con polvo (Figura 2).

45 Se preparan 10 gramos de una combinación de PCL y PEG con diferentes proporciones en peso (90:10, 80:20 y 70:30). La mezcla de los dos polímeros se microniza con un molino de cuchillas hasta obtener un polvo fino y homogéneo que es tamizado previa a la impresión.

50 Para imprimir los implantes se utiliza una impresora *Hyrel 3D Engine SR* (Georgia, USA) y un extrusor KR2-15 con una boquilla de extrusión de apertura de 0,5 mm. Este extrusor tiene un cilindro hueco donde se carga el material pulverulento. Una vez lleno con la mezcla de los polímeros, se acopla al extrusor y a la impresora, calentándolo hasta 75°C. La temperatura de la

cama es de 55°C. En estas condiciones, el flujo de polímero fundido a través de la boquilla extrusora permite imprimir con alta resolución los implantes 3D.

5 **Ejemplo 4.** Este ejemplo se refiere al cargado de los implantes fabricados con PVA- PEG con 0,4% de vancomicina y 0,1% de AmB mediante difusión pasiva (Figura 3)

10 Se disuelven 150 mg de principio activo (vancomicina o AmB) en 7,5 ml de DMSO, agitando la mezcla en vortex y sonicando durante 15 minutos. En una placa Petri se añaden 22,5 ml de etanol y se añade lentamente la disolución de DMSO con el principio activo, evitando así la precipitación del fármaco.

15 A continuación, se sumergen las redes impresas, se cubre la placa, y se sella con Parafilm para evitar la evaporación del solvente. A determinados tiempos, se coge un fragmento de la red sumergida, se disuelve en 10 ml de agua destilada con la ayuda de vortex y sonicador, y se analiza por HPLC para determinar la cantidad de principio activo que ha difundido al interior de la red.

20 El HPLC está equipado con una bomba *Jasco PU-1580*, un inyector automático *Jasco AS-2050 Plus* y un detector UV-visible *Jasco UV-1575*. La integración de los picos se realiza con el programa *Borwin 1.5* para PC (*JMBS Developments*). La AmB se separa en una columna *Thermo Hypersil-Keystone BDS* (200 x 4,4 mm, 5µm). La fase móvil consiste en acetonitrilo: ácido acético: agua destilada (52:4,3:43,7, V: V: V), que se bombea a un caudal de 1 mL/min y el volumen de inyección de la muestra fue de 40 µL. La temperatura de la columna se mantiene a 25°C y el detector se ajusta a 406 nm. En el caso de la vancomicina, se emplea una columna *Nucleosil C18* (250 x 4,6 mm, 5µm). La fase móvil consiste en fosfato de amonio 50mM: acetonitrilo (92:8, V: V), con un pH final de 2,2, la cual se bombea a un caudal de 0,7 mL/min y el volumen de inyección de la muestra es de 40 µL. La temperatura de la columna se mantiene a 25°C y el detector se ajusta a 205 nm. Previo al experimento, se realiza una curva de calibración por triplicado para la AmB y la vancomicina, con el objetivo de determinar la linealidad, la especificidad y el límite de detección del método.

30 Para la vancomicina, la cinética de carga por difusión pasiva es lineal a una velocidad de 0.096% / h ($R^2 = 0,8545$) hasta las 4 horas. Tiempos más prolongados no dan lugar a mayores cargas.

35 En el caso de la AmB, la cinética de incorporación es bilineal, siendo la velocidad de carga de 0.0042% / h hasta las 3 horas y de 0.047% / h desde las 3 hasta las 6 horas. A tiempos cortos, la geometría de la red sigue siendo muy rígida, pero, pasadas las tres horas de humectación, la red se vuelve más flexible permitiendo una mayor carga de AmB.

40 En comparación con la vancomicina, el proceso de carga de la AmB es más lento debido a su baja solubilidad en medio acuoso y su menor miscibilidad con los materiales empleados para imprimir la red.

45 El proceso de cargado de fármacos también puede realizarse mediante la técnica de extrusión directa en polvo, para lo cual los fármacos se mezclan junto con los polímeros para formar una muestra pulverulenta y posteriormente ser extruidos con las condiciones reflejadas en el ejemplo 3.

50 **Ejemplo 5.** Este ejemplo se refiere a la esterilización mediante luz UV de los implantes fabricados con PVA-PEG y su efecto en el contenido de AmB y vancomicina (Figura 4).

Los implantes cargados con diferentes principios activos (vancomicina y/o AmB) se secan al aire libre durante 24 h, se guardan en una bolsa hermética transparente y se colocan bajo luz UV durante 20 minutos. Pasado ese tiempo, se da la vuelta a los implantes y se exponen a la luz durante 10 minutos adicionales. Una vez finalizado el proceso de esterilización, se recogen
5 pequeños fragmentos de los implantes esterilizados y se compara el contenido de principio activo antes y después de su exposición a la luz UV. Para determinar la cantidad de principio activo en los implantes, se analiza mediante HPLC, según se describe en el ejemplo 4.

A pesar de que en todos los casos se observa una ligera disminución de principio activo en los implantes que han sido esterilizados con ultravioleta, en ninguno de ellos las diferencias son
10 significativas en comparación con el implante que no ha sido expuesto a la luz UV ($p > 0,05$). El contenido de vancomicina se mantiene igual a 0,4% y el de AMB a 0,1%.

Tampoco se observa crecimiento microbiano en ninguna de las placas de agar tras la exposición de las mismas al implante expuesto durante 20 min a la luz UV. Por ello, puede concluirse que
15 el método de esterilización UV es suficiente para asegurar la calidad microbiológica de los implantes y no afectar a su contenido de principio activo.

Ejemplo 6. Este ejemplo se refiere a la liberación de los principios activos del implante de PVA-PEG 3D tras su adhesión al cotilo de la prótesis y su posterior inmersión en medio fisiológico (PBS pH 7.4) con albúmina (Figura 5).
20

Implantes cargados con vancomicina, AmB y ambos principios activos se sumergen unos segundos en agua desionizada para ensalzar su carácter adhesivo y, posteriormente, se adhieren a los cotilos. A continuación, la prótesis con el implante 3D adherido en su superficie,
25 se coloca boca abajo sobre un receptáculo cóncavo diseñado en 3D para cada prótesis con un tamaño similar a éstas imitando al espacio articular, con una capacidad de 10 ml. Se añaden 10 ml de PBS pH 7,4 con albúmina al 20% (80:20, V: V) para mimetizar las condiciones fisiológicas (la adición de albúmina al medio es clave teniendo en cuenta la alta unión a proteínas plasmáticas de la AmB). Se cubren los receptáculos con *parafilm* para evitar la evaporación del medio y se
30 mantienen a 37°C durante 48 h. A diferentes tiempos, se cogen puestas del medio (750 µl) y se diluyen con metanol (1/1, V / V). Se reemplaza el volumen del receptáculo con 750 µl de PBS pH 7,4 con albúmina adicionales, para mantener condiciones *sink*.

Las muestras diluidas se congelan durante 24 horas con el fin de precipitar las proteínas del medio antes del análisis por HPLC. Posteriormente, se centrifugan a 10.000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante (350 µl), se diluye (1:3, V / V) con metanol (1.050 µl) y se vuelve a centrifugar (10.000 rpm durante 15 min). El sobrenadante se analiza por HPLC para cuantificar el contenido liberado de los implantes 3D a diferentes tiempos.
35

En el caso de la vancomicina se observa que, tanto en los implantes cargados solo con vancomicina como en los cargados con ambos principios activos, se produce una liberación inmediata de prácticamente el 100% del contenido del implante durante la primera hora. Dichos valores de concentración se mantienen estables en el tiempo durante 48 horas.
40

En el caso de la AmB, la liberación es sostenida, liberándose durante 10 horas. Pasado este tiempo, los niveles de AmB disminuyen, probablemente debido a un efecto de *spring and parachute* (como consecuencia de que el fármaco amorfo poco a poco va recristalizando en el medio acuoso, disminuyendo su solubilidad y, por tanto, su concentración) asociado a una menor solubilidad de la AmB en medio acuoso en comparación con la vancomicina.
45

Independientemente, en ambos casos, la concentración que se mantiene en el medio tras su liberación del implante (en torno a 200 µg/ml para la AmB y 400 µg/ml para la vancomicina) se encuentra por encima de la concentración mínima inhibitoria necesaria para conseguir efecto
50

antimicrobiano, lo cual indica que la cantidad de fármaco cargada en los implantes es óptima para producir el efecto antimicrobiano deseado.

Ejemplo 7. En este ejemplo se muestra el efecto hemolítico de los implantes de PVA- PEG cargados con los diferentes principios activos (AMB y vancomicina), los implantes sin cargar y los principios activos por separado y combinados, disueltos en DMSO (Figura 6).

Se obtienen glóbulos rojos por centrifugación de sangre de personas sanas voluntarias ($5,48 \times 10^6$ RBC/ml) contenida en tubos Vautainer, recubiertos de EDTA, durante 5 min a 1000 rpm. Se descarta el sobrenadante (el plasma) y los eritrocitos se lavan tres veces consecutivas con un volumen equivalente de NaCl al 0,9% (150mN) centrifugando en cada paso a 1000 rpm durante 5 min. Tras los lavados, los eritrocitos (RBCs) se diluyen en PBS pH 7,4 hasta una concentración final del 4%. Posteriormente, se añade un volumen de 180 μ l en cada pocillo de una placa de 96 pocillos.

Para comprobar el efecto de los implantes y los principios activos, se preparan diferentes soluciones seriadas, en agua desionizada y DMSO, respectivamente. Se añaden 20 μ l de cada una de las concentraciones (comprendidas entre 50 y 0,01 μ g/ml) en cada pocillo. Como control positivo se utiliza una disolución al 20% de Triton X, y como control negativo se utilizó PBS pH 7,4. Las placas se incuban a 37°C durante 1 hora. Después, se centrifugan a 2500 rpm durante 5 minutos para sedimentar los eritrocitos intactos. El sobrenadante (100 μ l) se transfiere a una placa transparente de 96 pocillos de fondo plano. Se mide la absorbancia (ABS) usando un lector de placas (*BioTeK, EKx808*) a 595 nm. El porcentaje de hemólisis se calcula mediante la ecuación:

$$\text{Hemólisis (\%)} = \frac{(ABS_{\text{muestra}} - ABS_{\text{pbs}})}{(ABS_{\text{triton}} - ABS_{\text{pbs}})}$$

En el caso de los implantes, sólo la mayor concentración evaluada es la que muestra algún signo de toxicidad, siendo en todos los casos por debajo del 10%. Lo más característico es la reducción de la toxicidad hemolítica observada entre el implante de AmB (toxicidad inferior al 5%) en comparación con el fármaco disuelto en DMSO. Del mismo modo, se obtiene una reducción significativa de la toxicidad (casi cinco veces inferior) en el implante combinado de AmB y vancomicina en comparación con la combinación de ambos principios activos disueltos en DMSO en la misma concentración. Esto puede deberse a la liberación sostenida del fármaco a partir del implante, dando lugar a una toxicidad hemolítica mínima. El caso de la vancomicina, este efecto no fue relevante ya que no es un fármaco tan hemolítico como la AmB.

Ejemplo 8. En este ejemplo se demuestra la actividad antifúngica in vitro de los implantes de PVA-PEG cargados con 0,1% de AmB (Figura 7).

La actividad antifúngica de los implantes cargados con AmB frente a cuatro cepas diferentes de *Candida spp.* (*Candida spp.*, *Candida albicans*, CECT 1394, *Candida Parassilopsis* 57744, *Candida Glabrata* 60750, y *Candida Krusei* 1068) se evalúa por ensayo de difusión en agar (*Ruiz, H.K. et al. Int. J. Pharm, 2014. 473(1-2): p. 148-57*). Para que los implantes quepan en las placas Petri y el halo de inhibición sea legible, se imprimen implantes de 13 mm, los cuales se colocan en el centro de las placas en la superficie del agar. Como control positivo se emplean discos cargados con AmB disuelta en DMSO (10 μ g).

Los diámetros de la zona de inhibición se miden en los puntos donde hay una inhibición completa del crecimiento de la levadura. Los aislados se clasifican según la CLSI en susceptibles (S) de

AmB cuando la zona de inhibición es mayor de 15mm; resistentes (R), si la zona de inhibición es mejor de 10 mm; e intermedios (I) si la zona de inhibición es entre 11 y 14 mm.

5 En la Figura 7 se observa que las cepas *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. glabrata* son susceptibles a los implantes cargados con AmB, con un halo de inhibición mayor de 15 mm, lo que indica que existe una buena difusión del fármaco desde el implante hasta el agar. Por otra parte, en el caso de *C. krusei*, tanto los implantes como la AmB en DMSO se encuentran en la zona intermedia, por lo que la efectividad frente a esta cepa sería dependiente de la dosis. Estos resultados son prometedores teniendo en cuenta que *C. Krusei* es una de las cepas
10 microbiológicas más resistentes frente a la AmB y, aun así, se obtiene una eficacia que es dependiente de la dosis.

Ejemplo 9. En este ejemplo se muestra la actividad antimicrobiana in vitro de los implantes de PVA-PEG cargados con 0.4% de vancomicina.

15 Se prueba la actividad antibacteriana de implantes cargados con vancomicina y se comparan con los valores obtenidos solo con el principio activo frente a una cepa de *Staphylococcus epidermidis*, ATCC 12228. La actividad antimicrobiana se prueba por ensayo de difusión en agar Kirby-Bauer (Ursulino Pontes, E. K. et al. *Food Sci Biotechnol*, **2019**. 28(3): p. 633-639.). Para
20 que los implantes quepan en las placas Petri y el halo de inhibición sea legible, se imprimen implantes de 13 mm, los cuales se cargan según el sistema descrito en el ejemplo 8 y se colocaron en el centro de las placas en su superficie.

25 Los diámetros de la zona de inhibición se miden en puntos donde hay una inhibición completa de crecimiento de bacterias tras 24 h de incubación. Los aislados se clasifican en susceptibles a vancomicina (S) cuando la zona de inhibición es mayor de 15 mm de acuerdo con las guías CLSI.

30 En la Figura 8 se observa que *S. epidermidis* es susceptible al implante cargado con vancomicina, con un halo de inhibición superior a 15 mm. Además, no hay diferencias significativas con respecto a los discos comerciales de Neo-Sensitabs™ de vancomicina cargados con 30 µg de fármaco ($p > 0,05$). Por otra parte, los implantes sin cargar, impregnados con DMSO y solo DMSO no mostraron halo de inhibición indicando que la actividad antibacteriana se produce debido a la liberación de vancomicina del implante impreso en 3D.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Implante parenteral con liberación inmediata-controlada de fármacos, constituido por materiales biocompatibles y biodegradables y contiene principios activos anti-infecciosos, caracterizado porque contiene antibióticos o antifúngicos o combinación de ambos y tiene forma de tela de araña de espesor milimétrico donde la tela de araña consiste en un círculo central del que parten múltiples filamentos radiales y varios filamentos marco y de apoyo centrales de unas dimensiones entre 10-30 mm de largo y 5-10 mm de ancho y donde los filamentos radiales pueden estar unidos entre sí o separados por un espacio de, al menos, 100µm.
- 10 2. Implante, según reivindicación 1, donde los materiales biocompatibles que constituyen el implante son alcohol polivinílico, policaprolactona, polietilenglicol o mezcla de ellos.
- 15 3. Implante, según reivindicaciones anteriores, donde el principio activo es un antibiótico.
4. Implante, según reivindicación 3, donde el antibiótico es vancomicina.
5. Implante, según reivindicaciones 1 y 2, donde el principio activo es un antifúngico.
- 20 6. Implante, según reivindicación 5, donde el antifúngico es anfotericina B.
7. Implante, según reivindicación 1, donde el antibiótico es vancomicina y el antifúngico es anfotericina.
- 25 8. Implante, según reivindicaciones 2 y 7, donde el implante está constituido por alcohol polivinílico (PVA) con fragmentos de polietilenglicol (PEG) y está cargado con un 0,4% de vancomicina y un 0,1% de anfotericina B.
- 30 9. Método de obtención del implante reivindicado que comprende:
- Diseñar la forma de la red,
 - Imprimir la red diseñada mediante técnica de impresión 3D con materiales biocompatibles y biodegradables.
 - Cargar la red impresa con principios activos anti-infecciosos mediante difusión pasiva.
- 35 10. Método, según reivindicación 9, donde la red se diseña a partir de las medidas del cotilo sobre el que se va a ajustar el implante y empleando un programa de CAD (Computer Aided Design).
- 40 11. Método, según reivindicación 9, donde la impresión 3D de la red se realiza a partir de un filamento de material biocompatible o biodegradable siguiendo el método FDM (*Fused Deposition Modeling*)
- 45 12. Método, según reivindicación 9, donde la impresión 3D de la red se realiza a partir de un material biocompatible o biodegradable pulverulento siguiendo el método de extrusión directa con polvo.
- 50 13. Método, según reivindicación 9, donde los materiales biocompatibles que constituyen el implante son alcohol polivinílico, policaprolactona, polietilenglicol o mezcla de ellos.

14. Método, según reivindicación 9, donde los principios activos anti-infecciosos son antibióticos, antifúngicos o mezcla de ellos.

5 15. Método, según reivindicación 14, donde los principios activos anti-infecciosos son vancomicina, anfotericina B, o mezcla de ellos.

16. Método, según reivindicaciones 9 a 15, donde, opcionalmente, el implante obtenido es esterilizado mediante luz UV.

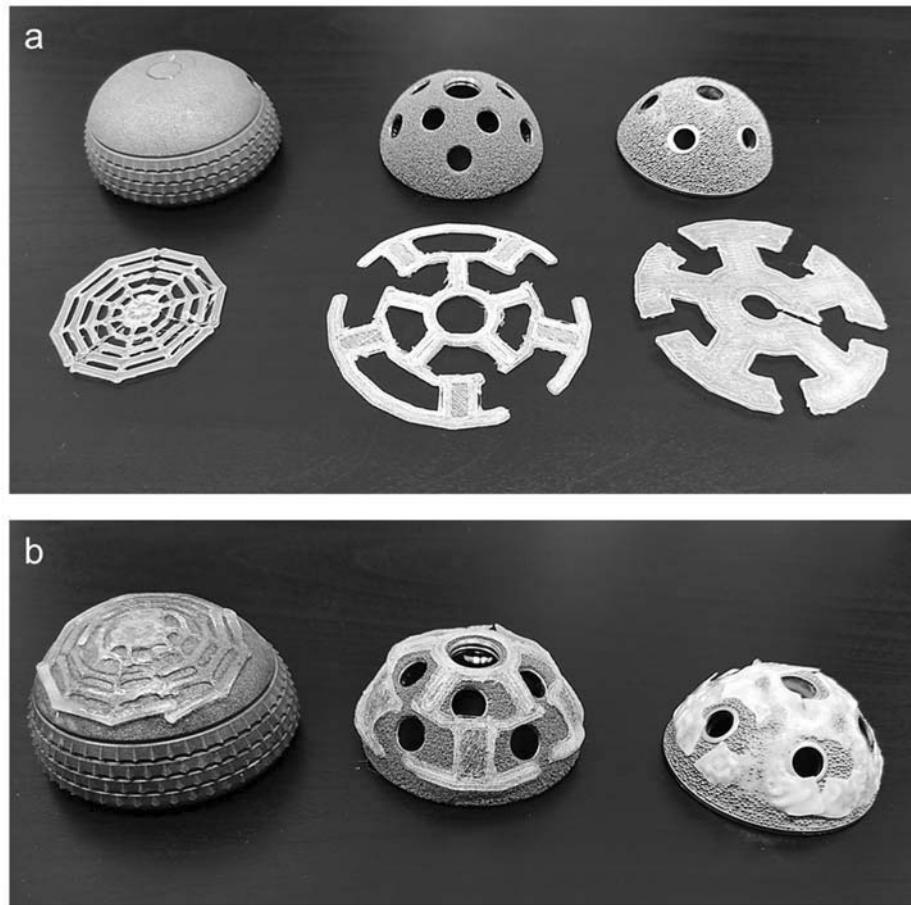


Figura 1

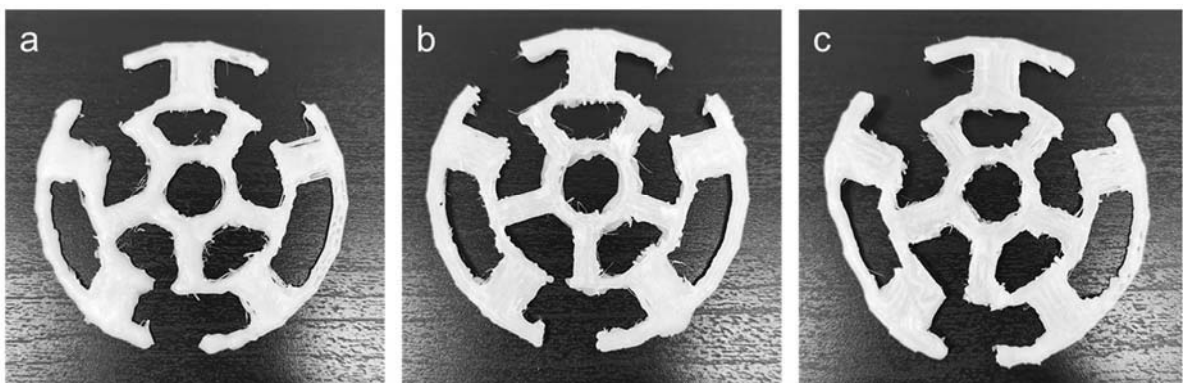


Figura 2

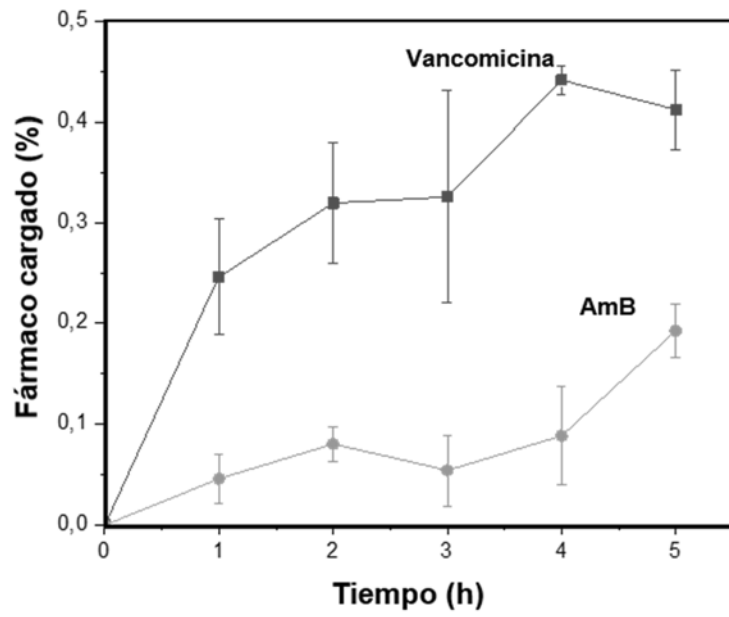


Figura 3

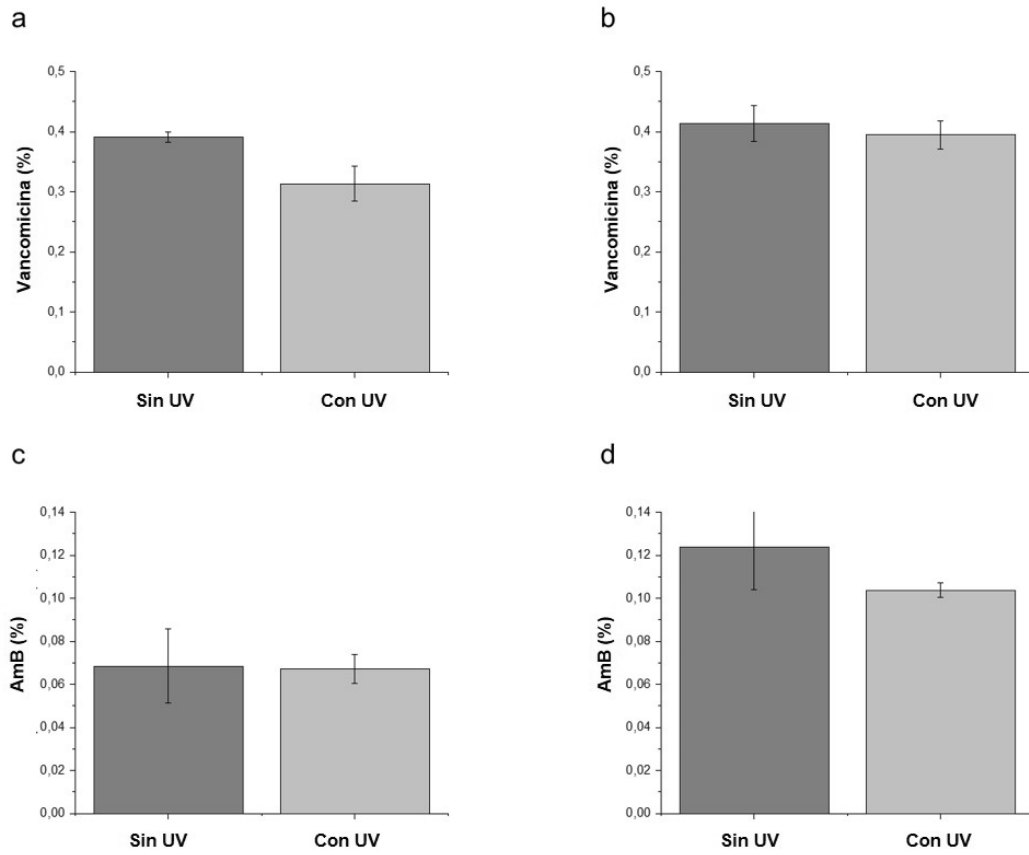


Figura 4

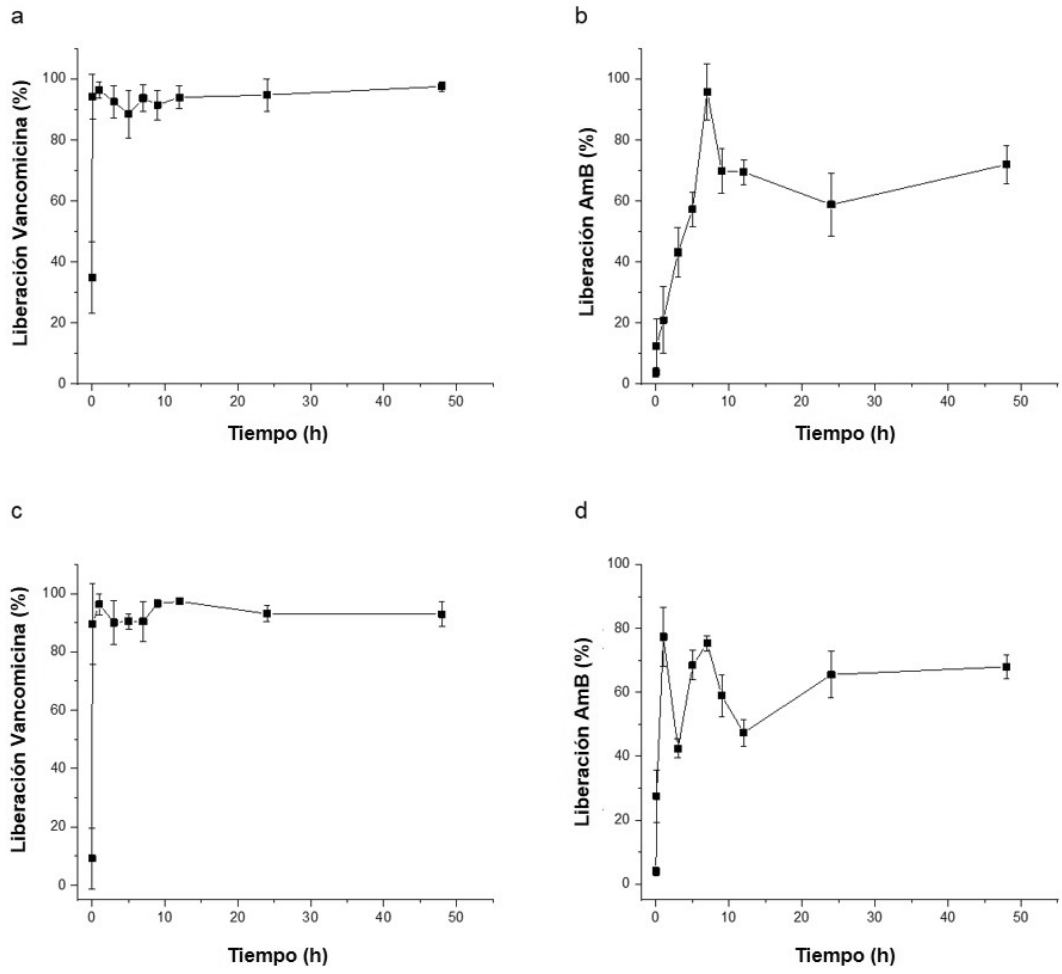


Figura 5

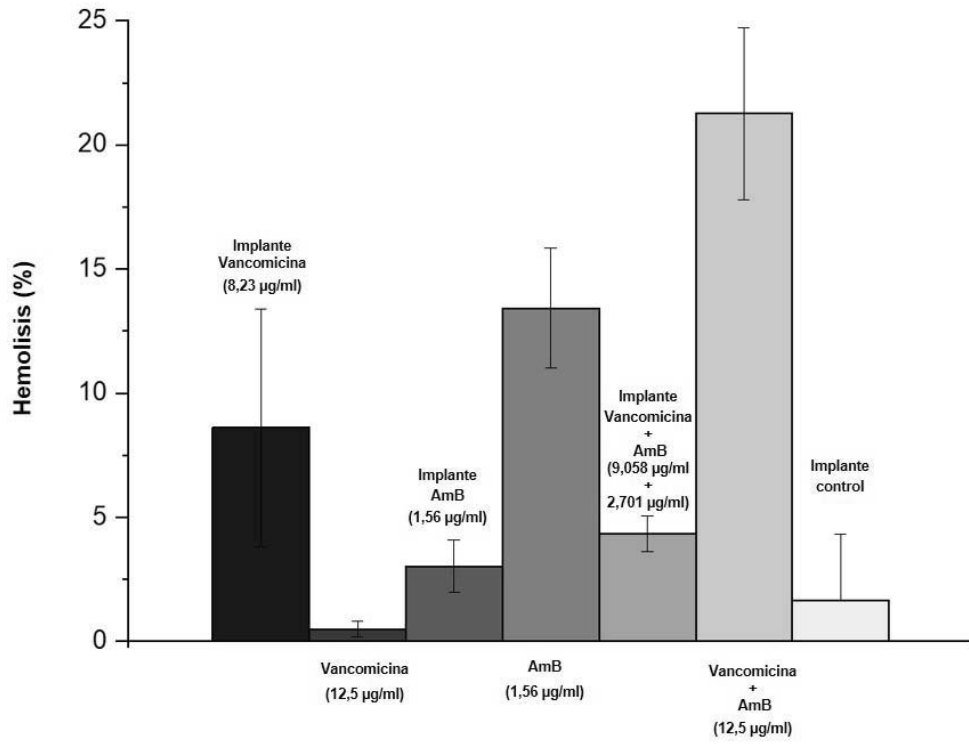


Figura 6

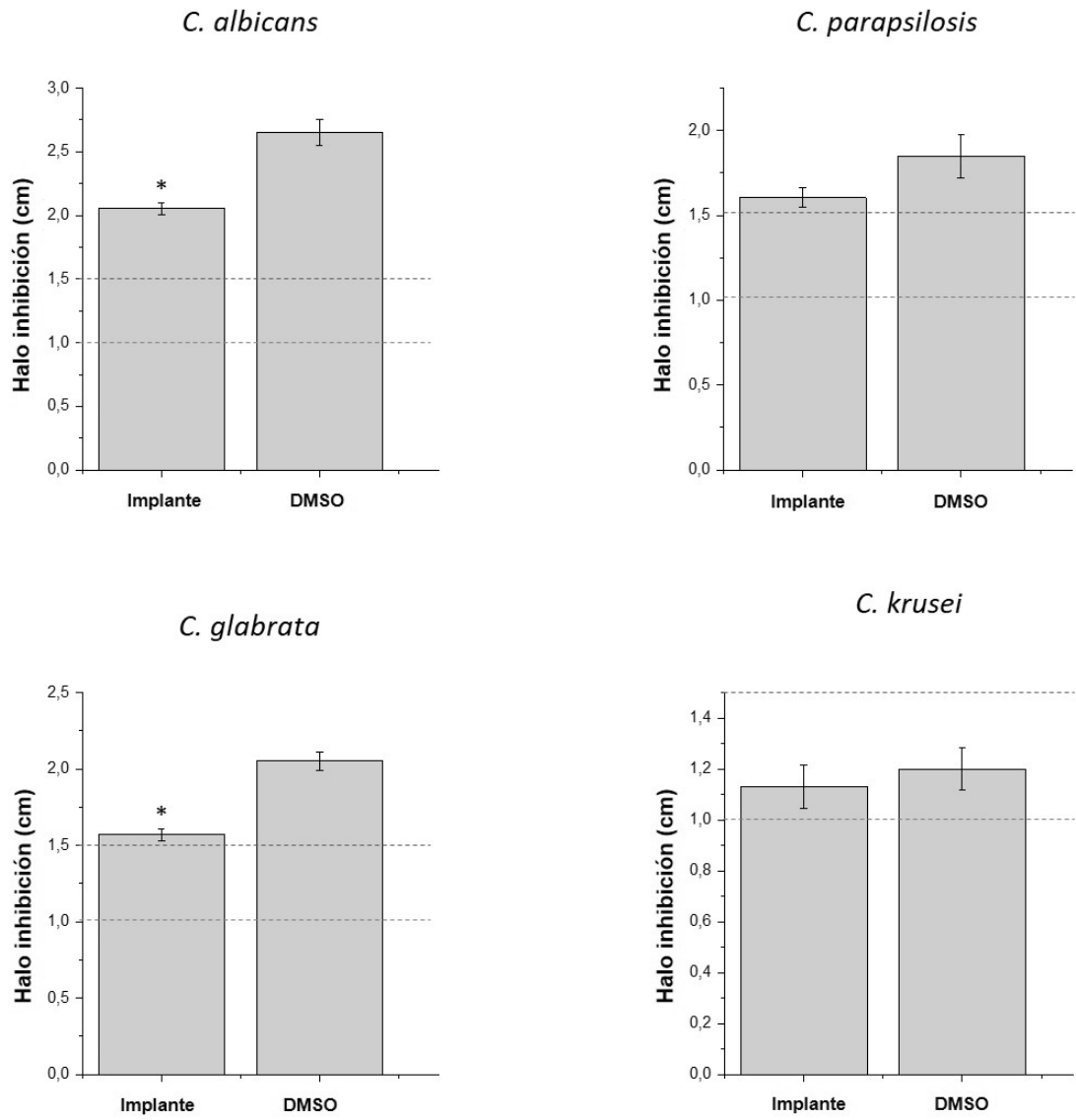


Figura 7

S. epidermidis

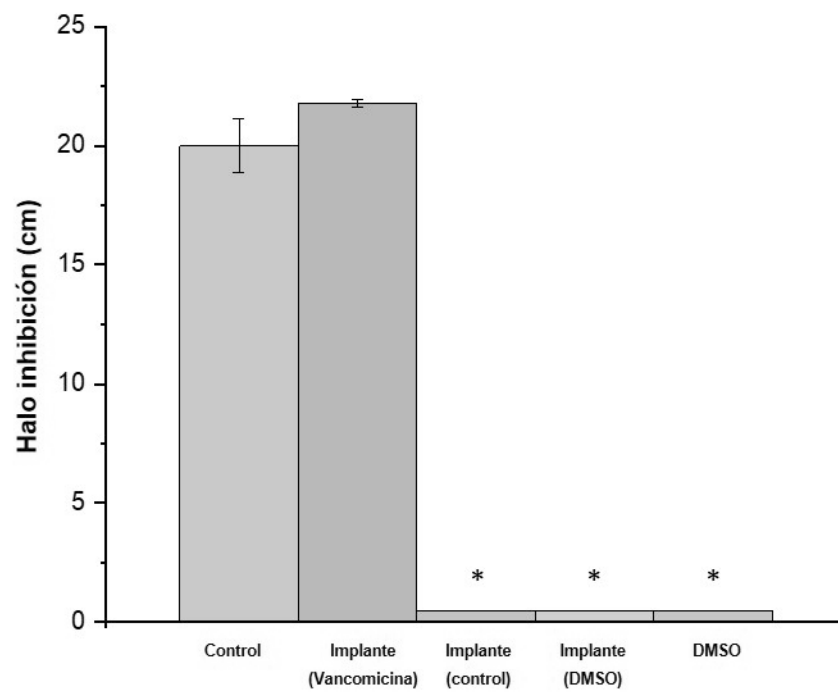


Figura 8