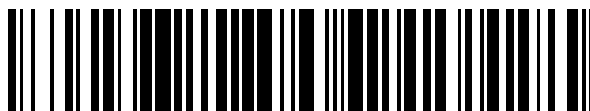


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 623**

51 Int. Cl.:  
**A61F 2/02** (2006.01)  
**A61K 9/50** (2006.01)  
**A61K 38/14** (2006.01)  
**A61K 31/7036** (2006.01)  
**A61K 31/545** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)  
**A61P 19/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03754460 .8**  
96 Fecha de presentación: **05.09.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1549246**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.07.2005**

54 Título: **Microesferas de antibiótico para el tratamiento de infecciones y osteomielitis**

30 Prioridad:  
**05.09.2002 US 408496 P**  
**05.09.2002 US 408502 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**17.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**17.10.2012**

73 Titular/es:  
**AMBROSE, CATHERINE G.**  
**6431 FANNIN**  
**HOUSTON, TX 77030, US;**  
**CLYBURN, TERRY A. y**  
**MIKOS, ANTONIOS G.**

72 Inventor/es:  
**Ambrose, Catherine G.;**  
**Clyburn, Terry A. y**  
**Mikos, Antonios G.**

74 Agente/Representante:  
**Rizzo, Sergio**

ES 2 388 623 T3

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

**MICROESFERAS DE ANTIBIÓTICO PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES Y OSTEOMIELITIS**

**Descripción**

ÁMBITO TÉCNICO

5 **[0001]** La presente invención hace referencia en general a las microesferas capaces de liberar un fármaco durante un periodo de tiempo y, más en particular, a microesferas de implantación, inyección o cualquier otro método de colocación total o parcial dentro del cuerpo capaces de liberar de manera controlada casi constante el antibiótico durante un periodo de tiempo extenso para el tratamiento y la prevención de  
10 infecciones relacionadas con el cuerpo.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

**[0002]** De manera histórica, el tratamiento de la osteomielitis ha consistido en el desbridamiento de tejidos infectados, irrigación con una solución antiséptica, y de cuatro a seis semanas de tratamiento antibiótico parenteral. Debido a la pobre  
15 penetración del antibiótico en el área del hueso infectada, altas concentraciones de suero del antibiótico necesitan ser empleadas durante periodos extensos de tiempo con tal de producir niveles bactericidas dentro del tejido óseo. Estos altos niveles de suero pueden asociarse a la nefrotoxicidad o a la ototoxicidad, y puede causar efectos secundarios gastrointestinales. Debido a la morbilidad asociada con los altos niveles  
20 de suero de los antibióticos, muchos métodos de suministro local han sido descritos incluyendo el cemento óseo con antibióticos, esponja de colágeno con gentamicina, portadores poliméricos con varios antibióticos, y portadores de sulfato de calcio para antibióticos.

**[0003]** La necesidad de un sistema de suministro local de fármacos para suministrar  
25 antibióticos directamente en el área infectada ha llevado a muchos físicos a mezclar antibióticos y cemento óseo de metacrilato de polimetilo (PMMA) dentro de microesferas y colocar estas microesferas en el área desbridada del hueso. Típicamente, estas microesferas han sido expuestas para suministrar dosis no constantes de antibióticos sólo durante unas pocas semanas, y después de que el  
30 antibiótico haya sido eluido, las microesferas de cemento deben extraerse, ya que el cemento no es biodegradable y puede convertirse en un foco de infección. La técnica anterior relevante incluye US6410056.

**[0004]** Una infección puede complicar cualquier tratamiento quirúrgico. Las áreas de alto riesgo incluyen fracturas del hueso tratadas con una varilla o una placa de metal o  
35 con fijadores externos. El riesgo es particularmente alto si la fractura está abierta (fracturas compuestas). Otras intervenciones quirúrgicas también están en riesgo incluyendo la cirugía de bypass vascular con el uso de material de injerto artificial,

intervenciones quirúrgicas generales como una cirugía de hernia y varias intervenciones ejecutadas en el útero o la vejiga. Una vez establecidas, estas infecciones son tratadas típicamente mediante un drenaje quirúrgico y antibióticos sistémicos. Al igual que el tratamiento por osteomielitis, el tratamiento por infección puede prolongarse, puede ser costoso y puede fallar. Existe la necesidad de una formulación segura y efectiva de suministro local de antibiótico que mejorará la curación y evitará las complicaciones.

**[0005]** La presente invención se distingue de las diferentes técnicas anteriores en general, y estas patentes en particular, por las microesferas biodegradables implantadas, inyectadas o colocadas de otra manera en el cuerpo total o parcialmente que son capaces de liberar de manera controlada casi constante el antibiótico durante un periodo de tiempo predeterminado para el tratamiento y la prevención de infecciones relacionadas con el cuerpo. Las microesferas están formadas por ácido poliláctico-glicólico (PLGA) y una cantidad efectiva de antibiótico suficiente para producir niveles bactericidas en los tejidos del cuerpo, y puede incluir o no polietilenglicol (PEG). Las microesferas presentan un suministro casi constante del antibiótico durante al menos 4 semanas a niveles que exceden la concentración mínima inhibitoria (MIC) para organismos comúnmente considerados causantes de infecciones. Las microesferas permiten la liberación de antibióticos en un periodo de varios tratamientos quirúrgicos para disminuir la incidencia de infección, y puede utilizarse para el tratamiento de las fracturas abiertas, la reducción abierta y la fijación interna con fijaciones metálicas para fracturas, la colocación de los dispositivos de reemplazo de las articulaciones, y la colocación de varios materiales de injerto utilizados en intervenciones cardiovasculares, generales, ginecológicas, y de neurocirugía.

#### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

**[0006]** Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar microesferas de antibiótico para el tratamiento y la prevención de infecciones capaces de liberar el antibiótico de manera casi constante durante un extenso periodo de tiempo, y a niveles que excedan la concentración mínima inhibitoria (MIC) para organismos comúnmente considerados causantes de infecciones.

**[0007]** Otro objetivo de la presente invención es proveer un sistema de suministro de antibiótico mediante una microesfera biodegradable para el tratamiento y la prevención de infecciones y osteomielitis que elimina la necesidad de cirugía posterior para extraer el portador de fármacos.

**[0008]** Otro objetivo de la presente invención es proporcionar microesferas de antibiótico para el tratamiento y la prevención de infecciones y osteomielitis que puedan permanecer en el área de implantación y no impidan la regeneración del tejido.

**[0009]** Otro objetivo de la presente invención es proporcionar microesferas de antibiótico para el tratamiento y la prevención de infecciones que liberan antibiótico en un periodo de varios tratamientos quirúrgicos para disminuir la incidencia de infección.

**[0010]** Otro objetivo de la presente invención es proporcionar microesferas de antibiótico para el tratamiento y la prevención de infecciones que puedan ser fácil y rápidamente implantadas, inyectadas o colocadas de otra manera total o parcialmente dentro del cuerpo en el área real o potencial de la infección.

**[0011]** Otro objetivo de la presente invención es proporcionar microesferas de antibiótico para el tratamiento y la prevención de infecciones que pueda colocarse en el área de colocación de las varillas y placas de metal, las fijaciones metálicas, los dispositivos de reemplazo de articulaciones, y varios materiales de injerto utilizados en intervenciones cardiovasculares, generales, ginecológicas, y de neurocirugía.

**[0012]** Otros objetivos de la presente invención se harán evidentes en ocasiones a lo largo de las especificaciones y reivindicaciones expresadas en lo sucesivo.

**[0013]** Los objetivos nombrados anteriormente y otros objetivos de esta invención se consiguen con las presentes microesferas biodegradables que se implantan, inyectan, o colocan de otra manera total o parcialmente en el cuerpo y son capaces de liberar antibiótico de manera controlada casi constante durante un periodo de tiempo predeterminado para el tratamiento y la prevención de las infecciones relacionadas con el cuerpo. Las microesferas están formadas por ácido poliláctico-glicólico (PLGA) y una cantidad efectiva de antibiótico suficiente para producir niveles bactericidas en los tejidos del cuerpo, y puede incluir o no polietilenglicol (PEG). Las microesferas presentan un suministro casi constante del antibiótico durante al menos 4 semanas a niveles que exceden la concentración mínima inhibitoria (MIC) para organismos comúnmente considerados causantes de infecciones. Las microesferas permiten la liberación de antibióticos en un periodo de varios tratamientos quirúrgicos para disminuir la incidencia de infección, y puede utilizarse para el tratamiento de las fracturas abiertas, la reducción abierta y fijación interna con fijaciones metálicas para fracturas, colocación de los dispositivos de reemplazo de las articulaciones, y colocación de varios materiales de injerto utilizados en intervenciones cardiovasculares, generales, ginecológicas, y neurocirugía.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**[0014]**

La Fig. 1 es una gráfica que ilustra la elución *in-vitro* de varias formulaciones de microesfera.

5 La Fig. 2 es una gráfica que ilustra los resultados de un estudio de repetibilidad de las velocidades de la elución *in-vitro* donde dos de las formulaciones fueron elaboradas con más de un año de diferencia.

La Fig. 3 es una gráfica que ilustra las concentraciones de tobramicina *in-vivo* en el tejido a lo largo del tiempo de las dos formulaciones analizadas.

10 La Fig. 4 es una gráfica que ilustra el porcentaje de animales con resultado positivo de osteomielitis en un estudio a conejos tratados en grupos con varias formulaciones de microesferas de antibiótico.

La Fig. 5 es una gráfica que ilustra los resultados de una clasificación radiográfica e histológica de las muestras de hueso tomadas del estudio de los conejos.

La Fig. 6 es una gráfica que ilustra la concentración de tobramicina en los huesos para los grupos tratados localmente con tobramicina.

La Fig. 7 es una gráfica que ilustra la eficiencia del atrapamiento y la velocidad de elución a lo largo del tiempo con varias formulaciones de microesfera utilizando vancomicina.

MODO DE REALIZACIÓN PREFERIDO

**[0015]** La microesfera que contiene la sustancia de antibiótico, de acuerdo con la presente invención, puede estar hecha de diferentes cantidades de ácido poliláctico-glicólico (PLGA) con o sin polietilenglicol (PEG), y de un efectivo antibiótico de cefalosporina, utilizando una técnica de emulsión de agua en aceite y aceite en agua (W/O/W) o de doble emulsión de extracción del solvente. Según un modo de realización preferido, las microesferas biodegradables están formadas por ácido poliláctico-glicólico (PLGA) entre el 85% y el 99% de su peso aproximadamente con una proporción de un 50% de ácido láctico y un 50% de ácido glicólico y por polietilenglicol (PEG) entre el 0% y el 5% de su peso; y una cantidad efectiva de un agente antibiótico suficiente para producir niveles bactericidas en los tejidos corporales. Las microesferas están caracterizadas por presentar un suministro casi constante del agente antibiótico durante al menos 4 semanas a niveles que exceden la concentración mínima inhibitoria (MIC) para organismos comúnmente considerados causantes de infecciones. La presente invención será mejor entendida con las referencias de los ejemplos siguientes.

EJEMPLO 1- Sistema de suministro del fármaco PLGA/tobramicina

### Preparación de las Microesferas

**[0016]** En los ejemplos siguientes, el ácido poliláctico-glicólico (PLGA) utilizado era una combinación de alto peso molecular con un 50% de ácido láctico y un 50% de ácido glicólico (Medisorb®), de Alkermes, Cincinnati, OH. El polietilenglicol (PEG) y el alcohol de polivinilo (PVA) fueron adquiridos de Sigma Aldrich, de St. Louis, MO. La tobramicina (Nebcin®), de Eli Lilly, Indianapolis, IN. fue adquirida en polvo, y el resto de sustancias químicas fueron adquiridas de Fisher Scientific (Pittsburgh, PA).

**[0017]** Las micropartículas fueron preparadas en múltiples combinaciones de PLGA/PEG/tobramicina utilizando una técnica establecida de emulsión de agua en aceite y aceite en agua (W/O/W) o de doble emulsión de extracción del solvente. La distribución del tamaño de las micropartículas fue medida con un multimedidor de Coulter (modelo 0646, Coulter Electronics, Hialeah, FL) tras suspender las partículas en una solución de Isoton II (Coulter Electronics).

**[0018]** La eficiencia de atrapamiento de la formulación fue determinada por duplicado normalizando la cantidad realmente atrapada con respecto a la cantidad de inicio, utilizando la técnica establecida de extracción del solvente. Se disolvieron 10mg de micropartículas en 1ml de diclorometano durante 6 horas a temperatura ambiente. Entonces, se extrajo la tobramicina de la fase orgánica a la fase acuosa mezclando 1ml de tampón fosfato salino (PBS) y retirando la parte acuosa. Esto fue repetido cada seis horas durante veinticuatro horas y todos los alícuotas acuosos analizados de concentración de tobramicina.

**[0019]** Todas las concentraciones de tobramicina fueron elaboradas utilizando el inmunoanálisis de polarización de la fluorescencia (Abbot TDx System). La sensibilidad del análisis de tobramicina se define como la concentración medible más baja que puede distinguirse de cero con un 95% de seguridad y fue comprobado que tenía 0,18 microgramos por milímetro.

### Velocidad de Determinación de la Eución In-Vitro

**[0020]** Según el peso seco, el porcentaje de PEG en las formulaciones fue del 0% o el 5%, y el porcentaje de tobramicina fue del 1%, el 5% o el 10%. En total, seis formulaciones diferentes fueron estudiadas para obtener las velocidades de elución de tobramicina. 25 mg de micropartículas fueron medidos y situados en ampollas de cristal de 2ml que contenían 1ml de PBS. Cada formulación de micropartículas fue analizada por triplicado y situada al baño maría a 37° C. Después de 24 horas, las ampollas se centrifugaron y el sobrenadante se eliminó del análisis de tobramicina. Se añadió 1ml de PBS a las ampollas y se reemplazaron las ampollas del baño maría. Este proceso se repitió una vez al día durante una semana y después cada dos días durante tres semanas más.

Características de liberación del fármaco *in-vivo*

**[0021]** Se estudiaron dos formulaciones en un modelo de bolsa muscular de ratón, un 10% de tobramicina con entre un 0% y un 5% de PEG. 60 hembras adultas de ratón de laboratorio, que pesaban entre 20-24 g fueron utilizadas para esta investigación. Cada animal fue anestesiado utilizando ketamina (150mg/kg) y xilazina (6mg/kg) mediante una inyección intraperitoneal. Se hizo una pequeña incisión sobre el músculo del cuádriceps derecho y se formó una pequeña bolsa en el músculo mediante disección despuntada. En treinta ratones, 5mg de microesferas conteniendo un 10% de tobramicina y un 0% de PEG fueron implantados en la bolsa; en los treinta ratones restantes, 5mg de microesferas conteniendo un 10% de tobramicina y un 5% de PEG fueron implantados. Cada bolsa fue cerrada con una sutura no absorbible para marcar la ubicación. La piel se cerró con sutura reabsorbible. Todos los animales se comportaron de manera normal a lo largo del estudio, y no hubo señales visibles de inflamación local (hinchazón, molestias).

**[0022]** Para cada una de las dos formulaciones de microesfera analizadas, los ratones fueron divididos en 5 grupos de seis ratones cada grupo y sacrificados secuencialmente un día, cuatro días, siete días, veintidós días y 33 o 40 días después de la cirugía. Al sacrificarlos, se reabrió la incisión cicatrizada y la bolsa fue localizada por la sutura. Aproximadamente fue extraído 0,1g de tejido que rodeaba la sutura. La mitad del tejido fue colocada en formalina para su subsecuente evaluación histológica. La mitad restante del tejido fue pesada y colocada en 0,5ml de PBS y macerada. Los tejidos de tres ratones de cada grupo fueron unidos de manera aleatoria en cada ampolla para que hubiera dos ampollas para cada tiempo de cada grupo. El tejido fue incubado durante 2 horas a 37°. Tras la incubación, la ampolla fue centrifugada y el sobrenadante filtrado para analizar la tobramicina. La concentración de tobramicina se presenta como la cantidad de tobramicina por peso del tejido muscular.

**[0023]** El tejido preservado fue cortado en secciones de 5µm y tintado con tinción de hematoxilina-eosina *H&E*. Cada muestra fue clasificada según la inflamación por un patólogo de acuerdo con la siguiente escala: 1 para ninguna o mínima inflamación, 2 para inflamación moderada, y 3 para inflamación severa o notable.

Resultados *In Vitro*

**[0024]** La elución *in-vitro* de las 6 formulaciones de microesfera se muestra en la Fig. 1. En esta figura, la cantidad de fármaco liberado ha sido normalizada con respecto a la cantidad total presente en las microesferas implantadas. La eficiencia de atrapamiento para cada formulación de microesfera se extiende entre el 40,24% y el 61,8%, como se muestra en la Tabla 1 a continuación. En general, añadir PEG

aumenta la eficiencia de atrapamiento. Todas las microesferas encontradas tenían aproximadamente un tamaño de entre 20 y 1,6µm de diámetro.

[0025] Cada formulación tuvo una gran liberación inicial de tobramicina en las primeras 24 horas, seguida de unos días de poca liberación y después unas pocas semanas de liberación casi constante. Los ajustes constantes de la curva de elución durante el periodo de tiempo de 7-28 días demostró correlaciones de entre  $r^2=0.7748$  y 0.9770, indicando que la liberación de antibiótico es muy constante durante este periodo de tiempo. La Tabla 1 muestra la liberación media constante de tobramicina para cada formulación durante los días del 7 al 28 en cantidades absolutas y el porcentaje total de la cantidad del fármaco.

Tabla 1. Características de la microesfera y la elución *in vitro*

Formulación de la microesfera			Atrapamiento	Liberación media	
%PLGA	%tobramicina	%PEG	Eficiencia	µg/día	%/día
99	1	0	42,8%	0,3852	0,48
95	5	0		2,3586	0,37
90	10	0	45,8%	4,4510	0,41
94	1	5	61,8%	0,5131	0,33
90	5	5	40,2%	1,3415	0,27
85	10	5	52,4%	8,7916	0,67

[0026] Llevamos a cabo un estudio de repetibilidad donde dos de las formulaciones estaban elaboradas con más de un año de diferencia. Las velocidades de elución *in vitro* para estos experimentos se presentan en la Fig. 2.

#### 15 Resultados In Vivo

[0027] Las concentraciones de tobramicina *in-vivo* se muestran en la Fig. 3 para las dos formulaciones analizadas. La concentración mínima inhibitoria (MIC) de la tobramicina contra el estafilococo áureo se muestra para comparar. Los resultados histológicos para el tejido del cuádriceps se muestran en la Tabla 2 abajo.

20 Tabla 2. Resultado histológico para tejido del cuádriceps

Tiempo Días	Resultado histológico de la inflamación	
	10% tobramicina 0% PEG	10% tobramicina 5% PEG
1	1	
4	3	
7	3	
14		
21	1	1
30-40	1	



**[0028]** Los resultados de los estudios *in-vitro* demuestran que tanto cambiar la concentración del antibiótico como la concentración de PEG puede alterar las características de elución del antibiótico. En general, aumentar la concentración de cualquier componente disminuía la velocidad a la que se liberaba el antibiótico, pese a que el impulso inicial de liberación del fármaco aumentaba al aumentar la concentración del antibiótico o del PEG. En todas las formulaciones la velocidad de liberación se estabilizaba a una velocidad casi constante tras la primera semana y continuaba constante durante las siguientes tres semanas. Con estas velocidades de liberación constante, se determinó que la formulación con un 10% de tobramicina y un 0% de PEG habrían liberado todo el antibiótico en 60 días. En cambio, la formulación con un 1% de tobramicina y un 0% de PEG habría tardado aproximadamente 186 días en liberar todo el antibiótico. Como se puede ver en la Fig.2, podemos elaborar de manera reproducible las diferentes formulaciones de microesfera.

**[0029]** Los resultados del estudio *in-vivo* demuestran que estas microesferas no provocan una respuesta inflamatoria extrema. La inflamación aumentó a notable el día 3, pero volvió a niveles mínimos el día 7 y se mantuvo así durante las siguientes tres semanas. Esta inflamación estuvo localizada en el área del implante y no produjo señales visibles de inflamación y no afectó el apetito del animal o su movimiento.

**[0030]** El resultado más importante fue que pese a que las características de elución *in-vitro* demostraron una velocidad de liberación constante de tobramicina más prolongada con la formulación del 10% de tobramicina y el 5% de PEG, los resultados *in-vivo* demostraron concentraciones más altas de tobramicina en el tejido con la formulación del 10% de tobramicina y el 0% de PEG, de hecho, pese a que los niveles en el tejido eran medibles con la formulación del 10% de tobramicina y el 5% de PEG a lo largo del estudio, se mantuvieron al nivel o por debajo de la concentración mínima inhibitoria (MIC) contra el estafilococo áureo a lo largo de la cuarta semana. Por el contrario, la formulación del 10% de tobramicina y el 0% de PEG dio como resultado concentraciones en el tejido de al menos el doble de la concentración mínima inhibitoria (MIC) durante todo el periodo del estudio.

**[0031]** Las microesferas fueron visibles mediante el examen histológico lo que indica que las microesferas permanecen en el área de implantación durante al menos treinta días, y, de hecho, encontramos niveles de tobramicina medibles en el tejido para ambas formulaciones de microesferas a lo largo de la duración del estudio.

**[0032]** Los resultados de este estudio sugieren que las microesferas hechas de PLGA y tobramicina, con o sin PEG, son un sistema biodegradable adecuado para el suministro de fármaco. Estas microesferas no provocan una respuesta inflamatoria no deseada y la formulación puede ajustarse para variar la liberación cinética del

antibiótico. Las microesferas liberan el antibiótico a una velocidad casi constante durante al menos de cuatro a seis semanas. Las microesferas permanecen en el área de implantación pero son muy pequeñas como para evitar la regeneración del tejido, característica no compartida por otros sistemas de suministro de antibióticos sugeridos.

EJEMPLO 2- PLGA/tobramicina/PMMA – Antibióticos parenterales

**[0033]** Con tal de analizar la efectividad para erradicar un caso establecido de osteomielitis, se condujo un estudio utilizando un conejo como modelo de osteomielitis, en el que analizamos dos métodos de terapia de antibiótico local – las microesferas y el cemento óseo de polimetilmetacrilato (PMMA) contra los antibióticos parenterales.

Materiales y Métodos

**[0034]** Cuarenta conejos neozelandeses macho adultos blancos, con un peso de entre 3 y 4 kg fueron seleccionados para este estudio. Cada conejo pasó por una cirugía inicial para inocular el área con la bacteria mediante un procedimiento bien establecido. Cuatro semanas después, cada conejo fue devuelto a la sala de operaciones para someterse a cirugía de irrigación y desbridamiento y un cultivo de la herida. En el momento de la segunda cirugía, cada animal fue situado de manera aleatoria en uno de los 5 grupos del tratamiento de la infección:

- (1). *Control*: el grupo de control tratado con microesferas de PLGA que no contenían antibiótico,
- (2). *Microesferas*: microesferas de PLGA con un 10% de tobramicina,
- (3). *Microesferas + Parenteral*: microesferas de PLGA con un 10% de tobramicina y Ancef parenteral,
- (4). *Cemento + Parenteral*: microesfera de PMMA con tobramicina y Ancef parenteral, y
- (5). *Parenteral*: Ancef parenteral.

**[0035]** Cada animal estuvo bajo tratamiento durante cuatro semanas antes de su sacrificio. Todos los procedimientos a los animales fueron aprobados por el de Comité por el Bienestar de los Animales de nuestra institución.

Preparación de las microesferas PLGA

**[0036]** La técnica de extracción del solvente de doble emulsión, como se ha descrito con anterioridad, fue utilizada para fabricar microesferas de aproximadamente 15-20µm de diámetro conteniendo tobramicina aproximadamente un 10% de su peso (Nebcin®), de Eli Lilly, Indianapolis, IN. y PLGA 50:50 un 90% de su peso (MEdisorb®), de Alkermes, Cincinnati, OH. Estas microesferas fueron cubiertas con gas nitrógeno, colocadas en ampollas cerradas, y guardadas congeladas a -70° C hasta ser utilizadas. Dos días antes de la cirugía las microesferas fueron esterilizadas utilizando

gas de óxido de etileno. En cada animal tratado, se implantaron 50mg de microesferas esterilizadas en la parte del hueso desbridada.

#### Preparación de las esferas PMMA

5 **[0037]** En el momento de la cirugía de irrigación y desbridamiento, las esferas estaban preparadas con la mezcla de 20g de cemento óseo de polimetilmetacrilato (Orthoset®), de Wright Medical, Arlington, TN, con 0,6g de tobramicina (Nebcin®). La mezcla resultante se introdujo en esferas de aproximadamente 4mm de diámetro, pesando aproximadamente 0,3g. Una esfera fue colocada en cada uno de los radios desbridados para su tratamiento.

#### 10 Preparación de la inoculación del estafilococo áureo

**[0038]** La variedad de estafilococo áureo utilizado en este estudio, UAMS-1, fue aislada del paciente con osteomielitis y depositada en la *American Type Culture Collection* (Colección Americana de Cultivos Tipo) como la variedad ATCC 49230. La bacteria fue preparada con cultivos de noche cultivados en caldo con tripticasa de soja  
15 a 37° C con aireación. Las células fueron recogidas mediante centrifugación, lavadas con salina fisiológica estéril, y vueltas a suspender en una concentración final de  $2 \times 10^8$  UFC/ml (con una absorbancia del 60% de transmitancia). Las suspensiones de célula fueron preparadas el día de la cirugía y mantenidas en hielo hasta su implantación.

20 **[0039]** La concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) para los dos antibióticos analizados, tobramicina y cefazolina, fueron determinadas por métodos de dilución estándar publicados por el *National Committe for Clinical Laboratory Standards* (Comité Nacional de Estándares de Laboratorios Clínicos). Rápidamente, las células de estafilococo áureo fueron  
25 cultivadas y diluidas en un estándar de turbidez McFarland de 0.5, aproximadamente  $2 \times 10^8$  células/ml. Brevemente, las células fueron mezcladas con uno de los dos antibióticos analizados, en concentraciones de entre 2 µg/ml y 64 µg/ml. Al día siguiente, los cultivos fueron examinados por la turbidez para permitir la determinación de los valores MIC. Después de esto, los cultivos libres de pruebas fueron recubiertos  
30 para determinar el MBC, y las colonias de cultivos se elaboraron al siguiente día.

#### Procedimiento quirúrgico – Inoculación

**[0040]** Todos los animales estuvieron en ayunas 24 horas antes de la operación. La anestesia fue inducida con ketamina (40mg/kg) y xilazina (0,5mg/kg) mediante una inyección subcutánea. La anestesia se mantuvo utilizando isoflurano adaptado para su  
35 efecto. El área de la herida fue cubierta con betadine seguido por un enjuague del 70% de etanol, y pintada con Prepoddyne antes de la incisión. La incisión se hizo sobre la superficie anterior y se extendió hacia abajo por la superficie del área. Se produjo una

incisión aguda en el periostio y se elevó desde la diáfisis. Una sierra oscilante MicroHall fue utilizada para extirpar un segmento de 1cm de la diáfisis del área. Un inóculo de 10 $\mu$ m (2 x 10<sup>6</sup> CPU) de estafilococo áureo fue liberado mediante microinyección con la punta de una pipeta estéril con un diámetro exterior de 0,56mm directamente en el centro del canal medular. El segmento fue devuelto a su posición original y la herida cerrada. Todos los animales fueron monitorizados diariamente durante 4 semanas para controlar el consumo de comida y bebida, el movimiento, y la presencia de infección localizada y sistémica (hinchazón de la herida, fiebre, etc.).

#### Operación quirúrgica – Irrigación y Desbridamiento

10 **[0041]** Cuatro semanas después de la fecha de la cirugía inicial, los animales estuvieron en ayunas y preparados para la segunda cirugía. La preparación quirúrgica fue exactamente la misma. Al abrir la herida, se hizo un frotis del hueso infectado y ese frotis se envió para su cultivo. Todos los tejidos blandos y el hueso infectado fueron extraídos. La herida fue irrigada con 40cc de solución salina normal con una jeringuilla. Si el tratamiento envolvía un sistema local de liberación de fármaco (grupos 1-4) este sistema se colocaba antes de cerrar la herida.

15 **[0042]** Los cuidados post-operativos incluían la administración de 25mg/kg de cefazolina (de Bums Veterinary Supply, Farmers Branch, TX) subcutánea dos veces al día para los animales de los grupos 3, 4 y 5. Para los grupos 2, 3 y 4, el suero y la orina fueron recogidos tres veces al día durante el primer día, una vez al día los días del 2 al 7, tres veces a la semana durante la semana 2, dos veces a la semana durante las semanas 3 y 4. Las muestras de suero y orina fueron analizadas de la concentración de tobramicina. Todas las concentraciones de tobramicina fueron elaboradas utilizando un inmunoensayo de polarización fluorescente (Sistema Abbot TDx). La sensibilidad del ensayo de tobramicina se define como la concentración medible más baja que puede distinguirse de cero con un 95% de seguridad y se determinó que fuera de 0,18 microgramos por mililitro.

#### Sacrificio y Análisis

30 **[0043]** Todos los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis de anestesia (50-60mg/kg de inyección intravenosa de Pentobarbital). Se obtuvieron los pesos. Si el suero no se había obtenido en la semana precedente al sacrificio, se obtuvieron en el momento del sacrificio y se guardaron congelados hasta que se examinaron. Se extrajo el área de cada animal y se tomaron radiografías laterales y anteroposteriores. Cada radiografía fue etiquetada con un número de tatuaje y la fecha. Las radiografías fueron evaluadas por dos observadores parciales que desconocen el proyecto de acuerdo con la escala de clasificación radiográfica mostrada en la Tabla 3, abajo.

Tabla 3. Escala de clasificación radiográfica

Categorías	Resultados
Tamaño de la infección (longitud en mm en su punto más largo)	0-10
Nueva formación ósea	
Total (2 corticales + matriz)	0
Moderada (2 corticales, sin matriz)	1
Leve (1 cortical)	2
Ninguna	3
Máximo (peor) resultado	13

**[0044]** La piel de la extremidad anterior fue entonces extirpada y los tejidos blandos y los cultivos obtenidos mediante un frotis en el área infectada con un cuturette, que se envió para identificar las especies.

- 5 **[0045]** Las muestras de hueso del área infectada estaban divididas para que tanto el ensayo de tobramicina como el análisis histológico pudieran llevarse a cabo. Una parte de 2cm del área que rodeaba el área infectada fue aislada utilizando una sierra Dremel. Esta sección fue dividida en mitades proximales y distales. Una mitad fue elegida de manera aleatoria y pulverizada tras congelarla con nitrógeno líquido
- 10 (MicroCryoCrusher®, BioSpec Products, Bartlesville, OK). El hueso pulverizado fue colocado en una ampolla de cristal de peso conocido, se pesó y se añadió 0,55 cc de PBS. Esta muestra fue incubada a 37° C al baño maría durante 2 horas. La muestra entonces fue filtrada en un contenedor criogénico y refrigerada a 4° C hasta que el ensayo tuvo lugar. La mitad restante fue colocada en una ampolla conteniendo un 10%
- 15 de formalina neutra tamponada. Las muestras histológicas fueron decalcificadas, cubiertas con parafina y las secciones tintadas con tinción de hematoxilina-eosina (H&E and Gram). Estos portaobjetos fueron evaluados por un patólogo según la escala de clasificación de la Tabla 4, abajo.

Tabla 4. Escala de clasificación histológica

Categoría	Resultados
Presencia de Bacterias	
Notable	3
Moderada	2
Leve	1
Ninguna	0
Inflamación intraósea	

Categoría	Resultados
Severa, absceso y fibrosis	3
Moderada, con fibrosis	2
Leve, con fibrosis	1
Ninguna, solo fibrosis	0
Nueva formación ósea	
Mínima - <25%	3
Leve - 25-50%	2
Moderada - 50-75%	1
Total - 75-100%	0
Máximo (peor) resultado	9

[0046] Las tablas 5 y 6 muestran la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) de tobramicina y cefazolina para esta variedad de estafilococo áureo. Los números son consistentes con los valores publicados para la variedad MRSA.

5

Tabla. 5

Antibiótico	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
Cefazolina	2	32
Tobramicina	4-8	16

Tabla 6. Determinaciones MIC y MBC

Concentración de Antibiótico (µg/ml)	Turbidez (MIC)		Colonv # (MBC)	
	T	C	T	C
0	++	++	ND	ND
2	+	-	ND	ND
4	+	-	ND	125
8	-	-	120	ND
16	-	-	0	86
32	-	-	0	0
64	-	-	0	0

T= Tobramicina C= Cefazolina ND= No Documentado

**[0047]** Todos los conejos fueron infectados tras la cirugía de inoculación; el 100% de los cultivos tomados en la cirugía de irrigación y desbridamiento dieron resultados positivos en estafilococo áureo. La mayoría de animales desarrollaron signos de infección localizada como por ejemplo hinchazón o drenaje en el área de la cirugía pero ningún animal mostró signos de enfermedad sistémica. Todos los animales fueron monitorizados diariamente en busca de signos o incomodidades y fueron tratados para reducir esas incomodidades. Se les suministró alimento suplementario a los animales cuyo apetito había disminuido y se colocaron esterillas de goma en las jaulas para conseguir que el movimiento fuera más cómodo. Tras el tratamiento con cefazolina parenteral, algunos animales tuvieron que ser tratados con metronidazol (Flagyl®, Bums Veterinary Supply) para la diarrea. Tres animales murieron de forma prematura debido a la diarrea.

**[0048]** En el momento del sacrificio, el porcentaje de animales que dieron positivo para osteomielitis estaba entre el máximo con un 75% en el grupo *Control* (1) y el mínimo con un 25% en el grupo *Microesferas + grupo parenteral* (3) como se muestra en la Fig. 4. La tabla de análisis de contingencia según la prueba  $\chi^2$  muestra que sólo el grupo *Microesferas + Parenteral* (3) tuvo un porcentaje significativamente más bajo que el grupo *Control* (1) ( $p=,046$ ). Sin embargo, si todos los grupos donde los antibióticos parenterales fueron dados se agrupan, y los grupos *Control* y *Microesferas* (1) y (2) se agrupan, estos son significativamente diferentes ( $p=,033$ ).

**[0049]** La Fig. 5 muestra los resultados de la clasificación radiográfica e histológica de las muestras. En la escala de clasificación radiográfica, el grupo *Cemento + Parental* (4) obtuvo resultados significativamente peores que los grupos *Control* (1), *Microesferas* (2), y *Parenteral* (5) ( $p=,047$ ). En la clasificación histológica, ninguno de los grupos era significativamente diferente.

**[0050]** La Fig. 6 muestra la concentración de tobramicina en los huesos para grupos tratados de manera local con tobramicina. Cuatro semanas después de la implantación del sistema de bolsa local, las microesferas todavía liberaban cantidades significantes de tobramicina. Las muestras de cemento tuvieron pequeñas pero medibles cantidades de tobramicina. Todas menos dos de las muestras de microesfera tenían concentraciones de tobramicina por encima del nivel MIC y cerca del nivel MBC para las bacterias analizadas, mientras que ninguna de las muestras PMMA llegó al nivel MIC. Ninguna de las muestras de orina y suero analizadas tenían niveles medibles de tobramicina.

**[0051]** Hemos desarrollado y descrito aquí, microesferas cargadas de tobramicina como un sistema de liberación de fármaco biodegradable para el tratamiento de la osteomielitis. Estas microesferas tienen forma esférica con un tamaño medio de 20 $\mu$ m.

Los copolímeros PLGA son biocompatibles, biodegradables, y están aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) para ciertos usos clínicos humanos. Los análisis *in-vitro* e *in-vivo* en el músculo demostraron que estas microesferas liberan antibióticos durante un periodo más largo que cuatro semanas y a velocidades casi constantes.

5 **[0052]** Hemos demostrado la efectividad de estas microesferas en un modelo de conejo con osteomielitis. En este estudio, todos los animales desarrollaron osteomielitis unas cuatro semanas después de la inoculación. Después de la segunda cirugía de irrigación y desbridamiento de la herida, la mayoría de los animales mostraron signos de mejoría. El 25% de los animales en el grupo *Control* (1) no mostraron signos de infección al sacrificarlos. El único grupo de tratamiento que demostró una  
10 mejoría significativa mayor que el grupo *Control* fue el grupo *Microesferas + Parenteral* (3), donde el 75% de los animales no mostraba signos de infección al sacrificarlos. Ningún tratamiento obtuvo resultados de un 100% de éxito.

**[0053]** Por lo tanto, las microesferas de acuerdo con la presente invención reflejaron  
15 altas concentraciones de tobramicina en el hueso cuatro semanas después de su implantación. Las esferas de cemento, por el contrario, todavía estaban eluyendo tobramicina pero a niveles mucho más bajos que el MIC y el MBC para el organismo estudiado. Además, las microesferas de cemento crearon una barrera física contra la nueva formación ósea en el área desbridada de la infección. Debido a este fenómeno,  
20 los resultados del grupo *Cemento + Parenteral* (4) fueron altos (más pobres) en la evaluación radiográfica. Pese a que los altos niveles de tobramicina en tejido óseo indicaban que las microesferas todavía permanecían en el área de implantación, las microesferas eran lo suficientemente pequeñas como para permitir nuevas formaciones óseas y se produjo la degradación del portador (PLGA).

25 **[0054]** Los resultados histológicos indicaron que no hubo diferencias significativas entre ninguno de los cinco grupos estudiados. Por lo tanto, ni las microesferas ni las microesferas de cemento repercutieron una respuesta inflamatoria crónica de los tejidos locales.

**[0055]** También hemos demostrado que estas microesferas PLGA liberan antibiótico  
30 en el tejido óseo en concentraciones por encima o cerca del nivel MBC durante al menos cuatro semanas. Cuatro semanas después del comienzo del tratamiento, el grupo *Microesferas + parenteral* (3) fue el único grupo que demostró una mejoría significativa por encima del grupo *Control* (1). Las microesferas, de acuerdo con la presente invención, no impiden la nueva formación ósea en el área desbridada, y no  
35 se requiere una segunda cirugía para su extracción. Las microesferas son biodegradables y no implican una inflamación crónica.



EJEMPLO 3- Microesferas de PLGA/vancomicina/PMMA

**[0056]** Realizamos estudios similares a los ejemplos y formulaciones arriba descritos, sustituyendo la tobramicina por vancomicina. En estos experimentos, fabricamos microesferas de unos 6,86 $\mu$ m (micronos) de diámetro que contenían aproximadamente un 5% de su peso de vancomicina, y microesferas de unos 7,46 $\mu$ m (micronos) de diámetro que contenían aproximadamente un 10% de su peso de vancomicina, y el 90% de su peso de PLGA 50:50. El porcentaje de PEG en las formulaciones fue entre 0% y 5%.

**[0057]** Los resultados de las eficiencias de atrapamiento y las velocidades de elución de la vancomicina en un periodo de 600 horas se representan en la Fig. 7. El resultado fue que por encima de un periodo de 600 horas, en la formulación del 10% de vancomicina aproximadamente un 27% de la vancomicina fue eluída y en la formulación del 5% de vancomicina aproximadamente un 40% de la vancomicina fue eluída. Descubrimos que la eficiencia de atrapamiento de la formulación del 10% de vancomicina era de aproximadamente un 20,4% para la formulación del 10% de vancomicina y la eficiencia de atrapamiento para la formulación del 5% de vancomicina fue de un 21,5%.

**[0058]** La formulación de vancomicina, como la formación de tobramicina, se eluye muy bien de manera constante. En ambas formulaciones, los niveles fueron aceptables, con sólo pequeñas diferencias en el atrapamiento y la liberación. Cada una de estas formulaciones tiene ventajas, por ejemplo, una puede utilizarse como profilaxis, mientras la otra puede utilizarse para el tratamiento de una infección.

**[0059]** Pese a que varios antibióticos han sido descritos aquí como ejemplos de propósitos de las microesferas, debe entenderse que las microesferas de la presente invención puede utilizarse con varios agentes antibióticos y antibacteriales o combinaciones de ellos, preferentemente aquellos dentro de la clase de "cefalosporinas". Estos pueden obtenerse comercialmente o prepararse según las referencias citadas en el *Physicians' Desk Reference* y en el **FDA's Orange book** Estadounidense.

**[0060]** Por ejemplo, la presente invención puede utilizar uno o más de los siguientes antibióticos disponibles comercialmente y los agentes antibacteriales seleccionados del grupo compuesto por: Ancef, Tobramicina, Cefadroxilo, Cefazolina, Cefalexina, Cefaclor, Cefotetan, Cefoxitina, Cefprozil, Cefuroxima, Loracarbef, Cefdinir, Cefixima, Cefoperazona, Cefotaxima, Cefpodoxima, Ceftazidima, Ceftibutén, Ceftiozoxima, Ceftriaxona, Cefepima, y Vancomicina.

**[0061]** Las presentes microesferas de liberación de antibiótico controlada pueden implantarse mediante la inyección, o colocarse total o parcialmente dentro del cuerpo

en el área de la infección real o potencial y liberar una cantidad efectiva del agente antibiótico suficiente para producir niveles bactericidas en los tejidos del cuerpo y liberar una dosis del agente antibiótico casi constante durante al menos 4 semanas a niveles que exceden la concentración mínima inhibitoria (MIC) para los organismos comúnmente considerados causantes de infecciones. Las microesferas pueden situarse en el área de tratamiento quirúrgico, como por ejemplo el área de una fractura de hueso, en el área de colocación de una varilla o una placa de metal o de fijadores metálicos y dispositivos de reemplazo de las articulaciones, o en el área de colocación de materiales de injerto utilizados en las operaciones cardiovasculares, generales, ginecológicas y de neurocirugía.

**Reivindicaciones**

1. Formulaciones de liberación controlada capaces de liberar un antibiótico de manera casi constante durante un determinado periodo de tiempo para su uso en el tratamiento y prevención de infecciones relacionadas con el cuerpo en el área de una infección real o potencial, comprendiendo:
  - microesferas biodegradables formadas por ácido polilactico-glicólico (PLGA) de entre el 85% y 99% de su peso en una proporción de 50% ácido láctico y 50% ácido glicólico;
  - por polietilenglicol (PEG) de entre el 0% y el 5% de su peso, y una solución acuosa de antibiótico atrapada en dichas microesferas y capaz de ser eluída desde dichas microesferas,
  - en la que dichas microesferas tienen de entre 6µm a 20µm de diámetro y por lo tanto tienen un tamaño suficiente como para no impedir la nueva formación ósea y como para ser capaces de permanecer en el área donde se desea que se produzca esa nueva formación ósea, cuando dichas microesferas se sitúan en dicha área.
2. Las formulaciones de liberación controlada para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en las que dicho antibiótico comprende de un 1% a un 10% de su peso.
3. Las formulaciones de liberación controlada para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en las que dicho antibiótico se selecciona de la clase de antibióticos de cefalosporina.
4. Las formulaciones de liberación controlada para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en las que dicho antibiótico se selecciona del grupo compuesto por el Ancef, la Cefazolina, la Tobramicina, y la Vancomicina.
5. Las formulaciones de liberación controlada para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en las que dicho antibiótico se selecciona del grupo compuesto por Ancef, Tobramicina, Cefadroxilo, Cefazolina, Cefalexina, Ceflacor, Cefotetan, Cefoxitina, Cefprozil, Cefuroxima, Loracarbef, Cefdinir, Cefixima, Cefoperazona, Cefotaxima, Cefpodoxima, Ceftazidima, Ceftibutén, Ceftiozoxima, Ceftriaxona, Cefepima, y Vancomicina.
6. Las formulaciones de liberación controlada para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en las que dichas microesferas tienen entre 15µm y 20µm de diámetro.
7. El uso de la liberación controlada como se define en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6 en la elaboración del medicamento para el

tratamiento de infecciones relacionadas con el cuerpo en dicha área donde se desea que se produzca la nueva formación ósea.

8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7 para la administración en el área de un tratamiento quirúrgico.
- 5 9. El uso de acuerdo con la reivindicación 7 para la administración en el área de una fractura de hueso.
- 10 10. El uso de acuerdo con la reivindicación 7 para la administración en el área de colocación de las varillas y placas de metal o de las fijaciones metálicas.
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 7 para la administración en el área de los dispositivos de reemplazo de articulaciones.
- 10 12. El uso de acuerdo con la reivindicación 7 para la colocación en el área de osteomielitis.
- 15 13. Un sistema de liberación de fármaco que comprende múltiples microesferas comprendiendo una solución acuosa de antibiótico encapsulada en una membrana polimérica que contiene ácido polietilenglicol (PEG) y ácido poliláctico-glicólico (PLGA), en el que dicho PLGA es una mezcla 50:50 de ácido láctico y ácido glicólico, en el que dichas microesferas tienen entre 6µm y 20µm de diámetro, siendo de tamaño suficiente para no impedir la nueva formación ósea y ser capaz de permanecer en el área de la infección real o potencial dentro del cuerpo donde se desea que la nueva formación ósea se produzca, y en la que dicha solución de antibiótico encapsulado es capaz de liberarse de manera controlada.
- 20
- 25

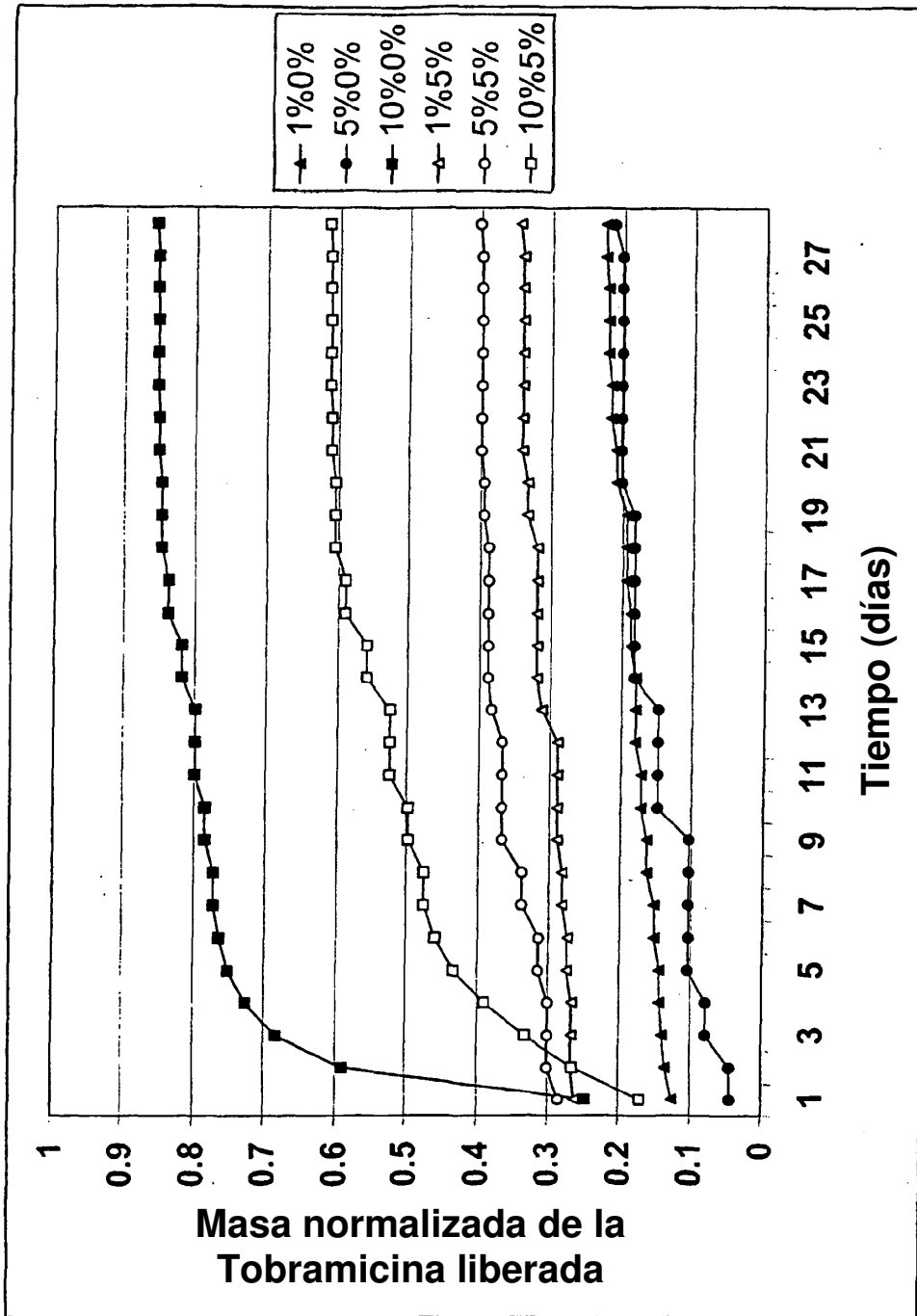


Fig. 1

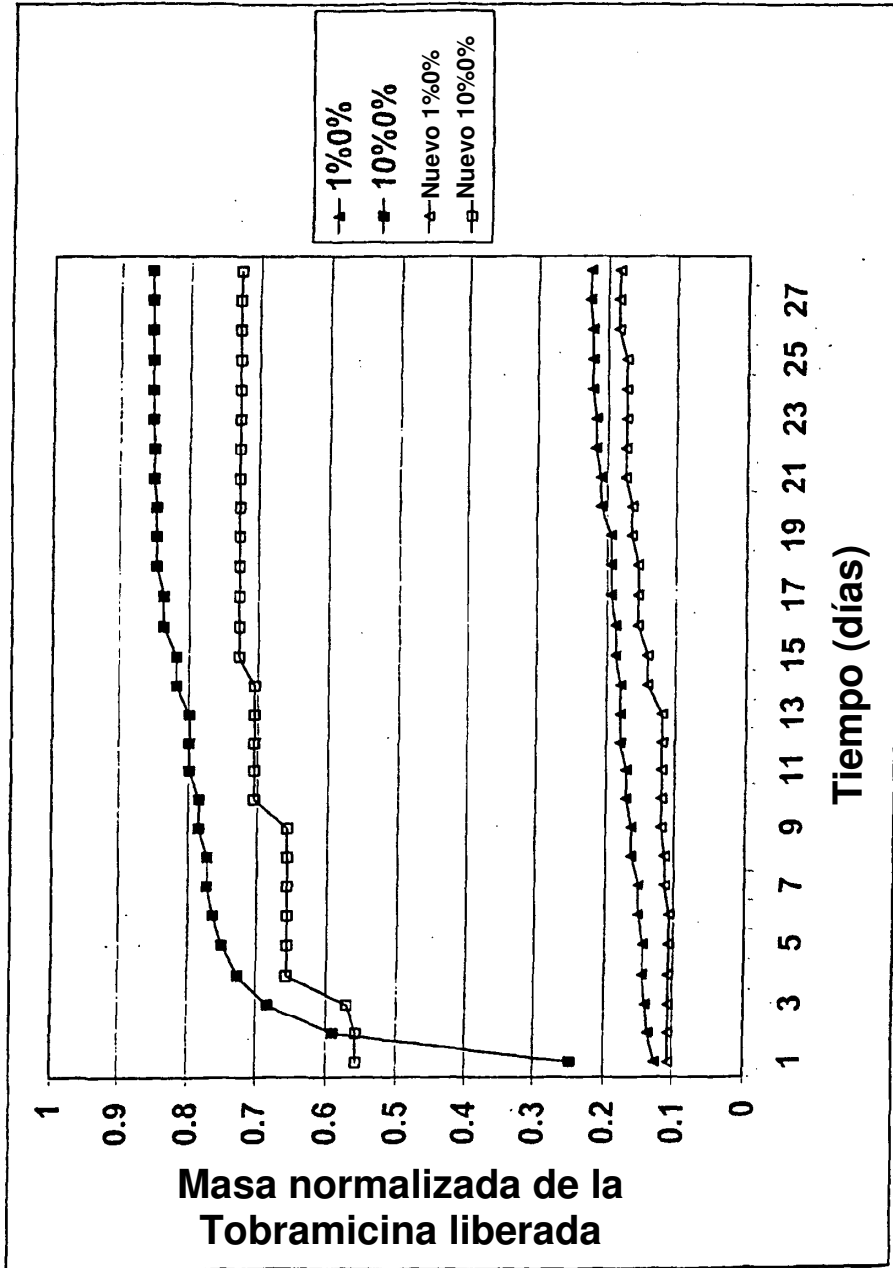


Fig. 2

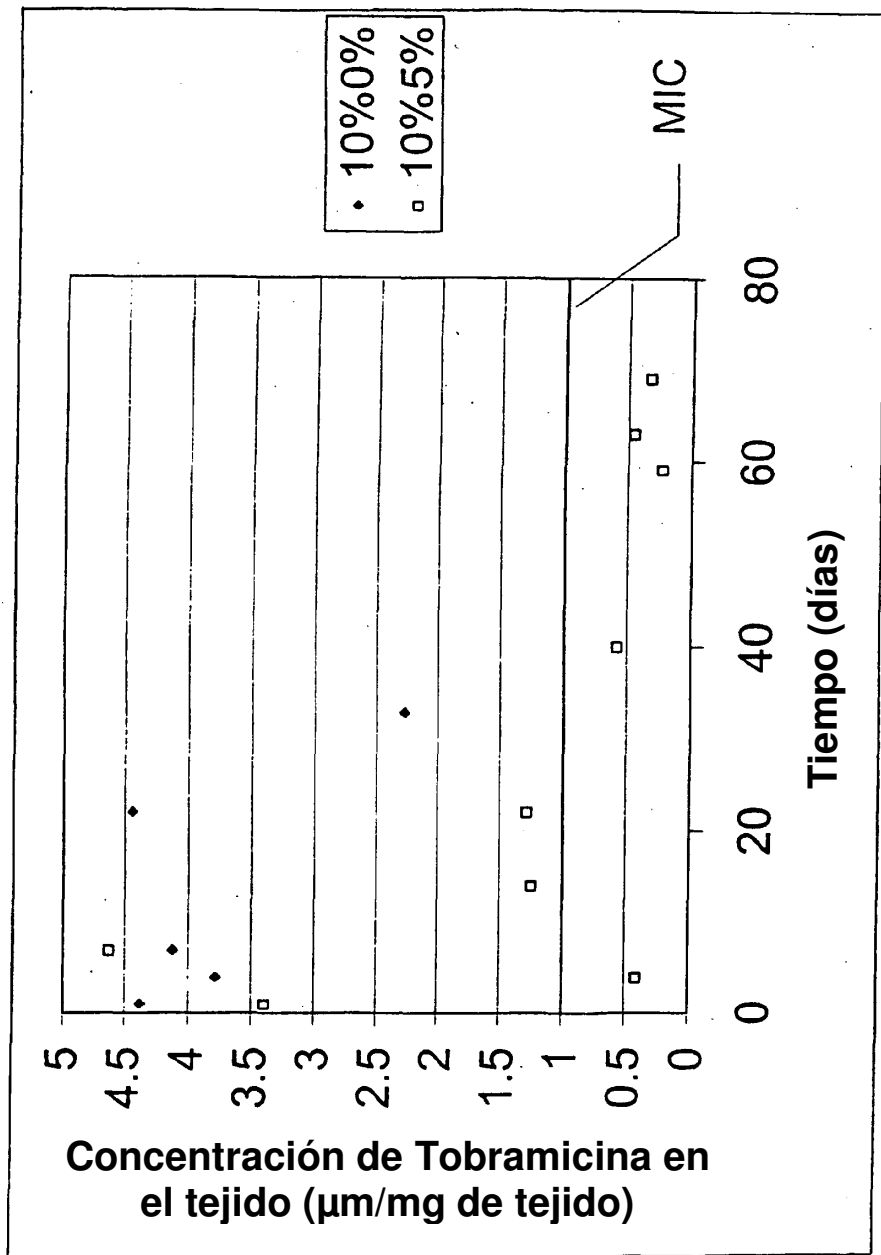
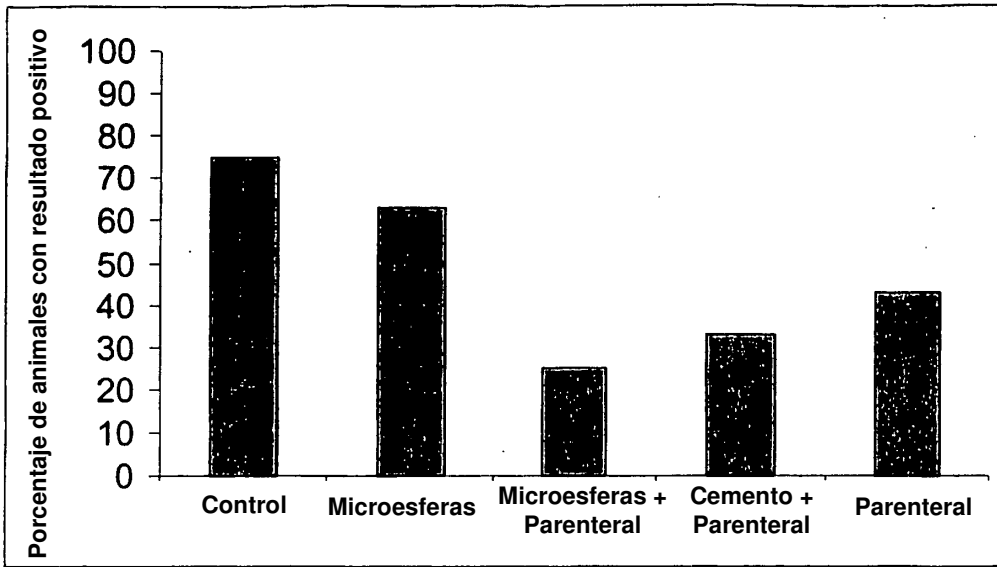
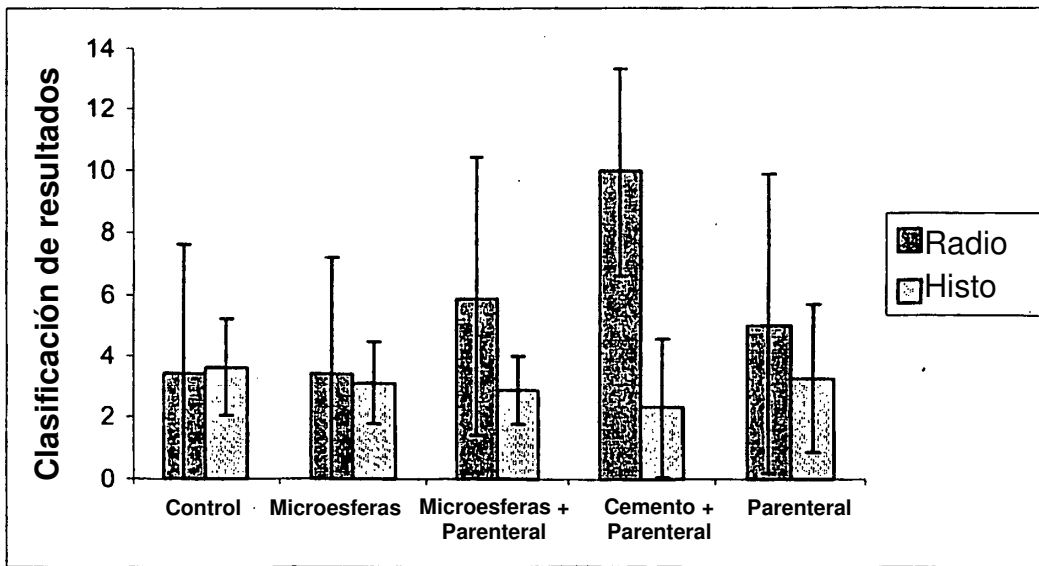


Fig. 3

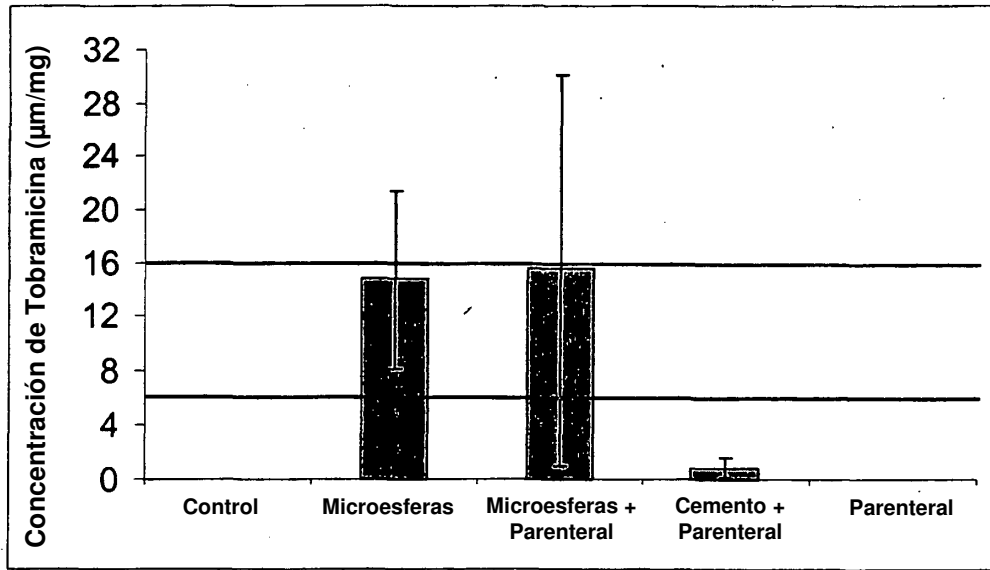


*Fig. 4*



*Fig. 5*





*Fig. 6*

Características de la elución de la Vancomicina a lo largo del tiempo

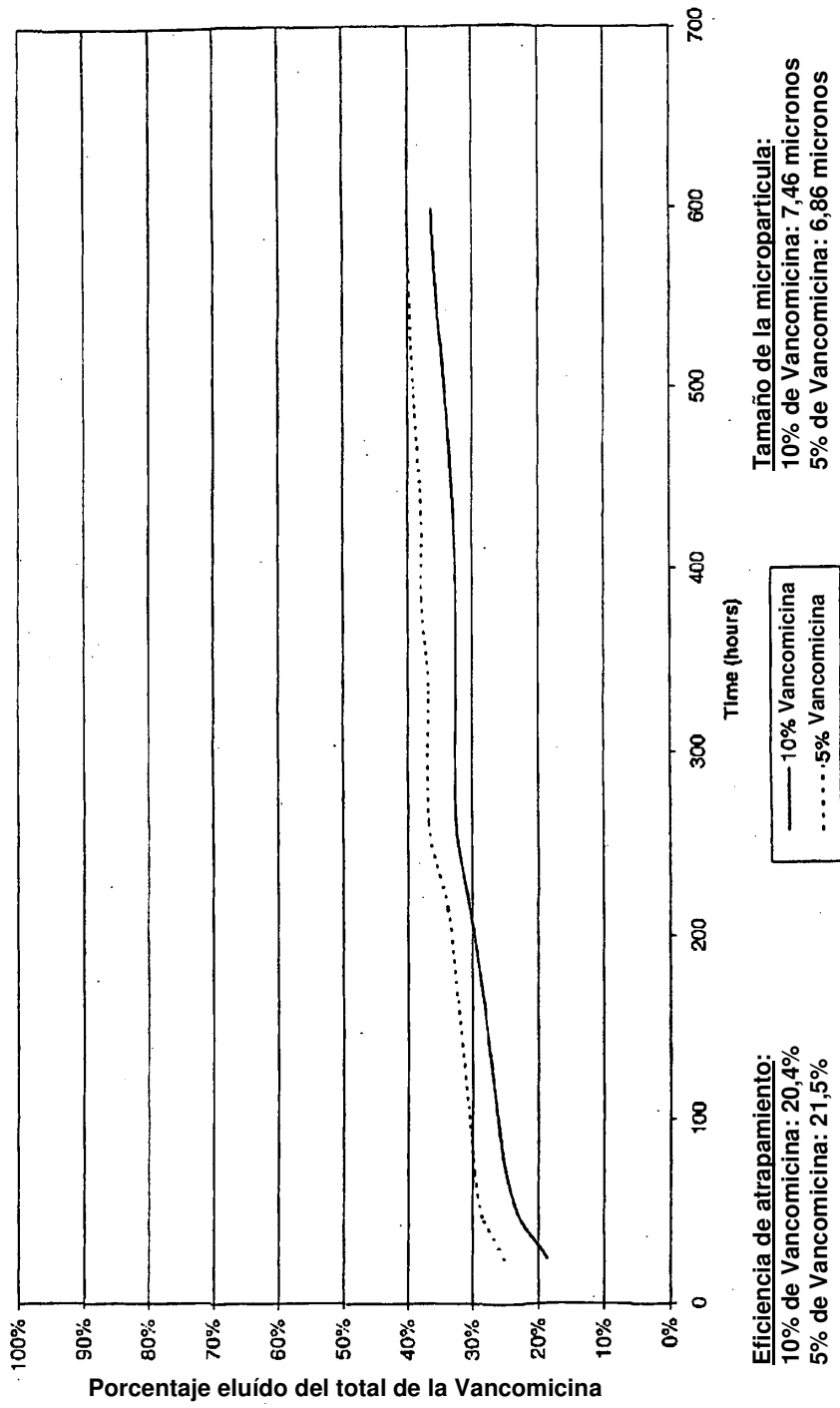


Fig. 7