(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
21 de septiembre de 2023 (21.09.2023)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2023/175210 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
A61B 17/56 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2023/070126

(22) Fecha de presentación internacional:
08 de marzo de 2023 (08.03.2023)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P202230220 16 de marzo de 2022 (16.03.2022) ES

(71) Solicitantes: **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID** [ES/ES]; Avenida de Séneca, 2, 28040 Madrid (ES). **FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL GREGORIO MARAÑÓN** [ES/ES]; Doctor Esquerdo, 46, 28028 Madrid (ES).

(72) Inventores: **SERRANO LÓPEZ, Dolores Remedios**; Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, Plaza Ramón y Cajal, s/n, 28040 Madrid (ES). **YUSTE SOSA, Ivan**; Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, Plaza Ramón y Cajal, s/n, 28040 Madrid (ES). **LUCIANO DE LEÓN, Francis Cristina**; Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, Plaza Ramón y Cajal, s/n, 28040 Madrid (ES). **BALLESTEROS PAPANTONAKIS, María Paloma**; Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, Plaza Ramón y Cajal, s/n, 28040 Madrid (ES). **GONZÁLEZ BURGOS, Elena**; Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacología, Farma-

(54) **Title:** CUSTOMISED IMPLANTS HAVING ANTIMICROBIAL ACTIVITY FOR PREVENTING AND TREATING BONE INFECTIONS

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

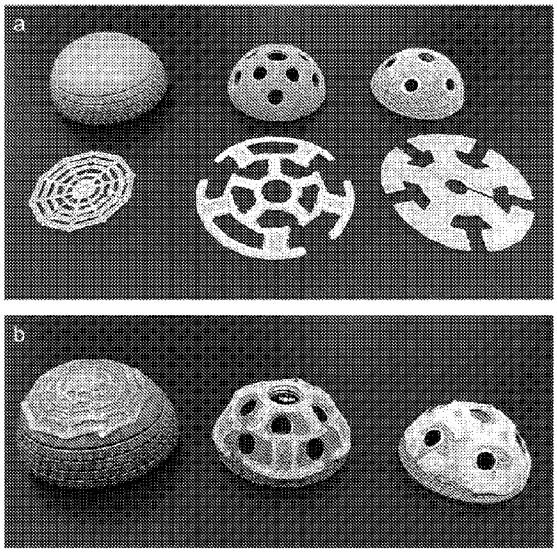


Figura 1

(57) **Abstract:** Current treatments for surgical site infections that are caused by fungi or bacteria with antibiotics and antifungal agents are usually based on the prolonged intravenous administration or use of polymethyl methacrylate cements after removing the prosthesis and cleaning the surrounding tissue, which requires another surgical procedure. However, an administration system that avoids high body exposure to the antimicrobial agent and prevents the patient from having to undergo a new surgery would be more desirable. The present invention discloses 3D printed implants with biocompatible and biodegradable polymers comprising medicinal drugs with immediate-sustained release, having a reduced haemolytic profile, which easily adhere to the prostheses, exhibit a good in vitro efficacy profile against different fungal and bacterial strains and can be sterilised by means of UV light due to the thinness thereof.

WO 2023/175210 A1

[Continúa en la página siguiente]

cognosia y Botánica, Plaza de Ramón y Cajal, s/n, 28040 Madrid (ES). **SANZ RUIZ, Pablo**; Fundación para la Investigación Biomédica, Hospital Gregorio Marañón, Calle Doctor Esquerdo, 46, 28028 Madrid (ES). **RIBED SÁNCHEZ, Almudena**; Fundación para la Investigación Biomédica, Hospital Gregorio Marañon, Calle Doctor Esquerdo, 46, 28028 Madrid (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

(57) Resumen: Implantes personalizados con actividad antimicrobiana para prevenir y tratar infecciones óseas. Los actuales tratamientos de infecciones de localización quirúrgica causadas por hongos o bacterias con antibióticos y antifúngicos, suelen estar basados en la administración intravenosa prolongada o el uso de cementos de polimetilmetacrilato tras retirar la prótesis y limpiar los tejidos circundantes, lo cual hace necesario otro proceso quirúrgico. Sin embargo, sería más deseable un sistema de administración que evite una alta exposición corporal al antimicrobiano y que el paciente deba someterse a una nueva cirugía. La presente invención describe implantes impresos en 3D con polímeros biocompatibles y biodegradables que comprenden fármacos con una liberación inmediata - sostenida con un perfil hemolítico reducido, que son fácilmente adheridles a las prótesis, presentan un buen perfil de eficacia in vitro frente a diferentes cepas de hongos y bacterias y pueden ser esterilizados mediante la acción de luz UV debido a su fino grosor.

DESCRIPCIÓN

IMPLANTES PERSONALIZADOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA PARA PREVENIR Y TRATAR INFECCIONES ÓSEAS

SECTOR DE LA TÉCNICA

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

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

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

Se han desarrollado cementos de PMMA cargados con un único antibiótico (como vancomicina, gentamicina, ciprofloxacino, entre otros). Los PMMA cargados con dos antibióticos se encuentran, actualmente, en fase de ensayos clínicos y la interacción en la liberación de fármacos sigue siendo un desafío sin resolver. Por otra parte, hasta la fecha no hay disponible comercialmente un cemento de PMMA cargado con un

antifúngico, lo cual limita su aplicación en el tratamiento de infecciones causadas por hongos a este nivel. Los principales inconvenientes ligados al uso de cementos cargados con antimicrobianos son que, para ciertos fármacos (especialmente los lipofílicos), la administración del fármaco desde el cemento óseo es insuficiente después de la cirugía, lo cual da lugar a una liberación de antibiótico muy baja y, por tanto, a un alto riesgo de resistencia a microorganismos. Una segunda limitación es el hecho de que las propiedades biomecánicas de la articulación pueden alterarse al incorporar el fármaco y la resistencia a la compresión del cemento se reduce, comprometiendo la vida del paciente. Con el objeto de salvar estos inconvenientes, se han propuesto otras alternativas como el uso de taurolidina para tratar infecciones óseas (EP0139534), la administración parenteral de partículas poliméricas recubiertas de antibióticos (US2010/0291220), la liberación sostenida de iones plata mediante un implante (US9248254) o la aplicación *in situ* de microesferas biodegradables que liberan un antibiótico de forma controlada (US8986737). Pero en la mayoría de los casos, sigue existiendo un problema de bioadhesión a la prótesis articular, problemas de osteointegración y citotoxicidad y bajo control en la liberación del antibiótico, sin existir ninguna terapia dual que actúe frente a bacterias y hongos.

Por todo ello, sigue existiendo la necesidad de estrategias novedosas para reducir las IRAS mediante sistemas versátiles con capacidad de contener más de un antibiótico o combinar antibióticos y antimicóticos para cubrir un amplio espectro de infecciones. Estos sistemas no deben alterar las propiedades biomecánicas de la articulación e, idealmente, deben poder colocarse externamente en la parte superior de la prótesis con grosor milimétrico, de manera que no obstaculicen el procedimiento quirúrgico.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención describe un sistema de liberación inmediata-controlada con acción antibacteriana y antimicótica individual o combinada para el tratamiento de IRAS. Estas formulaciones constituyen una solución al problema clínico de la falta de medicamentos disponibles para el tratamiento y la profilaxis de infecciones de prótesis articular causadas por agentes patógenos exógenos o aquellos que forman parte de la flora microbiana de la piel del paciente y que, durante el acto quirúrgico, contaminan las prótesis implantadas.

De forma más concreta, se presenta un sistema de liberación controlada de fármacos de administración parenteral basado en un implante de morfología en tela de araña o similar, fabricado mediante impresión 3D, con un perfil de liberación complementario (liberación inmediata-sostenida) para prevenir y tratar infecciones, tanto agudas como retardadas en el tiempo. Se ha seleccionado la anfotericina B (AmB) como antifúngico modelo, que actualmente se utiliza como *gold-standard* para el tratamiento de las infecciones fúngicas sistémicas, y vancomicina como agente antibacteriano de amplio espectro; estos pueden ser administrados directamente durante el acto quirúrgico.

Un primer aspecto de la invención se refiere al diseño y fabricación de implantes parenterales en forma de tela de araña (*spiderwebs*) adaptados de forma personalizada al componente acetabular o cotilo de prótesis como cadera, rodilla o válvulas cardiacas, por ejemplo. Estos implantes tienen una dimensiones milimétricas y están compuestos de materiales biocompatibles y biodegradables (por ejemplo alcohol polivinílico polietilenglicol, policaprolactona o mezcla de ellos). El diseño de la red facilita la osteointegración, al contener espacios de al menos, 100 µm. Además, tienen capacidad adhesiva tras la humectación en medios acuosos, pudiendo ser adheridos sobre las prótesis articulares en minutos. Las redes permiten conseguir una buena liberación inmediata (*burst effect*) combinada con un perfil sostenido de liberación de agentes antimicrobianos (especialmente durante las primeras 24 h post-implantación) presentando una óptima eficacia anti-infecciosa, tanto frente a hongos como frente a bacterias. Dichas redes, además, pueden esterilizarse mediante luz UV sin que esto dañe su estructura o composición, debido a su fino grosor.

Las redes pueden fabricarse mediante cualquier técnica de impresión 3D, especialmente técnicas de deposición de material fundido conocidas como FDM (*Fused Deposition Modeling*) o mediante extrusión directa de polvo. En el primer caso se utilizan filamentos previamente fabricados mediante extrusión en caliente con polímeros biocompatibles; una vez impresa la red, esta se carga mediante difusión pasiva con los agentes anti-infecciosos. En el caso de la extrusión directa, se parte del excipiente y fármaco en estado pulverulento previamente mezclado y homogeneizado. Las redes también pueden fabricarse mediante técnicas con láser como la estereolitografía y el sinterizado láser.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

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

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

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

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

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

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

Figura 7. Actividad *in vitro* antifúngica de los implantes cargados con AmB y AmB disuelta en DMSO frente a diferentes especies de *Candida* (*C. albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, C. krusei*). Las diferencias estadísticas significativas ($p<0,05$) están expresadas mediante *. Un halo de inhibición superior a 1,5 cm indica que el microorganismo es susceptible al fármaco; sin embargo, un halo inferior a 1 cm de diámetro indica que el microorganismo es resiste al fármaco de acuerdo con las guías CLSI (*Clinical Laboratory Standard Institute*). Halos de inhibición intermedios indican que el microorganismo es susceptible dependiendo de la dosis utilizada.

Figura 8. Actividad in vitro antibacteriana frene a *Staphylococcus epidermis* de discos comerciales de vancomicina (control, 30 µg), de la red cargada con vancomicina, la red sin cargar (control), la red cargada con DMSO; y DMSO puro como control 100%. Las diferencias estadísticas significativas ($p<0,05$) están expresadas mediante *. Un halo de inhibición superior a 1,5 cm indica que el microorganismo es susceptible al fármaco según las guías CLSI.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCIÓN

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

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

En primer lugar, se toman las medidas de diferentes cotilos para, posteriormente, poder hacer un diseño que se ajuste a cada uno de ellos mediante un programa de CAD (*Computer Aided Design*), como *Tinkercad* o *Solid Works*. En el caso de cotilos

totalmente sólidos, se diseña una estructura en forma de tela de araña con varios brazos que permiten una mejor adhesión al cotilo y con cierta separación entre las fibras de las redes, al menos 100 µm, para asegurar la posterior osteointegración.

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

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

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

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

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

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

Se preparan 10 gramos de una combinación de PCL y PEG con diferentes proporciones en peso (90:10, 80:20 y 70:30). La mezcla de los dos polímeros se micronizа con un

molino de cuchillas hasta obtener un polvo fino y homogéneo que es tamizado previa a la impresión.

Para imprimir los implantes se utiliza una impresora *Hyerl 3D Engine SR* (Georgia, USA) y un extrusor KR2-15 con una boquilla de extrusión de apertura de 0,5 mm. Este extrusor tiene un cilindro hueco donde se carga el material pulverulento. Una vez lleno con la mezcla de los polímeros, se acopla al extrusor y a la impresora, calentándolo hasta 75°C. La temperatura de la cama es de 55°C. En estas condiciones, el flujo de polímero fundido a través de la boquilla extrusora permite imprimir con alta resolución los implantes 3D.

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

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

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

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

inyección de la muestra es de 40 µL. La temperatura de la columna se mantiene a 25ºC y el detector se ajusta a 205 nm. Previo al experimento, se realiza una curva de calibración por triplicado para la AmB y la vancomicina, con el objetivo de determinar la linealidad, la especificidad y el límite de detección del método.

Para la vancomicina, la cinética de carga por difusión pasiva es lineal a una velocidad de 0,096%/h (R^2 = 0,8545) hasta las 4 horas. Tiempos más prolongados no dan lugar a mayores cargas.

En el caso de la AmB, la cinética de incorporación es bilineal, siendo la velocidad de carga de 0,0042%/h hasta las 3 horas y de 0,047%/h desde las 3 hasta las 6 horas. A tiempos cortos, la geometría de la red sigue siendo muy rígida pero, pasadas las tres horas de humectación, la red se vuelve más flexible permitiendo una mayor carga de AmB.

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 6. Este ejemplo se refiere a la liberación de los principios activos del implante de PVA-PEG 3D tras su adhesión al cotilo de la prótesis y su posterior inmersión en medio fisiológico (PBS pH 7,4) con albúmina (Figura 5).

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

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

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

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

Independientemente, en ambos casos, la concentración que se mantiene en el medio tras su liberación del implante (en torno a 200 µg/ml para la AmB y 400 µg/ml para la vancomicina) se encuentra por encima de la concentración mínima inhibitoria necesaria para conseguir efecto antimicrobiano, lo cual indica que la cantidad de fármaco cargada en los implantes es óptima para producir el efecto antimicrobiano deseado.

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

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

Para comprobar el efecto de los implantes y los principios activos, se preparan diferentes soluciones seriadas, en agua desionizada y DMSO, respectivamente. Se añaden 20 µl

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

$$\text{Hemolisis (\%)} = \frac{(\text{ABS}_{\text{muestra}} - \text{ABS}_{\text{PBS}})}{(\text{ABS}_{\text{Triton}} - \text{ABS}_{\text{PBS}})}$$

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

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

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

Los diámetros de la zona de inhibición se miden en los puntos donde hay una inhibición

completa del crecimiento de la levadura. Los aislados se clasifican según la CLSI en susceptibles (S) de AmB cuando la zona de inhibición es mayor de 15mm; resistentes (R), si la zona de inhibición es mejor de 10 mm; e intermedios (I) si la zona de inhibición es entre 11 y 14 mm.

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

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

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

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

En la Figura 8 se observa que *S. epidermidis* es susceptible al implante cargado con vancomicina, con un halo de inhibición superior a 15 mm. Además, no hay diferencias significativas con respecto a los discos comerciales de Neo-Sensitabs™ de vancomicina cargados con 30 µg de fármaco ($p>0,05$). Por otra parte, los implantes sin cargar,

impregnados con DMSO y solo DMSO no mostraron halo de inhibición indicando que la actividad antibacteriana se produce debido a la liberación de vancomicina del implante impreso en 3D.

5

REIVINDICACIONES

1. Implante parenteral con liberación inmediata-controlada de fármacos, caracterizado porque está constituido por materiales biocompatibles y biodegradables, tiene forma de tela de araña, espesor milimétrico y contiene principios activos anti-infecciosos.

2. Implante, según reivindicación 1, donde los materiales biocompatibles que constituyen el implante son alcohol polivinílico, policaprolactona, polietilenglicol o mezcla de ellos.

3. Implante, según reivindicación 1, donde la tela de araña consiste en un círculo central del que parten múltiples filamentos radiales y varios filamentos marco y de apoyo centrales.

4. Implante, según reivindicación 3, donde los filamentos radiales pueden estar unidos entre sí o separados por un espacio.

5. Implante, según reivindicación 4, donde los espacios son de al menos 100 µm.

6. Implante, según reivindicaciones anteriores, donde los filamentos tienen unas dimensiones entre 10-30 mm de largo y 5-10 mm de ancho.

7. Implante, según reivindicaciones anteriores, donde el principio activo es un antibiótico.

8. Implante, según reivindicación 5, donde el antibiótico es vancomicina.

9. Implante, según reivindicaciones 1 a 6, donde el principio activo es un antifúngico

10. Implante, según reivindicación 9, donde el antifúngico es anfotericina B.

11. Implante, según reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque contiene antibióticos y antifúngicos.

12. Implante, según reivindicación 11, donde el antibiótico es vancomicina y el antifúngico es anfotericina.

13. Método de obtención del implante reivindicado que comprende:
    - Diseñar la forma de la red.
    - Imprimir la red diseñada mediante técnica de impresión 3D con materiales biocompatibles y biodegradables.
    - Cargar la red impresa con principios activos anti-infecciosos mediante difusión pasiva.

14. Método, según reivindicación 13, donde la red se diseña a partir de las medidas del cotilo sobre el que se va a ajustar el implante y empleando un programa de CAD (Computer Aided Design).

15. Método, según reivindicación 13, donde la impresión 3D de la red se realiza a partir de un filamento de material biocompatible o biodegradable siguiendo el método FDM (*Fused Deposition Modeling*)

16. Método, según reivindicación 13, donde la impresión 3D de la red se realiza a partir de un material biocompatible o biodegradable pulverulento siguiendo el método de extrusión directa con polvo.

17. Método, según reivindicación 13, donde los materiales biocompatibles que constituyen el implante son alcohol polivinílico, policaprolactona, polietilenglicol o mezcla de ellos.

18. Método, según reivindicación 13, donde los principios activos anti-infecciosos son antibióticos, antifúngicos o mezcla de ellos.

19. Método, según reivindicación 18, donde los principios activos anti-infecciosos son vancomicina, anfotericina B, o mezcla de ellos.

20. Método, según reivindicaciones 13 a 19, donde, opcionalmente, el implante obtenido es esterilizado mediante luz UV.

21. Uso de los implantes reivindicados para prevenir y tratar las infecciones derivadas tras unas artoplastia o valvulopatía cardiaca.

22. Uso de los implantes reivindicados, según reivindicación 20, donde el implante es previamente humectado para ser administrado directamente durante el acto quirúrgico.

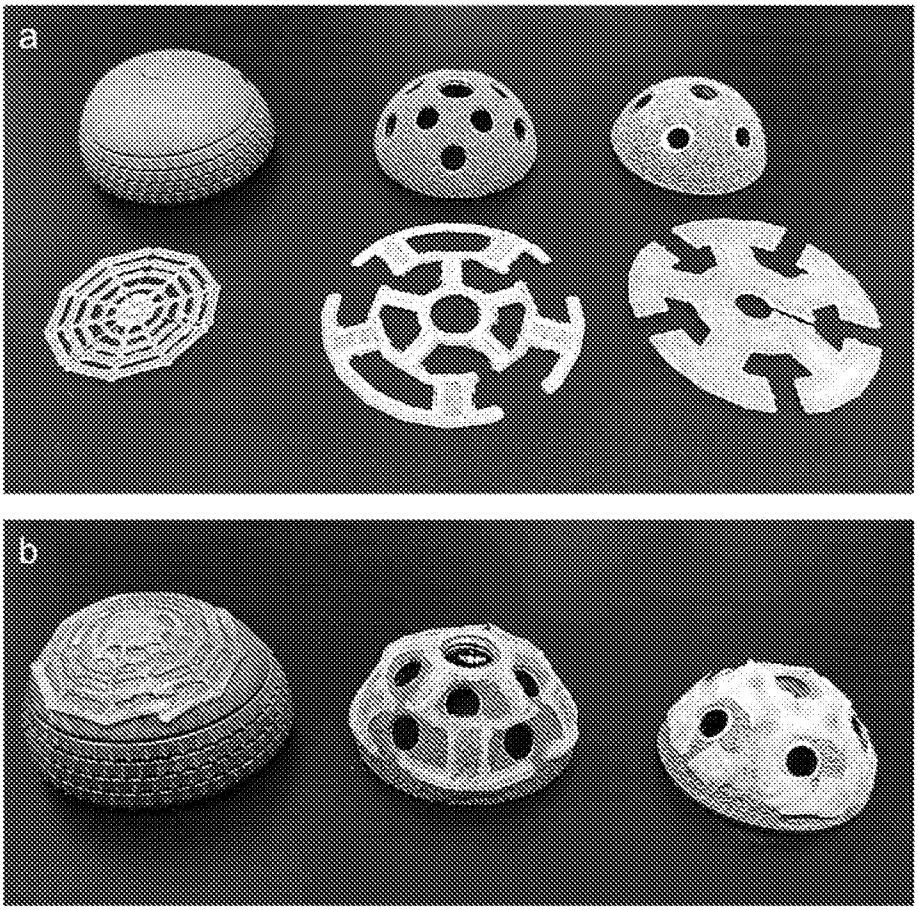


Figura 1

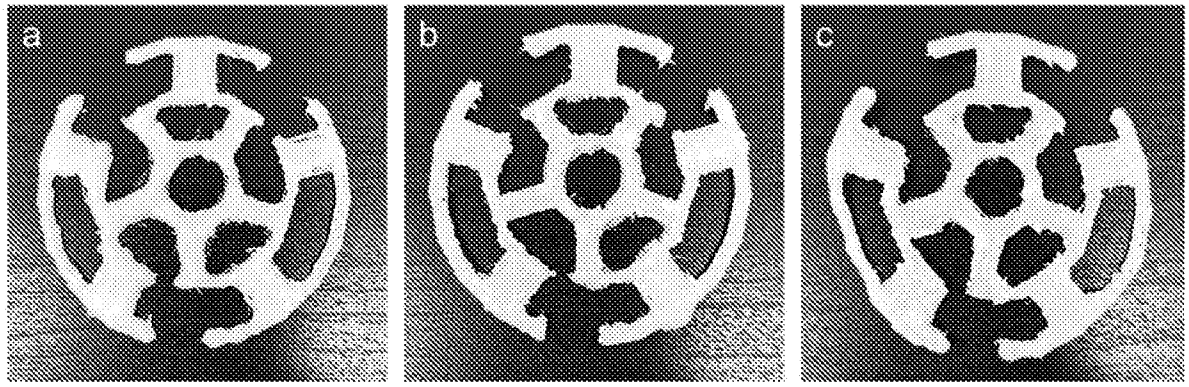


Figura 2

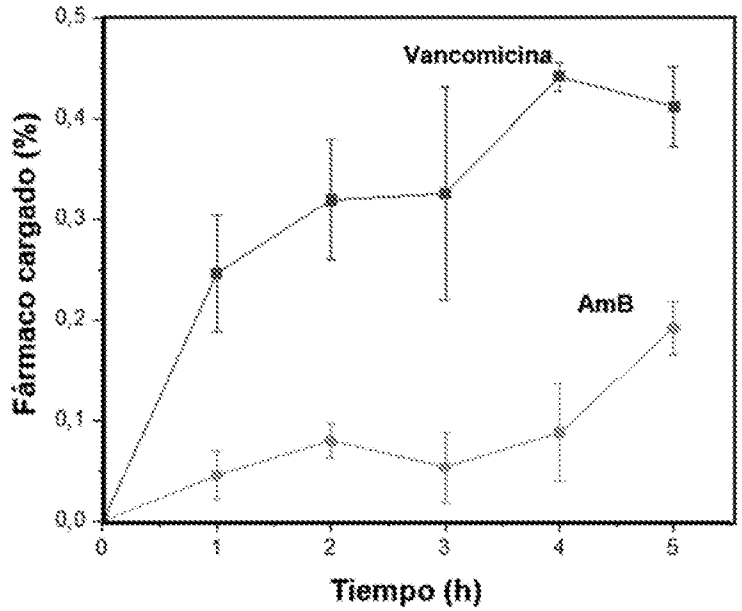


Figura 3

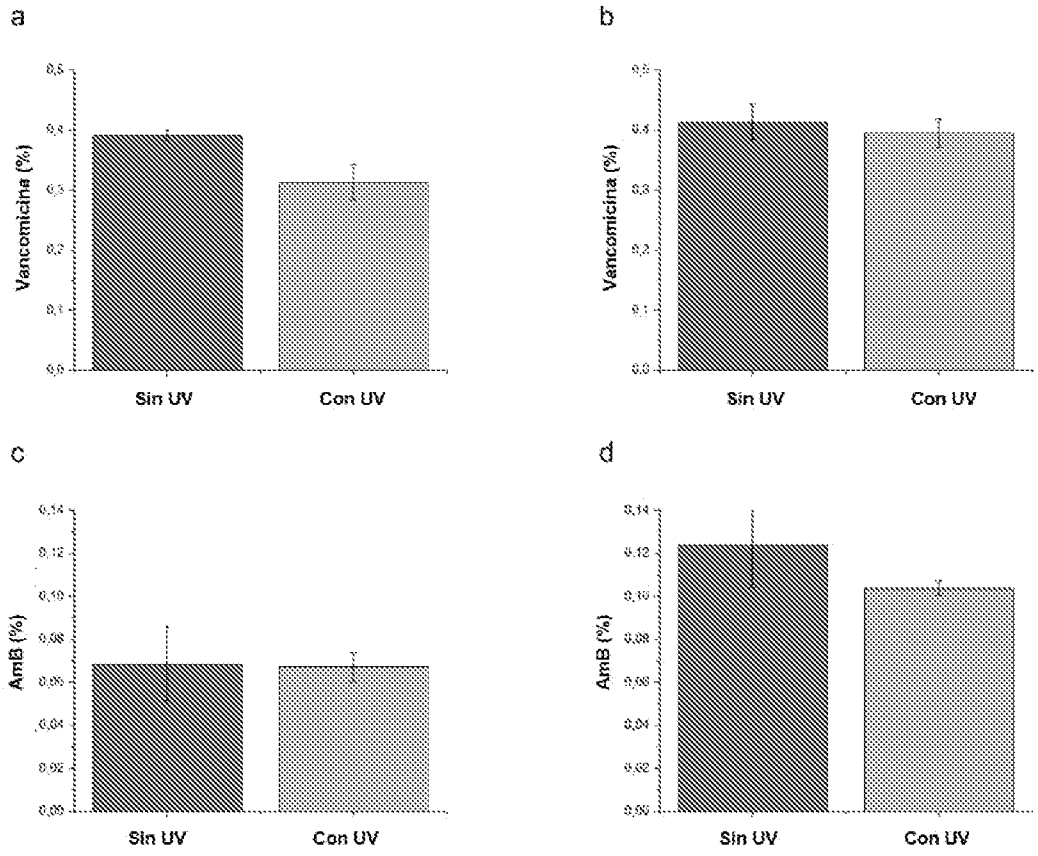


Figura 4

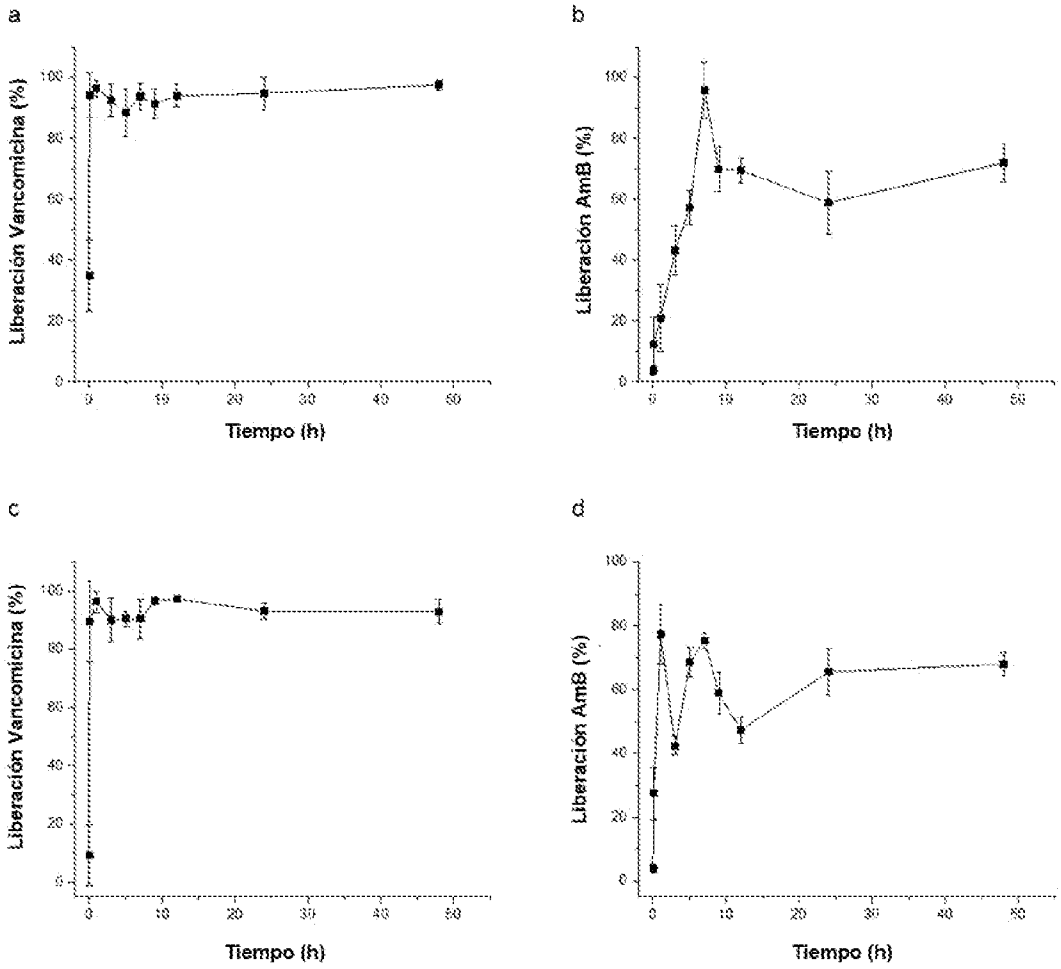

a
Liberación Vancomicina (%)
Tiempo (h)
b
Liberación AmB (%)
Tiempo (h)
c
Liberación Vancomicina (%)
Tiempo (h)
d
Liberación AmB (%)
Tiempo (h)

Figura 5

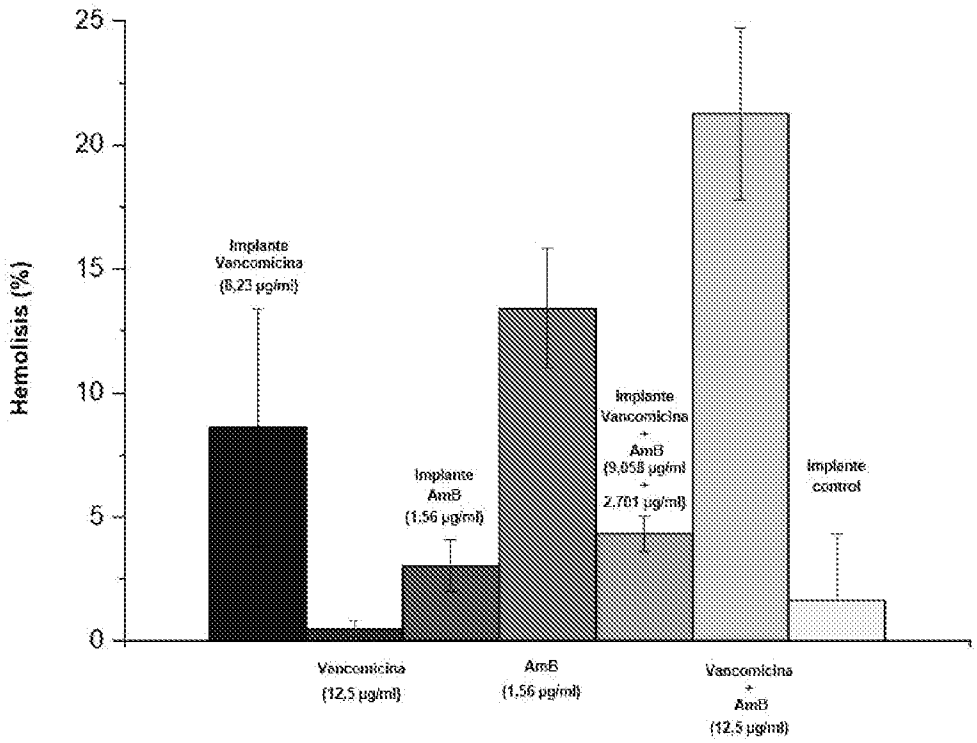

Hemolisis (%)
25
20
15
10
5
0
Implante Vancomicina (8,23 µg/ml)
Implante AmB (1,56 µg/ml)
Implante Vancomicina + AmB (9,858 µg/ml + 2,781 µg/ml)
Implante control
Vancomicina (12,5 µg/ml)
AmB (1,56 µg/ml)
Vancomicina + AmB (12,5 µg/ml)

Figura 6

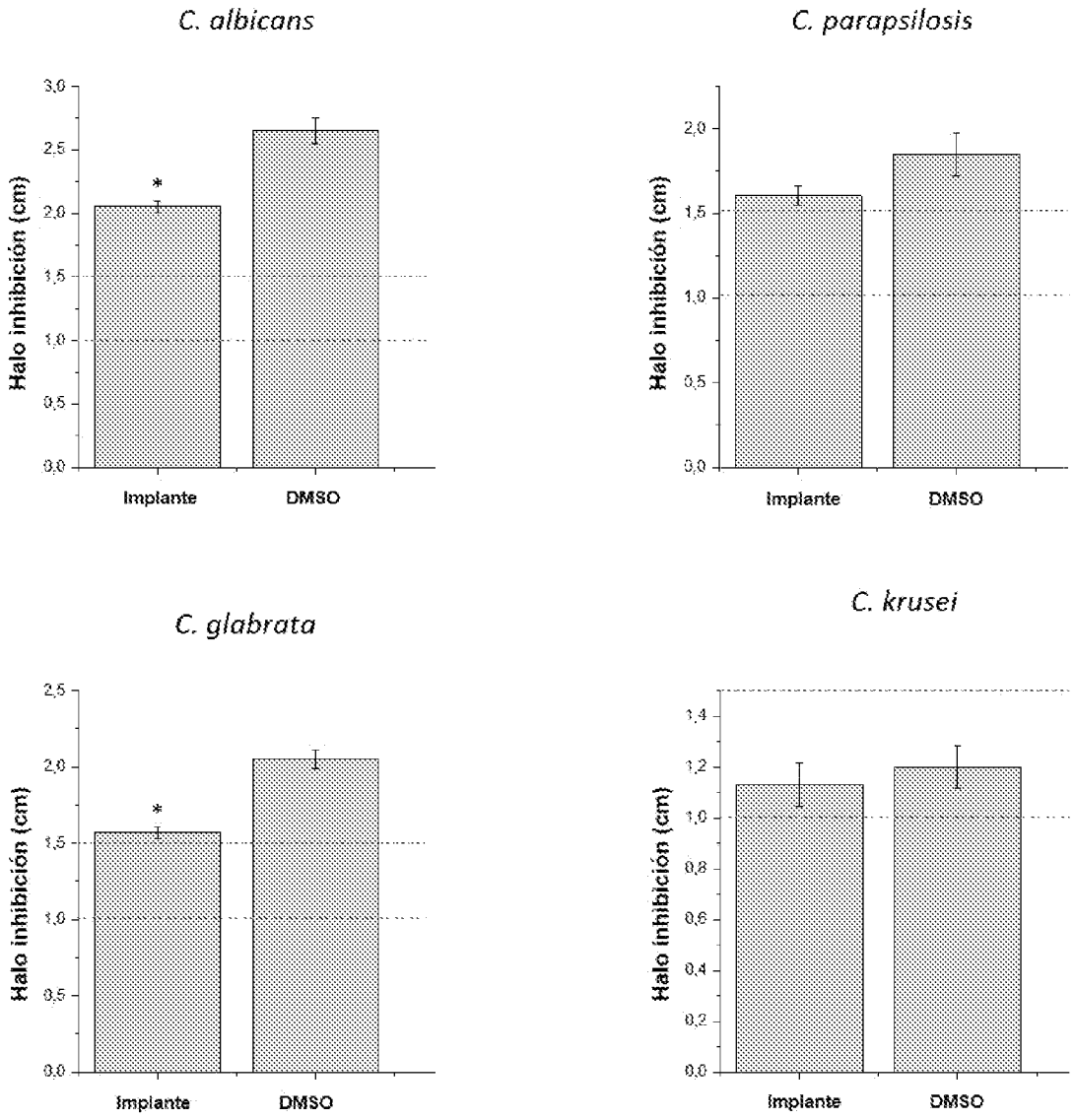

C. albicans
Halo inhibición (cm)
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
*
Implante
DMSO
C. parapsilosis
Halo inhibición (cm)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Implante
DMSO
C. glabrata
Halo inhibición (cm)
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
*
Implante
DMSO
C. krusei
Halo inhibición (cm)
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Implante
DMSO

Figura 7

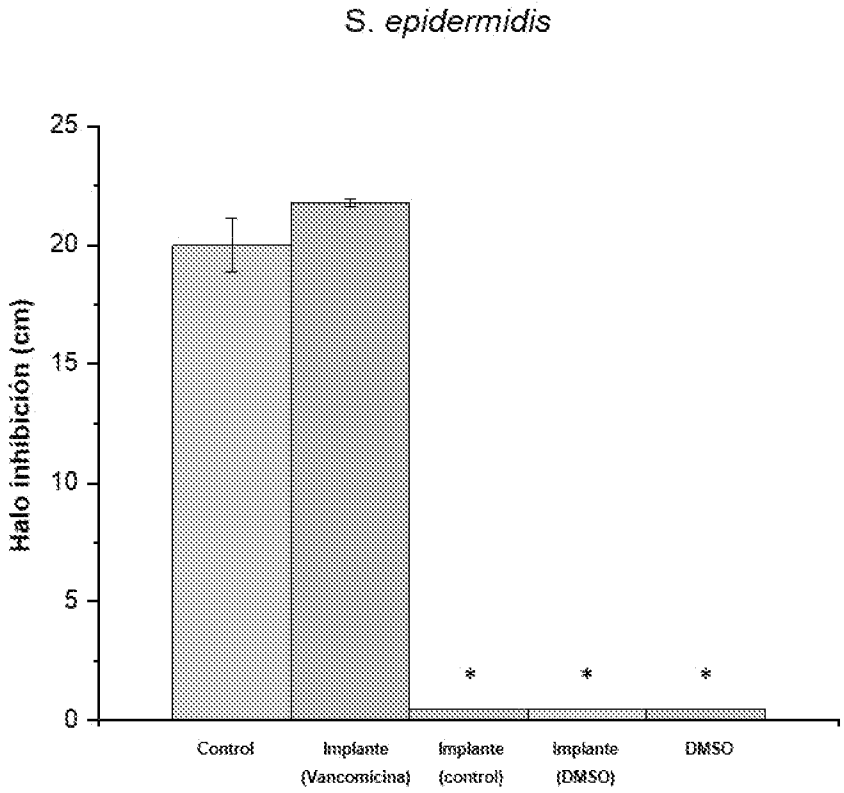

S. epidermidis
Halo inhibición (cm)
25
20
15
10
5
0
*
*
*
Control
Implante (Vancomicina)
Implante (control)
Implante (DMSO)
DMSO

Figura 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2023/070126

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61B17/56 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INSPEX, COMPDX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CORDUAS F *et al.* Bio-design And Manufacturing 2021 Springer Germany., 30/11/2020, Vol. 4, Nº 2, pages 278 - 310 [on line][retrieved the 1/07/2022]. ISSN 2096-5524 (print), <DOI: 10.1007/s42242-020-00108-1> Pages 280, 290-292	1-12 y 21-22
A	GARCIA-GARCIA C *et al.* Journal Of The Mechanical Behavior Of Biomedical Materials Netherlands 01 2022., 31/12/2021, Vol. 125, pages 104909 [on line][retrieved on 01/01/2022]. ISSN 1878-0180 (Electronic), <DOI: 10.1016/j.jmbbm.2021.104909 pubmed:34736025> figure 1	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
05/06/2023	**(16/06/2023)**
Name and mailing address of the ISA/ OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Facsimile No.: 91 349 53 04	Authorized officer C. González Valdespino Telephone No. 91 3498541

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2023/070126

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DOMSTA VANESSA *et al*. Molecules (basel, Switzerland) Switzerland 02 Jul 202., 02/07/2021, Vol. 26, Nº 13 [on line][retrieved on 01/07/2022]. ISSN 1420-3049 (Electronic), <DOI: 10.3390/molecules26134066 pubmed:34279405> Abstract, figure 1.	13-20
A	SUHARDI V J *et al*. Nature Biomedical Engineering, 20170601 Nature Pub. Group, 01/06/2017, Vol. 1, Nº 6, pages 1 [on line][retrieved on 01/07/2022]. ISSN 2157-8451, <DOI: 10.1038/s41551-017-0080> Page 6	1-12
A	TIWARI ARJUN PRASAD *et al*. Bimodal fibrous structures for tissue engineering: Fabrication, characterization and *in vitro* biocompatibility. Page 2	13-20
A	WO 2019157142 A1 (UNIV CORNELL) 15/08/2019, Figures 1a-1c; Paragraph [0092]	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ES2023/070126

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2019157142 A1	15.08.2019	US2020390823 A1	17.12.2020

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2023/070126

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
A61B17/56 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
A61B

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)
EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INSPEX, COMPDX

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	CORDUAS F *et al*. Bio-design And Manufacturing 2021 Springer Germany., 30/11/2020, Vol. 4, Nº 2, páginas 278 - 310 [en línea][recuperado el 1/07/2022]. ISSN 2096-5524 (print), <DOI: 10.1007/s42242-020-00108-1> Páginas 280, 290-292	1-12 y 21-22
A	GARCIA-GARCIA C *et al*. Journal Of The Mechanical Behavior Of Biomedical Materials Netherlands 01 2022., 31/12/2021, Vol. 125, páginas 104909 [en línea][recuperado el 01/01/2022]. ISSN 1878-0180 (Electronic), <DOI: 10.1016/j.jmbbm.2021.104909 pubmed:34736025> Figura 1	1-12

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
05/06/2023	**16 de junio de 2023 (16/06/2023)**
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Nº de fax: 91 349 53 04	Funcionario autorizado C. González Valdespino Nº de teléfono 91 3498541

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2023/070126

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2).a) por los siguientes motivos:

1. ☒ Las reivindicaciones nos: 21-22
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
Las reivindicaciones 21 y 22 se refieren a una materia que esta Administración considera que están afectadas por las disposiciones de la Regla 67. 1 (iv) PCT, relativas a un método de tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal. A pesar de ello, se ha efectuado una búsqueda para estas reivindicaciones basada en los efectos atribuidos al compuestos.

2. ☐ Las reivindicaciones nos:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

3. ☐ Las reivindicaciones nos:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.

3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones nos:

4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones nos:

Indicación en cuanto a la protesta

☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2023/070126

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	DOMSTA VANESSA *et al*. Molecules (basel, Switzerland) Switzerland 02 Jul 2021., 02/07/2021, Vol. 26, Nº 13 [en línea][recuperado el 01/07/2022]. ISSN 1420-3049 (Electronic), <DOI: 10.3390/molecules26134066 pubmed:34279405> Abstract, Figura 1.	13-20
A	SUHARDI V J *et al*. Nature Biomedical Engineering, 20170601 Nature Pub. Group., 01/06/2017, Vol. 1, Nº 6, páginas 1 [en línea][recuperado el 01/07/2022]. ISSN 2157-8451, <DOI: 10.1038/s41551-017-0080> Página 6	1-12
A	TIWARI ARJUN PRASAD *et al*. Bimodal fibrous structures for tissue engineering: Fabrication, characterization and *in vitro* biocompatibility. Página 2	13-20
A	WO 2019157142 A1 (UNIV CORNELL) 15/08/2019, Figuras 1a-1c; Párrafo [0092]	1-12

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2023/070126

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2019157142 A1	15.08.2019	US2020390823 A1	17.12.2020