

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 395**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/32** (2006.01)

**A61L 24/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2014 E 14160184 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2875832**

54 Título: **Pasta implantable y su uso**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.11.2016**

73 Titular/es:

**BONALIVE BIOMATERIALS OY (100.0%)  
Biolinja 12  
20750 Turku, FI**

72 Inventor/es:

**DRAGO, LORENZO;  
ROMANO, CARLO LUCA;  
OLLILA, FREDRIK y  
LUCCHESI, JIMMY**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

**ES 2 588 395 T3**

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

DESCRIPCIÓN

PASTA IMPLANTABLE Y SU USO

5

La presente invención se refiere a una pasta implantable que comprende vidrio bioactivo, para su uso como un implante o recubrimiento de un implante.

10

Antecedentes de la invención

El vidrio bioactivo es un material bioactivo y biocompatible conocido. Durante décadas, se han investigado vidrios bioactivos como materiales de relleno óseo que pueden unirse al hueso, incluso químicamente. Los descubrimientos recientes de las cualidades superiores de vidrios bioactivos han hecho que los materiales sean mucho más interesantes para estas aplicaciones. Determinados vidrios bioactivos se venden comercialmente con el nombre comercial de por ejemplo BonAlive®, NovaBone® y Biogran®. Se han usado vidrios bioactivos en diferentes formas para aplicaciones médicas, tales como gránulos y placas para relleno de cavidades óseas craneomaxilofaciales y ortopédicas y reconstrucción ósea.

20

Los beneficios principales del uso de vidrio bioactivo como un sustituto de injerto óseo es que puede evitarse la recogida de los injertos óseos de un sitio secundario. Dentro de un determinado intervalo de composición los vidrios bioactivos estimulan el crecimiento óseo y muestran propiedades de inhibición de crecimiento bacteriano.

25

Para que el vidrio sea bioactivo y tenga las propiedades mencionadas anteriormente, el vidrio tiene que disolverse y tener una determinada velocidad de disolución así como tener una determinada composición. La relación entre la composición y la bioactividad se ha descrito en Hench L. Bioactive ceramics: Theory and clinical applications. Bioceramics 1994;7:3-14 de una manera que proporciona suficientes herramientas a un experto en la técnica para diseñar un vidrio bioactivo.

30

Un factor que influye en la velocidad de disolución y por tanto el tiempo de degradación total de las partículas de vidrio es el tamaño de partícula, o la re-

lación superficie-volumen (S/V). En otras palabras cuánto más pequeña es la partícula más alta es la relación S/V y más rápida es la disolución y más corto es el tiempo de degradación total. Por ejemplo, el vidrio comercialmente disponible 45S5/Bioglass® está disponible en un intervalo de tamaño de 90-710  $\mu\text{m}$  y se dice que se disuelve en el cuerpo en menos de un año. El vidrio S53P4, vendido con el nombre comercial de BonAlive®, tiene una composición química del 53% en peso de  $\text{SiO}_2$ , el 23% en peso de  $\text{Na}_2\text{O}$ , el 20% en peso de  $\text{CaO}$  y el 4% en peso de  $\text{P}_2\text{O}_5$ , y es claramente un vidrio que se disuelve más lentamente que el vidrio 45S5 que tiene una composición del 45% en peso de  $\text{SiO}_2$ , el 24,5% en peso de  $\text{Na}_2\text{O}$ , el 24,5% en peso de  $\text{CaO}$ , y el 6% en peso de  $\text{P}_2\text{O}_5$ .

Para potenciar el uso y ampliar el alcance quirúrgico del vidrio bioactivo, se han desarrollado composiciones de tipo pasta moldeable o masilla. En un caso ideal, la formulación de masilla debe ser fácil de dosificar, manipular y administrar directamente al defecto óseo sin riesgo de contaminación cruzada, derrames o dosificación excesiva. En la práctica, los médicos han usado sus manos para dosificar y conformar la masilla, y sus dedos y/o una espátula o similar para rellenar las cavidades óseas. Sin embargo, una formulación tal posee numerosos inconvenientes prácticos debido a por ejemplo riesgos de contaminación durante la manipulación, lo que no es óptimo para el paciente o el médico.

Se conoce una formulación de masilla/pasta sintética a partir del documento US 2008/0226688 y se conoce comercialmente como masilla Nova-Bone®. El documento describe un tipo de relleno de hueso óseo de pasta o masilla, es decir, una composición de implante formable estéril para la aplicación a un sitio de defecto óseo que comprende partículas de vidrio bioactivo en una disolución acuosa de portador. Las partículas de vidrio bioactivo se añaden a un portador viscoso a una concentración que oscila de desde aproximadamente el 68% hasta aproximadamente el 76% (p/p). El portador comprende una mezcla de glicerol y polietilenglicol (PEG) de peso molecular medio que oscila de desde el 24% hasta el 32% (p/p), oscilando la proporción de glicerol a polietilenglicol de desde aproximadamente 45:55 hasta aproximadamente 65:35.

Además de masillas o pastas de relleno de hueso óseo completamente sintéticas, se han usado ampliamente y se conocen en la técnica determinadas mezclas semisintéticas en forma de formulaciones de masilla o pasta, tales como mezclas de huesos de aloinjerto, matriz ósea desmineralizada y colágeno bovi-

no/hidroxiapatita. Sin embargo, tales formulaciones de aloinjerto poseen numerosos inconvenientes de los que el riesgo de transmisión de enfermedad es el mayor inconveniente y nunca puede excluirse completamente.

Además, las infecciones de prótesis articulares (IPA) y otros implantes  
5 no biológicos son una preocupación importante para el sistema sanitario, y están relacionadas con muchas molestias para los pacientes, tal como hospitalización prolongada, cirugía adicional asociada con un mayor riesgo de complicaciones y tratamiento antimicrobiano de larga duración. A pesar de la incidencia relativamente baja de las IPA (1-2%), el impacto económico asociado sigue siendo enorme.  
10 me. Una amplia gama de microorganismos pueden producir biopelícula en materiales protésicos, provocando en muchos casos un transcurso fatal de la terapia. *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulasa negativos y varillas gram-negativos son los patógenos más implicados en las IPA.

La primera etapa en la patogénesis de las IPA es la adherencia de  
15 células bacterianas al implante, seguido de la formación de una matriz de biopelícula. Una biopelícula es una población microbiana encerrada en una matriz caracterizada por la adhesión de célula a célula entre microorganismos y la superficie no biológica. La formación de biopelícula es un componente antiguo e integral del ciclo celular procariótico y un factor importante para la supervivencia bacteriana  
20 en el ambiente. La característica común de infecciones relacionadas con biopelícula es su resistencia intrínseca a la inmunidad del huésped, agentes antimicrobianos y biocidas convencionales. Se conoce de hecho que las bacterias encerradas en estructuras de biopelícula toleran niveles de antibióticos de 10 a 1000 veces superiores a las concentraciones inhibitorias mínimas de la correspondiente  
25 forma planctónica.

Aún otro problema relacionado con infecciones bacterianas en general es la capacidad de las bacterias a hacerse resistentes a antibióticos. No es un fenómeno reciente, sino que es un tema de salud crítico en la actualidad. Durante varias décadas, en grados variantes, las bacterias que provocan infecciones  
30 comunes han desarrollado resistencia a cada antibiótico nuevo, y la resistencia antimicrobiana ha evolucionado para convertirse en una amenaza de salud mundial según el Centro para el control y la prevención de enfermedades en EEUU y la Organización mundial de la salud.

Efectivamente, las infecciones de bacterias resistentes son ahora demasiado comunes, y algunos patógenos incluso se han hecho resistentes a múltiples tipos o clases de antibióticos. En la actualidad la resistencia a antibióticos se encuentra en la mayoría de los hospitales y se ha estimado que el 70% de todas las bacterias será resistente a antibióticos en el 2020. Se ha demostrado la actividad inhibitoria de crecimiento bacteriano *in vitro* de BAG S53P4 frente a *S. aureus* resistente a meticilina (SARM), *Staphylococcus epidermidis* resistente a meticilina (SERM), *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* que se aislaron de pacientes afectados por osteomielitis crónica (Drago L, Romanò D, De Vecchi E, et al. Bioactive glass BAG-S53P4 for the adjunctive treatment of chronic osteomyelitis of the long bones. An in vitro and prospective clinical study. BMC Infect. Dis. 10, 13:584 (2013)).

El documento "Antibacterial effect of bioactive glasses on clinically important anaerobic bacteria *in vitro*", J. Mat. Sc.: Mat. en Medicine, Vol 19, no. 2, 10 de julio de 2007 da a conocer que el polvo de vidrio bioactivo S53P4 con un tamaño de partícula igual o inferior a 45 micrómetros tiene un buen efecto antibacteriano. El documento EP 2322134 del presente solicitante da a conocer pastas implantables que comprenden diferentes tipos de polietilenglicoles y esferas de vidrio bioactivo.

20

### Definiciones

Los términos usados en esta solicitud, si no se especifica lo contrario, son los acordados en la conferencia de consenso sobre biomateriales en 1987 y 1992, véase Williams, DF (ed.): Definitions in biomaterials: Proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, Inglaterra. Marzo 3-5, 1986. Elsevier, Amsterdam 1987, y Williams DF, Black J, Doherty PJ. Second consensus conference on definitions in biomaterials. En: Doherty PJ, Williams RL, Williams DF, Lee AJ (eds). Biomaterial-Tissue Interfaces. Amsterdam: Elsevier, 1992.

En esta solicitud, material bioactivo significa un material que se ha diseñado para obtener o modular actividad biológica. El material bioactivo es a menudo material de superficie activa que puede unirse químicamente a tejidos mamíferos.

El término reabsorbible en este contexto significa que el material está desintegrado, es decir descompuesto, tras la implantación prolongada cuando se inserta en el cuerpo mamífero y cuando se pone en contacto con el entorno fisiológico. Especialmente, la expresión vidrio reabsorbible significa vidrio rico en silicio que no forma una capa de hidroxilcarbonato de apatita en su superficie cuando está en contacto con el entorno fisiológico. El vidrio reabsorbible desaparece del cuerpo a través de reabsorción y no activa significativamente las células o el crecimiento celular durante su proceso de descomposición.

Biomaterial significa un material que está destinado a interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo. Biocompatibilidad significa la capacidad de un material usado en un dispositivo médico para rendir de manera segura y adecuada provocando una respuesta del huésped apropiada en una ubicación específica. Reabsorción significa la descomposición de biomaterial debido a una disolución sencilla. Material compuesto significa un material que comprende al menos dos constituyentes diferentes, por ejemplo un polímero orgánico y un material cerámico, tal como vidrio.

#### Objetos y sumario de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar composiciones útiles como rellenos de huecos óseos que son fáciles y seguros de manipular y que tienen las propiedades deseadas en relación con el efecto de relleno óseo, mientras que al mismo tiempo son antibacterianas. Otro objeto de la invención es proporcionar una composición que es útil para evitar la formación de biopelícula en la superficie de un implante. Un objeto de la invención es por tanto también proporcionar un material para su uso en cirugía de implante para evitar infecciones de manera local. Aún otro objeto de la invención es proporcionar un material al que las bacterias no se harán resistentes.

La presente invención se refiere a una pasta implantable que comprende gránulos de vidrio bioactivo que tienen una distribución de tamaño de 0,5-45  $\mu\text{m}$  en una cantidad del 10-30% en peso del peso total del vidrio bioactivo y gránulos de vidrio bioactivo que tienen una distribución de tamaño de 100-4000  $\mu\text{m}$  en una cantidad del 90-70% en peso del peso total del vidrio bioactivo. La composición del vidrio bioactivo es del 45-55% en peso de  $\text{SiO}_2$ , el 20-25% en

peso de  $\text{Na}_2\text{O}$ , el 18-25% en peso de  $\text{CaO}$  y el 3-6% en peso de  $\text{P}_2\text{O}_5$ . La pasta comprende además polietilenglicol de bajo peso molecular que tiene un intervalo de peso molecular de 200-700 g/mol, polietilenglicol de peso molecular medio que tiene un intervalo de peso molecular de 700-2500 g/mol y polietilenglicol de alto peso molecular que tiene un intervalo de peso molecular de 2500-8000 g/mol, con la condición de que el peso molecular del polietilenglicol de bajo peso molecular y del polietilenglicol de peso molecular medio difieren entre sí en al menos 80 g/mol y de que el peso molecular del polietilenglicol de peso molecular medio y del polietilenglicol de alto peso molecular difieren entre sí en al menos 300 g/mol.

La invención también se refiere al uso de una pasta según esta invención en la fabricación de un implante para su uso en la formación ósea. La invención todavía adicionalmente se refiere al uso de una pasta según esta invención en el recubrimiento de un implante. La invención aún se refiere a un implante recubierto con una pasta según esta invención.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una pasta implantable que comprende

(a) polvo de vidrio bioactivo que tiene una distribución de tamaño de 0,5-45  $\mu\text{m}$  en una cantidad del 10-30% en peso del peso total del vidrio bioactivo,

(b) gránulos de vidrio bioactivo que tienen una distribución de tamaño de entre 100 y 4000  $\mu\text{m}$  en una cantidad del 90-70% en peso del peso total del vidrio bioactivo,

(c) polietilenglicol de bajo peso molecular que tiene un intervalo de peso molecular de 200-700 g/mol,

(d) polietilenglicol de peso molecular medio que tiene un intervalo de peso molecular de 700-2500 g/mol,

(e) polietilenglicol de alto peso molecular que tiene un intervalo de peso molecular de 2500-8000 g/mol y

(f) glicerol,

en la que la composición del vidrio bioactivo es del 45-55% en peso de  $\text{SiO}_2$ , el 20-25% en peso de  $\text{Na}_2\text{O}$ , el 18-25% en peso de  $\text{CaO}$  y el 3-6% en peso de  $\text{P}_2\text{O}_5$ , con la condición de que el peso molecular del polietilenglicol de bajo peso molecular y del polietilenglicol de peso molecular medio difieren entre sí en al

menos 80 g/mol y de que el peso molecular del polietilenglicol de peso molecular medio y del polietilenglicol de alto peso molecular difieren entre sí en al menos 300 g/mol.

La presente invención por tanto proporciona una composición que es  
5 osteoconductor, bioactiva, antibacteriana y moldeable. La pasta comprende  
gránulos de vidrio bioactivo en una matriz o viscosa disolución orgánica de portador. La pasta está por tanto compuesta por partículas de silicato de calcio-fósforo-sodio mezcladas con un aglutinante sintético compuesto por polietilenglicol que actúa como un agente aglutinante temporal para las partículas. Las partículas y el  
10 aglutinante normalmente se prevén como un material cohesivo premezclado. Con la implantación, el aglutinante se absorbe para permitir la infiltración de tejido entre las partículas y permitir el proceso de curación normal del hueso asociado con las partículas (reabsorción de vidrio bioactivo y regeneración ósea). Una vez que se ha absorbido el aglutinante poco después de la implantación, solamente deja  
15 atrás las partículas de vidrio bioactivo. Todos estos componentes se conocen bien y se usan y toleran ampliamente en los campos médicos, farmacéuticos y cosméticos así como en comidas y bebidas.

Al menos parte los objetos mencionados anteriormente, si no todos, se logran por tanto mediante la presente invención y sus diversas realizaciones.  
20 Efectivamente, cuando un polvo de partículas bioactivas pequeñas se combina con una mezcla de polietilenglicoles, el material resultante sorprendentemente tiene efecto antibacteriano, mientras que al mismo tiempo mejora el crecimiento óseo hacia el interior.

La patente EP 2322134 da a conocer una composición similar, que  
25 comprende esferas de vidrio bioactivo y una mezcla de diferentes polietilenglicoles (PEG de peso molecular bajo, medio y alto). Se ha observado, sin embargo, que tal composición, en la que el vidrio bioactivo es vidrio bioactivo BonAlive®, no tiene un efecto antibacteriano significativo. Por otro lado, el vidrio bioactivo BonAlive® por sí solo ha demostrado tener un efecto antibacteriano independientemente de su tamaño de partícula, incluso frente a bacterias resistentes a antibióticos.  
30 Sin embargo, un polvo de partículas bioactivas pequeñas (diámetro promedio inferior a 45  $\mu\text{m}$ ) no puede incorporarse en tejidos mamíferos ya que su velocidad de reacción es demasiado alta e incluso puede ser peligrosamente alta. Tampoco promovería el crecimiento óseo debido a su alta velocidad de reacción.

En comparación con un polvo de vidrio bioactivo de similar tamaño de partícula, el presente material, incluidos los polietilenglicoles, tiene la ventaja adicional de que puede aplicarse a través de un tubo, permitiendo su uso también en cirugía mínimamente invasiva. El material es viscoso y por tanto rellena el defecto de manera controlada, gradual, a diferencia del polvo seco que fluye libremente. Es por tanto posible controlar la distribución uniforme de la pasta al defecto.

También es posible combinar el vidrio bioactivo en forma de polvo de tamaño de partícula pequeño a gránulos más grandes, que tendrían una influencia sobre tanto las propiedades de flujo del material como en sus propiedades de crecimiento óseo hacia el interior. La elección de los polietilenglicoles también puede adaptarse para cumplir con las necesidades de propiedades de flujo.

En la presente descripción, la abreviatura % en peso significa el porcentaje en peso, y se expresa normalmente como un porcentaje en peso del peso total. El peso molecular es el peso molecular medio, que aquí es el peso molecular promedio en número, y se expresa como g/mol. La distribución de tamaño de las partículas de vidrio bioactivo se determina por tamizado.

Gránulos significan partículas que tienen cualquier forma regular o irregular diferente de esferas. El polvo de vidrio bioactivo también está hecho de gránulos.

Según una realización preferida, la pasta también comprende (g) agente terapéuticamente activo.

Según una realización, los gránulos de vidrio bioactivo tienen una distribución de tamaño de 500-800  $\mu\text{m}$ . Según otra realización, los gránulos de vidrio bioactivo tienen una distribución de tamaño de 100-350  $\mu\text{m}$ . Según aún otra realización, los gránulos de vidrio bioactivo tienen una distribución de tamaño de 315-500  $\mu\text{m}$ . Según otra realización, los gránulos de vidrio bioactivo tienen una distribución de tamaño entre 1000 y 2000  $\mu\text{m}$ . La composición puede por ejemplo comprender el vidrio bioactivo en forma de polvo y gránulos que tienen una distribución de tamaño de 315-500  $\mu\text{m}$ . Una composición tal puede ser útil por ejemplo para cirugía dental. Otra posible combinación es el polvo y gránulos que tienen una distribución de tamaño de 500-800  $\mu\text{m}$ . Esta composición puede ser útil para cirugía craneomaxilofacial y de manos. Una posible combinación adicional es el

polvo con gránulos que tienen una distribución de tamaño de 1000-2000  $\mu\text{m}$ . Esta composición puede ser útil para cirugía ortopédica, de trauma y de espina dorsal.

La composición puede por tanto comprender vidrio bioactivo en forma de polvo, es decir en gránulos que tienen una distribución de tamaño de 1-44  $\mu\text{m}$ .

5 La distribución de tamaño puede ser por ejemplo de desde 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ó 40  $\mu\text{m}$  hasta 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 ó 45  $\mu\text{m}$ . La composición adicionalmente comprende gránulos más grandes, que pueden tener una distribución de tamaño de por ejemplo 100-350  $\mu\text{m}$  o 100-200  $\mu\text{m}$  o 150-250  $\mu\text{m}$  o 200-300  $\mu\text{m}$  o 250-350  $\mu\text{m}$ . La distribución de tamaño de estos gránulos más grandes  
10 también puede ser de por ejemplo 315-500  $\mu\text{m}$  o 350-500  $\mu\text{m}$  o 400-500  $\mu\text{m}$ . La distribución de tamaño de los gránulos más grandes todavía adicionalmente puede ser de por ejemplo 500-800  $\mu\text{m}$  o 500-700  $\mu\text{m}$  o 550-800  $\mu\text{m}$  o 600-800  $\mu\text{m}$  o 650-750  $\mu\text{m}$ . La distribución de tamaño también puede, en algunas realizaciones, ser de por ejemplo 1000-2000  $\mu\text{m}$  o 1000-1500  $\mu\text{m}$  o 1300-1800  $\mu\text{m}$  o 1500-2000  
15  $\mu\text{m}$  o 2000-3150  $\mu\text{m}$ . La distribución de tamaño de los gránulos de vidrio se determina por tamizado.

La distribución de tamaño de los gránulos de vidrio también puede ser por ejemplo de desde 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350,  
20 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2900, 3000 ó 3150  $\mu\text{m}$  hasta 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2900, 3000, 3100, 3150, 3200, 3300, 3400, 3450, 3550, 3600,  
25 3700, 3800, 3900 ó 4000  $\mu\text{m}$ .

Los polietilenglicoles (PEG), también conocidos como óxidos de polietileno, contienen la unidad de repetición ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ) y se preparan mediante la adición por etapas de óxido de etileno a un compuesto que contiene un átomo de hidrógeno reactivo. Los polietilenglicoles se preparan mediante la adición de óxido  
30 de etileno a etilenglicol para producir una estructura de polietileno bifuncional  $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ , en la que n es un número entero de tamaño que varía en función del peso molecular de polietilenglicol.

Los polietilenglicoles usados en la presente invención son generalmente polietilenglicoles lineales, es decir que tienen un peso molecular de 100 a 8000 g/mol. También pueden usarse polietilenglicoles ramificados y en forma de estrella para reducir o adaptar adicionalmente la viscosidad de la pasta. Los polietilenglicoles normalmente se denominan PEG con una cifra, indicando la cifra el peso molecular promedio en g/mol. Por tanto, PEG 400 significa polietilenglicol que tiene un peso molecular medio de 400 g/mol y PEG 2000 significa polietilenglicol que tiene un peso molecular medio de 2000 g/mol.

Los polietilenglicoles (PEG) se usan para formar un material de tipo pasta aglutinando y mojando las partículas de vidrio bioactivo. Para lograr la viscosidad adecuada de la pasta, se deben mezclar al menos dos PEG entre sí. Al elegir los pesos moleculares apropiados para los PEG, debe tenerse en cuenta que el PEG de bajo peso molecular (< 600 g/mol) es líquido a temperatura ambiente pero los PEG de peso molecular más alto son céreos o sólidos.

Para tener una pasta que permanece como pasta en sus temperaturas de uso (temperaturas ambiente y corporal), se mezclan entre sí al menos tres PEG, normalmente a temperaturas elevadas. Como los PEG de peso molecular más alto son materiales cristalinos, su uso elevará el límite superior de la temperatura de uso de la pasta así como aumentará la viscosidad de la pasta y evitará la sedimentación de partículas de vidrio bioactivo a temperatura ambiente durante el almacenaje. Para disminuir el límite inferior de la temperatura de uso, es decir ampliar el intervalo de temperatura de uso, son útiles los PEG de bajo peso molecular para evitar la solidificación, es decir el endurecimiento de la pasta a temperaturas inferiores, ya que los PEG de alto peso molecular tienden a cristalizar a bajas temperaturas.

Si solamente se usara PEG céreo o sólido de un peso molecular, la temperatura de uso sería muy estrecha para usos prácticos. El PEG 600 (es decir, polietilenglicol que tiene 600 g/mol como peso molecular medio) muestra un intervalo de fusión de aproximadamente 17 a 22°C, de modo que puede ser líquido a temperatura ambiente pero pastoso a temperaturas ambiente inferiores, mientras que los PEG con un peso molecular medio de 800 a 2000 son materiales pastosos con un bajo intervalo de fusión. Por encima de un peso molecular de 3000, los polietilenglicoles son normalmente sólidos.

El glicerol, es decir propan-1,2,3-triol, se denomina habitualmente glicerina. Es un líquido viscoso, inodoro, incoloro que se usa ampliamente en formulaciones farmacéuticas. El glicerol puede añadirse a la pasta para mejorar su suavidad y para proporcionar lubricación adicional potenciando las propiedades térmicas y de viscosidad debidas a las interacciones físicas entre los PEG y el glicerol. Los PEG y el glicerol son compatibles entre sí.

El PEG 400 es miscible en todas las proporciones a glicerol pero el poder de disolución y la solubilidad de los PEG en glicerol disminuyen a medida que aumenta la masa molar. Sin embargo, ambas de estas propiedades pueden mejorarse mediante calentamiento moderado y sustancias que se disuelven a temperatura ambiente en PEG 400 son solubles en aproximadamente la misma medida en PEG fundido 4000 (es decir a una temperatura de 60-70°C).

Según una realización de la invención, la cantidad total de vidrio bioactivo es del 50-80% en peso del peso total de la pasta.

Preferiblemente, la cantidad total de polietilenglicoles es del 20-50% en peso del peso total de la pasta. Por ejemplo, la cantidad de PEG de bajo peso molecular (c) es del 2-15% en peso y la cantidad de PEG de peso molecular medio (d) es del 8-48% en peso del peso total de la pasta. La cantidad de PEG de alto peso molecular (e) es del 1-10% en peso del peso total de la pasta.

En la realización en la que se usa glicerol, su cantidad es de hasta el 10% en peso del peso total de la pasta. Algunas pastas adecuadas tienen la siguiente composición:

- PEG (c+d+e) 23-45% en peso,
- glicerol (f) 0-10% en peso y
- vidrio bioactivo (a + b) 55-67% en peso.

Algunas pastas preferibles tienen el siguiente intervalo de composición:

- PEG de bajo peso molecular (c) 4-10% en peso
- PEG de peso molecular medio (d) 13-18% en peso
- PEG de alto peso molecular (e) 1-8% en peso
- Glicerol (f) 8-10% en peso
- Pequeños gránulos de vidrio bioactivo (a) 8-12% en peso
- Gránulos de vidrio bioactivo más grandes (b) 48-52% en peso.

Según una realización de la invención, la cantidad de agente terapéuticamente activo (g) es de hasta el 30% en peso del peso total de la pasta. El agen-

te terapéuticamente activo puede seleccionarse del grupo que consiste en factores de crecimiento, proteínas, péptidos, antibióticos, mucopolisacáridos, es decir ácido hialurónico, células madre de origen no humano (es decir excluidas células madre humanas), peróxidos, y mezclas de los mismos, y puede usarse para promover crecimiento óseo o para tener un efecto adicional antimicrobiano tal como antibacteriano. Debe observarse sin embargo que el presente material es eficaz también en ausencia de antibióticos.

En una realización de la invención, la composición del vidrio bioactivo es del 45-54% en peso de  $\text{SiO}_2$ , el 22-25% en peso de  $\text{Na}_2\text{O}$ , el 19-25% en peso de  $\text{CaO}$  y el 3,5-6% en peso de  $\text{P}_2\text{O}_5$ . En otra realización de la invención, la composición del vidrio bioactivo es del 53% en peso de  $\text{SiO}_2$ , el 23% en peso de  $\text{Na}_2\text{O}$ , el 20% en peso de  $\text{CaO}$  y el 4% en peso de  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Tal vidrio bioactivo se conoce como S53P4 y se vende con el nombre comercial de BonAlive®. Esta realización proporciona una composición aglutinante que se disuelve rápidamente *in vivo* que permite el proceso de curación normal del hueso asociado con polvo y gránulos de S53P4 (reabsorción de vidrio bioactivo y regeneración ósea). Debido a la lenta velocidad de disolución la composición química de vidrio bioactivo S53P4 y el tamaño de partícula, se logrará de manera natural el efecto de crecimiento óseo a largo plazo. Según otra realización, la composición del vidrio bioactivo es del 45% en peso de  $\text{SiO}_2$ , el 24,5% en peso de  $\text{Na}_2\text{O}$ , el 24,5% en peso de  $\text{CaO}$  y el 6% en peso de  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Este vidrio bioactivo también se conoce como 45S5 y se vende con el nombre comercial de NovaBone®.

Las pastas que comprenden todos los ingredientes en los extremos finales de los intervalos no necesariamente pueden proporcionar propiedades de flujo y producto óptimas. Por ejemplo, la combinación de un PEG de alto peso molecular a alta concentración sin suficiente PEG de bajo peso molecular y/o glicerol puede proporcionar un producto de alta viscosidad, que no se adecuado para la inyección a temperatura ambiente o corporal. Un experto en la técnica será sin embargo capaz de hallar la proporción ideal de ingredientes a través de alguna experimentación fácil, para cada conjunto de propiedades deseadas. Algunos ejemplos de combinaciones adecuadas también se proporcionan en la parte experimental a continuación.

La invención también proporciona un método de producción de una pasta de relleno de hueso óseo moldeable que tiene propiedades antimicrobianas,

que incluye fundir y mezclar las materias primas en condiciones controladas, así como el enfriamiento, envasado y acondicionamiento de los productos finales.

La pasta normalmente se produce mezclando y/o fundiendo los ingredientes juntos en un mezclador discontinuo a una temperatura de 25 a 95°C bajo un gas protector o a vacío o en condiciones atmosféricas durante 5 a 60 min. Entonces se enfría la mezcla a 25-45°C y se transfiere a un aplicador y/o se almacena para su uso posterior. Alternativamente, el mezclado, la fusión y/o la transferencia pueden hacerse usando cualquier tipo de equipo de mezclado por ejemplo un mezclador discontinuo abierto o cerrado, mezclador o reactor de tanque de agitación continuo, extrusora, máquina de moldeo por inyección, reactor de tubos u otro equipo estándar de tratamiento por fusión o mezclado por fusión conocido en el campo.

La invención también proporciona un uso de la presente pasta en la fabricación de un implante para su uso en formación ósea, tal como en un sitio de defecto óseo, es decir como una pasta de relleno de hueso óseo. La invención proporciona además un uso de la presente pasta para recubrir un implante. Efectivamente, se ha determinado que la presente pasta tiene una capacidad para evitar y tratar la formación de biopelícula en la superficie de implantes. También puede usarse en el tratamiento de infecciones protésicas relacionadas con biopelícula, ya que tiene una eficacia antibacteriana frente a las bacterias más problemáticas de infecciones protésicas.

La invención también proporciona un implante recubierto con la presente pasta. El implante puede ser por ejemplo un implante de cadera, un implante de rodilla o cualquier otra prótesis articular, o cualquier otro implante incorporado en mamíferos. El implante se recubre con la presente pasta antes de la implantación en el cuerpo humano o animal.

La invención proporciona además composiciones antimicrobianas que promueven el crecimiento óseo que comprenden la formulación mencionada anteriormente con agentes activos. El agente activo puede ser cualquier agente farmacéuticamente activo para uso humano o animal.

Se describirán ahora diferentes realizaciones de la presente invención en más detalle en la siguiente parte experimental.

### Parte experimental

Método de fabricación general para masilla

Se añadieron glicerol y PEG 400 a un reactor calentado (60°C) usando una velocidad de mezclado de 100 RPM (rotaciones por minuto) seguido de la adición de PEG 1500 y PEG 3000. Los PEG se suministraron por Clariant y el glicerol se suministró por Uniqema o Sigma-Aldrich. Se añadieron gránulos de vidrio bioactivo a la mezcla fundida y se mezclaron hasta que la mezcla era homogénea. La masilla obtenida se enfrió hasta temperatura ambiente (RT) con mezclado y el recipiente se descargó, envasó y almacenó en un desecador para su uso y pruebas posteriores.

10

Actividad antimicrobiana de vidrios bioactivos de referencia

La capacidad de vidrio bioactivo por sí solo y con una matriz tal como se describe en esta descripción para matar bacterias se sometió a prueba de la siguiente manera. Las bacterias usadas en la prueba se enumeran en la tabla 1. MetR significa resistente a meticilina. Los diversos vidrios sometidos a prueba se enumeran en la tabla 2. El vidrio S53P4 y el vidrio BonAlive® tienen la misma composición, tal como se describe anteriormente.

Composición de masilla BonAlive®

20

Glicerol	16 g
PEG 400	12,8 g
PEG 1500	25,6 g
PEG 3000	9,6 g
Gránulos de S53P4 de 500-800 µm	76,8 g
Esferas de S53P4 de 90-425 µm	19,2 g

PEG significa polietilenglicol y la cifra posterior denota el peso molecular promedio en g/mol.

25 Tabla 1. Cepas bacterianas

Bacteria	Descripción
----------	-------------

<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 29213	Cocos gram positivos, parte de la flora de la piel humana, hallada en la nariz y en la piel
<i>Staphylococcus aureus</i> MetR, ATCC 43300	Cocos gram positivos
<i>Staphylococcus epidermidis</i> , ATCC 14990	Cocos gram positivos, parte de la flora de la piel humana y mucosa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , ATCC 27853	Patógeno gram negativo, con forma de varilla, oportunista, secreta una variedad de pigmentos, crea esterillas oscuras de tipo gel durante su crecimiento

Tabla 2. Productos sometidos a prueba, controles y materiales de referencia

<b>Producto</b>	<b>Descripción</b>
BonAlive® 0,5 - 0,8	Tamaño de gránulo 0,5 - 0,8 mm, esterilizado por rayos gamma
BonAlive® 1,0 - 2,0	Tamaño de gránulo 1,0 - 2,0 mm, esterilizado por rayos gamma
BonAlive® 2,0 - 3,15	Tamaño de gránulo 2,0 - 3,15 mm, esterilizado por rayos gamma
Masilla BonAlive®	Aglutinante de tipo pasta con gránulos de BonAlive® (tamaño de gránulo 0,5-0,8 mm) + esferas de S53P4 0,09-0,425 mm), esterilizado por rayos gamma
Polvo de vidrio S53P4 (control positivo)	Tamaño de partícula de gránulo < 45 µm, esterilizado por rayos gamma
Aglutinante de masilla	Material de polímero puro (PEG-glicerol) sin gránulos, esterilizado por rayos gamma
Fosfato tricálcico (TCP)	Material de referencia, esterilizado por rayos gamma
Vidrio inerte (referencia no bioactiva)	Vidrio transparente littala, esterilizado por aire caliente, tamaño de gránulo no definido

Las bacterias se incubaron (tubos de ensayo estériles de 5 ml, Becton Dickinson) junto con diferentes productos en caldo de triptona de soja estéril (TSB, que comprende digerido enzimático de caseína, digerido enzimático de harina de soja, cloruro sódico, fosfato dipotásico y dextrosa). Las concentraciones de los productos usados en el estudio se enumeran en la tabla 3. Los gránulos, materiales de referencia y controles se pesaron (Mettler AE 50) y se mezclaron correctamente con 2 ml de TSB. Se pesaron tres réplicas de cada producto excepto seis réplicas de producto de masilla. Tres réplicas de producto de masilla se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente, tras las cuales se sustituyó TSB con polímero disuelto con un lote nuevo de 2 ml de TSB. Finalmente, se añadieron inóculos de bacterias (cantidad conocida determinada por densitometría óptica, Thermo GeneSys 20) a la mezcla. Los cultivos bacterianos sin productos añadidos y TSP puro sirvieron de controles. El polvo de S53P4 actuó como un control positivo ya que se conoce de estudios anteriores que una concentración de 100 mg/ml de polvo es suficiente para la inhibición bacteriana eficaz. Se incluyeron el vidrio littala y el fosfato tricálcico (TCP) como materiales de referencia. El vidrio littala no bioactivo inerte se trituró a gránulos pequeños (tamaño de gránulo exacto no definido) antes del estudio.

Tabla 3. Concentraciones de producto usadas en el estudio

Producto	Concentración (mg/ml)
BonAlive® 0,5-0,8	1000
BonAlive® 1,0-2,0	1000
BonAlive® 2,0-3,15	1000
Masilla BonAlive®	1400
Polvo de vidrio S53P4	100
Aglutinante de masilla	560
TCP	600
Vidrio littala	600

La viabilidad de las suspensiones bacterianas incubadas con diferentes productos se evaluó usando placas de agar sangre sólidas comerciales (Agar de

Tripticasa-Soja II con sangre de oveja al 5%, Becton Dickinson). En puntos de cultivo de 24 h consecutivos, muestras de 10 mL tomadas directamente de las suspensiones se sembraron en placas (tal como se describe en Vuorenoja K, Jalava J, Lindholm L. et al. (2011) Detection of *Streptococcus pneumoniae* carriage by the Binax NOW test with nasal and nasopharyngeal swabs in young children. Eur J Clin Microbiol Infect. Epub PMID: 21800217). Además, una réplica de diluciones 1:10 000 de las muestras y controles bacterianos se sembraron en placas para garantizar la formación de colonia única cuantificable.

El crecimiento de bacterias se evaluó mediante la comparación con la muestra de control tras el cultivo (+37°C durante 16 h) en placas de agar. La ausencia de crecimiento en las placas era un indicador de la capacidad de un producto dado para evitar la colonización bacteriana. Se llevó a cabo el cultivo *in vitro* durante un periodo de 7 días excepto que para *P. aeruginosa* no pudo superarse un periodo de 5 días debido a la formación de lodo que impidió la recogida precisa de una muestra de 10 mL.

El pH de las muestras se estimó a partir de los tubos de ensayo usando papel pH (intervalo de pH 7,5 - 14 Merck Alkalit 81,09532 e intervalo 6,4 - 8,0 Nacher-Nagel, REF 90210). Se sumergió un trozo de papel en caldo tras lo cual se estimó el valor de pH comparando el color del papel con la escala proporcionada por los fabricantes. La estimación de pH se realizó tras 8 días de cultivo para *S. aureus* y *S. epidermidis*, tras 7 días para MRSA y 5 días para *P. aeruginosa*.

#### *Resultados de los materiales de referencia*

Los controles negativos proporcionaron de manera consistente un resultado demasiado numeroso para contar tras la siembra en placas. Esto se observó con todas las cepas y en todos los puntos temporales, lo que demostró que las bacterias eran viables durante el periodo de estudio. Se usó el TSB puro sin inoculante como un control para demostrar que todo el trabajo se realizó de manera aséptica. No hubo crecimiento bacteriano en TSB puro en ninguno de los puntos temporales.

Todos los productos de gránulos de BonAlive® sometidos a prueba (por sí solos) afectaron al crecimiento bacteriano. El tiempo y nivel necesarios para el efecto variaron en función del tamaño de gránulo. El efecto también varió entre especies bacterianas. El polvo tamizado a un tamaño de partícula de <45 µm

era capaz de resistir el crecimiento de todas las bacterias estudiadas. El producto de masilla BonAlive® no afecto al crecimiento de ninguno de los patógenos estudiados. Los resultados de *S. epidermidis*, *S. aureus* MetR y *P. aeruginosa* mostraron un efecto escaso en la mitad del periodo de prueba, pero la masilla BonAlive® no tuvo ningún efecto sobre *S. aureus* ATCC 29213. Existieron variaciones de día a día durante el periodo de prueba. El polímero puro (masilla aglutinante) tuvo algún efecto sobre *S. epidermidis* y *S. aureus* MetR al final del periodo de prueba pero existieron variaciones de día a día. El TCP no tuvo ningún efecto ningún día sobre *P. aeruginosa* gram negativa, ni tampoco tuvo ningún efecto sobre *S. aureus* ATCC 29213 al final del periodo de prueba. Se observaron ligeros efectos sobre los otros dos cocos gram positivos.

Puede concluirse por tanto que el producto de masilla BonAlive® no fue capaz de evitar la colonización de cuatro patógenos clínicamente importantes durante este periodo de prueba. La variación de día a día y los resultados cambiantes de la masilla y el polímero pueden al menos parcialmente explicarse mediante el ajuste de la prueba *in vitro* usado. Además, las características físicas y químicas del polímero podrían tener algún efecto sobre la calidad del pipeteado.

Todos los resultados del crecimiento bacteriano se enumeran en las tablas 4-7. Los números enumerados indican la diferencia ( $\log_{10}$ ) entre control bacteriano y bacterias incubadas con una muestra (0 = ninguna diferencia con el control bacteriano, 1 = diferencia de  $\log_{10}$  al control bacteriano, 5 es una diferencia o más de 4 logs), 0 significa ninguna inhibición del crecimiento bacteriano.

Tabla 4. *S epidermidis*

<b><i>S epidermis</i></b>	<b>Día 1</b>	<b>Día 2</b>	<b>Día 3</b>	<b>Día4</b>	<b>Día 5</b>	<b>Día 6</b>	<b>Día 7</b>
BonAlive® 0,5 – 0,8	0	0	0	0	1	2	3
BonAlive® 1,0 - 2,0	0	0	0	0	1	2	3
BonAlive® 2,0-3,15	0	0	0	1	1	2	3
Masilla BonAlive®	0	0	1	1	1	0	0
Polvo de vidrio S53P4	5	5	5	5	5	5	5
Masilla aglutinante	0	0	0	0	1	1	1
TCP	0	0	1	1	0	1	1
Vidrio littala	0	0	0	0	0	2	0

Tabla 5 *S. aureus*

<b><i>S aureus</i></b>	<b>Día 1</b>	<b>Día 2</b>	<b>Día 3</b>	<b>Día4</b>	<b>Día 5</b>	<b>Día 6</b>	<b>Día 7</b>
BonAlive® 0,5 – 0,8	0	0	0	1	1	2	3
BonAlive® 1,0 - 2,0	0	0	0	1	1	2	5
BonAlive® 2,0-3,15	0	0	0	1	1	2	3
Masilla BonAlive®	0	0	0	0	0	0	0
Polvo de vidrio S53P4	1	1	1	3	2	4	4
Masilla aglutinante	0	0	0	0	0	0	0
TCP	0	1	0	1	0	0	0
Vidrio littala	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 6 *S. aureus MetR*

<b><i>S aureus MetR</i></b>	<b>Día 1</b>	<b>Día 2</b>	<b>Día 3</b>	<b>Día4</b>	<b>Día 5</b>	<b>Día 6</b>	<b>Día 7</b>
BonAlive® 0,5 – 0,8	0	0	1	2	2	5	
BonAlive® 1,0 - 2,0	0	0	0	1	2	5	
BonAlive® 2,0-3,15	0	0	0	2	3	3	
Masilla BonAlive®	0	0	0	1	0	0	
Polvo de vidrio S53P4	1	2	5	5	5	5	
Masilla aglutinante	0	0	0	1	0	0	
TCP	0	1	0	1	1	2	
Vidrio littala	0	0	0	0	0	0	

5

Tabla 7. *P. aeruginosa*

<b><i>P. aeruginosa</i></b>	<b>Día 1</b>	<b>Día 2</b>	<b>Día 3</b>	<b>Día4</b>	<b>Día 5</b>	<b>Día 6</b>	<b>Día 7</b>
BonAlive® 0,5 – 0,8	0	0	1	2	2	5	
BonAlive® 1,0 - 2,0	0	0	0	2	3		
BonAlive® 2,0-3,15	0	0	0		5		
Masilla BonAlive®	1		1	0	0		
Polvo de vidrio S53P4	1	3	5	5	5		
Masilla aglutinante	0	0	0	0	0		
TCP	0	0		0	0		
Vidrio littala	0	0	0	0	0		

La tabla 8 resume los valores de pH al final del periodo de incubación (8 días para *S. epidermidis* y *S. aureus*, 7 días para *S. aureus* MetR, 5 días para *P. aeruginosa*).

5

Tabla 8. Valores de pH

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i> MetR	<i>P. aeruginosa</i>
BonAlive® 0,5 – 0,8	9,5	9,5	9,5	9,5
BonAlive® 1,0 - 2,0	9,5	9,5	9,5	9,5
BonAlive® 2,0-3,15	9,5	9,5	9,5	9,5
Masilla BonAlive®	6,8	8,5	7,8	6,8
Polvo de vidrio S53P4	10,0	10,0	9,5	10,0
Masilla aglutinante	6,4	6,4	6,4	6,4
TCP	8,0	7,4	8,0	8,0
Vidrio littala	8,5	7,8	7,8	8,5

Actividad antimicrobiana de la pasta según la invención

Una pasta que tiene la composición indicada en la tabla 9 (composición 1) se sometió a prueba para su actividad antibacteriana. Las muestras de referencia eran un polvo de vidrio bioactivo con un tamaño de fracción inferior a 45 µm (composición 2) y gránulos de vidrio bioactivo con un tamaño de fracción de 500-800 µm (composición 3), esterilizados por rayos gamma como anteriormente.

Se usaron tres muestras de vidrio inerte de tamaño similar (R1350 littala transparente, littala, Finlandia) como un control negativo: gránulos de < 45 µm con PEG y glicerol tal como se indica en la tabla 9 (referencia 1), gránulos de < 45 µm (referencia 2) y gránulos de 500-800 µm (referencia 3). Todas las muestras se prepararon a una concentración final de 400 mg/ml (correspondiente al 5% de la disolución de trabajo clínica) en caldo de soja triptica (TSB; Biomerieux, Marcy l'Etoile, Francia), y se colocaron 4,8 ml de cada disolución en microplacas de poliestireno de 6 pozos estériles (Jet Biofil; Guangzhou, China). Las muestras de vidrio bioactivo se incubaron a 37°C durante 4 horas para la composición 1, 7 horas

para la composición 2 y 24 horas para la composición 3. Los valores de pH se midieron con un pH-metro a intervalos regulares para determinar la liberación de iones y cambios de pH que sugieren acondicionamiento. Un valor de pH igual o superior a 11 se consideró que sugería acondicionamiento óptimo. Una vez alcanzado el acondicionamiento óptimo, el contenido de cada pozo estaba listo para su uso.

Tabla 9. La composición de la pasta inventiva sometida a prueba

Material	Cantidad (g)
Glicerol	16
PEG 400	12,8
PEG 1500	25,6
PEG 3000	9,6
Gránulos de S53P4, 500-800 $\mu\text{m}$	76,8
Polvo de S53P4, < 45 $\mu\text{m}$	19,2

Se usaron una cepa de *S. aureus* resistente a meticilina y una de *P. aeruginosa* aisladas en el laboratorio de microbiología de IRCCS Galeazzi Orthopaedic Institute de prótesis de rodilla infectadas de pacientes que asisten al Center for Reconstructive Surgery of Osteoarticular Infections (C.R.I.O.) de la misma institución para revisión de implantes. Estas cepas se seleccionaron en función de su fuerte capacidad para producir biopelícula *in vitro* sobre materiales protésicos.

Se usaron discos de titanio esmerilados con arena estériles con un diámetro de 25 mm y un espesor de 5 mm (Adler Ortho, Cormano (Milan), Italia; LOTE J04051) como sustrato para la formación y el crecimiento de biopelícula. Cultivos durante toda la noche de *S. aureus* y *P. aeruginosa* se resuspendieron en una densidad final de  $1,0 \times 10^8$  UFC/ml en TSB y alícuotas (200 ml) de cada disolución de trabajo se inocularon en microplacas de poliestireno de 6 pozos que contenían discos de titanio y 4,8 ml de TSB nuevo. Tras la incubación durante 24 h a 37°C de manera aeróbica, se retiró el medio de crecimiento gastado que contenía bacterias no adherentes y se sustituyó con 5 ml de medio nuevo. Se incubaron placas durante 48 h más para obtener una biopelícula madura, entonces el

### *Resultados*

medio y las bacterias no adherentes remanentes, si estaban presentes, se retiraron lavando tres veces con solución salina estéril.

Tras el tiempo de acondicionamiento, los discos de titanio cubiertos por biopelícula bacteriana se colocaron en microplacas de poliestireno de 6 pozos estériles que contenían o bien el biovidrio acondicionado o bien el control negativo (vidrio inerte). La cantidad de biopelícula en cada disco de titanio se evaluó tras 24, 48 y 72 horas de incubación.

### Ensayo de cristal violeta

El ensayo de cristal violeta se usó como una prueba preliminar para evaluar la mejor formulación y el mejor tiempo de incubación de vidrio S53P4 para usar frente a biopelículas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Para evaluar el efecto de los vidrios probados en la arquitectura de biopelícula, toda la biomasa presente en cada disco se midió tras el tratamiento tal como se describe en Christensen *et al.* (Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* 22(6), 996-1006 (1985)). Al final del tiempo de incubación, la biopelícula crecida en los discos de titanio se secó al aire y se tiñó con una disolución de cristal violeta al 5% durante 15 minutos. Entonces, tras varios lavados, los discos se secaron al aire otra vez, y se colocaron en 3 ml de etanol al 96% para eluir el cristal violeta unido a la biopelícula. Se colocaron tres alícuotas (100 µl) de cada disolución de etanol-colorante en una placa multipozo de 96 pozos y se leyeron las absorbancias a 595 nm con un lector de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific; Milan, Italia) tres veces para cada disco.

### Análisis estadístico

Las cantidades de biopelícula tal como se midieron mediante el ensayo de cristal violeta se presentaron como media  $\pm$  DE. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos factores seguido de la prueba t de Bonferroni y la prueba t de Student según proceda. El límite de significancia para valores P se fijó a menos de 0,05.

La actividad anti-biopelícula de S53P4, como el valor de absorbancia a 595 nm para las dos bacterias, se muestran en las tablas 10 y 11. La cantidad de biopelícula presente en todos los discos de titanio tras el tratamiento era significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) entre discos tratados con S53P4 y discos tratados con vidrio inerte (controles). Aunque el tiempo de exposición a vidrio bioactivo parecía que no afectaba significativamente a la cantidad de biopelícula, tras 72 horas de tratamiento se observó una reducción en la biopelícula, en comparación con las observadas tras 24 y 48 horas. La actividad anti-biopelícula de S53P4 no difería significativamente entre las tres formulaciones sometidas a prueba.

10

Tabla 10. Absorbancia a 595 nm para *S. aureus MetR*

<i>S. aureus MetR</i>	24 horas	48 horas	72 horas
Composición 1	0,8	0,6	0,4
Composición 2	0,9	0,6	0,5
Composición 3	0,9	0,6	0,5
Referencia 1	2,6	3,0	3,5
Referencia 2	3,8	3,8	3,9
Referencia 3	3,3	3,5	3,7

Tabla 11. Absorbancia a 595 nm para *P. aeruginosa*

<i>P. aeruginosa</i>	24 horas	48 horas	72 horas
Composición 1	1,6	0,8	0,7
Composición 2	1,5	0,7	0,5
Composición 3	1,5	0,7	0,4
Referencia 1	3,5	3,8	3,9
Referencia 2	3,4	3,7	3,9
Referencia 3	3,2	3,7	3,8

15

REIVINDICACIONES

1. Pasta implantable que comprende
- 5 (a) polvo de vidrio bioactivo que tiene una distribución de tamaño de 0,5-45  $\mu\text{m}$  en una cantidad del 10-30% en peso del peso total del vidrio bioactivo,
- (b) gránulos de vidrio bioactivo que tienen una distribución de tamaño de entre 100 y 4000  $\mu\text{m}$  en una cantidad del 90-70% en peso del peso total del vidrio bioactivo,
- (c) polietilenglicol de bajo peso molecular que tiene un intervalo de peso molecular
- 10 de 200-700 g/mol,
- (d) polietilenglicol de peso molecular medio que tiene un intervalo de peso molecular de 700-2500 g/mol,
- (e) polietilenglicol de alto peso molecular que tiene un intervalo de peso molecular de 2500-8000 g/mol y
- 15 (f) glicerol,
- en la que la composición del vidrio bioactivo es del 45-55% en peso de  $\text{SiO}_2$ , el 20-25% en peso de  $\text{Na}_2\text{O}$ , el 18-25% en peso de  $\text{CaO}$  y el 3-6% en peso de  $\text{P}_2\text{O}_5$ , con la condición de que el peso molecular del polietilenglicol de bajo peso molecular y del polietilenglicol de peso molecular medio difieren entre sí en al menos 80
- 20 g/mol y de que el peso molecular del polietilenglicol de peso molecular medio y del polietilenglicol de alto peso molecular difieren entre sí en al menos 300 g/mol.
2. Pasta según la reivindicación 1, **caracterizada porque** comprende además
- 25 (g) agente terapéuticamente activo.
3. Pasta según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada porque** comprende gránulos de vidrio bioactivo (b) que tienen una distribución de tamaño de 125-315  $\mu\text{m}$ .
- 30
4. Pasta según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** comprende gránulos de vidrio bioactivo (b) que tienen una distribución de tamaño de 315-500  $\mu\text{m}$ .

5. Pasta según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** comprende gránulos de vidrio bioactivo (b) que tienen una distribución de tamaño de 500-800  $\mu\text{m}$ .
- 5 6. Pasta según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** comprende gránulos de vidrio bioactivo (b) que tienen una distribución de tamaño de 1000-2000  $\mu\text{m}$ .
7. Pasta según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada**  
10 **porque** la cantidad total de vidrio bioactivo es del 50-80% en peso del peso total de la pasta.
8. Pasta según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada**  
15 **porque** la cantidad de polietilenglicol de bajo peso molecular que tiene un intervalo de peso molecular de 200-700 g/mol (c) es del 2-15% en peso, la cantidad de polietilenglicol de peso molecular medio que tiene un intervalo de peso molecular de 700-2500 g/mol (d) es del 8-48% en peso del peso total de la pasta y **porque** la cantidad de polietilenglicol de alto peso molecular (e) es del 1-10% en peso del peso total de la pasta.
- 20 9. Pasta según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** la cantidad total de polietilenglicoles es del 20-50% en peso del peso total de la pasta y **porque** la cantidad de glicerol (f) es de hasta el 10% en peso del peso total de la pasta.
- 25 10. Pasta según cualquiera de las reivindicaciones 2-9, **caracterizada porque** la cantidad de agente terapéuticamente activo (g) es de hasta el 30% en peso del peso total de la pasta.
- 30 11. Pasta según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada porque** la composición del vidrio bioactivo es del 45-54% en peso de  $\text{SiO}_2$ , el 22-25% en peso de  $\text{Na}_2\text{O}$ , el 19-25% en peso de  $\text{CaO}$  y el 3,5-6% en peso de  $\text{P}_2\text{O}_5$ .

12. Pasta según la reivindicación 11, **caracterizada porque** la composición del vidrio bioactivo es del 53% en peso de  $\text{SiO}_2$ , el 23% en peso de  $\text{Na}_2\text{O}$ , el 20% en peso de  $\text{CaO}$  y el 4% en peso de  $\text{P}_2\text{O}_5$  o el 45% en peso de  $\text{SiO}_2$ , el 24,5% en peso de  $\text{Na}_2\text{O}$ , el 24,5% en peso de  $\text{CaO}$  y el 6% en peso de  $\text{P}_2\text{O}_5$ .

5

13. Uso de una pasta según cualquiera de las reivindicaciones 1-12 en la fabricación de un implante para su uso en formación ósea o para recubrir un implante.

10 14. Implante recubierto con una pasta según cualquiera de las reivindicaciones 1-12.