

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 207**

51 Int. Cl.:

A61L 26/00 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2008** **E 08853269 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013** **EP 2222347**

54 Título: **Biomateriales bioactivos y reabsorbibles a base de soja**

30 Prioridad:

26.11.2007 GB 0723102

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

09.12.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF BRIGHTON (100.0%)
MITHRAS HOUSE LEWES ROAD
BRIGHTON, SUSSEX BN2 4AT, GB**

72 Inventor/es:

**AMBROSIO, LUIGI;
NICOLAIS, LUIGI;
SALVAGE, JONATHAN PETER;
SANTIN, MATTEO y
STANDEN, GUY**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 433 207 T3

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

DESCRIPCIÓN

Biomateriales bioactivos y reabsorbibles a base de soja

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para producir biomateriales a base de soja. Los biomateriales resultantes tienen una gama de usos biomédicos y son particularmente deseables por su contenido en isoflavona.

10 Como entienden los expertos en la técnica, un biomaterial es un material no viable que se usa como dispositivo médico (tal como un implante) destinado a interactuar con sistemas biológicos. El futuro de la medicina regenerativa depende estrechamente de la disponibilidad de nuevos biomateriales capaces de (i) intervenir en los procesos de regeneración tisular y potenciar la formación de tejido nuevo que muestra morfología fisiológica y (ii) degradarse en el tiempo para dejar espacio al tejido recién formado. Ninguno de los biomateriales disponibles puede cumplir estos objetivos a menos que se carguen factores de crecimiento muy caros e inestables en el volumen del material y se optimice su liberación controlada o a menos que las células madre y las diferenciadas se encapsulen (1,2).

15 Hasta ahora la regeneración de los tejidos blandos (p. ej., vasos sanguíneos y piel), así como de tejidos duros (es decir, hueso y cartílago) se ha perseguido mediante el uso de polímeros y cerámicas sintéticos o naturales capaces de proporcionar un armazón para el crecimiento interno de tejido nuevo en el lugar de la lesión (2, 3 y 4). No obstante, los biomateriales disponibles en la actualidad no pueden actuar de forma selectiva sobre las fases principales del proceso de regeneración tisular, que son: (i) la cascada de coagulación, (ii) la respuesta inflamatoria, (iii) la diferenciación celular en el tejido y (iv) la síntesis de nueva matriz extracelular.

20 Además, la presencia del implante, reconocido como un cuerpo extraño por el tejido huésped, normalmente desencadena una respuesta inflamatoria (5). Como consecuencia de esta respuesta de cuerpo extraño. (i) los implantes permanentes no siempre se integran completamente con el tejido en crecimiento pero están encapsulados dentro de una cápsula fibrosa; y (ii) la velocidad de biodegradación/bioresorción de los implantes temporales puede verse afectada y no estar sincronizada con la velocidad de crecimiento del tejido nuevo. Este último es el caso con los biomateriales biodegradables aceptados por la Food and Drug Administration, tal como las diversas formulaciones de ácidos poli(láctico/glicólico) (PGLA) (6). En el caso de aplicaciones óseas, por ejemplo la degradación relativamente lenta de los PGLA retrasa la regeneración tisular (7). Incluso cuando el tiempo de degradación se reduce, como es el caso de algunas formulaciones de PGLA, la morfología del hueso formado alrededor del implante muestra características no fisiológicas (es decir, hueso cortical en lugar de hueso trabecular), lo que sugiere un mecanismo alterado de regeneración tisular (7). La cicatrización no fisiológica observada tras la implantación de estos materiales también se ha atribuido a la respuesta inflamatoria provocada por las propiedades fisicoquímicas del material y, en el caso de los PGLA, a los productos de degradación (8).

25 También se han desarrollado cerámicas, tal como cementos de hidroxiapatita (HA) y de fosfato cálcico (CaP), y biocristales, principalmente para aplicaciones de regeneración ósea. Aunque no son biodegradables, se ha demostrado que estos materiales poseen un elevado potencial de osteointegración (9, 10). En el caso de los cementos de HA y CaP, el potencial de osteointegración parece estar generado por las propiedades de sustrato celular del material que permiten la colonización de la superficie por las células óseas, los osteoblastos (11).

30 En el caso de los biocristales, un grado de bioactividad se ha atribuido a la liberación de elementos (p. ej., silicio) desde el material en degradación o mediante el atrapamiento y la concentración de los factores de crecimiento en el medio en gel formado en la interfaz durante la degradación del biocristal (12).

35 No obstante, los rendimientos de los materiales cerámicos solo se limitan a determinadas aplicaciones por su naturaleza frágil y no maleable. Las cerámicas monolíticas son difíciles de manipular durante el procedimiento de implantación, mientras que los recubrimientos cerámicos se deslaminan con cargas mecánicas (9, 13).

40 Los polímeros naturales de composición proteica o polisacárida, tal como colágeno, agarosa, alginato, quitosano, cola de fibrina, fibroína de seda, ácido hialurónico y carboximetilcelulosa también se usan como biomateriales biodegradables y se ha demostrado que algunos de ellos tienen propiedades hemostáticas y que sirven de soporte para la adhesión celular (14, 15 y 16). La cola de fibrina, el ácido hialurónico y el colágeno son componentes naturales de un tejido en regeneración y sus rendimientos en biomedicina se han demostrado (14). No obstante, se han planteado dudas sobre su uso como biomateriales por su potencial antigénico, por los riesgos de enfermedades transmisibles y por los relativamente altos costes de fabricación. En el caso específico de rellenos de cavidades óseas, los riesgos de enfermedades transmisibles también están ligados al uso de aloinjertos óseos, mientras que los autoinjertos conducen a una segunda operación en el paciente en diferentes puntos para recoger hueso y con limitaciones en las cantidades disponibles.

45 También se ha sugerido el uso de biomateriales a base de soja (17, 18). La investigación se ha orientado hacia la fabricación de hidrogeles de proteína de soja, películas, membranas y fibras a partir de fracciones de proteína de soja (18). Aunque son muy maleables, este tipo de biomaterial sufre las mismas limitaciones que otros polímeros biodegradables naturales, principalmente, un potencial antigénico y una velocidad de degradación incontrolable (no

ajustable) (19). Además, no incluyen la fracción de isoflavona que tiene una bioactividad demostrada sobre células inmunocompetentes y sobre células tisulares tales como osteoblastos y osteoclastos (20, 21). Se ha presentado una patente que cubre el uso de genisteína, una de las isoflavonas de soja, como agente farmacéutico para reducir la pérdida de hueso en la osteoporosis inhibiendo la actividad ácida de los osteoclastos (21).

5 Por estos motivos, más recientemente se ha desarrollado una clase nueva de biomateriales a base de soja usando cuajada de soja desgrasada que incluye todos los componentes de la soja: proteínas, hidratos de carbono, minerales e isoflavonas (22). Esta clase de biomaterial se puede formular como películas, membranas y gránulos, bien como material monolítico o en combinación con otros biomateriales convencionales. Además, esta clase nueva
10 de biomateriales de soja y sus productos de degradación han mostrado muchas propiedades adecuadas para aplicaciones biomédicas entre las cuales se encuentran: (i) control de la respuesta inflamatoria, (ii) tener una velocidad de degradación controlada (ajustable), (iii) favorecer la actividad celular e (iv) inducir el depósito de una fase mineral de fosfato cálcico (22).

15 Aunque los biomateriales a base de proteína de soja se han sometido a ingeniería en forma de hidrogeles, películas y fibras, carecen de la bioactividad reconocida de las isoflavonas de soja sobre las células tisulares. Por el contrario, por tanto los biomateriales a base de soja obtenidos de biomateriales derivados de soja desgrasada no se han formulado hasta ahora en forma de hidrogeles blandos adecuados para, por ejemplo, implantación mediante inyección. Además, su procedimiento de fabricación depende de la preparación previa de una cuajada y del
20 contenido en isoflavona de soja natural sin la posibilidad de modificar sus niveles.

Se han publicado procedimientos que muestran la extracción de concentrados de proteína de soja ricos en isoflavonas (23). Estos procedimientos se han optimizado únicamente para fines de la industria alimentaria y no se han centrado en la preparación de hidrogeles bioactivos para aplicaciones biomédicas. Además, no se ha realizado
25 ningún estudio sobre la coextracción de las fracciones proteica y de hidratos de carbono junto con un contenido en isoflavona ajustado de la harina y la cuajada de soja a partir de los cuales se producen los biomateriales.

El documento WO02/10261 del mismo solicitante divulga un biomaterial termoplástico compacto o poroso producido a partir de tofu de soja desgrasada que se ha funcionalizado con uno o más péptidos bioactivos. El biomaterial
30 también se ha sometido a termofijación.

El documento US2007/077305 divulga agentes bioactivos como péptidos o proteínas para liberar en el tracto gastrointestinal que comprenden proteínas de soja que podrían servir como sustrato competitivo y reducir el ataque de las proteasas sobre los péptidos o proteínas bioactivos.
35

El documento US2007/054031 divulga un procedimiento de producir un producto a base de soja que comprende desgrasar la harina de soja, realizar una extracción del disolvente para producir un biomaterial que comprende niveles variables de proteínas de soja, hidratos de carbono e isoflavonas.
40

El documento US2005/123662 divulga un procedimiento para producir un material que contiene saponina de soja que comprende preparar un contenido de malonil isoflavona glicósido del 25% en peso o más en base a la cantidad total de isoflavonas en dicho extracto y una proporción de extracción de saponinas de soja a partir de dichas sojas de partida del 60% en peso o más.
45

El documento WO95/10512 hace referencia a copos de soja de los que se ha eliminado el aceite mediante extracción del disolvente. Los copos se extraen con un extractor acuoso que tiene un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 10,0.
50

De acuerdo con la presente invención se proporciona un procedimiento de producir un biomaterial a base de soja que es adecuado para usar en un producto biomédico como se menciona en las reivindicaciones.
55

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención se refiere al biomaterial a base de soja producido por el procedimiento mencionado anteriormente. Por ejemplo, el biomaterial puede estar en forma de películas, membranas, gránulos, hidrogeles y pastas.
60

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del biomaterial a base de soja producido por el procedimiento mencionado anteriormente en un producto biomédico y a dichos productos. Como entienden los expertos en la técnica, los productos biomédicos son productos o dispositivos médicos destinados a usar en tratamientos de reparación de tejidos, cirugía y regeneración tisular. No incluyen productos alimentarios.
65

En contraste con las técnicas conocidas anteriormente que se han tratado en lo que antecede, el procedimiento de la presente invención permite preparar biomateriales a base de soja directamente a partir de harina de soja desgrasada. Este procedimiento es eficiente y, lo más importante, tiene como resultado la producción de biomateriales que tienen una composición predeterminada o controlable (ajustado o ajustable), por ejemplo la cantidad de isoflavonas y/u otros componentes contenidos en los biomateriales se puede predeterminar o controlar de modo que sean los más adecuados para el área de uso a la que están destinados los productos concretos.

El procedimiento de la presente invención implica extraer el biomaterial a base de soja de la harina de soja. Permite conservar (o variarlos, según se desee) los niveles de las proteínas de soja, hidratos de carbono e isoflavonas presentes en la harina de soja. Esto contrasta con los abordajes anteriores que se centran en retener las proteínas de soja, pero pierden los hidratos de carbono y las isoflavonas. Proporcionando un procedimiento que permite variar

5 o modular los niveles y las proporciones de estos tres componentes, la presente invención permite controlar las características físicas y químicas, además de la bioactividad del biomaterial y, en consecuencia, las propiedades de los productos biomédicos resultantes.

10 Los biomateriales resultantes se pueden usar como materiales monolíticos o en combinación entre ellos o con materiales poliméricos, cerámicos y metálicos tradicionales en forma de mezclas, redes poliméricas interrelacionadas y recubrimientos, Los biomateriales son bioactivos, ya que:

- (i) participan en la formación del coágulo de sangre en base a la capacidad conocida de la proteína de soja para actuar como sustrato para las enzimas transglutaminasas (24, 25),
- 15 (ii) inducir la síntesis de colágeno en fibroblastos y osteoblastos,
- (iii) inducir la calcificación de osteoblastos, y
- (iv) inhibir la actividad de los osteoclastos.

20 Su gama de aplicaciones incluye, por ejemplo, como rellenos de defectos tisulares; vendajes de heridas, armazones y guías para regeneración ósea, de la piel y nerviosa, barreras temporales para usar en procedimientos dentales o quirúrgicos, o para prevenir las adherencias tisulares posquirúrgicas, agentes antiinflamatorios, vehículos para la liberación de fármacos, péptidos bioactivos o plásmidos; revestimientos bioactivos para implantes ortopédicos, neurológicos, ginecológicos, urológicos, craneofaciales, dentales y cardiovasculares poliméricos y metálicos, y como bioadhesivo. El biomaterial también se puede preparar en diferentes formulaciones o disolver en soluciones acuosas

25 para convertirse en calmantes adecuados para el tratamiento de la irritación de encías y piel. Todas estas formulaciones se pueden usar en aplicaciones clínicas y veterinarias.

30 La etapa de extracción del disolvente en el procedimiento de la presente invención se puede realizar usando, por ejemplo, un sistema de disolventes que comprende metanol, etanol, acetonitrilo, acetona y agua, o una mezcla de los mismos. Normalmente se realiza durante un periodo de entre 2 horas y 4 horas y a una temperatura de entre 30 °C y 50 °C. El procedimiento puede incluir, aunque no es necesario, una o más de las siguientes etapas adicionales:

- i) introducir un agente de reticulación;
- ii) diálisis, con el fin de controlar el nivel de hidratos de carbono en el biomaterial;
- 35 iii) termofijación;
- iv) mezclar, interrelacionar, injertar o, de otro modo, combinar el biomaterial a base de soja con uno o más biomateriales biocompatibles naturales o sintéticos para formar un material biodegradable o bioestable compuesto.

40 Se entenderá que la etapa iv) es una opción importante cuando el biomaterial está en forma de un hidrogel. En una realización, el hidrogel está en forma inyectable.

45 A continuación, la presente invención se ilustrará mediante los ejemplos siguientes (en los que el ejemplo 1 describe el proceso de desgrasado usado en los ejemplos posteriores) y con referencia a las figuras adjuntas, del siguiente modo:

Figura 1. FT-IR de los biomateriales a base de soja: (a) harina de soja, (b) harina de soja desgrasada, (c) biomaterial de soja desgrasada y termofijada.

50 **Figura 2.** FT-IR del extracto liofilizado de gel de soja.

Figura 3. Niveles de isoflavona determinados mediante HPLC de un gel típico a base de soja: (a) isoflavonas glicosiladas, (b) isoflavonas no glicosiladas.

55 **Figura 4.** Hidrogeles típicos a base de soja: (a) gel no reticulado, (b) gel reticulado con genipina que forma un bioadhesivo.

60 **Figura 5.** Propiedades reológicas de los hidrogeles a base de soja a una concentración del agente de reticulación de 0,1M: (a) Módulo de conservación G' (b) Módulo de viscosidad G''.

Figura 6. Mediciones de la viscosidad para los hidrogeles a base de soja a una concentración del agente de reticulación de 0,1M:

Figura 7. Rendimientos de hidrogeles a base de soja obtenidos de diferentes condiciones de extracción.

65 **Figura 8.** Niveles de isoflavona determinados mediante HPLC de los hidrogeles a base de soja obtenidos de

diferentes condiciones de extracción: (a) daidzina, (b) daidzeína, (c) genistina, (d) genisteína.

Figura 9. SEM de mezclas de hidrogeles a base de soja con otros biomateriales convencionales: (a) inspección visual de gel de soja/gránulos de soja/goma xantana, (b) análisis SEM de gel de soja/gránulos de soja/goma xantana, (c) gel de soja/ hidroxiapatita en nanocrystal, (d) perlas de gel de soja/hidroxiapatita.

Figura 10. Liberación típica de isoflavona determinada mediante HPLC de biomateriales a base de soja. Las leyendas muestran la proporción de goma xantana/gránulos de soja/hidrogel de soja en las diferentes mezclas analizadas.

Figura 11. Una formulación típica de gel de soja (inyectable) para usar como vendaje de heridas o relleno de cavidad ósea.

Figura 12. Inducción de la diferenciación celular en biomateriales típicos a base de soja: (a) tinción de colágeno de fibroblastos control tras 1 día de cultivo, (b) tinción de colágeno de fibroblastos tratados con biomateriales a base de soja tras 1 día de cultivo, (c) tinción con calcio de osteoblastos control tras 2 días de cultivo, (d) tinción con calcio de osteoblastos tratados con biomateriales a base de soja tras 2 días de cultivo.

Figura 13. Integración de biomateriales a base de soja en el coágulo sanguíneo: (a) inspección visual de 2 formulaciones diferentes, (b) microscopía óptica.

Figura 14. Efecto inhibitorio de los biomateriales a base de soja sobre la fosfatasa ácida resistente a tartrato de los osteoclastos. (a) osteoclasto control, (b) osteoclasto tratado con biomaterial a base de soja. Las flechas indican los osteoclastos.

Figura 15. Retrodispersión SEM de revestimiento de biomaterial a base de soja típico alrededor de un dispositivo biomédico (stent cardiovascular): (a) stent cardiovascular revestido, (b) morfología de la superficie del stent cardiovascular revestido con gel de soja, (c) morfología de la superficie del stent cardiovascular sin revestir.

Ejemplo 1. Procedimientos de preparación de biomaterial a partir de harina de soja desgrasada

Procedimientos

La harina de soja se liofilizó para eliminar el contenido en agua. La harina de soja se desgrasó siguiendo un procedimiento usado habitualmente en la industria alimentaria (26, 27). En resumen, la harina liofilizada se suspendió en hexano (proporción 1:5) a 30 °C durante 4 horas en un incubador con agitación en un ángulo de 45 grados y a 200 rpm para garantizar un mezclado eficaz del disolvente/harina. La suspensión se retiró del incubador y se dejó enfriar y reposar durante 10-15 minutos. Cuando la harina hubo reposado, se descartó la fracción de hexano, se añadió hexano fresco y la harina se resuspendió y dejó reposar durante 10 – 15 minutos. El lavado del hexano se repitió tres veces para eliminar todo resto de lípidos y la harina desgrasada se dejó secar durante 48 horas a temperatura ambiente. La extracción de lípidos se evaluó gravitométricamente, mientras que el contenido en isoflavona se evaluó mediante HPLC. La HPLC se realizó usando una columna Phenomenex Luna C₁₈ (2) – 150 mm x 4,6 mm (tamaño de partícula de 3 µm) equipada con un cartucho de protección SecurityGuard Phenomenex (3 µm) El calentador se fijó a 25 °C. La cromatografía se realizó en una fase móvil que consiste en un gradiente binario (Disolvente A: agua desionizada 0,1% de ácido acético, Disolvente B: Acetonitrilo y 0,1 % de ácido acético) que se bombeó mediante Perkin Elmer Series 200 Ic gradiente binario: Una bomba programada para liberar las mezclas de Disolvente A/Disolvente B en las condiciones siguientes 10/90 (0 min) - 15/85 (0,1 min) - 20/80 (4 min) - 40/60 (9 min) - 60/40 (0,1 min) retención a 60/40 (4 min). Tiempo de ciclo total - 17,2 minutos. Las isoflavonas eluidas se detectaron mediante un detector Shimadzu SPD-6A UV a 262 nm, 2,56 AUFS, respuesta rápida. Los cromatogramas se obtuvieron mediante un registrador de gráficos/integrador Shimadzu C-R5A Chromatopac programado con: Pendiente de 150 µV/min, µV 10 /min de desplazamiento, 50 µV min. Área del pico, 0 atenuación, a una velocidad de 4 mm/min, e incluye un área e impresión basal/de integración (sin RT en el gráfico). Las muestras se inyectaron mediante automuestreo usando un Waters 717+ con un automuestreador de carrusel de 96 viales con cubierta con insertos de 250 µl. El carrusel se programó con un volumen de inyección de 10 µl, una temperatura de inyección de 25 °C, un ciclo de 21 minutos e informe de 3,5 minutos. Para garantizar la estabilidad basal el tiempo de ciclo total fue de 24,5 minutos.

El biomaterial a base de soja se obtuvo sin la preparación previa de la cuajada mediante termofijación de la harina desgrasada a 60 °C durante la noche. Mediante este procedimiento, se pueden obtener biomateriales en forma de gránulos, películas, membranas y bloques de diferentes formas, tamaños y porosidad.

Resultados

El procedimiento convencional de extracción usado garantizó una eliminación de los lípidos de la soja de 0,175 g por gramo de soja correspondientes a un 18% del componente lipídico de soja como se indica en la literatura. El contenido de las principales isoflavonas de soja tras la extracción solo mostró una mínima eliminación de genistina

(0,7 mg/g de harina de soja) y sin co-extracción detectable de las otras isoflavonas (p. ej., genisteína o daidzeína). La eliminación eficaz de los lípidos se confirmó mediante FTIR, que mostró la falta de los picos de los lípidos a 2922, 2852 y 1734 cm^{-1} (Figura 1 a y b). La eficacia de la reticulación térmica adoptada para transformar la harina de soja desgrasada en plástico también se demuestra mediante el desplazamiento de los picos de proteína de soja, así como mediante el cambio de su proporción relativa (Figura 1c). En particular, el pico de la amina I cambió de 1626 a 1633 cm^{-1} , mientras que el pico de la amina II (de 1515 a 1516 cm^{-1}) y los picos de la amina III (de 1385 a 1389 cm^{-1} y de 1231 a 1233 cm^{-1}) no mostraron ningún desplazamiento significativo (Figuras 1 b y c). No obstante, el pico de la amina II mostró una intensidad más alta y un cambio en su proporción con el pico de la amina I. El pico a 1038 cm^{-1} atribuido a la fracción del hidrato de carbono de la soja también se desplazó tras la termofijación y la proporción con su hombro cambió a medida que la intensidad del hombro aumentaba (Figuras 1b y c, flechas).

Ejemplo 2. Procedimientos de preparación de biomateriales de hidrogel a base de soja a partir de harina de soja desgrasada

15 *Procedimientos*

La harina de soja se desgrasó como se ha descrito en el ejemplo 1. Para preparar hidrogeles a base de soja, la harina desgrasada se suspendió en sistemas de disolvente adecuados (proporción harina/disolvente 1:10). Los sistemas de disolvente usados incluyeron, entre otros: metanol, etanol, acetonitrilo, acetona, agua desionizada, HCl 0,05N o una mezcla de los anteriores a diferentes proporciones (p. ej., etanol/agua 80:20). La muestra se colocó en un ángulo de 45 grados en un incubador con agitación (200 rpm) durante tiempos diferentes (p. ej., de 2 a 4 horas) a diferentes temperaturas (p. ej., de 30 °C a 50 °C). Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se dejaron reposar durante 30 minutos. Se recogió el sobrenadante y se centrifugó durante 10 minutos a 2.500 rpm, temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido se filtró a través de una jeringuilla de vidrio limpia rellena con lana de vidrio. El disolvente se evaporó en flujo de nitrógeno, seguido de liofilización. Se obtuvieron geles de diferente densidad resuspendiendo el polvo liofilizado en soluciones de agua desionizada o de agente de reticulación (p. ej., solución acuosa de CaCl_2 o MgCl_2 0,1M, soluciones acuosas a base de dialdehído). Como alternativa, el gel obtenido, con o sin agente de reticulación, sufrió una etapa de estabilización adicional mediante termofijación a 60 °C durante la noche.

En un procedimiento alternativo, los hidrogeles a base de soja se obtuvieron mediante extracción simultánea (contemporánea) durante el proceso de desgrasado de la harina de soja. La harina se agitó durante 2 horas a 50 °C en un sistema de co-disolvente, tal como, entre otros, etanol:agua:hexano (proporción 80:20:10). La suspensión se dejó reposar y enfriar durante 5 minutos. La capa superior de hexano se descartó y el sobrenadante y los sólidos restantes se separaron mediante decantación. El sólido se lavó unas veces con un sistema de disolvente fresco como se ha descrito anteriormente y se combinaron los sobrenadantes de las diferentes extracciones. Los sobrenadantes filtrados y combinados se evaporaron en flujo de nitrógeno, seguido de liofilización. El sobrenadante de hexano se caracterizó por sus contenidos en lípidos e isoflavona como se describe en el Ejemplo 1.

Los hidrogeles a base de soja se obtuvieron como se ha descrito anteriormente en presencia y ausencia de soluciones con agente de reticulación y con o sin termofijación. El polvo y los hidrogeles relativos obtenidos con o sin reticulación se caracterizaron por su composición global mediante FTIR, por su contenido en proteínas mediante el método de Bradford, por su contenido en hidratos de carbono mediante el método de Anthorn y por su contenido en isoflavona mediante HPLC como se describe en el Ejemplo 1.

El contenido en proteínas de las materias primas y el extracto se determinó mediante el método de Bradford convencional. En resumen, las muestras de soja se disolvieron en NaOH 0,1N y se incubaron en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de incubar, se mezclaron 100 μl de muestras con 100 μl del pigmento reactivo de proteínas Bio-Rad (Biorad, nº de catálogo 500-0006) en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia de las muestras a 595 nm se midió y los valores transformados en concentración de proteínas mediante una curva estándar ($R^2 = 0,995$) obtenida de soluciones de seroalbúmina bovina (Sigma Aldrich, nº de catálogo A7030) en el intervalo de 0 a 0,1 mg/ml. Los experimentos se realizaron por triplicado con muestras de diferentes preparaciones de lotes.

El ensayo de método de Anthorn se realizó para evaluar la cantidad total del sacárido en la materia prima de partida y el extracto de soja final obtenido mediante el sistema de disolventes etanol/agua 80/20. En resumen, las muestras se incubaron con una solución de Anthron recién preparada (0,4 g, Acros Organics, UK) en 75% de ácido sulfúrico (200 ml, Fisher Scientific, UK) a 130 °C durante 10 min. La solución se refrigeró en hielo y la cantidad total de hidratos de carbono en las muestras se midió mediante espectrofotometría a 578 nm. Se obtuvo una curva estándar con un valor de R^2 de 0,998 mediante la lectura de la absorbancia de los patrones de glucosa en el intervalo de 0 a 0,1 mg/ml. Los experimentos se realizaron por triplicado con muestras de diferentes preparaciones de lotes.

La viscosidad como función de la velocidad de cizalladura y los módulos elástico y viscoso G' and G'' se determinaron a 37 °C usando un reómetro controlado por deformación (Bohilin Mod.Gemini) con una herramienta de placa en cono. Durante los experimentos, los geles se mantuvieron en un ambiente controlado mediante una cámara de humedad. Los hidrogeles a base de soja se analizaron a diferentes concentraciones del agente de reticulación

(0,1 M y CaCl_2 1,0 M) y mediante preparación de los hidrogeles con diferentes contenidos en agua (100 mg de polvo de extracto de soja reconstituido como hidrogel en 50 o 80 μl de la solución de reticulación).

Resultados

5 La extracción del hidrogel realizada de forma simultánea (contemporánea) al proceso de desgrasado mostró niveles de desgrasado comparables a los obtenidos mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 1. La figura 2 muestra el FTIR del polvo a base de soja obtenido tras la extracción, la evaporación del disolvente y la liofilización. Aunque se pudieron observar cambios conformacionales en la fracción proteica, se conservó la composición proteica y de hidratos de carbono de la harina de soja desgrasada (Figuras 1 y 2).

15 La cantidad de las fracciones tanto proteica como de hidratos de carbono en los extractos se cuantificó mostrando que el procedimiento de extracción conducía a concentrados de proteína y de hidratos de carbono (fracción proteica= 56%, fracción de hidratos de carbono = 35% en peso del polvo seco). La extracción obtenida de forma contemporánea al proceso de desgrasado mostró niveles de desgrasado comparables a los obtenidos mediante el procedimiento secuencial.

20 Las Figuras 3a y b muestran niveles típicos de isoflavonas glicosiladas (a) y no glicosiladas (b) en un gel a base de soja. La figura 4 muestra un hidrogel típico a base de soja obtenido con los procedimientos descritos en el ejemplo 2.

25 Las figuras 5a y b y la Figura 6 muestran las propiedades reológicas de los hidrogeles a base de soja a diferentes concentraciones del agente de reticulación (CaCl_2). Cuando la concentración del agente de reticulación fue 0,1M, fue posible observar que para los hidrogeles de soja 0,1 M G'' siempre es superior a G' , lo que indica un comportamiento viscoso de la solución.

30 Las mediciones de viscosidad (Figura 6) sugieren que los cambios de viscosidad son función de la concentración del biomaterial de soja; se obtiene un material más viscoso a medida que el contenido del extracto de soja aumenta. Desde un punto de vista conductual (Figura 6), es posible observar que ambas concentraciones muestran un comportamiento pseudoplástico. No obstante, a velocidades de deformación altas, la viscosidad se convierte en menos dependiente de velocidad de deformación y se detecta un comportamiento newtoniano. Estos datos del análisis reológico indican que los hidrogeles son adecuados para inyección.

Ejemplo 3. Procedimiento para obtener biomateriales de hidrogel a base de soja con contenidos en hidratos de carbono controlados

Procedimientos

35 Los extractos de soja se reconstituyeron en medio acuoso de acuerdo con los dos procedimientos descritos en el ejemplo 2. Tras la reconstitución y antes de la reticulación, las muestras se dializaron a tiempos diferentes contra un exceso de agua desionizada. Un procedimiento típico de diálisis del extracto de soja consistió en, entre otros, incubación de muestras en membranas de diálisis con un corte molecular de 8 kDa en un exceso de agua desionizada. El procedimiento se realizó durante hasta 5 días, a temperatura ambiente, con agitación y un cambio regular del medio de diálisis. La fracción dializada (rica en proteínas) y el medio de diálisis externa (fracción de hidratos de carbono) se recogió, se liofilizó y se resuspendió en 1 ml de agua desionizada para su análisis. Las cantidades de proteínas y de hidratos de carbono se evaluaron como se ha descrito en el ejemplo 2 a tiempos diferentes para controlar la eliminación parcial o completa de la fracción de hidratos de carbono y la conservación de la fracción proteica.

Resultados

50 El ensayo de Anthron de las muestras retenidas en la membrana de diálisis mostró una reducción progresiva de la fracción de hidratos de carbono del 35% (valor inicial) a valores no detectables (diálisis prolongada). El ensayo de Bradford confirmó que no se había producido una pérdida de proteínas significativa durante la muestra de diálisis. El porcentaje proteico en el extracto final permaneció en aproximadamente un 53%. Después de liofilizar, el polvo obtenido del medio de diálisis parecía ser de consistencia pegajosa, lo que soporta la liberación de hidratos de carbono de la muestra. Esta inspección visual se confirmó mediante el ensayo de Anthron, que mostró un incremento gradual de los hidratos de carbono liberados con el tiempo. La inspección visual de la fracción retenida dentro de la membrana de diálisis mostró una mayor densidad de la solución, indicativo de que los biomateriales de soja de consistencia diferente podían obtenerse mediante la eliminación de la fracción de hidratos de carbono.

Ejemplo 4. Procedimiento para obtener biomateriales de hidrogel a base de soja con contenidos en isoflavona controlados

Procedimientos

65 Los hidrogeles de soja con contenidos controlados de isoflavona se obtuvieron mediante extracciones realizadas

siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 2, combinando diferentes sistemas disolventes y temperaturas. Ejemplos de las condiciones de disolvente/temperatura/tiempo se proporcionan, entre otras, en la Tabla I. La eficiencia de los diferentes procedimientos de extracción se analizó gravitométricamente, mientras que el contenido en isoflavona se evaluó mediante HPLC. Dada la solubilidad de las isoflavonas en disolventes tales como

5 dimetilsulfóxido y metanol, los biomateriales con diferentes composiciones de isoflavona también se pueden preparar introduciendo diferentes porcentajes de estos disolventes en el medio de extracción.

Tabla I. Ejemplos de condiciones de extracción típicas para obtener hidrogeles a base de soja.

Sistema de disolvente	Temperaturas (°C).	Tiempo (h)	Agua (%)
Metanol/Agua	30, 50	2,4	50,80
Etanol/Agua	30, 50	2,4	50,80
Acetonitrilo	30, 50	2,4	50,80
Acetona	30,50	2,4	50,80

10 Resultados

La figura 7 muestra la cantidad de extracto de soja obtenido con cada tipo de extracción, lo que muestra que el nivel de extracción se podía ajustar de un modo relativamente preciso. Las Figuras 8 a-d muestran los perfiles de isoflavona de HPLC de los diferentes hidrogeles a base de soja obtenidos de la combinación de diferentes sistemas de disolvente y distintos sistemas de disolvente. Los gráficos muestran que la concentración en isoflavona se podía controlar durante el procedimiento de fabricación del biomaterial, lo que permite disponer de geles con niveles de isoflavona adaptados a los requisitos de las aplicaciones biomédicas finales.

15

20 Ejemplo 5. Mezclas de biomateriales, redes poliméricas interrelacionadas y compuestos y armazones funcionalizados.

Procedimientos

La harina de soja desgrasada y termofijada preparada como se describe en el ejemplo 1, así como los hidrogeles a base de soja preparados como en los ejemplos 2, 3 y 4 se mezclaron con polímeros típicos naturales y sintéticos, así como con materiales cerámicos a diferentes proporciones de peso/peso. Las mezclas poliméricas y las redes poliméricas interrelacionadas incluyen, entre otras, goma xantana, policaprolactonas de diferentes pesos moleculares (poli(etilenglicol), poli(ácido láctico/glicólico) de diferentes proporciones de copolímeros, agarosa, alginatos, quitosano, fibroína de seda, cola de fibrina y similares, así como polímeros lineales y ramificados (p. ej., dendrímeros).

25

Los biomateriales a base de soja preparados como en los ejemplos 1, 2, 3 y 4 se mezclaron con diferentes porcentajes de polvo y perlas de HA, así como con cementos de fosfato cálcico.

35 Los biomateriales a base de soja preparados como en los ejemplos 1, 2, 3 y 4 se mezclaron con varias sustancias espesantes, tales como, por ejemplo, goma xantana.

Los biomateriales a base de soja preparados como en los ejemplos 1, 2, 3 y 4, solos o en combinación con otros biomateriales, se funcionalizaron con péptidos que contienen secuencias reconocidas por diferentes tipos celulares (p. ej., -RGD-, -FHRRIKA-, y otros) y enzimas (p.ej., Factor XIIIa), sintetizados con péptidos tradicionales e injertados con el biomaterial mediante bioquímica convencional (p. ej., bases de Schiff, grupo tiol y otros) o mediante actividad enzimática.

40

Se usó inspección visual y análisis por microscopia electrónica de barrido (SEM) para caracterizar la morfología de las diferentes formulaciones.

45

Resultados

Se pudo obtener una serie de mezclas de diferentes porcentajes de material. Las Figuras 9a y b muestran el análisis visual y por SEM de una mezcla polimérica típica de los biomateriales a base de soja de los ejemplos 2, 3 y 4 con otro polímero (p. ej., goma xantana) y gránulos a base de soja obtenidos mediante los procedimientos usados en el ejemplo 1 y descritos en el documento WO 02/10261 (22). Las figuras 9c y d muestran un ejemplo típico de los biomateriales a base de soja de los ejemplos 2 a 4 mezclados con materiales cerámicos tales como hidroxiapatita en formas nanocristalinas (c) y perlas (d). Otras cerámicas, tales como cementos de fosfato cálcico y biocristales, también se pueden usar para este fin.

50

55

Ejemplo 6. Liberación controlada de isoflavonas a partir de biomateriales a base de soja*Procedimientos*

- 5 Los biomateriales a base de soja preparados como en los ejemplos 1, 2, 3 y 4 se incubaron en solución salina tamponada con fosfato a pH 7,4 (1 ml) durante tiempos diferentes (de 6 a 120 horas) en condiciones estáticas. Se extrajeron alícuotas del sobrenadante (0,1 ml) y se analizaron mediante HPLC para determinar su contenido en isoflavona. La concentración de las diferentes isoflavonas liberadas en el medio de incubación se evaluó mediante la integración de los picos del cromatograma. Los datos se transformaron a partir de las curvas estándar para cada isoflavona única de interés y se expresaron en mg/ml \pm desviación estándar a partir de n= 3.

Resultados

- 15 Los datos mostrados en la Figura 10 indican que los biomateriales a base de soja de los ejemplos 1 y 2 pueden sostener la liberación de las isoflavonas principales al menos durante 120 horas de incubación.

Ejemplo 7. Sólidos e hidrogeles a base de soja como biomateriales para fabricar dispositivos médicos*Procedimientos*

- 20 (a) Biomateriales monolíticos a base de soja. Los biomateriales monolíticos a base de soja preparados como se describe en los ejemplos 1, 2, 3 y 4 se usaron solos o en combinación con los biomateriales a base de soja del documento WO 02/10261 y con otros biomateriales para fabricar dispositivos médicos tales como rellenos de cavidades óseas (tal como gel inyectable), vendajes para heridas (también como gel inyectable),
25 sellantes/bioadhesivos tisulares (también como gel inyectable), armazones de cartilago y de hueso (también como gel inyectable), guías nerviosas, stents cardiovasculares y similares. Se obtuvieron bloques no porosos o porosos, gránulos, membranas y películas mediante diferentes grados de empaquetado de los gránulos de biomaterial y geles preparados en los ejemplos 1, 2, 3 y 4 en un molde. La porosidad también se generó mezclando los biomateriales de los ejemplos 1, 2, 3 y 4 con azúcar y cristales de sal, así como con perlas de polímeros de diferentes mallas. Después, los aditivos se disolvieron rápidamente mediante su disolvente, dejando huecos dentro del biomaterial a base de soja. También se dejó que el moldeo diera forma a los biomateriales a base de soja para adaptarlos a las aplicaciones biomédicas específicas. Por ejemplo, los biomateriales a base de soja preparados como en los ejemplos 1, 2, 3 y 4 se termofijaron alrededor de un alambre de metal que se retiró después del termofijado para formar una fibra o tubo hueco.
30 (b) Biomateriales a base de soja como revestimientos. Los biomateriales a base de soja preparados como en el documento WO 02/10261 y los preparados siguiendo los procedimientos descritos en los ejemplos 1, 2, 3 y 4 se usaron solos o en combinación con otros biomateriales para revestir implantes dentales y ortopédicos, implantes cardiovasculares y guías para regeneración nerviosa. Los hidrogeles, polvos, películas, esponjas y similares se pueden depositar, mezclar, injertar o plegar alrededor del dispositivo médico. Por ejemplo, los hidrogeles de soja blandos preparados como en los ejemplos 2, 3 y 4 se pueden aplicar como revestimiento mediante un procedimiento de revestimiento por inmersión usando las diferentes formulaciones preparadas como se describe en el ejemplo 4 capaz de liberar isoflavonas como se describe en el ejemplo 6. El revestimiento puede sufrir estabilización posterior mediante un procedimiento de termofijación a temperaturas superiores a 60 °C y/o mediante su incubación en agentes de reticulación, tales como, entre otros, cationes divalentes (p. ej., soluciones de calcio y de magnesio) o dialdehídos (p. ej., glutaraldehído y genipita). Como alternativa, la cuajada de soja desgrasada se puede empaquetar alrededor de la superficie de un implante metálico, polimérico o cerámico y, después, termofijar y/o reticular químicamente para formar revestimientos de diferente aspereza, espesor y arquitecturas., El éxito del procedimiento de revestimiento se demostró mediante SEM con retrodispersión a diferentes aumentos.

- 50 La bioactividad de los materiales obtenidos de los procedimientos (a) y (b) de este ejemplo se analizó para determinar su capacidad para estimular la síntesis de colágeno por los fibroblastos y los osteoclastos siguiendo un procedimiento de tinción estándar con rojo Sirio. El potencial de calcificación de los osteoblastos se analizó usando un procedimiento de tinción con alizarina, mientras que la activación de las células osteoclastos se evaluó usando un procedimiento de partida para destacar la actividad de la enzima fosfatasa ácida resistente a tartrato en un sistema de cultivo donde los osteoblastos se estimularon con el factor estimulante de colonias y se cocultivaron con osteoblastos. También se analizó la capacidad de las formulaciones de biomateriales a base de soja, incluyendo, entre otros, los geles a base de soja del ejemplo 2 mezclados con los gránulos obtenidos siguiendo el procedimiento indicado en el ejemplo 1 y en el documento WO 02/10261, para participar en la formación de coágulos mediante incubación de los biomateriales en sangre recién extraída y la evaluación de su integración en el coágulo en formación mediante inspección visual y microscopía óptica.

Resultados

- 65 Se obtuvieron vendajes para heridas y rellenos de cavidades óseas con diferentes propiedades fisicoquímicas. Las formulaciones en gel inyectable típicas se muestran en la figura 11. Tanto los vendajes para heridas como los

rellenos de cavidades óseas mostraron una bioactividad que condujo a la inducción de la síntesis de colágeno por fibroblastos y osteoblastos (figuras 12a y b) y la calcificación de los cultivos de osteoblastos (Figuras 12c y d). Los sellantes tisulares (es decir, bioadhesivos) también se obtuvieron, por ejemplo, mezclando los gránulos de biomaterial a base de soja del documento WO 02/10261 o los gránulos de biomaterial a base de soja del ejemplo 1 con los hidrogeles a base de soja de los ejemplos 2, 3 y 4 (Figuras 9 a y b). Las figuras 13^a y b muestran que el gel a base de soja solo o en combinación con otros materiales se puede usar como sellante (es decir, bioadhesivo), ya que favorece la integración del coágulo de sangre dentro de su estructura. La microscopía óptica mostró que el coágulo había invadido el gel y rodeado a los gránulos dispersos en el gel durante la preparación de esta formulación de biomaterial. Las figuras 14a y b muestran el efecto inhibitorio de la fosfatasa ácida resistente a tartrato de los osteoclastos de los biomateriales a base de soja producidos siguiendo los procedimientos descritos en los ejemplos 1, 2, 3 y 4. Las flechas indican los osteoclastos control positivos a la fosfatasa ácida resistente a tartrato (tinción roja) tras 8 días de cocultivo con osteoblastos (Figura 14a). La figura 14b muestra las células con un color rojo o amarillo claro, indicativo de una inhibición de la fosfatasa ácida resistente a tartrato de los osteoclastos en muestras tratadas con biomateriales de soja. Las figuras 15a y c muestran una SEM comparativa de un stent cardiovascular después de su revestimiento con hidrogeles a base de soja termofijados. Las imágenes a un aumento bajo muestran que el revestimiento aplicado no afecta al diseño de la estructura del stent que se adhiere íntimamente a su superficie (Figura 15a). La SEM con retrodispersión también ha demostrado la yuxtaposición satisfactoria del revestimiento, que, a un aumento alto, aparece como un material típico blando a base de carbono (Figura 15b), mientras que la superficie sin recubrir muestra claramente su estructura metálica (Figura 15c).

Ejemplo 7. Biomateriales a base de soja como calmantes

Procedimientos

Los biomateriales a base de soja preparados como se describe en los ejemplos 1, 2, 3 y 4 se usaron solos o en combinación con los biomateriales a base de soja del documento WO 02/10261 y con otros biomateriales para fabricar calmantes para irritación de encías y de piel. Los hidrogeles y las pastas de diferente consistencia se prepararon siguiendo los procedimientos descritos en los ejemplos anteriores y se hicieron adecuados para extenderse en los tejidos. Como alternativa, los biomateriales a base de soja preparados como en los ejemplos 2, 3 y 4 se convirtieron en fácilmente solubles mediante disolución en un exceso de solución acuosa a diferentes intervalos de concentraciones (p. ej., 1 mg/ml y diluciones mayores).

Resultados

Se demostró que los hidrogeles y las pastas se podían aplicar fácilmente sobre tejidos blandos, tales como piel y encías. En el caso de las soluciones acuosas, se pudieron disolver fácilmente diferentes concentraciones de biomateriales a base de soja con el fin de obtener calmantes con una bioactividad diferente.

Referencias

1. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Macromolecular Bioscience 4, 743 - 765 (2004)
2. Seliktar D, Zisch AH, Lutolf MP, Wrana JL, Hubbell JA. MMP-2 sensitive, VEGF-bearing bioactive hydrogels for promotion of vascular healing. J. Biomed. Mater. Res. Part A 68A, 704 - 712 (2004).
3. Wan ACA, Mao HQ, Wang S, Phua SH, Lee GP, Pan JS, Lu S, Wang J, Leong KW. Poly(phosphoester) ionomers as tissue-engineering scaffolds. J. Biomed. Mater. Res. Part B - Appl. Biomater. 70B, 91 - 102 (2004).
4. Luyten FP, Dell'Accio F, De Bari C. Skeletal tissue engineering: opportunities and challenges. Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. 15, 759 - 769 (2001).
5. Castner DG, Ratner BD. Biomedical surface science: foundation to frontiers. Surf. Sci. 500, 28 - 60 (2002).
6. Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. Adv. Drug Deliv. Rev. 28, 5 - 24 (1997).
7. Gogolewski S, Pineda L, Busing CM. Bone regeneration in segmental defects with resorbable polymeric membranes: IV. Does the polymer chemical composition affect the healing process? Biomaterials 21, 2513 - 2520 (2000)
8. Zaffe D, Leghissa GC, Pradelli J, Botticelli AR. Histological study on sinus lift grafting by Fisiograft and Bio-Oss. J. Mater. Sci. : Mater. Med. 16, 789 - 793 (2005).
9. Noro T, Itoh K. Biomechanical behaviour of hydroxyapatite as bone substitute material in a loaded implant model. On the surface strain measurement and the maximum compression strength determination of material crash. Biomed. Mater. Eng. 9, 319 - 324 (1999).
10. Xu HHK, Quinn JB, Whisker-reinforced bioactive composites containing calcium phosphate cement fillers: effects of filler ratio and surface treatments on mechanical properties. J. Biomed. Mater. Res. 57, 165 - 174 (2001).
11. Yuasa T, Miyamoto Y, Kon M, Ishikawa K, Takechi M, Momota Y, Tatehara S, Takano H, Mimamiguchi S, Nagayama M. Proliferation and differentiation of cultured MC3T3-E1 osteoblasts on surface layer modified hydroxyapatite ceramic with acid and heat treatments. Dent. Mater. J. 24, 207 - 212 (2005).
12. Boccaccini AR, Blaker JJ, Maquet V, Jerome R, Blacher S, Roether JA. Biodegradable and bioactive

- polymer/Bioglass® composite foams for tissue engineering scaffolds. *Curr. Res. Adv. Mater. Processes Mater. Sci. Forum* 494, 499 - 506 (2005).
13. Liang H, Shi B, Fairchild A, Cale T. Applications of plasma coatings in artificial joints: an overview. *Vacuum* 73, 317 - 326 (2004).
- 5 14. Brown R. Bioartificial implants: design and tissue engineering. In: *Structural Biological Materials: design and structure - property relationships*. Ed. Elices M, Pergamon Materials Series vol. 4. Pergamon 2000 Amsterdam Elsevier Science Ltd.
- 10 15. Daament WF, vanMoerkerk HThB, Hafmans T, Buttafoco L, Poot AA, Veerkamp JH, van Kuppevelt TH. Preparation and evaluation of molecularly-defined collagen-elastin-glycosaminoglycan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 24, 4001 - 4009 (2003).
16. Madhally SV, Matthew HWT. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 20, 1133 - 1142 (1999).
17. Xu JY, Liu ZS, Erhan SZ, Carriere CJ. Cross-linkers control the viscoelastic properties of soybean oil-based biomaterials. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 81, 813 - 816 (2004).
- 15 18. Vaz CM, Fossen M, van Tuil RF, de Graaf LA, Reis RL, Cunha AM. Casein and soybean protein-based thermoplastics and composites as alternative biodegradable polymers for biomedical applications. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 65A, 60 - 70 (2003).
19. Christensen HR, Bruun SW, Frokiaer H. Antigenic specificity of serum antibodies in mice fed soy protein. *Intern. Arch. Allergy Immunol.* 132, 58 - 67 (2003).
- 20 20. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52, 673 - 751 (2000).
21. Barnes S, Blair HC. Genistein for use in inhibiting osteoclasts. US Patent No. 5,506,211.
22. Santin M, Nicolais L, Ambrosio L. Soybean-based biomaterials. PCT Patent Application No. PCT/GB01/03464 published as WO 02/10261.
- 25 23. Pandjaitan N, Hettiarachchy N, Ju ZY, Crandall P, Sneller C, Dombek D. Evaluation of genistin and genistein contents in soybean varieties and soy protein concentrate prepared with 3 basic methods. *J. Food Sci.* 65, 399 - 402 (2000).
24. Ramirez-Suarez JC, Xiong YL. Effect of transglutaminase-induced cross-linking on gelation of myofibrillar/soy protein mixtures. *Meat Sci.* 65, 899 - 907 (2003).
- 30 25. Fan JF, Saito M, Yanyan Z, Szesze T, Wang LJ, Tatsumi E, Li LT. Gel-forming ability and radical scavenging activity of soy protein hydrolysate treated with transglutaminase. *J. Food Sci.* 70, C87 - C92 (2005).
26. Wiese KL, Sneider HE. Factors influencing soybean oil extraction rates. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 62, 618 (1985).
- 35 27. Lima ES, Abdalla DSP. High-performance liquid chromatography of fatty acids in biological samples. *Anal. Chim. Acta* 465, 81 - 91 (2002).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producir un biomaterial a base de soja directamente a partir de harina de soja desgrasada que es adecuada para usar en un producto biomédico, comprendiendo el procedimiento:
 5 desgrasar harina de soja, antes o al mismo tiempo que se realiza la extracción del disolvente;
 y termofijar la harina de soja desgrasada;
 producir un biomaterial que comprende niveles variables de proteínas de soja, hidratos de carbono e isoflavonas.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde la extracción del disolvente se realiza usando un
 10 sistema de disolventes que comprende metanol, etanol, acetonitrilo, acetona y agua, o una mezcla de los mismos.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la extracción del disolvente se realiza durante un periodo de entre 2 y 4 horas y a una temperatura de entre 30 °C y 50 °C.
- 15 4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 a 3, que incluye la etapa de introducir un agente de reticulación.
5. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que incluye la etapa de diálisis con el fin de controlar los niveles de hidratos de carbono en el biomaterial.
 20
6. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que incluye la etapa de funcionalizar el biomaterial con uno o más péptidos bioactivos.
7. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el biomaterial a base de soja está en forma de un hidrogel.
 25
8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, que incluye la etapa de mezclar, interrelacionar, injertar o, de otro modo, combinar el biomaterial a base de soja con uno o más biomateriales biocompatibles naturales o sintéticos para formar un material biodegradable o bioestable compuesto.
 30
9. Uso en un producto biomédico de un biomaterial a base de soja producido mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, donde el biomaterial a base de soja está en forma de un hidrogel.
 35
11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, donde el hidrogel está en forma inyectable.
12. Uso de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, donde el producto biomédico es un vendaje para heridas, un armazón para ingeniería tisular, un relleno o implante para usar en cirugía, una barrera temporal para usar en procedimientos dentales o quirúrgicos o para prevenir la adherencia tisular posquirúrgica, un vehículo para la liberación de fármacos, péptidos bioactivos o plásmidos, un agente antiinflamatorio, un revestimiento para vendajes para heridas o para dispositivos o implantes dentales, médicos, quirúrgicos o veterinarios, o una composición para calmar la piel o las encías irritadas.
 40
13. Un producto biomédico que es un armazón para ingeniería tisular, un relleno o implante para usar en cirugía, una barrera temporal para usar en procedimientos dentales o quirúrgicas o para prevenir la adherencia tisular posquirúrgica, un agente antiinflamatorio, o una composición un para calmar la piel o las encías irritadas, y **caracterizado por que** comprende un biomaterial a base de soja producido por un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
 45
 50
14. Un producto biomédico que es un vendaje para heridas o un revestimiento para vendajes para heridas o dispositivos o implantes dentales, médicos, quirúrgicos o veterinarios, y **caracterizado por que** comprende un biomaterial a base de soja producido por un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
 55
15. Un producto biomédico que es un vehículo para la liberación de fármacos, péptidos bioactivos o plásmidos, y **caracterizado por que** comprende un biomaterial a base de soja producido por un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

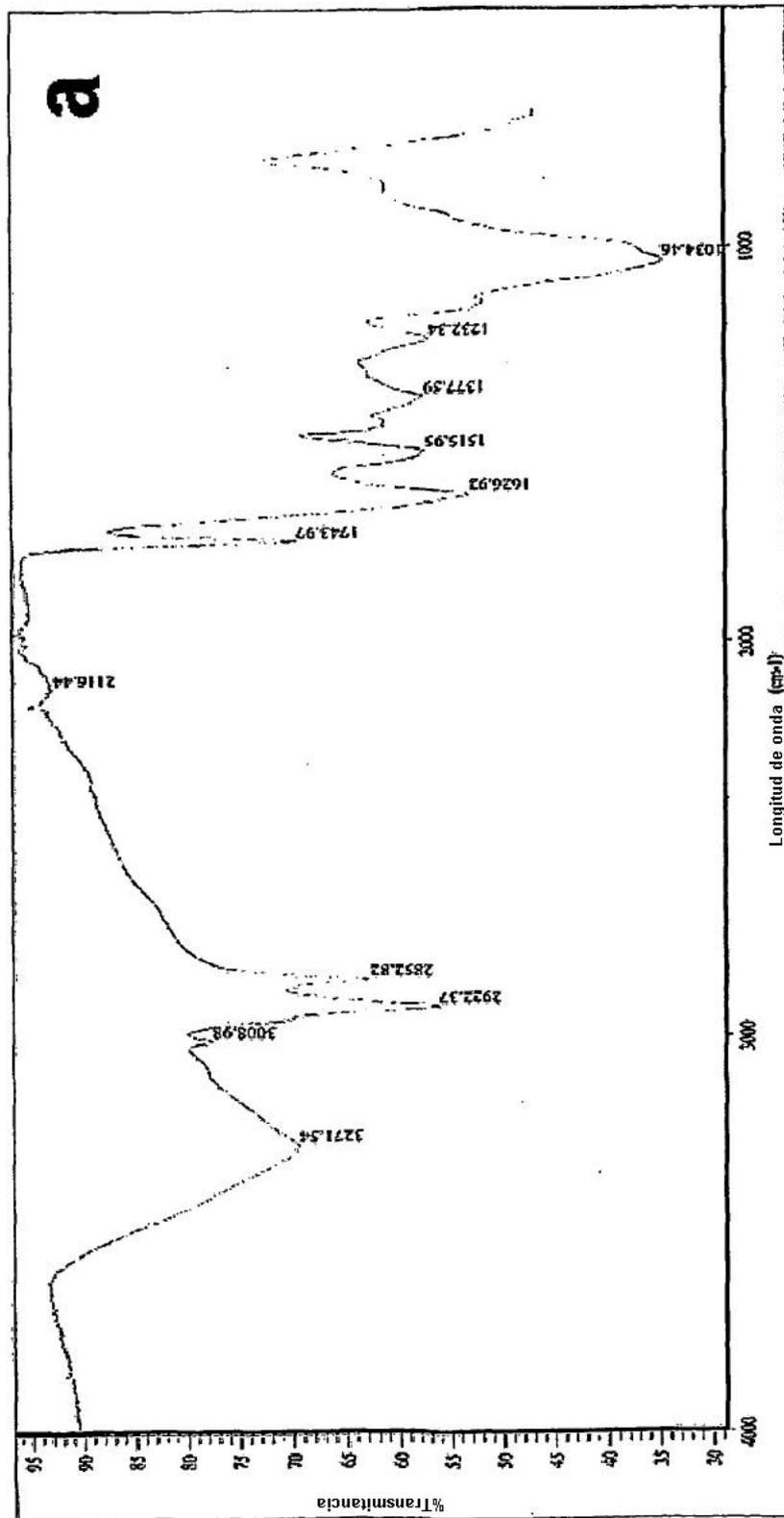


Fig. 1

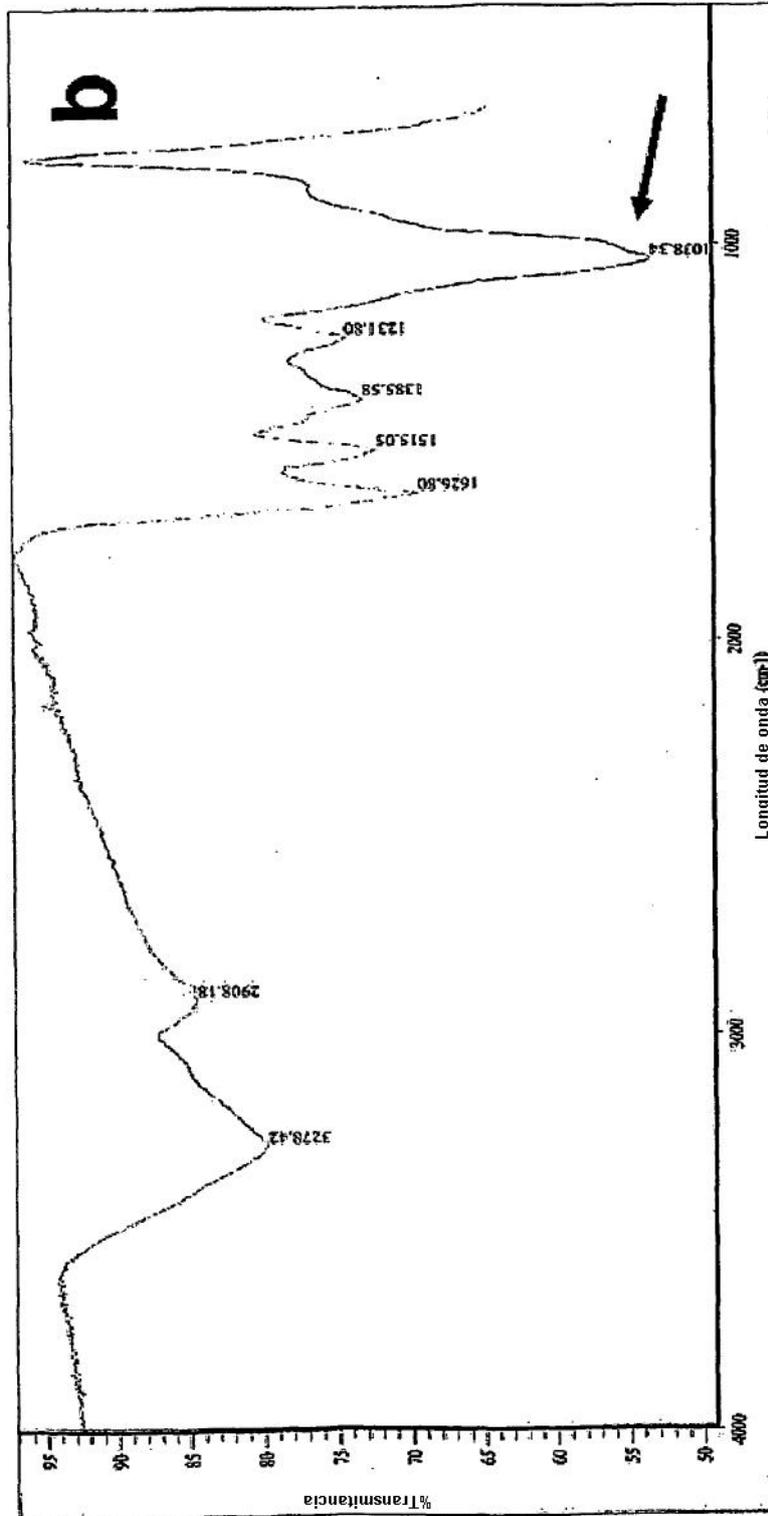


Fig. 1

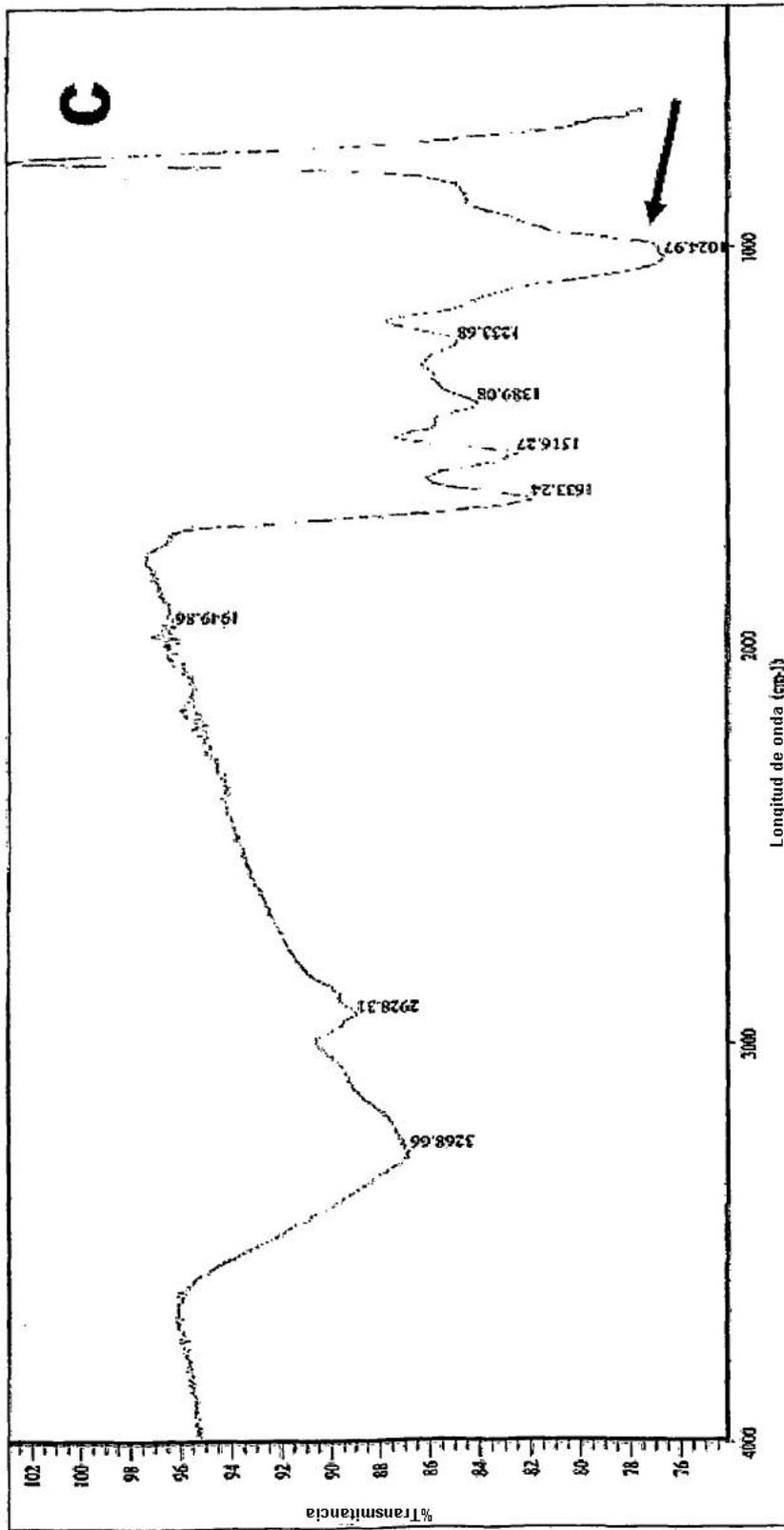


Fig. 1

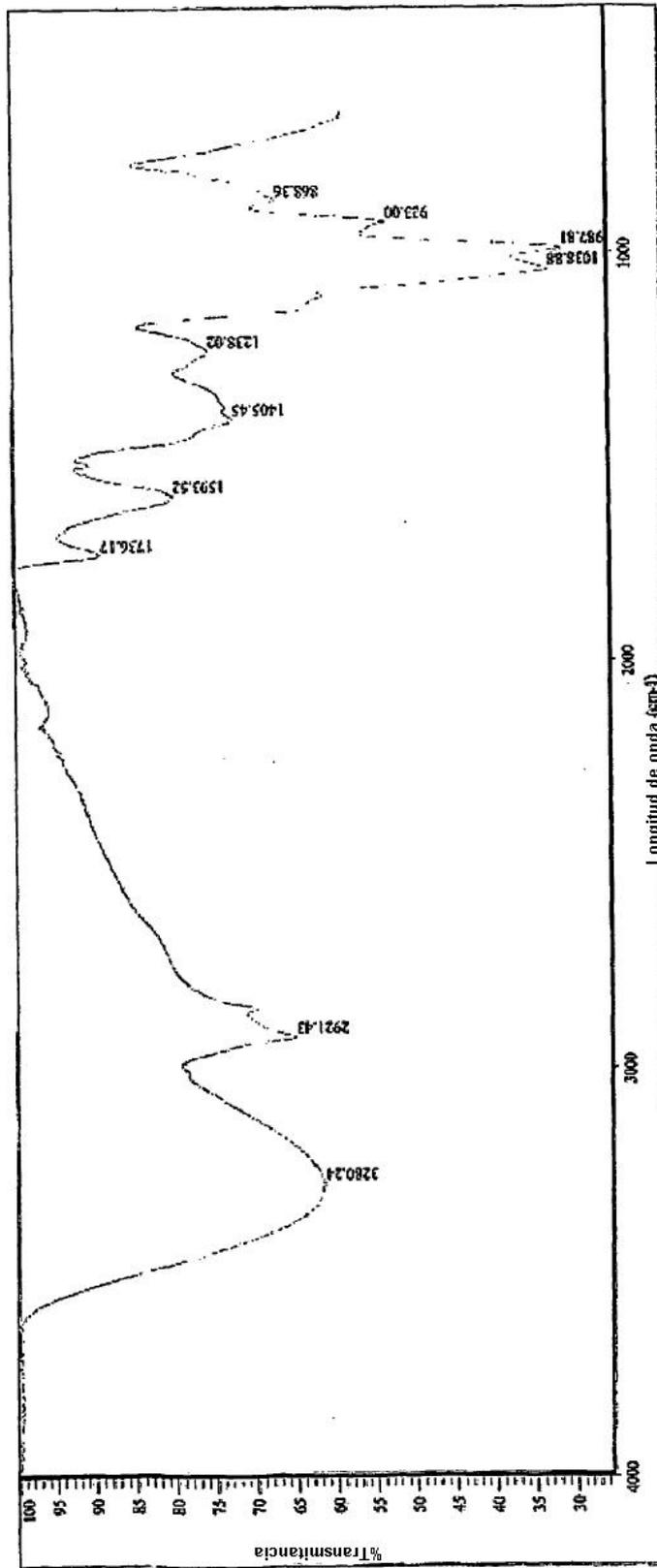


FIG. 2

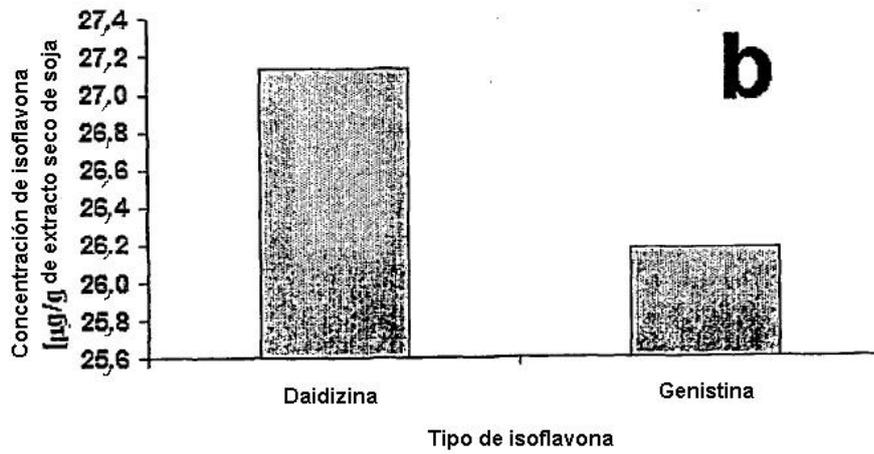
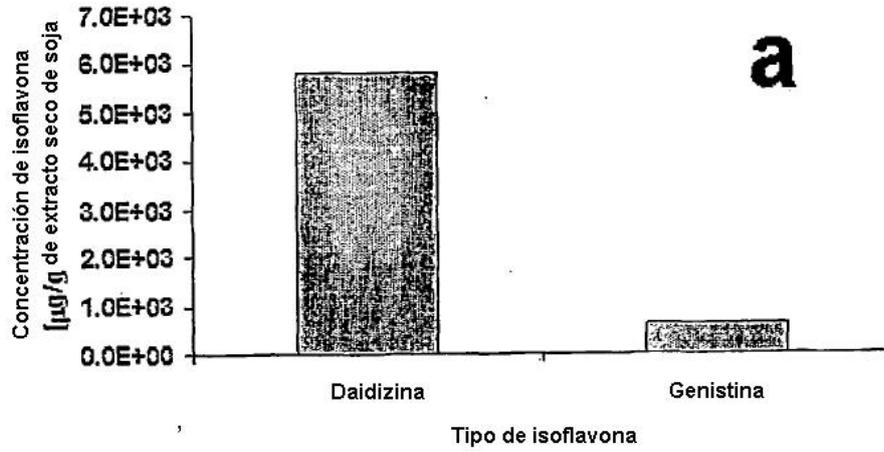


Fig. 3

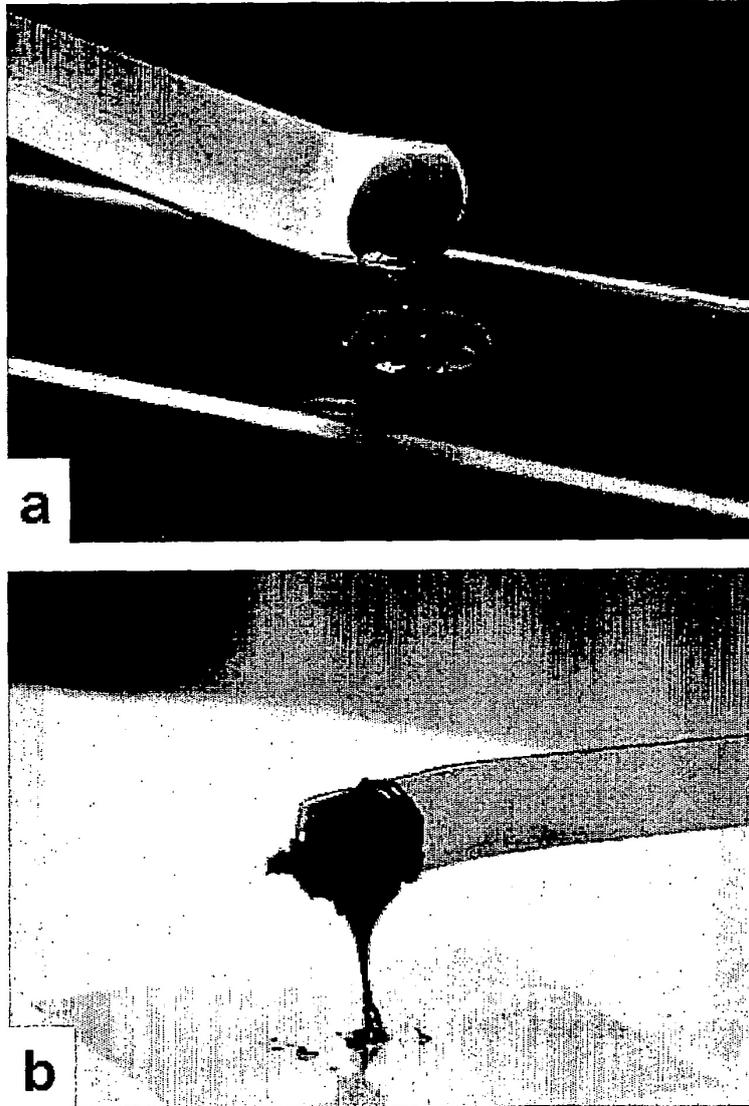


Fig. 4

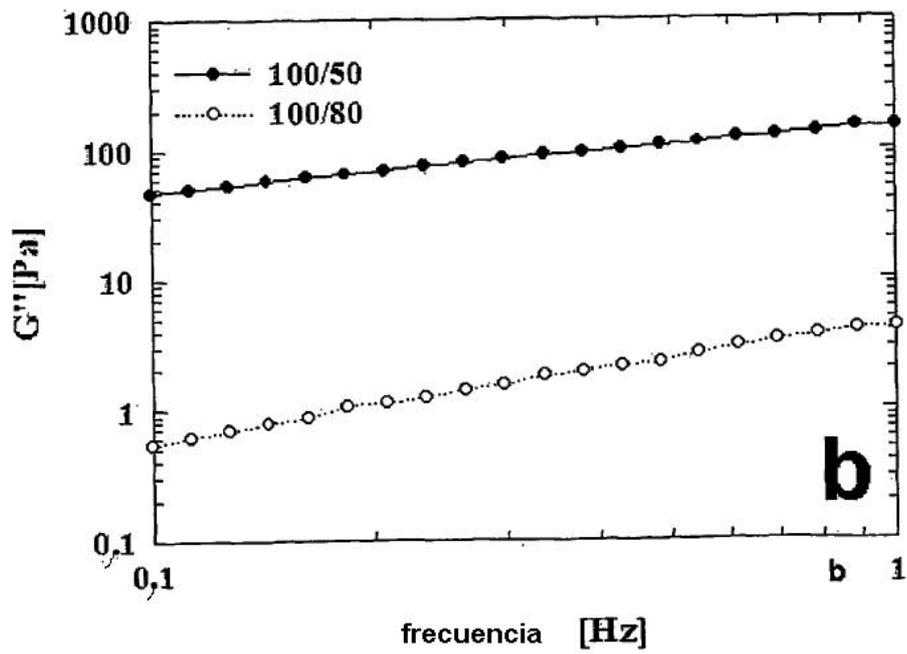
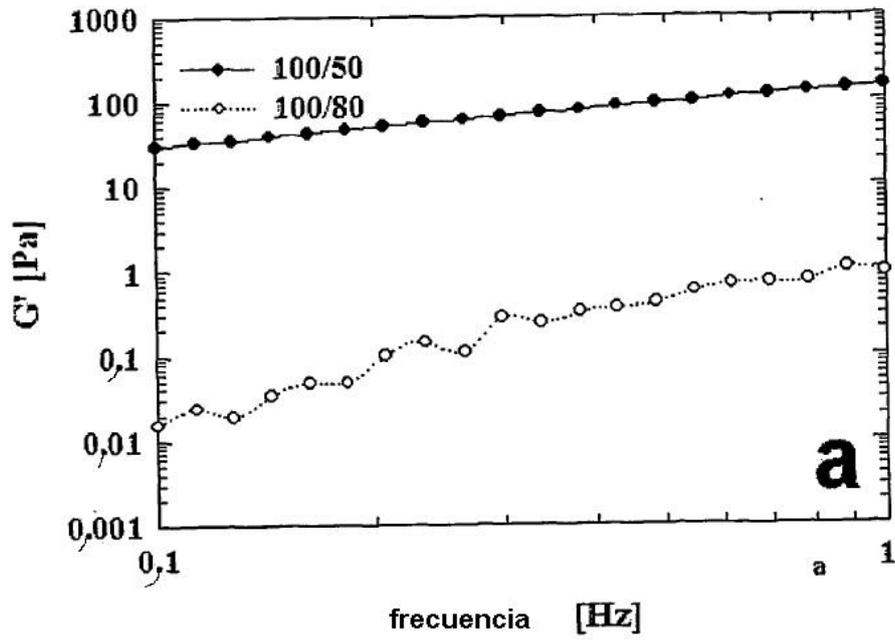


Fig. 5

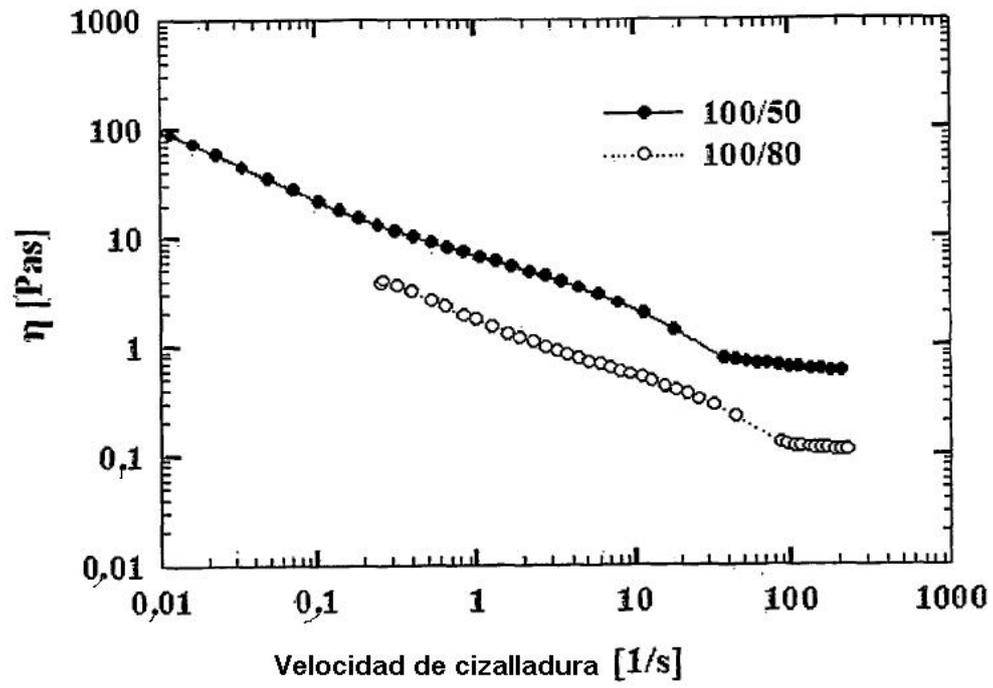


Fig. 6

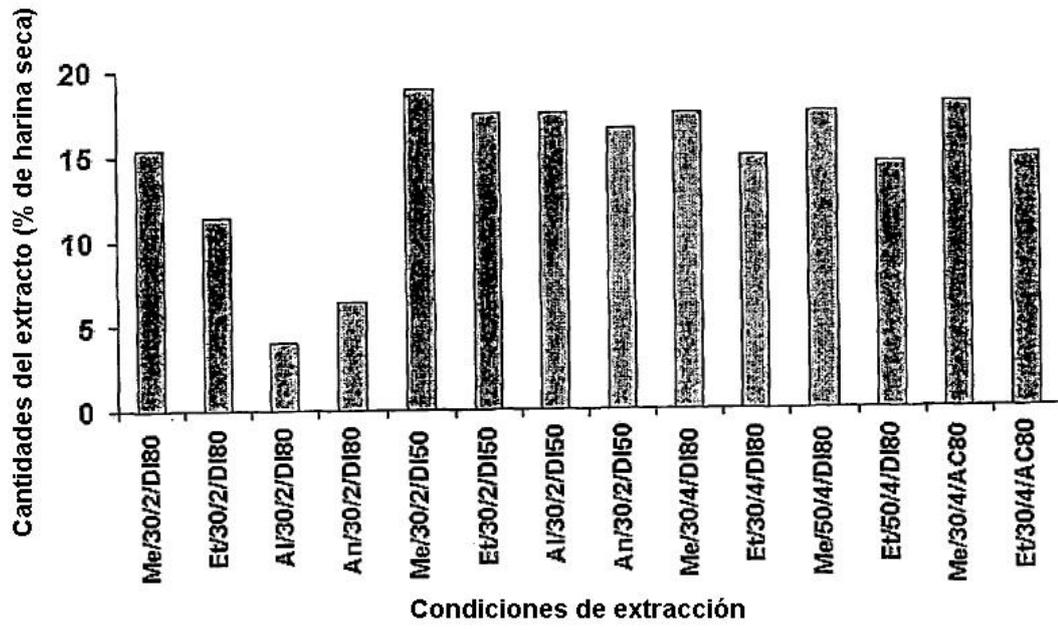


Fig. 7

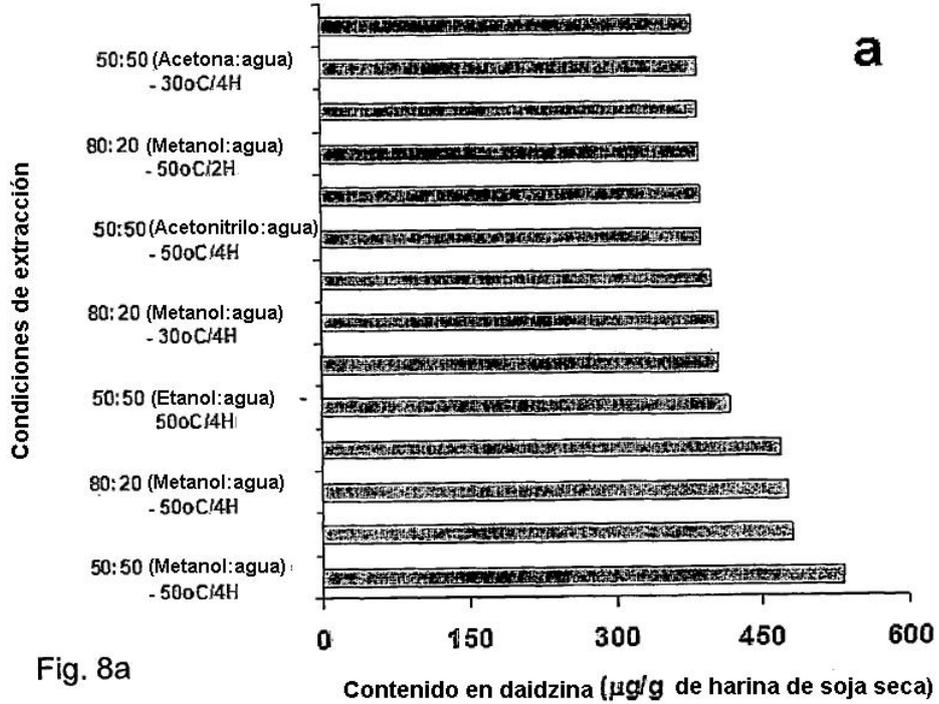


Fig. 8a

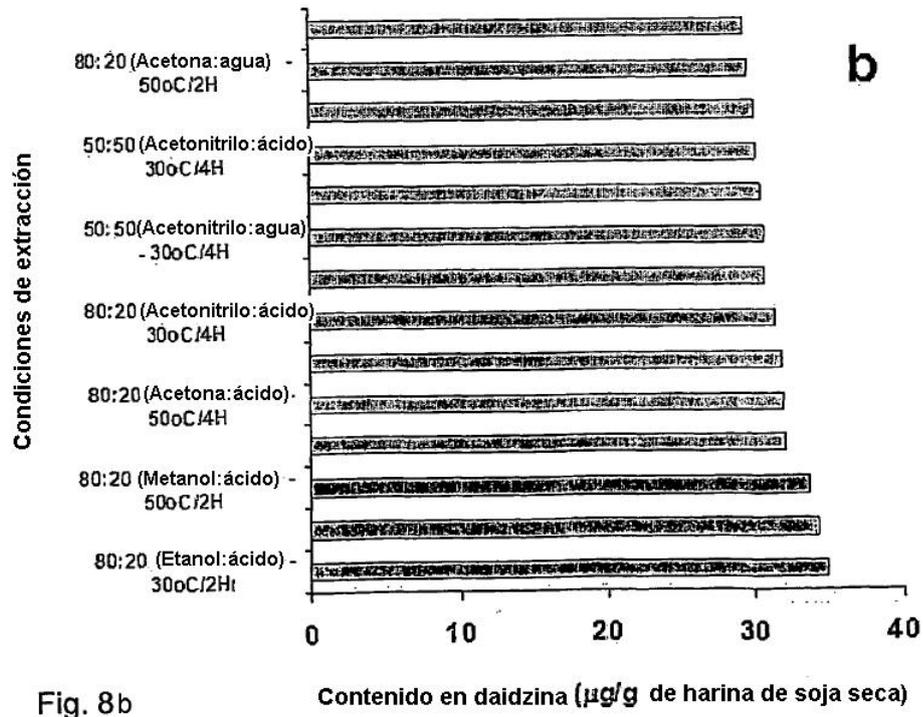


Fig. 8b

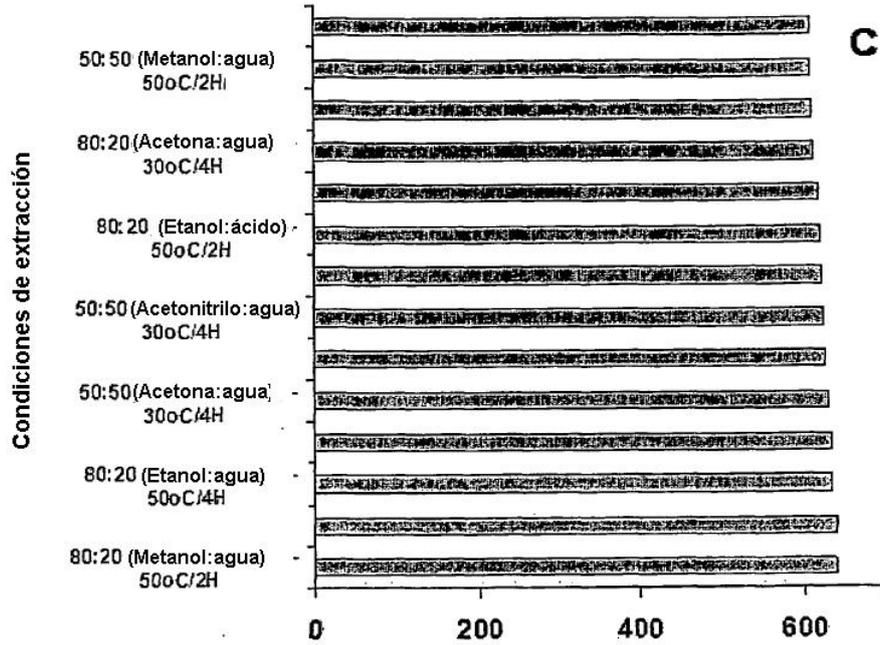


Fig 8c

Contenido en genistina (µg/g de harina de soja seca)

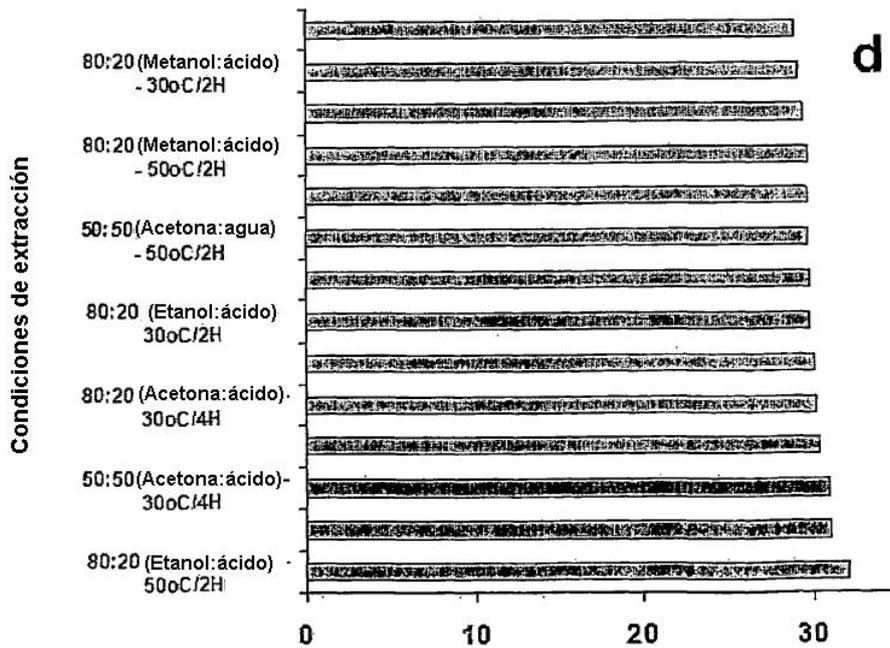


Fig 8d

Contenido en genistina (µg/g de harina de soja seca)

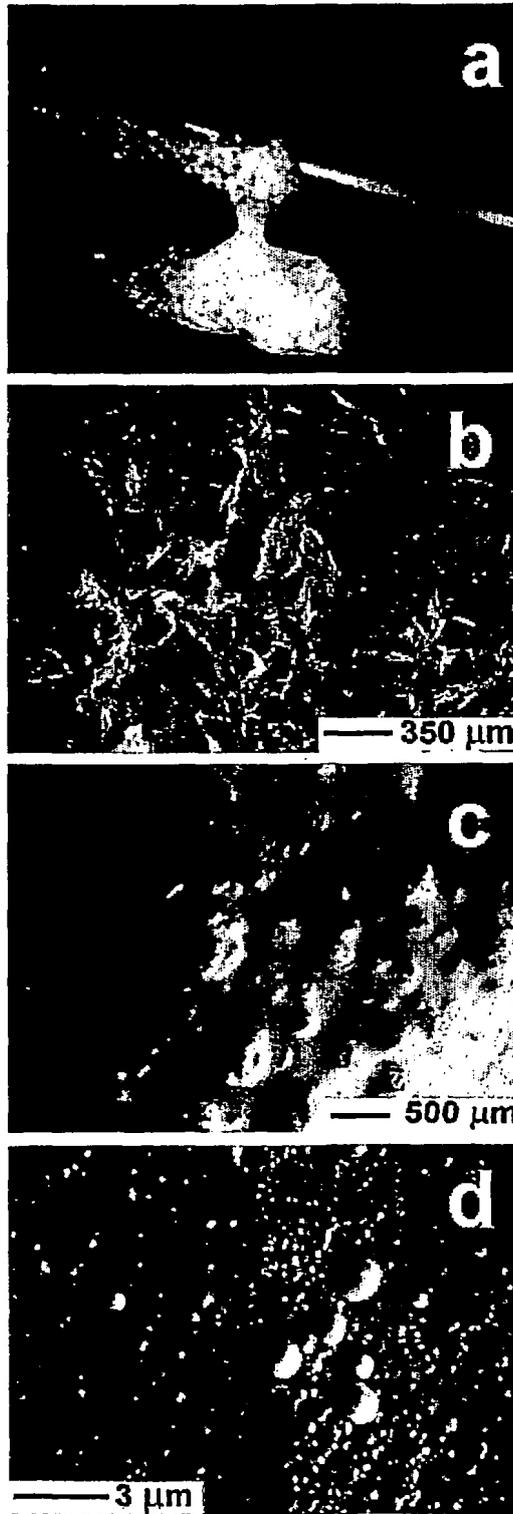


Fig. 9

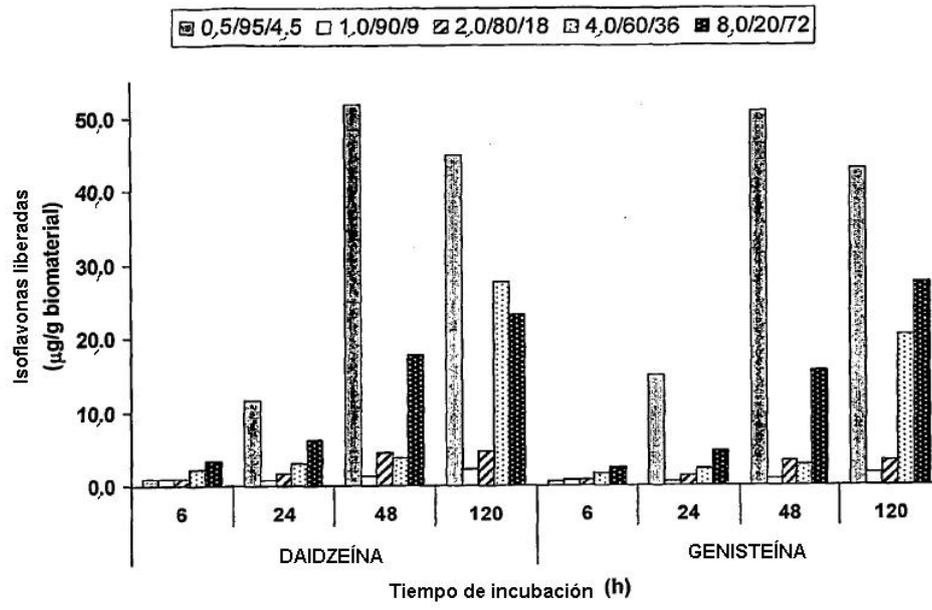


Fig. 10

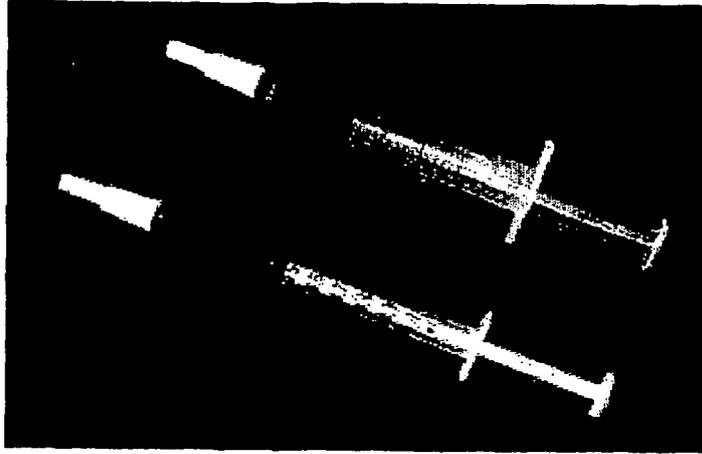


Fig. 11

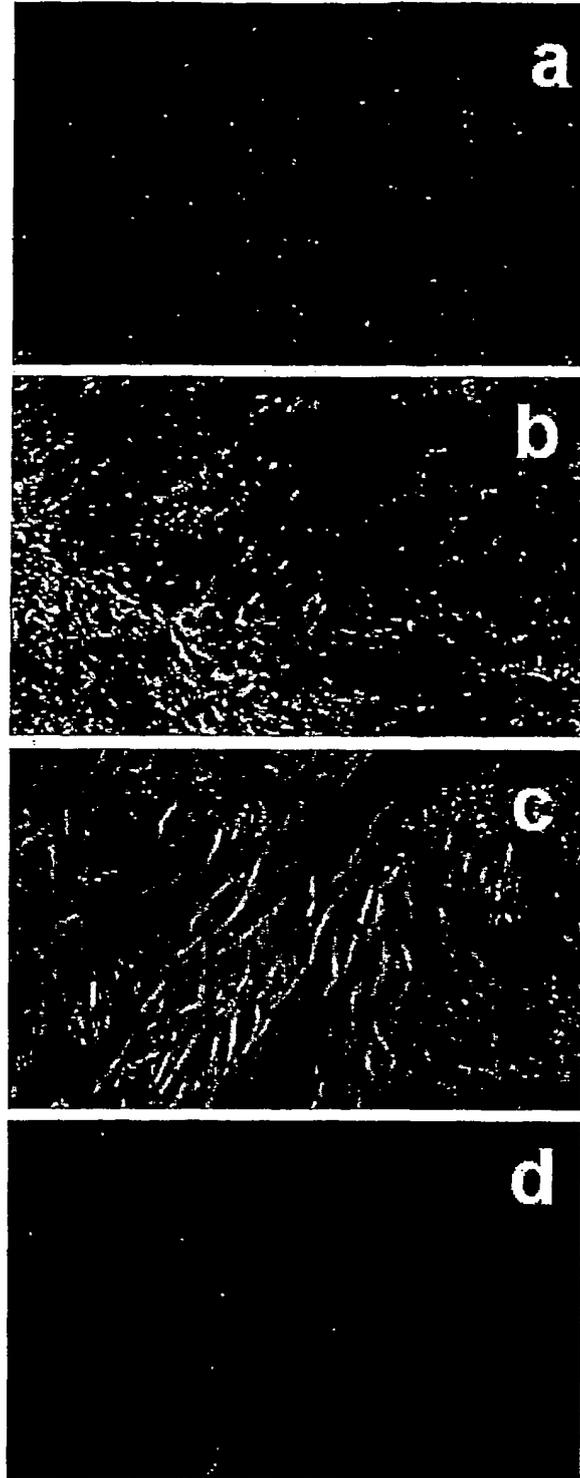


Fig. 12

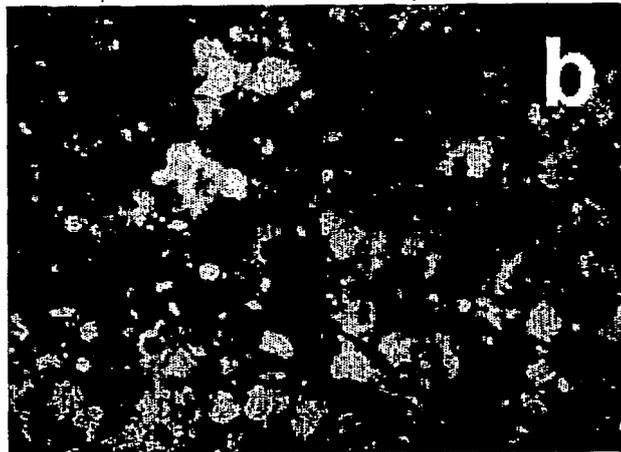
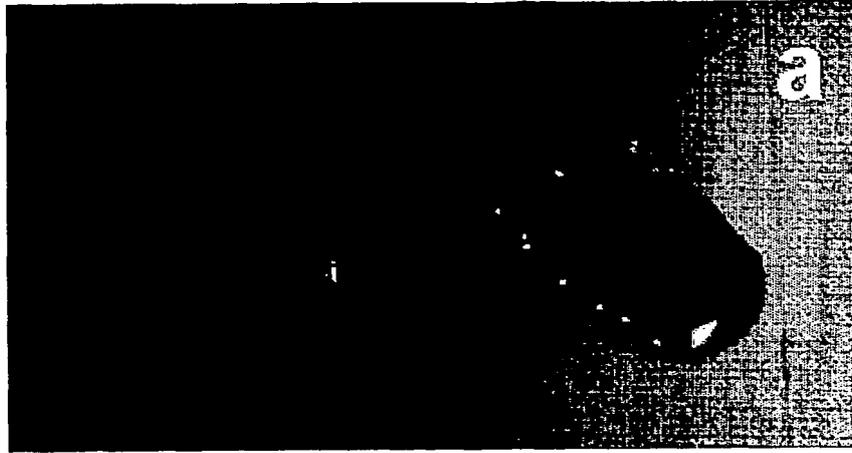


Fig. 13

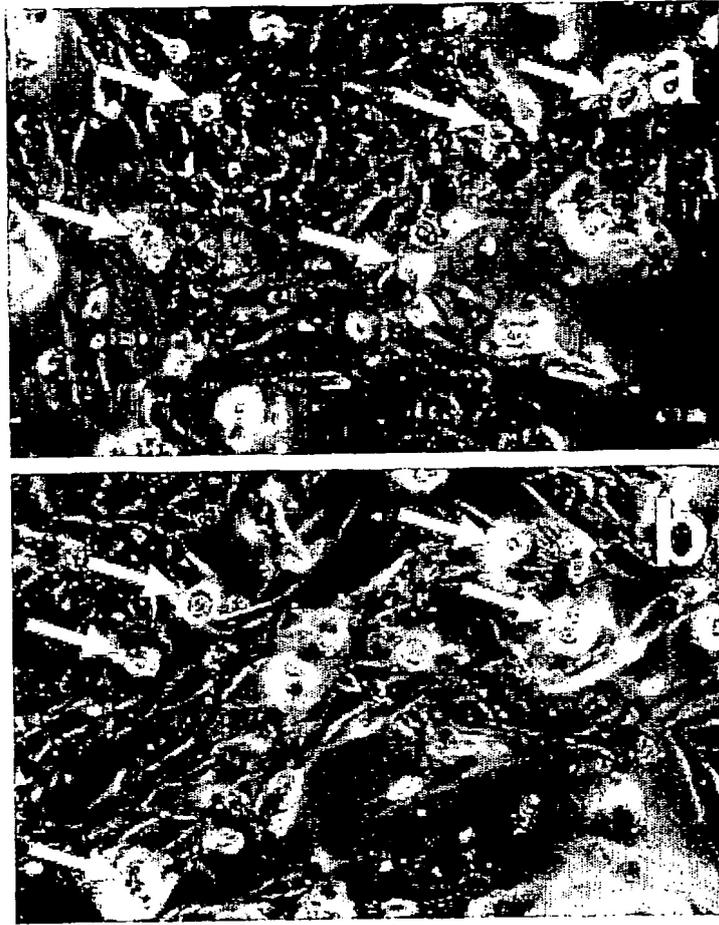


Fig. 14

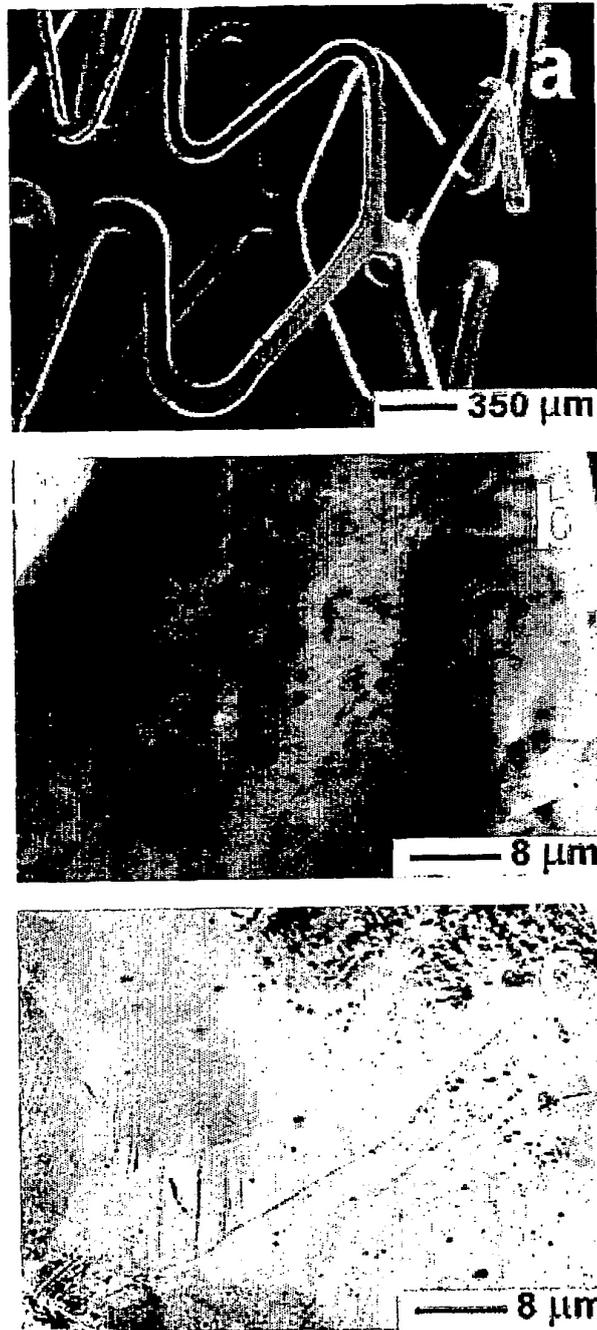


Fig. 15