(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 753 353**

(51) Int. CI.:

A61L 27/32 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61L 31/08 (2006.01)
A61L 31/16 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2014 PCT/IB2014/062454**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2014 WO14203204**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2014 E 14742357 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 3010557**

(54) Título: **Coprecipitación de Tobramicina en revestimientos de hidroxiapatita**

(30) Prioridad:

21.06.2013 US 201361837668 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2020

(73) Titular/es:

STRYKER EUROPEAN HOLDINGS I, LLC (100.0%)
2825 Airview Boulevard
Kalamazoo, MI 49002, US

(72) Inventor/es:

LILJA, MIRJAM;
SOERENSEN, JAN HENRIK;
PROCTER, PHILIP;
STECKEL, HARTWIG y
SORENSEN, TORBEN

(74) Agente/Representante:

ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María

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

Coprecipitación de Tobramicina en revestimientos de hidroxiapatita

Campo técnico

Un método para la coprecipitación de un agente terapéutico, que es Tobramicina, en una superficie revestida con hidroxiapatita de un implante.

Antecedentes

Los campos clínicos de la ortopedia y la traumatología se ocupan de la reconstrucción y la conservación de lesiones del sistema musculoesquelético y los órganos asociados. El aflojamiento de los implantes, la migración, corte y control de infecciones desempeña un papel importante en las complicaciones que pueden ocurrir después de una cirugía. En general, la hidroxiapatita (HA) es un material común utilizado para aplicaciones biomédicas. Se sabe que los revestimientos de HA son biocompatibles, osteoconductores y por lo general mejoran la osteointegración de los implantes y, por lo tanto, contribuyen a una fijación más rápida y mejorada. Véase Allegrini S *et al*., "Hydroxyapatite Grafting Promotes New Bone Formation and Osseointegration of Smooth Titanium Implants" Ann Anat 188 143-51 (2006) y Baker K. *et al*., "Growth, Characterization and Biocompatibility of Bone-like Calcium Phosphate Layers Biomimetically Deposited on Metallic Substrata" Mater Sci Eng 26 1351-60 (2006).

La hidroxiapatita se puede depositar sobre implantes quirúrgicos mediante diferentes procesos, tales como deposición biomimética de una solución acuosa, pulverización de plasma, deposición electroforética, procesos sol-gel o temperatura de revestimientos por inmersión, lo que da como resultado características de revestimiento dependientes del proceso. Véase Wang M.J. *et al*., "Electrophoretic Deposition of Porous Hydroxyapatite Scaffold" Biomaterials 24 3505-10 (2003) y Dean-Mo L. *et al*. "Water-based Sol-Gel Synthesis of Hydroxyapatite: Process Development" Biomaterials" 22 1721-30 (2001).

La estructura nanoporosa de los revestimientos biomiméticos de HA ha mostrado propiedades prometedoras para la incorporación de fármacos y con respecto a la administración local de fármacos. Véase el documento de Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos n.º 61/814.538. Los revestimientos de HA pueden proporcionar un excelente vehículo para diversos medicamentos solubles en agua. Véase Forsgren J. *et al*., "Co-loading of Bisphosphonates and Antibiotics to a Biomimetic Hydroxyapatite Coating" Biotechnol Lett 33 1265-68 (2011).

La liberación local de fármacos a partir de materiales basados en fosfato de calcio y los revestimientos de implantes de HA funcionales permiten una mejora favorable de la regeneración local del tejido óseo *in vivo*; véase Abtahi J. *et al*., "A Bisphosphonate-Coating Improves the Fixation of Metal Implants in Human Bone -A Randomized Trial of Dental Implants" Bone 50 1148-51 (2012) y Tengwall P. *et al*., "Surface Immobilized Bisphosphonate Improves Stainless-steel Screw Fixation in Rats" Biomaterials 25 2133-8 (2004), así como también previene la colonización bacteriana y la formación de biopelículas prematuras, véase Ginebra M. *et al*., "Calcium Phosphate Cements as Bone Drug Delivery Systems: A Review" J Control Release 113 102-10 (2006).

La mayoría de los enfoques para incorporar fármacos en fosfatos de calcio porosos o revestimientos de HA se centran en técnicas de carga por adsorción a partir de soluciones acuosas que contienen fármacos. La incorporación de fármacos en la estructura de revestimiento de HA porosa se puede hacer por empapado del implante revestido de HA en la solución que contiene el fármaco. Véase Brohede U. *et al*., "Multifunctional Implant Coatings Providing Possibilities For Fast Antibiotics Loading with Subsequent Slow Release" J Mater Sci - Mater Med 20 1859-67 (2009). A fecha de hoy, se ha demostrado la liberación de antibióticos durante un período de 8 días a partir de revestimientos de HA cargados por adsorción depositados en los pernos de fijación, mientras que el efecto antibiótico más prolongado demostrado hasta la fecha no excedía de 3 días. Ver Lilja, M. *et al*., "Photocatalytic and Antimicrobial Properties of Surgical Implant Coatings of Titanium Dioxide Deposited Through Cathodic Arc Evaporation" Biotechno Lett 12 2299-305.2 (2012).

En cambio, la coprecipitación, que incorpora fármacos de forma simultánea durante el crecimiento biomimético del revestimiento, ofrece la posibilidad de incorporar fármacos durante el crecimiento del revestimiento y, por lo tanto, constituye un método prometedor para producir revestimientos funcionales que contienen medicamentos en un proceso en un solo paso. Se ha demostrado que la concentración del fármaco en la solución tampón, así como la estructura química y molecular del fármaco, son parámetros críticos que afectan al crecimiento del revestimiento y el contenido del fármaco de dichos revestimientos. Véase Aberg J. *et al*., "Bisphosphonate Incorporation in Surgical Implant Coatings by Fast Loading and Co-precipitation at Low Drug Concentrations" J Mater Sci-Mater 20 2053-61 (2009). Por lo tanto, la nucleación inicial y el crecimiento de HA que contiene fármaco sigue siendo una etapa de proceso desafiante y no completamente comprendida.

El documento de Patente EP 0 806 212 A1 desvela un dispositivo implantable revestido con una capa de fosfato de calcio y opcionalmente una o más sustancias biológicamente activas. El documento de Patente US 2007/213832 A1 desvela implantes óseos protésicos de fosfato de calcio no sinterizados biorreabsorbibles con revestimientos

minerales de superficie capaces de actuar como vehículo farmacéutico para agentes bioactivos. Stigter M; de Groot K; Layrolle P: "Incorporation of tobramycin into biomimetic hydroxyapatite coating on titanium", BIOMATERIALS, 20021001 ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB - ISSN 0142-9612, Vol: 23, N.º: 20, Páginas: 4143 - 4153, desvelan un enfoque biomimético para producir revestimientos de fosfato de calcio que contienen un antibiótico en implantes de aleación de titanio (Ti6A14V). Xia W *et al*.: "Biomineralized strontium-substituted apatite/titanium dioxide coating on titanium surfaces", ACTA BIOMATERIALIA 6(4) 1591-1600 (2010) desvelan revestimientos de apatita sustituida con estroncio en revestimientos de dióxido de titanio, que están sobre sustratos de titanio. Roessler S *et al*.: "Characterization of oxide layers on Ti6A14V and titanium by streaming potential and streaming current measurements", COLLOIDS AND SURFACES B 26(4) 387-395 (2002) desvelan capas de óxido pasivas y anódicas sobre Ti6A14V y sus propiedades.

Sumario

La materia objeto de la presente invención se define mediante las reivindicaciones.

En una realización, un método para la coprecipitación un agente terapéutico en una superficie revestida con hidroxiapatita incluye los pasos de: proporcionar una superficie; aplicar un revestimiento base seleccionado entre el grupo de TiO_2, TiO, $TiCrO_2$, Ti_2O_3, Ti_3O_5, SiO_2, MgO_2, AlO_2 y CrO_2 a la superficie mediante evaporación por arco catódico; y aplicar una capa semilla de hidroxiapatita sobre el revestimiento base. La superficie en capas semilla de hidroxiapatita se pone en contacto con una solución de PBS que incluye iones de calcio y fosfato y el agente terapéutico, y un agente terapéutico coprecipitado, la capa de hidroxiapatita se forma sobre la superficie revestida para distribuir de forma uniforme el agente terapéutico en la capa. El agente terapéutico es tobramicina y tiene una concentración de 1,0 a 40 mg/ml en la solución de PBS.

El implante resultante tiene un suministro sostenido de agente terapéutico.

El sumario expuesto anteriormente, así como la siguiente descripción detallada de las realizaciones, se comprenderán mejor cuando se lean junto con los dibujos adjuntos. Se ha de entender que las realizaciones representadas no se limitan a las disposiciones e instrumentos precisos mostrados.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra el método de la presente divulgación.

La Figura 2 es una sección transversal de un implante hecho de acuerdo con el método de la presente divulgación.

Las Figuras 3(a) - 3(d) son imágenes de SEM de las estructuras de la superficie después de inmersión en Tobramicina que contiene tampón PBS durante 6 días con a) 0,5 mg/ml de Tobramicina a 37 ºC; b) 1,0 mg/ml de tobramicina a 37 ºC; c) 0,5 mg/ml de tobramicina a 60 ºC; y d) 1,0 mg/ml de tobramicina a 60 ºC.

La Figura 4 es una sección transversal de la capa semilla de HA después de inmersión durante 3 días en PBS a 60 ºC.

Las Figuras 5(a) - 5(b) son imágenes de SEM de estructuras de la superficie en capas semilla de HA después de inmersión en PBS dopado con tobramicina durante 6 días con a) 0,5 mg/ml de tobramicina a 37 ºC; b) 1,0 mg/ml de tobramicina a 37 ºC; c) 0,5 mg/ml de tobramicina a 60 ºC; y d) 1,0 mg/ml de tobramicina a 60 ºC.

Las Figuras 6(a) - 6(f) son imágenes de SEM de las estructuras de la superficie después de inmersión en PBS dopado con tobramicina durante 6 días a 60 ºC a) sin la capa semilla de HA a 4 mg/ml; b) y c) con una capa semilla de HA a 4 mg/ml con diferentes aumentos; d) sin capa semilla de HA a 20 mg/ml; y e) y f) con una capa semilla de HA a 20 mg/ml a diferentes aumentos.

Las Figuras 7(a) - 7(b) son imágenes de SEM de las estructuras de la superficie en capas semilla de HA después de la inmersión en PBS dopado con tobramicina durante 6 días con a) 4 mg/ml de tobramicina a 37 ºC; b) 20 mg/ml de tobramicina a 37 ºC.

La Figura 7(c) es un gráfico de la cantidad no acumulativa de Tobramicina liberada en PBS a 37 ºC a partir de clavos coprecipitados con diferentes concentraciones de Tobramicina en solución de PBS a través de HPLC.

Las Figuras 8(a) - 8(b) son análisis de GD-OES del perfil de profundidad de carbono de las muestras coprecipitadas en capas semilla de HA (Figura 8(a)) y el perfil de profundidad de nitrógeno (Figura 8 (b)). La Figura 8 (c) es una imagen de SEM de HA dopada con tobramicina.

Descripción detallada de la realización o realizaciones

Las presentes realizaciones se centran en la incorporación de Tobramicina a revestimientos biomiméticos de HA

usando el enfoque de coprecipitación. Se aborda el impacto de la temperatura de deposición y la concentración del fármaco en el crecimiento del revestimiento en sustratos cristalinos cubiertos de TiO_2. Para superar la problemática fase de nucleación en presencia de altas concentraciones de fármaco, se evalúa el impacto de una capa delgada de HA de tamaño submicrométrico. Se emplea cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para estudiar las propiedades de liberación del fármaco de los clavos de fijación coprecipitados de tobramicina y estas propiedades se correlacionan con los perfiles de liberación obtenidos de los revestimientos de HA cargados por adsorción pasiva.

Debido a los problemas actuales durante la cirugía, tales como migración de implantes, aflojamiento y corte, así como infecciones nosocomiales, se necesitan nuevas estrategias innovadoras que superen los problemas que se han identificado anteriormente de revestimientos delgados y etapas de carga adicionales. Como se expone completamente en el presente documento, el método de la presente descripción implica la coprecipitación combinando Tobramicina con hidroxiapatita biomimética (HA) directamente en el momento de la nucleación para producir nuevos revestimientos de implante. Dichos revestimientos de HA dopados con Tobramicina pueden garantizar la administración local controlada de fármacos para prevenir la colonización bacteriana temprana del implante. Una capa delgada de HA de tamaño submicrométrico sirvió como capa semilla para el proceso de coprecipitación y permitió la incorporación de Tobramicina al revestimiento de una solución madre de concentraciones de antibióticos tan altas como 20 mg/ml. Se evaluaron concentraciones de Tobramicina de 0,5 a 20 mg/ml y temperaturas de proceso de 37 ºC y 60 ºC para evaluar los parámetros óptimos que dan como resultado un revestimiento fino de HA con tobramicina en discos y clavos de fijación. La morfología y el espesor del revestimiento, así como el perfil de liberación en una solución tamponada con fosfato, se evaluaron mediante microscopía de barrido electrónico y cromatografía líquida de alta presión. El enfoque innovador para usar una capa semilla de HA demostró la viabilidad de fabricar un revestimiento de HA dopado con Tobramicina que muestra el suministro controlado de cantidades farmacéuticamente pertinentes de fármacos durante un período de 12 días *in vitro* por encima de la concentración inhibidora mínima de *Staphylococcus aureus*.

Por referencia a la Figura 1, un método 10 para la coprecipitación de un agente terapéutico en una superficie revestida de hidroxiapatita incluye una etapa 12 de proporcionar una superficie. Como se muestra en la Figura 2, una superficie 20 puede ser un implante o dispositivo. Implante y dispositivo se usan como sinónimos para referirse a cualquier objeto que esté diseñado para colocarse parcial o totalmente dentro del cuerpo de un paciente para uno o más fines terapéuticos, tales como restaurar la función fisiológica, aliviar los síntomas asociados con la enfermedad, administrar agentes terapéuticos y/o reparar o reemplazar o aumentar, etc. órganos y tejidos dañados o enfermos.

Algunos ejemplos representativos de implantes/dispositivos médicos incluyen clavos, clavos de fijación y otros dispositivos ortopédicos seleccionados entre el grupo de implantes, implantes dentales, endoprótesis vasculares, dispositivos de administración de medicamentos, láminas, películas, mallas, implantes de tejido blando, electrodos implantables, sensores implantables, bombas de suministro de fármacos, barreras de tejido y derivaciones. Se ha de entender que se pueden usar otras superficies o dispositivos.

El implante 20 incluye una base con un revestimiento base metálico 22 seleccionado entre el grupo de TiO_2, TiO, $TiCrO_2$, Ti_2O_3, Ti_3O_5, SiO_2, MgO_2, AlO_2 y CrO_2. El revestimiento base 22 se aplica sobre el implante 20 a través de evaporación por arco catódico.

Proporcionar un implante hecho de Ti de cualquier calidad, y exponer este implante al aire, da como resultado la formación de un revestimiento de TiO_2 muy delgado, nativo y a menudo amorfo. A pesar de su microestructura amorfa, este revestimiento de TiO_2 nativo tiene la capacidad de formar revestimientos de HA en su superficie, en especial a temperaturas elevadas de PBS (es decir, 60 ºC). La química de la superficie es "responsable" de las interacciones iónicas con los iones de PBS. A temperaturas elevadas, incluso es posible formar HA en otros óxidos, tales como MgO y Al_2O_3. Con tales, los cristales de HA se forman habitualmente en la solución de PBS y a continuación se acumulan en el sustrato, lo que da como resultado un revestimiento de HA.

De nuevo por referencia a las Figuras 1 y 2, se aplica una capa semilla de hidroxiapatita 24 sobre el implante en la etapa 14. Como se ha discutido anteriormente, la capa semilla se puede cultivar biomiméticamente. El método biomimético incluye remojar el implante en un fluido corporal simulado, tal como una solución salina tamponada con fosfato (PBS), a una temperatura y un pH apropiados. La temperatura de la solución puede ser, por ejemplo, 30-90 ºC. Se formará un revestimiento conformado después de unos días de remojo en la solución calentada.

La capa semilla 24 tiene un espesor de 0,1 µm a 1 µm. Como se describirá adicionalmente en el presente documento, la delgada capa semillas de HA activa y/o permite el crecimiento de un revestimiento de HA que contiene fármaco a altas concentraciones de fármaco.

La solución de PBS se prepara con diversas concentraciones de iones para imitar la composición química de los fluidos corporales humanos, tal como el plasma sanguíneo. La solución contiene iones de calcio y fosfato.

En la etapa 16, la superficie de capas semilla de hidroxiapatita se pone en contacto con una solución que incluye el agente terapéutico. La superficie del implante que se cubre con HA dopada con agente terapéutico se almacena en

solución acuosa tamponada con fosfato con la adición de diferentes cantidades de agente. El agente terapéutico está en la solución a la concentración especificada, es decir, de 1,0 a 40 mg/ml.

En la siguiente etapa 18, se forma una capa 26 le hidroxiapatita, coprecipitada con agente farmacéutico, sobre la superficie revestida para distribuir uniformemente el agente terapéutico en la capa. La incorporación simultánea del fármaco durante el crecimiento biomimético del revestimiento da como resultado la capa 26 de fármaco-HA coprecipitada. Las moléculas de fármaco, mediante el uso de este método de deposición, se distribuyen uniformemente en todo el espesor del revestimiento y, en consecuencia, la liberación del fármaco de tal revestimiento coprecipitado, como se describe adicionalmente en el presente documento, exhibe un perfil de liberación controlada y sostenida. La capa 26 coprecipitada puede crecer hasta un espesor de 1 µm a 10 µm.

Se evaluó la viabilidad para la coprecipitación del antibiótico aminoglucósido hidrófilo Tobramicina en revestimientos de HA durante la nucleación en la superficie del implante. Se observó el impacto de los diferentes parámetros de proceso y los tratamientos previos del material en la nucleación y coprecipitación de hidroxiapatita dopada con Tobramicina en discos de acero inoxidable bioactivos, revestidos con TiO_2 y clavos de fijación. Además, para superar la fase de inicio problemática de nucleación de HA que se ha descrito anteriormente, se evaluó el revestimiento previo de la superficie con una capa de HA a nanoescala. La capa semilla de HA se siembra y desencadena la cristalización. De ese modo, mediante este enfoque, se pueden coprecipitar cantidades significativamente mayores de Tobramicina en un revestimiento de hidroxiapatita dopado con fármaco mediante un enfoque más rápido en comparación con las superficies en capas semilla sin HA. Además, se pueden liberar dosis farmacéuticamente pertinentes de este revestimiento durante un período de tiempo razonable. Además, la técnica especial permitió que el revestimiento de HA dopado con Tobramicina creciera no solo en geometrías planas, sino también en geometrías complejas tales como clavos de fijación.

Se usaron clavos de fijación de acero inoxidable de calidad ortopédica (Ø 4 mm, 90 mm x 30 mm), Stryker Trauma AG (Selzach, Suiza), y discos circulares (Ø = 9 mm, espesor 1 mm) de titanio de calidad 5 para la deposición del revestimiento. Placas de acero inoxidable (20 mm x 20 mm x 1 mm) de calidad médica AISI de tipo 316L sirvieron como sustratos para investigaciones de espectroscopía de emisión óptica de descarga luminosa (GD-OES).

Los sustratos se revistieron con un revestimiento de TiO_2 cristalino anatasa mediante evaporación por arco catódico durante un tiempo de deposición de 20 minutos. La coprecipitación de Tobramicina en los sustratos bioactivos y revestidos con TiO_2 cristalino se llevó a cabo mediante la adición de diferentes cantidades del antibiótico Tobramicina a solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS) que sirve como fuente de iones.

Después de la deposición por arco catódico del TiO_2 cristalino, los sustratos se limpiaron con ultrasonidos en isopropanol y agua desionizada (5 minutos en cada uno). Posteriormente, los discos y las placas se colocaron en vasos de plástico que contenían 20 ml de PBS, mientras que los clavos de fijación se colocaron en tubos de plástico que contenían 50 ml de PBS. Se llevaron a cabo dos series de ensayos para investigar la influencia de la concentración de antibiótico en el crecimiento del revestimiento, así como el impacto de la química de la superficie en la afinidad del fármaco. Todas las muestras para ambas series de ensayos se produjeron por triplicado. La primera serie de ensayos se llevó a cabo en discos de titanio revestidos de TiO_2. Se añadieron diferentes concentraciones de Tobramicina (0,5 mg/ml; 1,0 mg/ml; 4 mg/ml; 20 mg/ml y 40 mg/ml) a PBS y las muestras se almacenaron durante 6 días a 37 ºC o 60 ºC.

La afinidad de la Tobramicina para las diferentes químicas de superficie se evaluó cubriendo los sustratos revestidos con TiO_2 antes de la deposición de la coprecipitación con una capa semilla de HA delgada submicrométrica. La capa semilla de HA se obtuvo por inmersión en PBS durante 3 días a 60 ºC. Para la segunda serie de ensayos, se almacenaron discos con la capa semilla de HA durante 6 días en PBS a 60 ºC que contenía Tobramicina a concentraciones de 4 mg/ml y 20 mg/ml, respectivamente. Los revestimientos coprecipitados en los clavos de fijación con la capa semilla de HA se hicieron colocando los clavos durante 6 días en PBS con concentraciones de Tobramicina de 4 mg/ml y 20 mg/ml a 37 ºC, para producir las muestras denominadas Co-4 y Co-20, respectivamente. Después del proceso de revestimiento, todas las muestras se secaron al aire en un horno a 37 ºC durante 24 horas.

Además, se evaluaron las propiedades de carga por adsorción de las estructuras de revestimiento coprecipitadas. Para este estudio, se colocaron muestras de Co-4 durante 5 minutos en tubos de ensayo de fondo redondo (130 mm x 14 mm x 1 mm) que contenían 5 ml de solución madre de Tobramicina a temperatura ambiente a una concentración de 20 mg/ml. Las muestras resultantes se denominaron Co-4/20. La homogeneidad y el espesor del revestimiento se evaluaron mediante microscopía de barrido electrónico (SEM) y la liberación de Tobramicina de los clavos de fijación se evaluó mediante HPLC.

Los revestimientos de HA coprecipitados biomiméticamente se examinaron usando un microscopio de barrido electrónico Zeiss Supra 40. Se registraron imágenes de SEM de la sección transversal de la HA dopada con Tobramicina obtenida por molienda iónica (E-3500, Hitachi) para evaluar los espesores y las estructuras de los revestimientos de HA depositados. El espesor de revestimiento de los revestimientos depositados se evaluó en regiones de desprendimiento, que se crearon de forma intencionada en las superficies utilizando una cuchilla de

afeitar.

Para cuantificar la cantidad de fármaco liberado y para evaluar la cinética de liberación de Tobramicina que se eluye de las muestras Co-4, Co-20 y Co-4/20, se usó cromatografía líquida (HPLC). La metodología de todas las mediciones se llevó a cabo y modificó de acuerdo con la Farmacopea Británica "HPLC Detection of Gentamicin Sulphate" Volumen I 695-697 (1999); Fabre H. *et al*., "Determination of Aminoglycosides in Pharmaceutical Formulations - I. Thin layer Chromatography, *J Pharmaceut Biomed* **7** 883-892 (1989); y Fabre H. *et al*., "Determination of Aminoglycosides in Pharmaceutical Formulations - II. High-Performance Liquid Chromatography, *J Pharmaceut Biomed* **17** 1711-1718 (1989).

La presencia y la profundidad de penetración de la Tobramicina incorporada en los revestimientos coprecipitados según se depositan se evaluaron mediante espectroscopía de emisión óptica de descarga luminosa (GD-OES, GDA750-HP Spectruma Analytik GmbH, Alemania). Los perfiles cuantitativos de los elementos característicos de la Tobramicina nitrógeno (N) y carbono (C) se obtuvieron midiendo la composición química de las muestras de HA dopadas con antibiótico desde las superficies de la muestra hacia el sustrato.

Por referencia a las Figuras 3(a) - 3(d), se muestran los análisis de SEM de las estructuras superficiales después de la inmersión en Tobramicina que contiene tampón PBS durante 6 días con a) 0,5 mg/ml de Tobramicina a 37 ºC; b) 1,0 mg/ml de Tobramicina a 37 ºC; c) 0,5 mg/ml de Tobramicina a 60 ºC; d) 1,0 mg/ml de Tobramicina a 60 ºC.

El análisis de SEM de las superficies de muestra de la primera serie producida a 37 ºC y con concentraciones de Tobramicina de 4, 20 y 40 mg/ml, no mostró signos de nucleación de HA en los discos revestidos con TiO_2 cristalino. La reducción de la concentración de Tobramicina a 0,5 mg/ml o 1,0 mg/ml no dio como resultado ninguna nucleación de HA observable, véanse las Figuras 3(a) y 3 b). Al aumentar la temperatura a 60 ºC, se pudo observar la nucleación para la concentración de tobramicina de 0,5 mg/ml y 1,0 mg/ml nucleación claramente activada. Véanse en las Figuras 3(c) y 3(d). Como se muestra, los revestimientos de HA poseen una morfología no homogénea, rugosa, similar a una bola cubierta con aglomerados adicionales similares a una bola. El espesor del revestimiento se midió y resultó ser de aproximadamente 1,5 µm después de almacenamiento durante 6 días a 60 ºC para ambas concentraciones de antibiótico. El espesor y la apariencia de todos los revestimientos investigados se presentan en la Tabla 1.

La segunda serie de ensayos se llevó a cabo en sustratos cristalinos revestidos con TiO_2 que se revistieron adicionalmente con una capa semilla de HA. Como se muestra en la Figura 4, el análisis de la sección transversal por SEM reveló un espesor de la capa semilla de HA en el intervalo de aproximadamente 300 a aproximadamente 600 nm después de inmersión durante 3 días en PBS a 60 ºC.

Por referencia a las Figuras 5(a) - 5(d), se pudo observar el crecimiento del revestimiento de hidroxiapatita dopada con Tobramicina para las dos concentraciones (0,5 mg/ml y 1,0 mg/ml) y las dos temperaturas (37 ºC y 60 ºC) sometidas a ensayo en tales capas. El análisis por SEM de las estructuras superficiales en las capas semilla de HA después de la inmersión en PBS dopado con Tobramicina durante 6 días: a) 0,5 mg/ml de Tobramicina a 37 ºC; b) 1,0 mg/ml de Tobramicina a 37 ºC; c) 0,5 mg/ml de Tobramicina a 60 ºC; y d) 1,0 mg/ml de Tobramicina a 60 ºC muestra que la morfología de los revestimientos coprecipitados estuvo influida por la temperatura del PBS. La morfología de las muestras sumergidas en PBS de 37 ºC parecía estar cubierta por un revestimiento liso y con forma de aguja. Véanse las Figuras 5(a) y 5(b). Para las dos concentraciones a 37 ºC se observó un espesor de revestimiento de aproximadamente 5 µm. Por otra parte, para el revestimiento desarrollado a concentraciones de 0,5 mg/ml y 1,0 mg/ml a temperaturas PBS de 60 ºC, un revestimiento más delgado de aproximadamente 1,5 µm y más morfológico, más rugoso, similar a una bola, pareció tener una estructura más inhomogénea. Véanse las Figuras 5(c) y 5(d).

Las Figuras 6(a) - 6(f) muestran el impacto de temperaturas elevadas (60 ºC) y mayores concentraciones de Tobramicina (4 mg/ml y 20 mg/ml) en el crecimiento del revestimiento, donde cada uno es un análisis SEM de las estructuras superficiales después de la inmersión en PBS dopado con Tobramicina durante 6 días a 60 ºC - a) sin capa semilla de HA a 4 mg/ml; b) y c) con una capa semilla de HA a 4 mg/ml (diferentes aumentos); d) sin capa de semilla de HA a 20 mg/ml; y e) y f) con una capa semilla de HA a 20 mg/ml (diferentes aumentos).

Los discos de referencia sin capa semilla de HA no mostraron signos de nucleación a la temperatura y las Concentraciones de Tobramicina seleccionadas, como se muestra en las Figuras 6(a) y 6(d), mientras que la presencia de la capa semilla dio como resultado un crecimiento de HA dopado con Tobramicina para ambas concentraciones, como se muestra en las Figuras 6(b), (c), (e) y (f). Las diferentes concentraciones de Tobramicina en el PBS dieron como resultado morfologías ligeramente diferentes de los revestimientos producidos. Los revestimientos hechos con 4 mg/ml del fármaco tuvieron un crecimiento después del almacenamiento durante 6 días a 60 ºC que dio como resultado espesores de revestimiento de aproximadamente 4 µm con una morfología similar a una aguja, Figura 6(c). Sin embargo, los revestimientos producidos a la concentración de fármaco más alta tenían espesores de aproximadamente 3 µm y contenían aglomerados en forma de bola con una topografía de superficie más densa y rugosa, Figura 6(e). Los espesores medidos informados incluyen el espesor de la capa de inicio de HA de aproximadamente 300 a aproximadamente 600 nm.

La técnica de revestimiento por coprecipitación se transfirió con éxito de los discos a los clavos de fijación. Para lograr una morfología homogénea y una topografía de superficie lisa, se sometieron a ensayo clavos de fijación en capas semilla de HA a concentraciones de 4 mg/ml y 20 mg/ml a la temperatura de deposición más baja de 37 ºC para producir los revestimientos de los clavos en la parte superior de la capa semilla de HA. La disminución de la temperatura a 37 ºC dio como resultado una nucleación de HA dopada con tobramicina en las dos concentraciones. Por referencia a las Figuras 7(a) - 7(b), se pudo observar un revestimiento continuo de HA dopado con Tobramicina para las dos concentraciones de antibiótico sometidas a ensayo (4 y 20 mg/ml), cubriendo completamente la geometría compleja del clavo, Figuras 7(a) y (b). La morfología del revestimiento de HA coprecipitado cambió de copos (4 mg/ml), Figura 7(a), a cristales esféricos más pequeños (20 mg/ml), Figura 7(b), de acuerdo con los resultados observado para los discos a la temperatura de deposición más alta, como se muestra en las Figuras 6(a) - (e).

El espesor total del revestimiento (incluyendo la capa inicial) se midió de aproximadamente 3 a aproximadamente 3,5 µm para concentraciones de Tobramicina de 4 mg/ml y disminuyó de aproximadamente 2 a aproximadamente 2,5 µm para el aumento de la concentración de fármaco a 20 mg/ml.

En la Tabla 1 se muestra una descripción general de los parámetros del proceso de muestra, los espesores de revestimiento y el aspecto del revestimiento.

Tabla 1

Tipo de muestra	Tiempo de proceso [d]	Temperatura de proceso [ºC]	Capa semilla de HA	Concentración de Tobramicina [mg/ml]	Espesor de revestimiento [µm]	Aspecto del revestimiento
Disco	6	37	No	40	---	---
	6	37	No	20	---	---
	6	37	No	4	---	---
Disco	6	37	No	1	---	---
	6	37	No	0,5	---	---
	6	60	No	1	-1,5	De tipo bola
	6	60	No	0,5	-1,5	De tipo bola
Disco	6	37	Sí	1	-5,0	De tipo aguja
	6	37	Sí	0,5	-5,0	De tipo aguja
	6	60	Sí	1	-1,5	De tipo bola
	6	60	Sí	0,5	-1,5	De tipo bola
Disco	6	60	No	20	---	---
	6	60	No	4	---	---
	6	60	Sí	20	-3,0	De tipo bola
	6	60	Sí	4	-4,0	De tipo aguja
Clavo de fijación	6	37	Sí	20	-2,5	De tipo bola
	6	37	Sí	4	-3,5	De tipo aguja

Además de la evaluación por SEM, los perfiles de liberación de Tobramicina de los clavos de fijación coprecipitados se evaluaron por HPLC. La Figura 7(c) presenta la cinética de liberación de los clavos de fijación coprecipitados (liberación de tobramicina en µg/clavo de fijación) durante un período de tiempo de 12 días. En general, el perfil de liberación se caracteriza por un estallido inicial seguido de una liberación sostenida para los tres tipos de muestra estudiados con una concentración total liberada en la solución de PBS de 5 ml por encima de la MIC del *Staphylococcus aureus*. La cantidad total de fármaco liberada de las muestras Co-4 fue de aproximadamente 350 µg/clavo, mientras que se midió una liberación significativamente mayor para las muestras Co-20 con una cantidad total de 1200 µg/clavo.

La mayor parte del contenido del fármaco en los revestimientos, 226 µg y 1093 µg para muestras Co-4 y Co-20, respectivamente, se liberó durante los primeros 15 minutos. Para ambas concentraciones utilizadas para producir los revestimientos, la cantidad de fármaco liberada disminuyó significativamente durante el período de liberación

sostenida. Co-20 mostró valores de liberación ligeramente más altos entre 15 y 30 minutos en comparación con Co-4, mientras que las muestras Co-4 proporcionaron valores de liberación más altos en todos los puntos de tiempo posteriores, excepto el punto de tiempo de 2 días donde las cantidades liberadas fueron casi iguales para los dos tipos de muestra. No se pudo detectar liberación de las muestras Co-20 después de 8 días, mientras que las muestras Co-4 continúan proporcionando una cantidad medible de liberación de Tobramicina hasta 12 días.

Además, las muestras Co-4/20 producidas por coprecipitación a 4 mg/ml seguidas de una carga de adsorción rápida en una solución madre de tobramicina de 20 mg/ml demostraron un estallido inicial mejorado en comparación con las muestras Co-4, que fue comparable a la liberación inicial que se observa en las muestras Co-20. Durante el período de liberación sostenida, las muestras Co-4/20 proporcionaron por lo general una mayor cantidad de liberación de fármaco en comparación con los otros dos tipos de muestra.

Los perfiles de profundidad de carbono y nitrógeno obtenidos de las mediciones de GD-OES de los discos Co-4 coprecipitados se muestran en la Fig. 8(a) y 8(b) y se comparan con un revestimiento de HA biomimético puro que no contiene antibióticos (HA-ref) con un grosor de aproximadamente 5 µm. El análisis de sección transversal por SEM demuestra un espesor de revestimiento de muestra de aproximadamente 3 µm, mientras que la capa semilla de HA, como en la Figura 4, tenía un espesor de aproximadamente 300 a aproximadamente 600 nm. La morfología del revestimiento mostró la estructura en forma de aguja que se ha descrito anteriormente y pareció ser más densa hacia la superficie cristalina bioactiva de TiO_2, Figura 8 (b). Se detectaron varias grietas dentro de la sección transversal de la muestra medida, lo que probablemente puede estar relacionado con la activación de fuerzas mecánicas como parte de la técnica de preparación.

Ambas concentraciones de C y N aumentaron desde la interfase del sustrato hacia la superficie. El perfil de profundidad de C mostró una mayor fracción en peso de carbono en Co-4 en todo el espesor del revestimiento de aproximadamente 3 µm, en comparación con la referencia (HA-ref), lo que muestra que la coprecipitación permitió integrar el fármaco en todo el revestimiento. Del mismo modo, el perfil de profundidad de N demostró una mayor concentración de nitrógeno para Co-4 para los aproximadamente 1,2 µm más exteriores del revestimiento en comparación con la HA-ref. De aproximadamente 1,2 a aproximadamente 1,8 µm, la concentración de nitrógeno muestra valores casi iguales seguida de concentraciones ligeramente más altas hacia la interfase del sustrato. Las concentraciones más altas de C y N se detectaron en la superficie externa y probablemente se originen en una solución que contiene un fármaco adsorbido superficialmente.

Dado lo expuesto anteriormente, se ha demostrado la viabilidad de la coprecipitación de dosis farmacéuticamente pertinentes de Tobramicina durante la deposición del revestimiento biomimético. El proceso de cristalización de la HA en sustratos bioactivos se ve fuertemente afectado por la concentración del fármaco que se incorpora en PBS, así como por la temperatura del proceso. La presencia de Tobramicina en PBS dio como resultado una disminución del espesor de revestimiento en comparación con los revestimientos de HA depositados biomiméticamente puros. Una temperatura elevada del PBS produjo revestimientos que contenían fármacos para concentraciones de hasta 1,0 mg/ml con una morfología rugosa similar a una bola.

Se ha demostrado que a una temperatura de proceso más alta se puede esperar una mayor movilidad de iones, lo que puede contribuir a mejorar la nucleación y el crecimiento de HA. Esto apoya el crecimiento del revestimiento observado a una temperatura aumentada incluso en presencia de pequeñas cantidades de Tobramicina. En comparación, las temperaturas de proceso más bajas en combinación con las concentraciones más altas de Tobramicina parecieron inhibir la cristalización de HA en sustratos de TiO_2. Esto se podría explicar por el hecho de que la Tobramicina podría actuar como un anticatalizador para el proceso de nucleación de HA en estas condiciones. La inhibición de la nucleación inducida por Tobramicina parece disminuir a temperaturas más altas y concentraciones más bajas. En estas condiciones, el producto de solubilidad de HA parece excedido y, por lo tanto, se puede producir la nucleación de los cristales de semillas de HA. Sin embargo, una combinación de mayor movilidad iónica y cambios en los productos de solubilidad pueden tener efecto en las diferencias de cristalización observadas. Esta suposición también puede explicar el impacto de la capa de inicio de HA en el crecimiento del revestimiento en presencia de Tobramicina. El revestimiento de HA podría actuar como un cristal semilla para todas las etapas siguientes de crecimiento del revestimiento y, por lo tanto, facilitar el crecimiento de HA a temperaturas de proceso más bajas y concentraciones más altas de Tobramicina.

El análisis por SEM demostró una morfología similar a una aguja para los revestimientos de Co-4 cultivados a 37 ºC. Los revestimientos depositados a temperatura elevada y en presencia de pequeñas cantidades de Tobramicina mostraron un cambio en la morfología del aspecto de aguja a bola. Se observó un cambio comparable en la morfología en el caso de concentraciones elevadas de Tobramicina donde, además, se observó la formación de aglomerados en la superficie del revestimiento. De ese modo, se puede concluir que la Tobramicina influye en la morfología del revestimiento cultivado durante la coprecipitación. A una concentración crítica de antibiótico, la nucleación y el crecimiento pueden verse limitados e incluso inhibidos, tal como lo respalda la disminución del grosor del revestimiento y la morfología con el aumento de las concentraciones de fármaco. Por otro lado, la temperatura elevada del proceso mejora la nucleación y el crecimiento hasta concentraciones de tobramicina de 1 mg/ml, lo que se pueda atribuir al impacto que se ha descrito anteriormente de la temperatura en la cinética del crecimiento. Además, las altas concentraciones de fármaco podrían conducir a interacciones farmacológicas durante los

procesos de adsorción y cristalización, lo que minimiza las posibilidades de nucleación.

Se ha de observar que la Tobramicina tiene efecto en el desarrollo del revestimiento coprecipitado y se puede clasificar como un factor de impacto para el crecimiento incluso en presencia de una capa de inicio de HA. La deposición de una capa de inicio de HA delgada submicrométrica permitió la incorporación de concentraciones más altas de Tobramicina durante el crecimiento del revestimiento. La Tobramicina puede tener una mayor energía de unión al HA en comparación con el TiO_2, lo que permite la coprecipitación a altas concentraciones de fármaco incluso a bajas temperaturas. El espesor del revestimiento de HA soporta la unión preferente especulada de Tobramicina a HA mediante un aumento del espesor. El perfil de liberación demostró una mejora del período de liberación de 12 días. Las cantidades liberadas de Tobramicina se encontraron por encima de la MIC del *Staphylococcus aureus*. Estos valores se midieron en condiciones de inmersión en PBS, que proporcionan condiciones *in vitro* adecuadas para evaluar la aplicación de revestimientos que liberan antibiótico en los campos de los implantes médicos.

Las muestras coprecipitadas liberaron cantidades comparables de fármaco durante el período de estallido inicial, al igual que las muestras cargadas por adsorción preparadas usando concentraciones similares de fármaco. Sin embargo, el período de liberación sostenida mostró cantidades superiores de fármaco liberado de las muestras coprecipitadas. Las mediciones por GD-OES confirmaron la incorporación del fármaco a todo el espesor del revestimiento y, por lo tanto, se puede esperar una mayor cantidad de fármaco liberado durante el período de liberación sostenida que se origina del fármaco liberado de las secciones más profundas y más densas del revestimiento.

La estructura nanoporosa de los revestimientos coprecipitados reveló la capacidad de incorporar mayores cantidades de antibiótico mediante carga por adsorción adicional. De ese modo, la deposición de revestimientos coprecipitados permite una acción adicional con el fin de diseñar perfiles de liberación dirigidos a la liberación de fármacos para aplicaciones específicas.

El método de deposición de revestimiento presentado no solo permite incorporar cantidades farmacéuticamente pertinentes de fármaco en un enfoque de un solo paso, además las propiedades de liberación son superiores a las informadas anteriormente y se espera que proporcionen una mejora del efecto antibacteriano que exceda el punto de referencia de 3 días informado en la bibliografía.

En resumen, la fase inicial de cristalización representa una parte muy importante para la deposición del revestimiento utilizando el enfoque de coprecipitación. La química de la superficie, así como la temperatura del proceso, son factores importantes que han demostrado afectar al crecimiento del revestimiento, al grosor y a la morfología de los revestimientos de HA dopados con fármaco.

Un enfoque de coprecipitación innovador y prometedor ha demostrado la viabilidad de crear un revestimiento de HA dopado con Tobramicina que suministra cantidades farmacéuticamente pertinentes de fármaco durante un período de 12 días. El período de liberación es superior en comparación con los resultados presentados anteriormente de revestimientos biomiméticos de HA cargados mediante enfoques de remojo rápido. El revestimiento de HA dopado con Tobramicina se consiguió cubriendo previamente la superficie con una capa de HA pura, delgada y submicrométrica para desencadenar la coprecipitación incluso a altas concentraciones de fármaco y temperaturas de proceso bajas (37 ºC). El mecanismo de liberación mostró una liberación de estallido inicial alta y controlable seguida de una liberación sostenida continua. La cantidad total de fármaco liberada fue superior a la MIC del *Staphylococcus aureus*. La estructura nanoporosa de los revestimientos coprecipitados investigados permitió además adaptar el perfil de liberación del fármaco mediante carga por adsorción adicional. La cinética de elución y las concentraciones de Tobramicina liberadas con el tiempo a partir de los recubrimientos coprecipitados pueden prevenir la colonización bacteriana y la formación de biopelículas tempranas en el momento de la cirugía y después de la operación.

Tal método de proceso permite, no solo el revestimiento de geometrías de implantes complejas, sino también el suministro al cirujano de implantes de HA dopados con antibióticos listos para su uso. Los resultados presentados en el presente documento demuestran una base fundamental para el desarrollo futuro que combina la administración adecuada de antibióticos con una necesidad clínica especial. Después de una evaluación cuidadosa de los problemas farmacéuticamente pertinentes, este tipo de revestimiento se podría usar para desarrollar un implante especial que aborde estas necesidades. El rendimiento del revestimiento de HA coprecipitado y su capacidad para estimular una osteointegración más rápida y prevenir la infección se pueden confirmar *in vivo*.

REIVINDICACIONES

1. Un método para coprecipitar un agente terapéutico en una superficie revestida de hidroxiapatita que comprende las etapas de:
proporcionar (12) una superficie (20);
aplicar un revestimiento base (22) seleccionado entre el grupo de TiO_2, TiO, $TiCrO_2$, Ti_2O_3, Ti_3O_5, SiO_2, MgO_2, AlO_2 y CrO_2 a la superficie (20) por evaporación con arco catódico;
aplicar (14) una capa semilla de hidroxiapatita (24) sobre el revestimiento base (22);
poner en contacto (16) la superficie con la capa semilla de hidroxiapatita (24) con una solución de PBS que incluye iones de calcio y fosfato y el agente terapéutico, en el que el agente terapéutico es tobramicina y en el que la tobramicina tiene una concentración de 1,0 a 40 mg/ml en la solución de PBS; y
formar (18) una capa (26) de hidroxiapatita y agente terapéutico coprecipitada sobre la superficie revestida.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la superficie (20) es un material seleccionado entre el grupo de titanio, aleación de titanio, aleación de níquel-titanio, tántalo, aleación de platino-iridio, oro, magnesio, acero inoxidable, aleación de cromo-cobalto, cerámica, plásticos biocompatibles o polímeros y las combinaciones de los mismos.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque el material de la superficie (20) es acero inoxidable.

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque el revestimiento base es TiO_2 cristalino.

5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque La capa semilla de hidroxiapatita (24) se hace crecer biomiméticamente.

6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque la capa (26) de hidroxiapatita y agente terapéutico coprecipitada se hace crecer biomiméticamente.

7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizado porque la capa semilla tiene un espesor de 0,1 µm a 1 µm.

8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque el espesor de la capa coprecipitada es de 1 µm a 10 µm.

9. Un dispositivo que tiene una superficie revestida de hidroxiapatita coprecipitada con un agente terapéutico de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

10. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el dispositivo se selecciona entre el grupo de implantes, clavos, clavos de fijación, dispositivos ortopédicos, implantes dentales, endoprótesis vasculares, dispositivos de suministro de fármacos, láminas, películas, mallas, implantes de tejido blando, electrodos implantables, sensores implantables, bombas de suministro de fármacos, barreras de tejido y derivaciones.

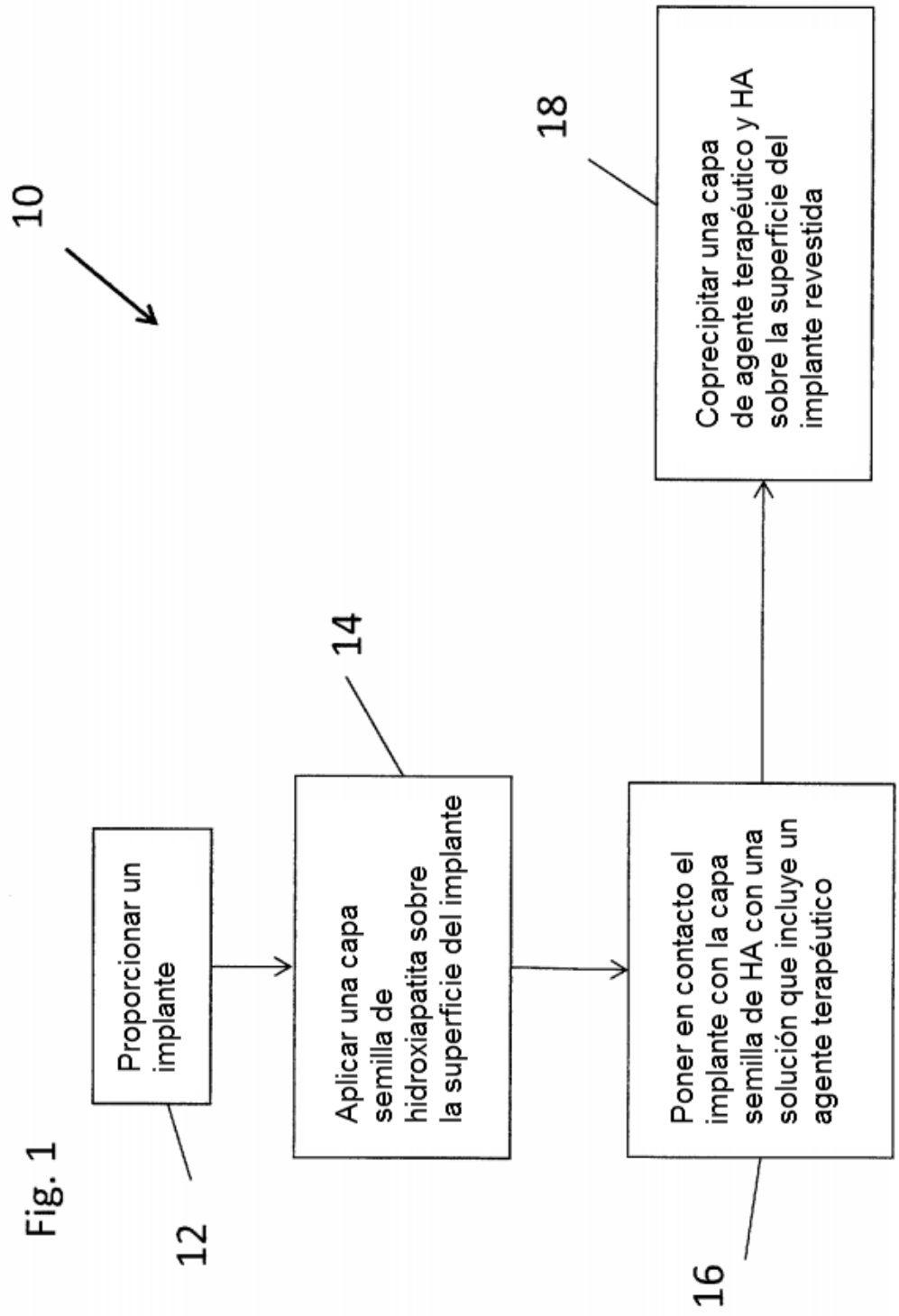
10
Proporcionar un implante
12
Aplicar una capa semilla de hidroxiapatita sobre la superficie del implante
14
Poner en contacto el implante con la capa semilla de HA con una solución que incluye un agente terapéutico
16
Coprecipitar una capa de agente terapéutico y HA sobre la superficie del implante revestida
18

Fig. 1

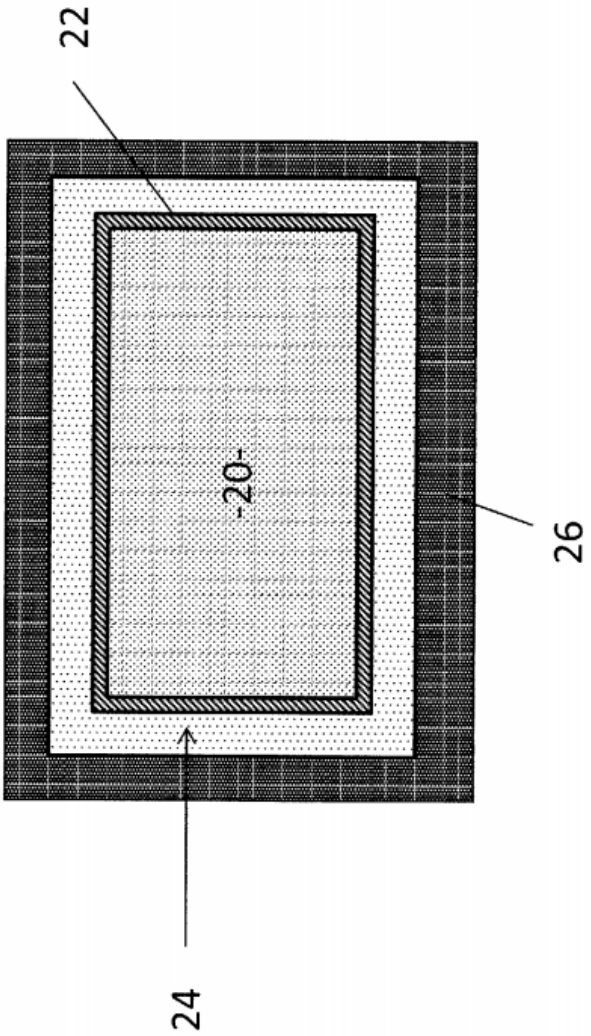

Fig. 2

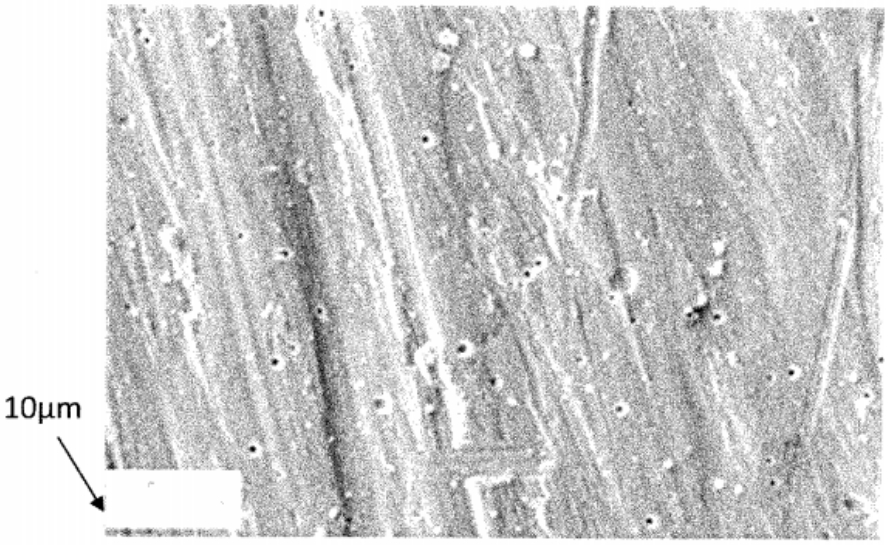

Fig. 3(a)

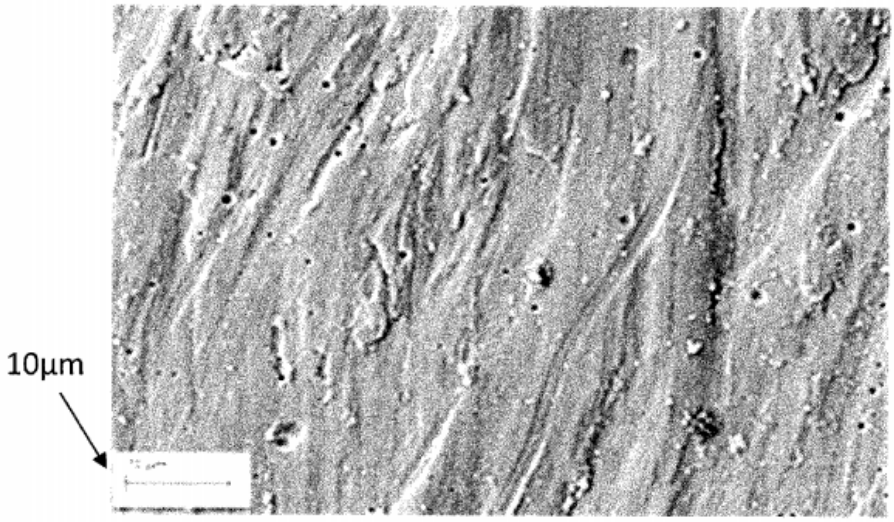

Fig. 3(b)

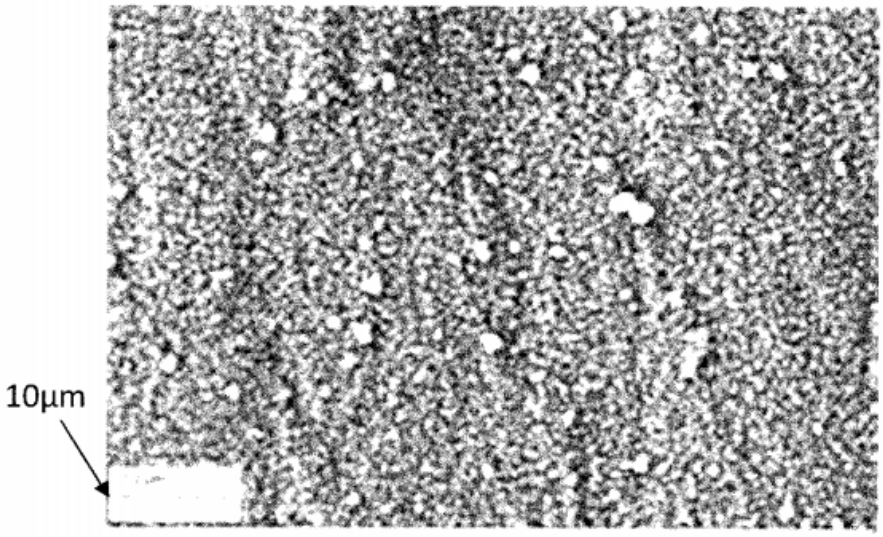

Fig. 3(c)

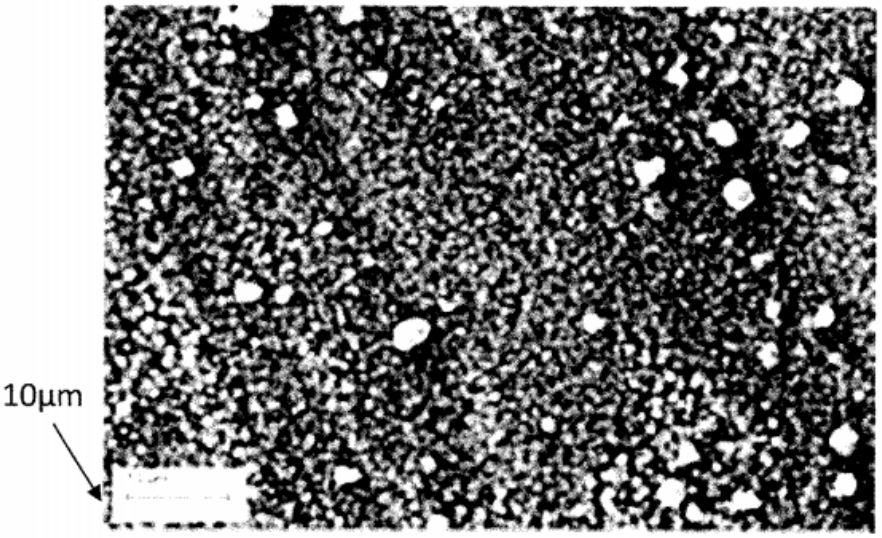

Fig. 3(d)

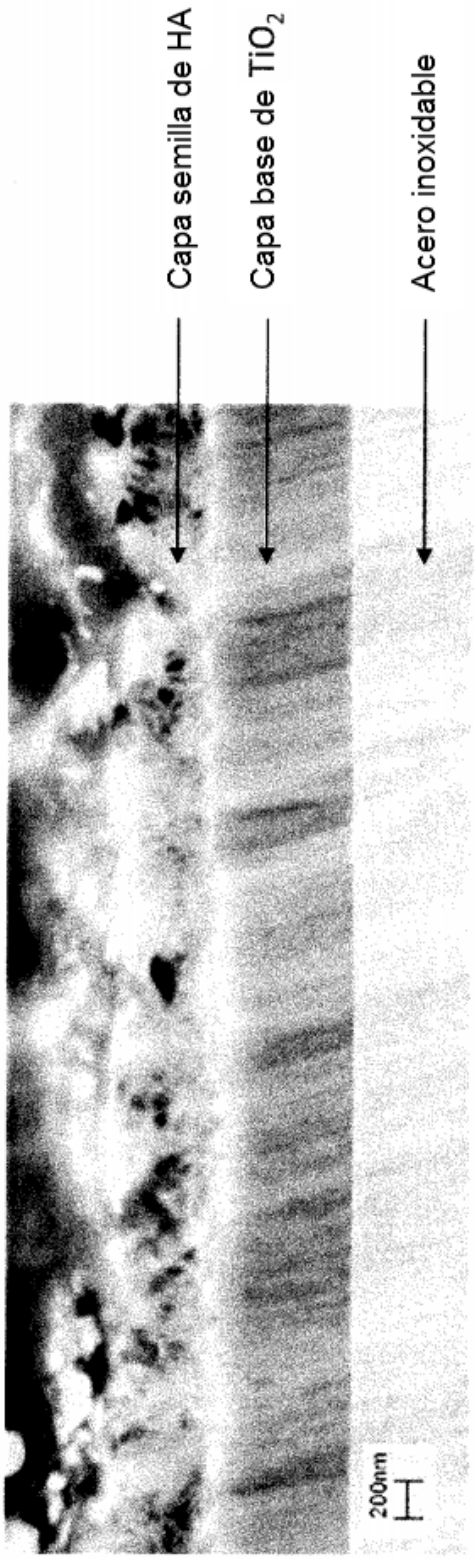

Fig. 4

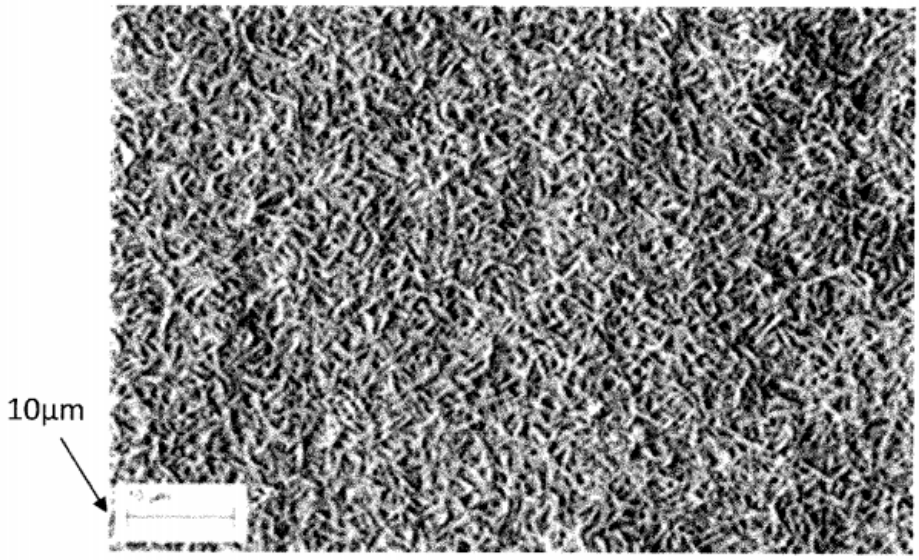

Fig. 5(a)

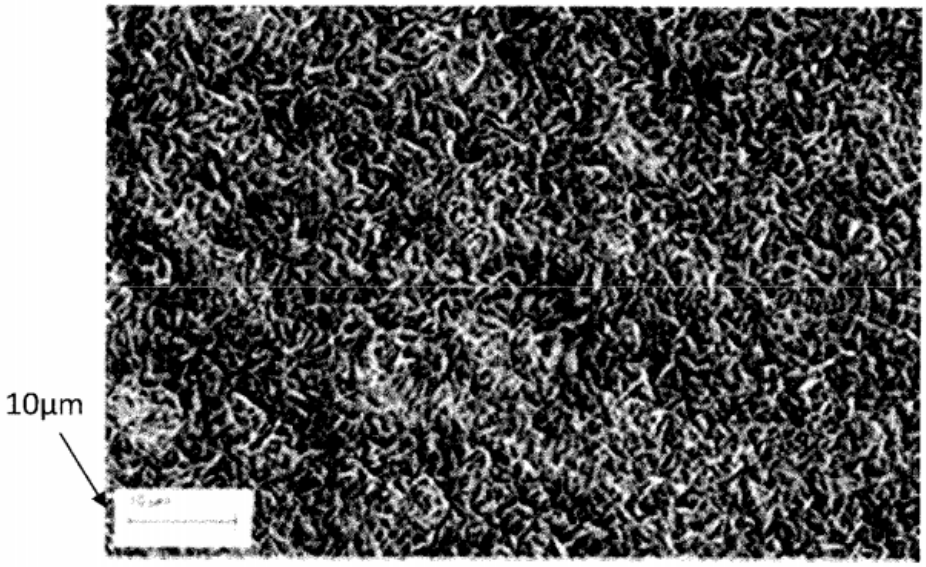

Fig. 5(b)

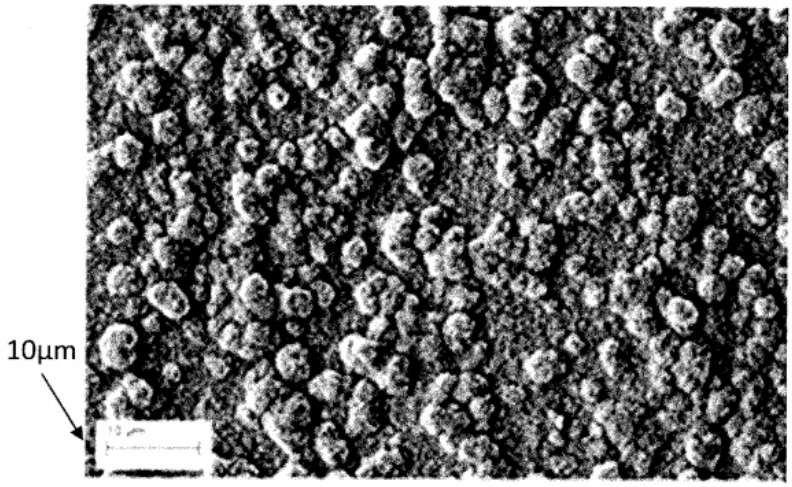

Fig. 5(c)

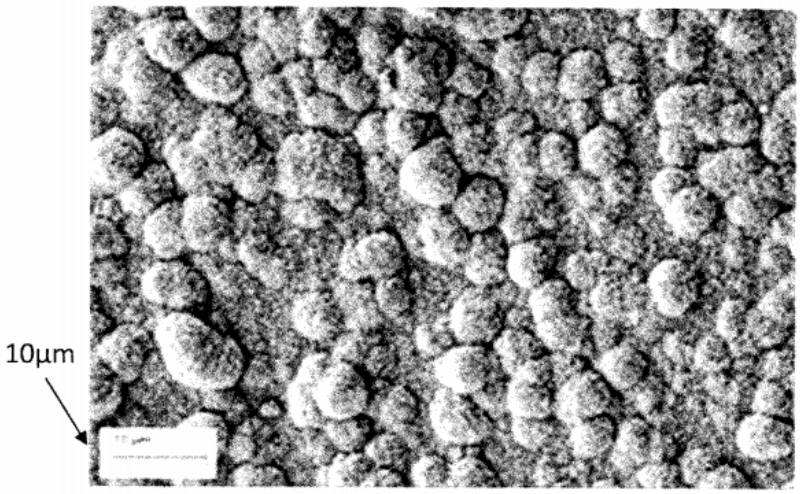

Fig. 5(d)

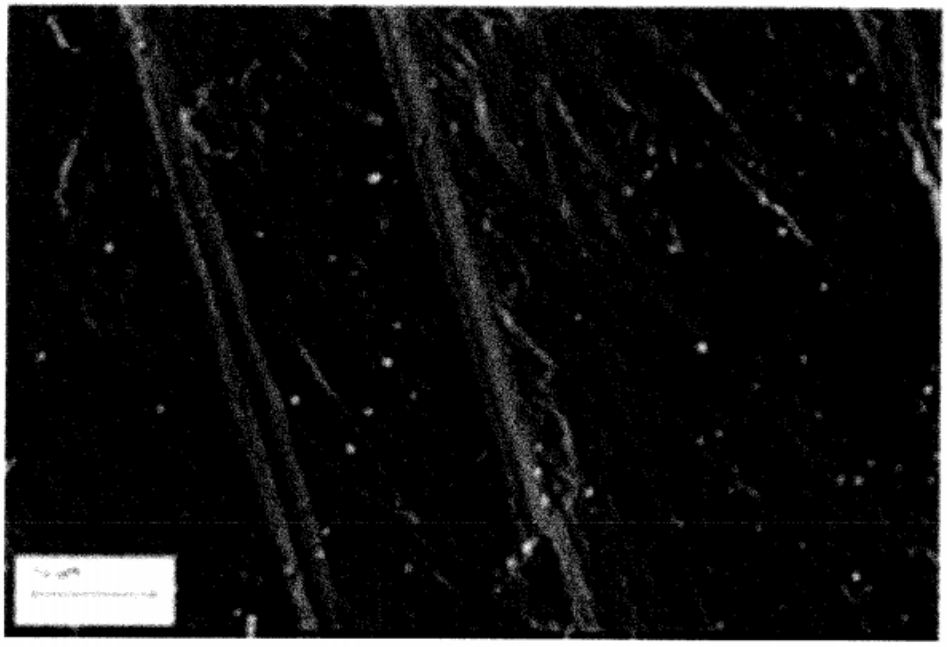

Fig. 6(a)

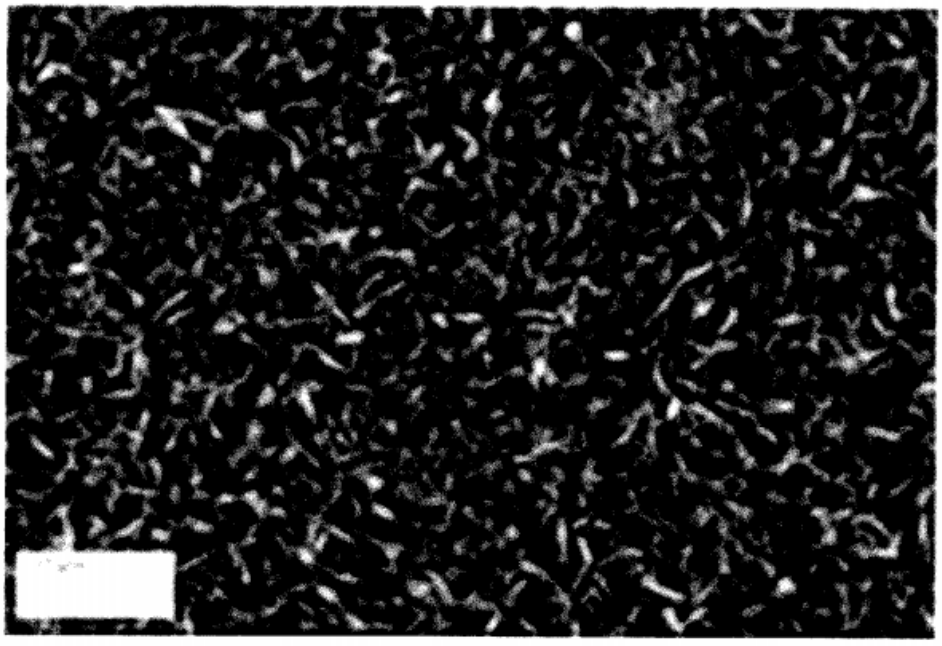

Fig. 6(b)

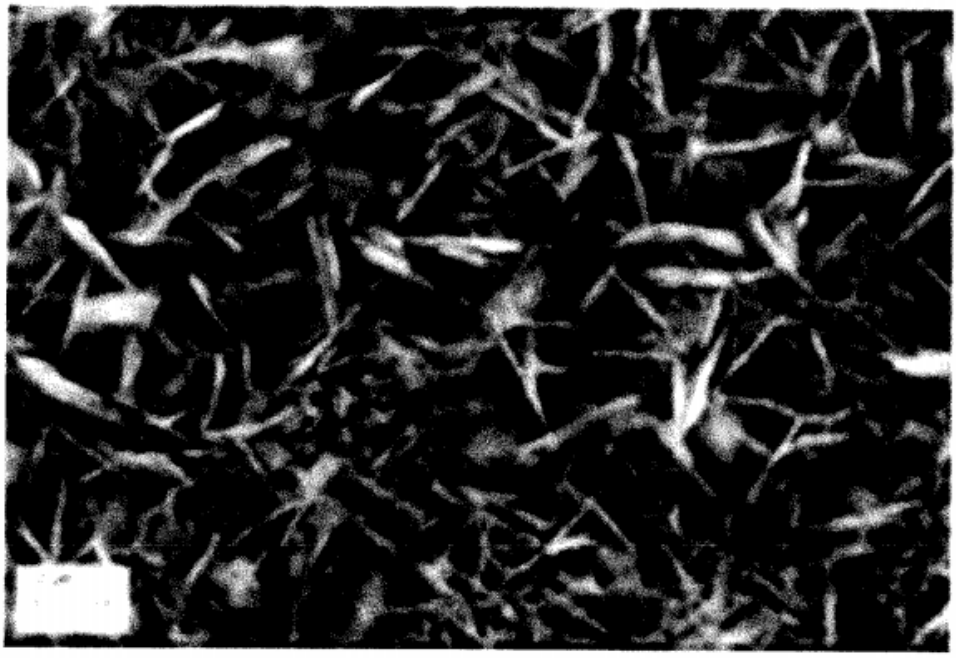

Fig. 6(c)

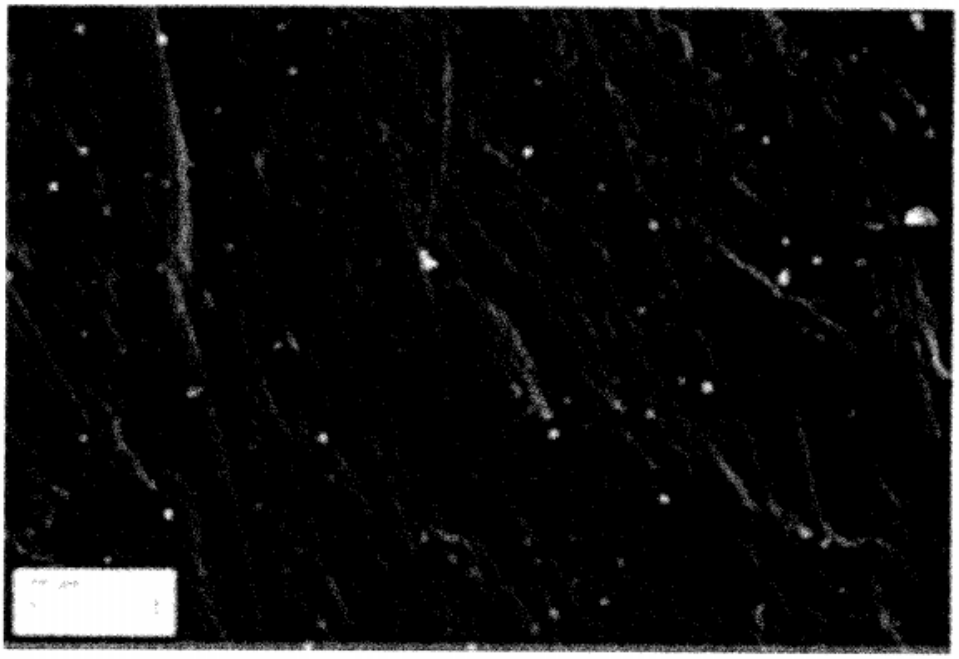

Fig. 6(d)

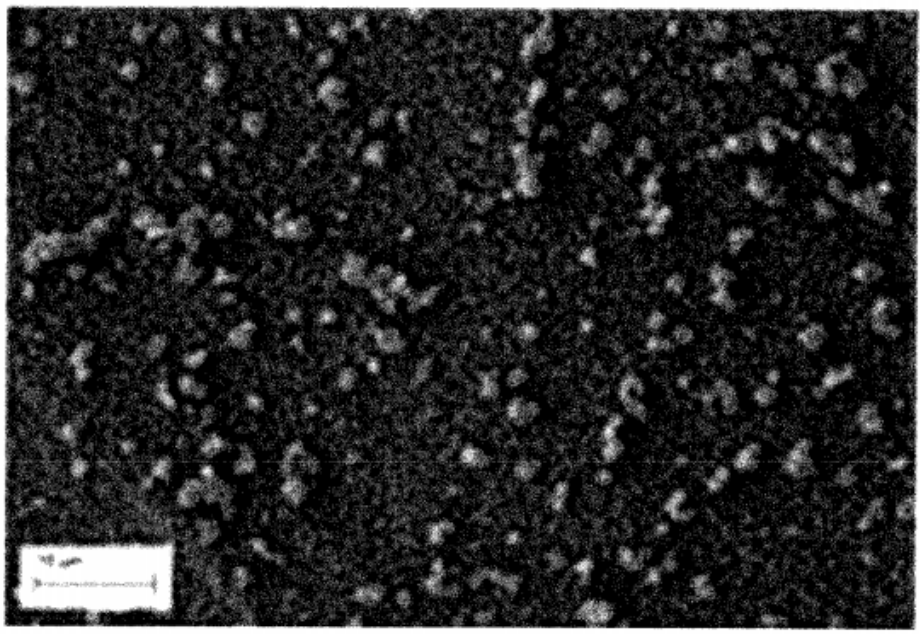

Fig. 6(e)

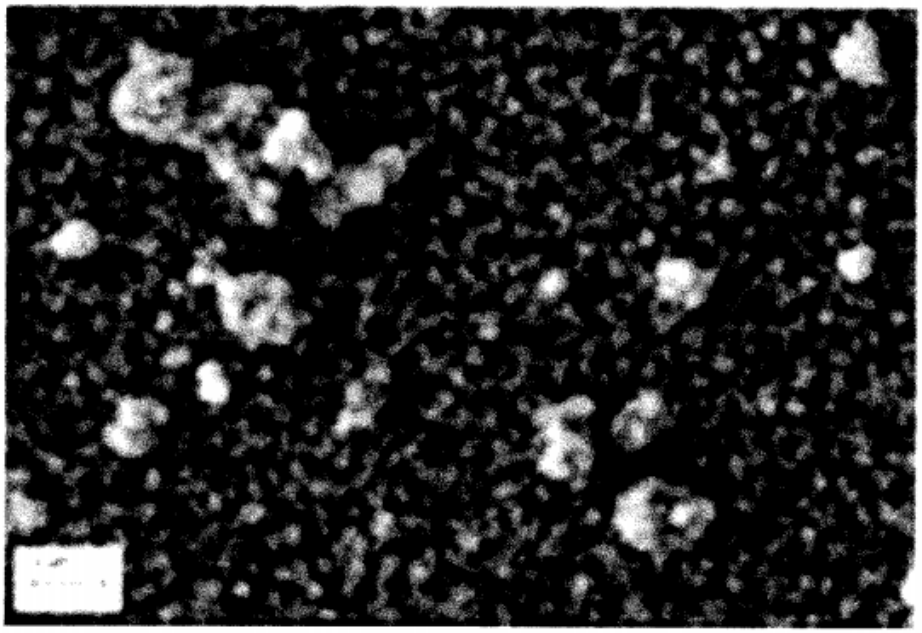

Fig. 6(f)

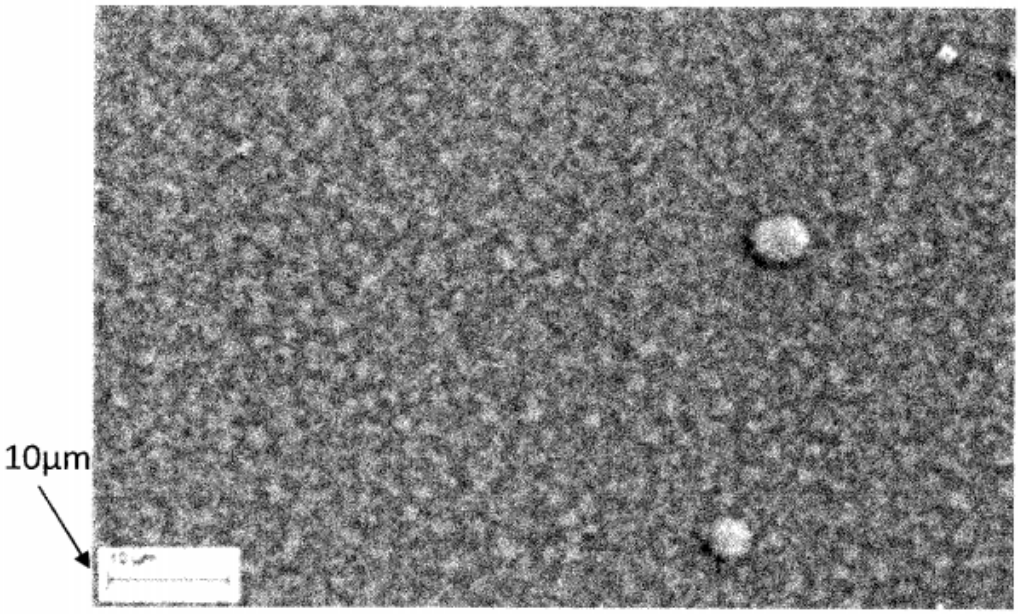

Fig. 7(a)

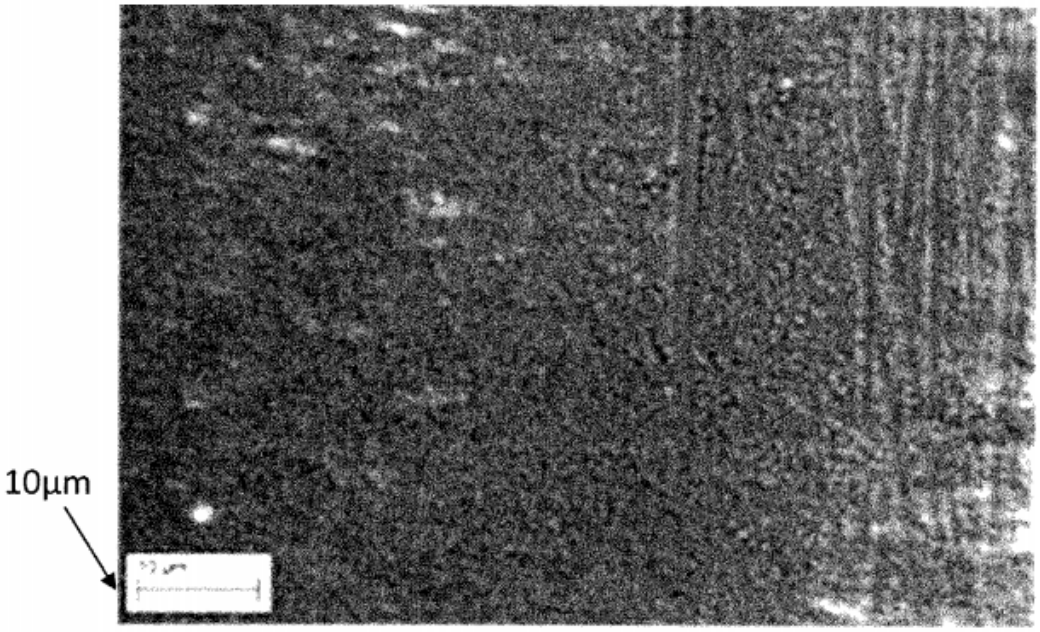

Fig. 7(b)

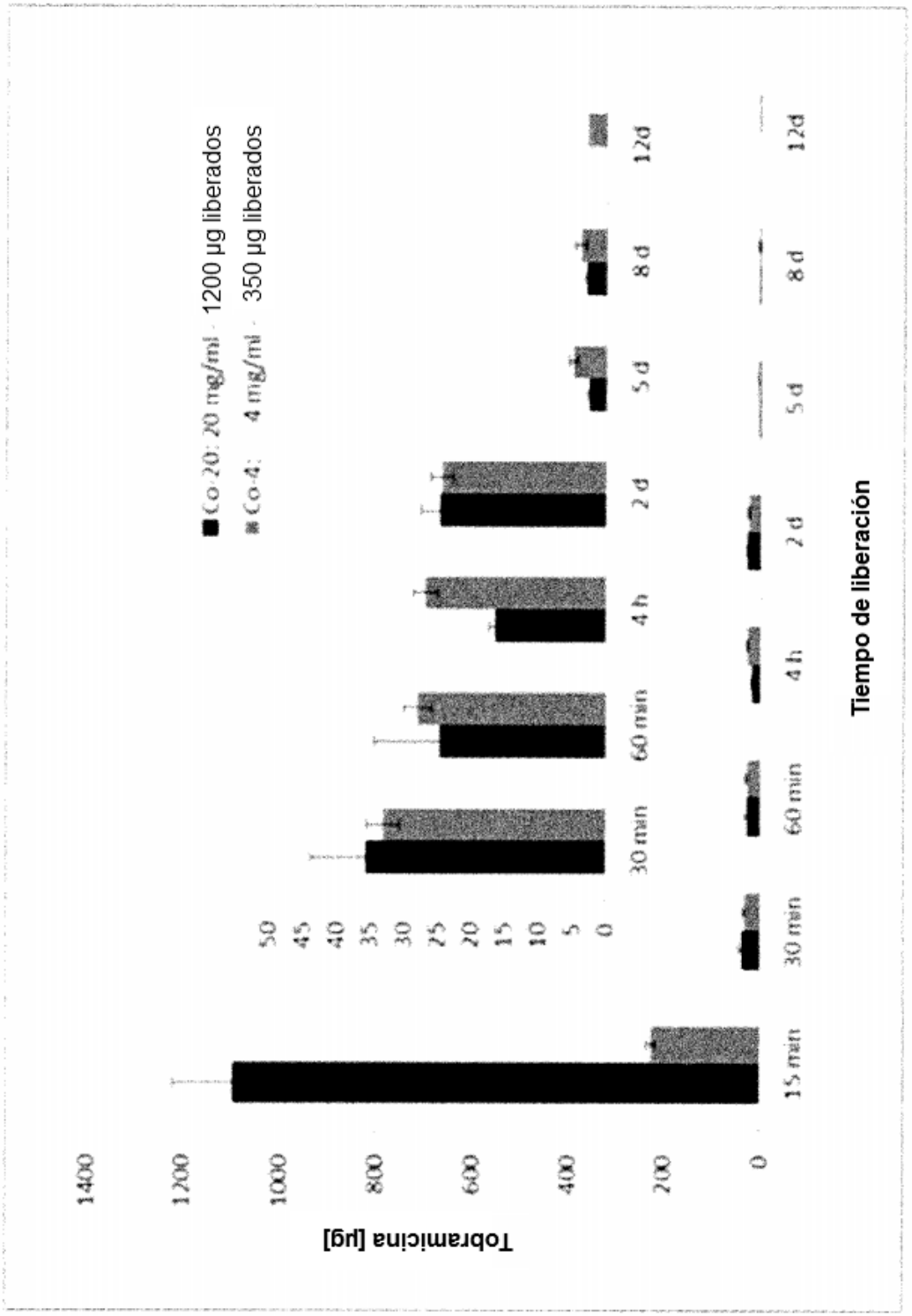
Co 20: 20 mg/ml - 1200 µg liberados
Co 4: 4 mg/ml - 350 µg liberados
Tobramicina [µg]
Tiempo de liberación
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
15 min
30 min
60 min
4 h
2 d
5 d
8 d
12d

Fig. 7(c)

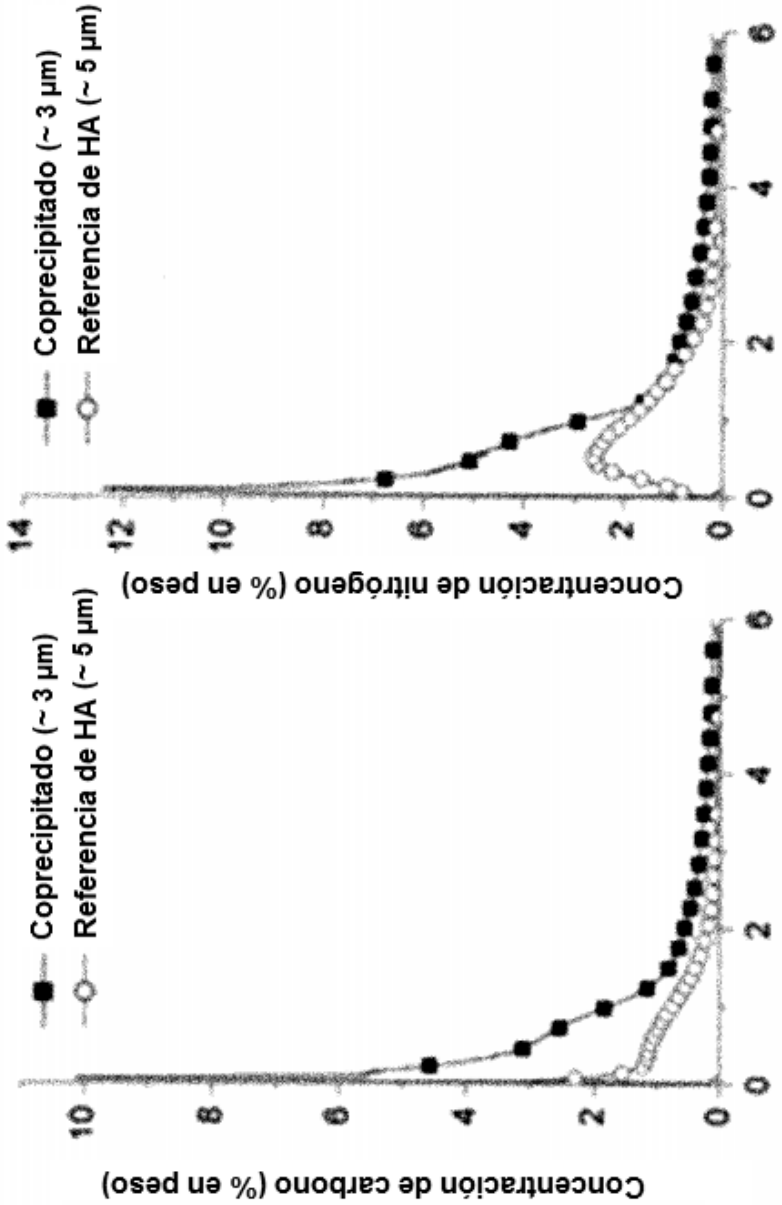
Coprecipitado (~ 3 µm)
Referencia de HA (~ 5 µm)
Concentración de nitrógeno (% en peso)
Profundidad (µm)
Coprecipitado (~ 3 µm)
Referencia de HA (~ 5 µm)
Concentración de carbono (% en peso)
Profundidad (µm)

Fig. 8(b)

Fig. 8(a)

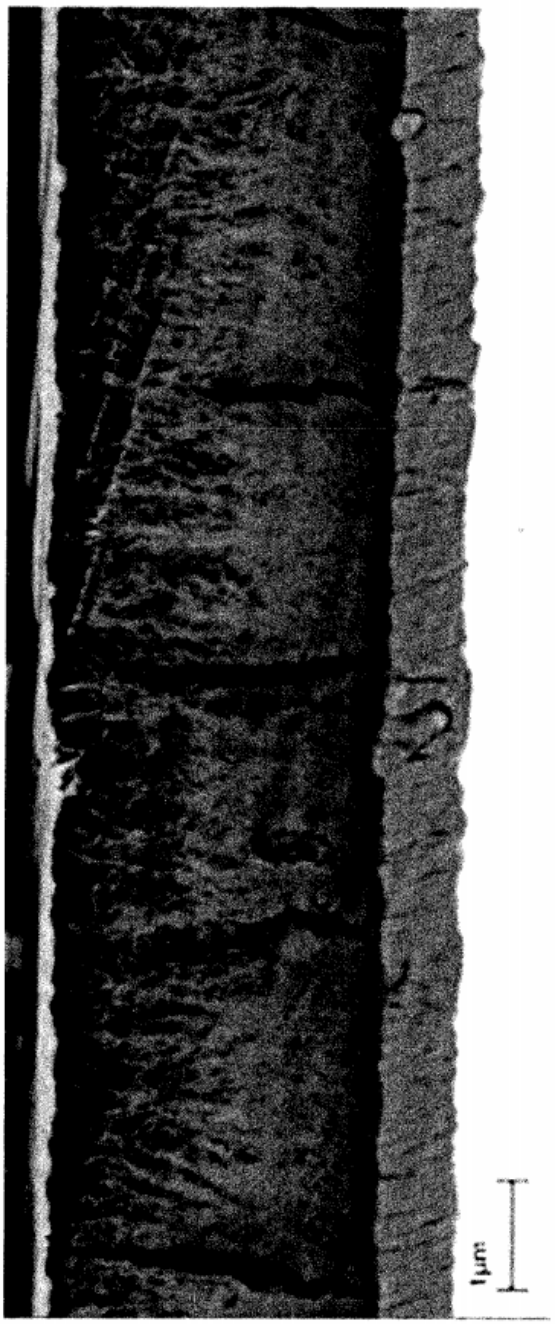

Fig. 8(c)