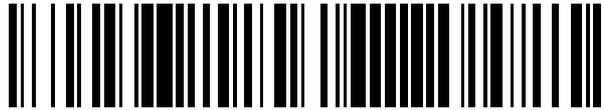


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 747**

51 Int. Cl.:

A61K 33/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2005 E 05743985 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013 EP 1758599**

54 Título: **Composiciones administrables por vía oral que comprenden carbonato cálcico amorfo estable**

30 Prioridad:

26.05.2004 US 574208 P

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

12.03.2014

73 Titular/es:

**BEN GURION UNIVERSITY OF THE NEGEV
RESEARCH AND DEVELOPMENT AUTHORITY
(100.0%)
P.O. BOX 653
84105 BEER SHEVA, IL**

72 Inventor/es:

**SAGI, AMIR;
BERMAN, AMIR y
BEN, YOSEF**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 447 747 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

Composiciones administrables por vía oral que comprenden carbonato cálcico amorfo estable

La presente invención se refiere a una composición administrable por vía oral que comprende carbonato cálcico amorfo (ACC) estable presente en asociación con una matriz orgánica que comprende quitina y proteínas.

- 5 El calcio es el mineral más abundante del cuerpo humano y comprende más de 1,5% del peso total del cuerpo. Investigaciones recientes han indicado que las dietas modernas contienen solamente alrededor de un tercio del calcio necesario. El mercado de aditivos alimenticios es muy grande y crece con rapidez, entre los cuales los aditivos de calcio ocupan una posición importante. Los suplementos de calcio, principalmente para el tratamiento profiláctico de la osteoporosis, se preparan, generalmente, utilizando carbonato cálcico que procede de depósitos terrestres o de orígenes marinos tales como corales o animales con concha (junto con sales orgánicas de calcio en las que el contenido de calcio es más pequeño). Ambos orígenes, corales y animales marinos de concha, son cristalinos. Se ha reivindicado en diversos estudios de nutrición que la biodisponibilidad del calcio procedente de esas formas cristalinas de carbonato cálcico, es baja, en especial en las personas de edad, cuando la producción del ácido del estómago ha disminuido. Por consiguiente, existe la necesidad de un origen alternativo de calcio para emplear en la preparación de aditivos alimenticios y composiciones terapéuticas.

A este fin, el carbonato cálcico amorfo (ACC) con su mayor solubilidad que la de los minerales de carbonato cálcico cristalino (p. ej., calcita y aragonito) podría aparecer que proporcionara una alternativa preferible para el consumo de calcio con respecto a los carbonatos cálcicos cristalinos existente, utilizados en las formulaciones de la técnica anterior.

- 20 Sin embargo, la preparación y/o purificación a escala industrial de depósitos del mineral amorfo (tal como ACC) es problemática, a la vista de la rareza de tales depósitos naturales, que en parte puede deberse a su inestabilidad inherente y a la necesidad consiguiente de compuestos especializados con objeto de evitar la transformación espontánea en el mineral cristalino, más estable.

- 25 Se ha establecido que en ciertos crustáceos, tales como el cangrejo de río, *Cherax quadricarinatus*, otras especies de cangrejos de río, y otros crustáceos decápodos, el ACC es el mineral principal utilizado para el endurecimiento del exoesqueleto, donde se deposita en una matriz orgánica previamente formada compuesta de compartimentos de quitina y proteínas. El ciclo vital del cangrejo de río implica la muda periódica, durante la cual el mineral amorfo es reabsorbido desde el exoesqueleto, movilizado y almacenado temporalmente en un órgano dedicado, el gastrolito. Después de la muda, los gastrolitos se disuelven rápidamente en el estómago por digestión ácida, y el mineral disuelto es reciclado y vuelve a depositarse en el nuevo exoesqueleto.

La patente europea EP 0 052 677 (A1) describe que el carbonato cálcico amorfo, en especial el carbonato cálcico amorfo estabilizado, resistente a la transición a carbonato cálcico cristalino, es útil como un factor de carbonato en bebidas efervescentes, con inclusión de bebidas medicadas.

- 35 Katsuaki Ishii et al., indican en *Biotechnol. Biochem.*, 62 (2), 291-296, 1998, acerca de la solubilización y caracterización química de una proteína de matriz, insoluble en el gastrolito de un cangrejo de río., *Procambarus clarkii*. El gastrolito del cangrejo de río *Procambarus clarkii* contiene una pequeña cantidad de una matriz orgánica constituida, principalmente, por quitina y proteínas, junto con una gran cantidad de carbonato cálcico.

- 40 Lia Addadi et al., informan en *Adv. Mater.* 2003, 15, No. 12, acerca de carbonato cálcico amorfo y su papel en la biomineralización. El carbonato cálcico amorfo (ACC) en su forma pura es sumamente inestable, todavía algunos organismos producen ACC estable y se conocen casos en los que el ACC actúa como un precursor transitorio de aragonito o calcita cristalinos, más estables.

- 45 Sefi Raz et al., indican en *Biol. Bull.* 203, 269-274 (Diciembre, 2002), que el carbonato cálcico amorfo estable es el componente principal de las estructuras de almacenamiento de calcio del crustáceo *Orchestia cavimana*. El carbonato cálcico amorfo (ACC) es la forma menos estable de las seis fases conocidas de carbonato cálcico. Sin embargo, es producido y estabilizado por una diversidad de organismos. En este estudio estos investigadores han examinado estructuras de almacenamiento de calcio procedente del crustáceo terrestre *Orchestia cavimana*, con objeto de una mejor comprensión de su modo de formación y función.

- 50 Sumin Hu et al., informan en *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, Vol. 259, No. 3 (2004), 369-373, del efecto de suplementos de calcio sobre la osteoporosis utilizando técnicas analíticas nucleares. El análisis de activación de neutrones (NAA) y de absorciometría de rayos X de energía doble (DEXA) han sido empleadas para estudiar los efectos de diferentes suplementos de calcio en la osteoporosis, que incluyen carbonato cálcico, treonato cálcico, gluconato cálcico, lactato cálcico, acetato cálcico y una medicina china tradicional.

- 55 La presente invención se refiere a composiciones administrables por vía oral que comprenden ACC estable, según la reivindicación 1. Además, la presente invención se refiere a una composición administrable por vía oral de uso como suplemento de la ingesta de calcio oral, según la reivindicación 12, y a un suplemento alimenticio o preparación farmacéutica que comprende dicha composición administrable por vía oral, según las reivindicaciones

18 y 19. El término “estable” se emplea en esta memoria para indicar que el carbonato cálcico amorfo se encuentra presente en asociación con un material orgánico, cuyo papel es mantener dicho carbonato cálcico en estado amorfo durante periodos de tiempo largos (p. ej., desde varios meses hasta varios años) sin conversión sustancial alguna en formas cristalinas. La expresión “composiciones administrables por vía oral” como se emplea en esta memoria, incluye tanto composiciones farmacéuticas como composiciones nutricionales, así como también suplementos alimenticios dentro de su alcance.

En una realización de la presente invención, el ACC estable existente en la composición expone un espectro FTIR que presenta una banda de absorción amplia en 1500 cm^{-1} y un pico en 870 cm^{-1} , ambos de los cuales son indicativos de ACC, y un pico en 1650 cm^{-1} , indicativo de quitina. Típicamente, el espectro FTIR obtenido con el ACC estable empleado en las composiciones actualmente descritas, es similar al que muestra la Fig. 2,

En otra realización, el ACC estable presente en la composición, exhibe una figura de difracción de rayos X que muestra picos amplios centrados en aproximadamente $2\theta=30^\circ$ y en aproximadamente $2\theta=45^\circ$, indicativos de ACC y un pico en aproximadamente $2\theta=19^\circ$ indicativo de quitina., cuya figura de difracción está esencialmente libre de una señal indicativa de carbonato cálcico cristalino. En el presente contexto, la expresión “esencialmente libre de una señal indicativa de carbonato cálcico cristalino” debe interpretarse como que significa que si una señal tal es, en absoluto, detectable, es producida por carbonato cálcico cristalino presente en una cantidad que constituye no más que 5% /p/p) del contenido total de carbonato cálcico. Típicamente, sin embargo, el contenido de carbonato cálcico cristalino no es mayor que 1%, al tiempo que, preferiblemente, no se encuentra presente carbonato cálcico cristalino.

Típicamente, el espectro de difracción de rayos X obtenido con el ACC estable utilizado en las composiciones actualmente descritas, es similar al expuesto en la Fig. 1.

Las composiciones administrables por vía oral de la presente invención, se caracterizan en términos de las proteínas encontradas en la matriz orgánica asociada con el ACC. La matriz orgánica asociada con el ACC comprende quitina y proteínas que poseen pesos moleculares de, aproximadamente, 218, 184, 138, 129, 71, 66, 55, 51, 43, 30, 25, 17 kDa, determinados mediante análisis .SDS-PAGE. Típicamente, el ACC estable se caracteriza por tener un perfil electroforético de la SDS-PAGE similar al que se muestra en la Fig. 5.

En una realización de la invención particularmente preferida, la composición administrable por vía oral mencionada comprende un material calcificado obtenido de algunos crustáceos decápodos que incluyen el grupo de los cangrejos de río, y, en particular, de crustáceos del género *Cherax*. En una realización particularmente preferida, el material calcificado se obtiene del cangrejo de río *C. quadricarinatus*. El origen anatómico más preferido del material calcificado citado es el órgano gastrolito. Alternativamente, el material calcificado puede obtenerse del exoesqueleto del crustáceo, preferiblemente del exoesqueleto desechado después de la muda (exuvia). El material calcificado que deriva del crustáceo puede estar presente en las composiciones de la presente invención en cualquier forma física adecuada para administración a seres humanos o a animales necesitados de ello. En una realización, los gastrolitos o el material procedente del exoesqueleto pueden prepararse muy sencillamente empleando medios de limpieza de dicho material en la forma física en la que haya sido recolectado (p. ej., gastrolitos intactos, o fragmentos grandes de los mismos). Más típicamente, sin embargo, el material calcificado se preparará reduciendo a polvo por molienda el gastrolito o las piezas del exoesqueleto.

La composición administrable por vía oral de la presente invención está en una forma farmacéutica sólida, en forma de una suspensión líquida o en la forma de un gel.

Preferiblemente, la composición dministrable por vía oral de la presente invención, , se prepara como una forma farmacéutica sólida. Así, en el caso del gastrolito molido o del que deriva del exoesqueleto, el polvo puede emplearse para llenar cápsulas o comprimirse, o configurarse de otro modo en comprimidos. Otras formas farmacéuticas sólidas adecuadas incluyen polvos, granulados, sobres, trociscos y pastillas. Mientras que, en el caso de algunas de las formas farmacéuticas sólidas citadas, el ACC y la matriz orgánica asociada constituyen la mayor parte del material (junto con cantidades menores de componentes inorgánicos), dicha forma farmacéutica comprenderá además, normalmente, uno o más excipientes, como es bien sabido en la técnica. Como ejemplos de excipientes se incluyen, pero no se limitan a diluyentes (p. ej., celulosa microcristalina, almidón pregelatinizado), aglutinantes (p.ej., carbopol, povidona, goma de xantano), cargas (p.ej., lactosa), lubricantes (p.ej., estearato magnésico, ácido esteárico, estearil fumarato sódico), agentes de deslizamiento (p.ej., talco, dióxido de silicio coloidal), y agentes de desintegración (p.ej., ácido alginico, carboximetilcelulosa, carboximetil almidón, croscarmelosa sódica, almidón glicolato sódico). Ha de apreciarse también que la matriz orgánica del ACC estable puede actuar también, en ciertas circunstancias, como un aglutinante intrínseco.

Pueden fabricarse formas farmacéuticas sólidas tales como comprimidos o cápsulas duras, mediante diversos métodos diferentes, que son bien conocidos en la técnica y que incluyen compresión directa utilizando un punzón de compresión. Como alternativa a la compresión directa, el ingrediente activo y los excipientes pueden combinarse mezclando en seco y sometiendo después a granulación en seco antes de realizar la compresión. Otro método alternativo es el de utilizar granulación en húmedo, en la que se combinan por lo menos algunos de los excipientes junto con el ingrediente activo, y luego se vuelve a mezclar en `presencia de un líquido de granulación. Después de

la agregación de los diversos polvos, los agregados (es decir, los gránulos) se seleccionan por tamaño, por tamizado, o se muelen y se secan.

Pueden prepararse mezclas de formulaciones sólidas para incorporar en cápsulas (tales como cápsulas blandas de gelatina), mezclando en seco o mediante granulación en húmedo o en seco antes de introducir en dichas cápsulas.

- 5 En otras realizaciones preferidas, el material calcificado puede prepararse también en la forma farmacéutica de suspensión líquida o gel administrable por vía oral. En el caso de suspensiones líquidas, además del ingrediente activo (es decir, el ACC y los constituyentes de su matriz orgánica asociados), la formulación puede contener también una diversidad de otros excipientes líquidos o sólidos que incluyen, pero no se limitan a agentes emulsionantes (p.ej., carbómero, alcohol cetílico, gelatina), disolventes (p.ej., agua, aceite vegetal, glicerina),
10 agentes saborizantes (p.ej. vainillina, ácidos de frutas, mentol), edulcorantes (p.ej., sacarosa, fructosa, aspartamo, sacarina) y tampones..

Puede obtenerse una información adicional con respecto a la preparación de formas farmacéuticas sólidas, líquidas y de gel que son adecuadas para uso en la presente invención, de cualquier trabajo estándar de referencia farmacéutica, tal como la publicación Remington's Pharmaceutical Science (Martin E. W. [1995], Mack Publishing
15 Company, 19ª ed.).

Las composiciones administrables por vía oral que comprenden carbonato cálcico amorfo estable, descritas anteriormente en la presente memoria y que se describen con mayor detalle más adelante en esta memoria, pueden ser utilizadas como aditivos o suplementos alimenticios, con objeto de aumentar la cantidad de calcio de la dieta ingerido por un ser humano o un animal en las materias alimenticias regulares. En otra realización, las
20 composiciones de la presente invención pueden ser utilizadas también terapéuticamente, para el tratamiento de condiciones médicas asociadas con niveles inferiores a los normales de calcio en sangre, tejidos o esqueleto, o que, por otra parte, pueden mejorarse mediante la administración de calcio. Tales condiciones incluyen, pero no se limitan a osteoporosis, reparación ósea después lesiones, osteomalacia e hipocalcemia. En esta memoria se describe también un método para optimizar la recolección de gastrolitos procedentes de cangrejos de río, en donde
25 dicho método comprende las etapas de:

- a) seleccionar cangrejos de río que tienen pesos dentro de un intervalo predeterminado;
- b) monitorizar el desarrollo de gastrolitos utilizando análisis digital de imágenes de rayos X ;
- c) opcionalmente, inducir la formación de gastrolitos por medios fisiológicos y endocrinológicos;
- d) calcular un Índice de Mineralización de la Muda (MMI), para cada cangrejo de río, en donde el MMI es la
30 razón de la anchura del gastrolito con respecto a la longitud del carapacho; y
- e) seleccionar, para recolectar, aquellos cangrejos de río que tienen un MMI mayor que un valor predeterminado, lo que indica que el crustáceo está acercándose a su muda (aproximadamente 2 días) y que el gastrolito ha alcanzado su contenido máximo de calcio.

La fase óptima de inducción de inducción de la formación de gastrolitos, mencionada anteriormente en esta
35 memoria, puede comprender varios procedimientos operatorios bien conocidos en la técnica, tales como la manipulación del complejo de la glándula sinuosa orgánica X y/o la regulación del nivel de ecdisteroides.

En el caso del *C. quadricarinatus*, el intervalo de pesos predeterminado de la etapa (a) es 25-80 g, y el valor del MMI predeterminado es 0,1.

En otra realización del método anteriormente definido para optimizar la recolección de gastrolitos de cangrejos de
40 río, dicho método comprende las etapas de :

- a) seleccionar cangrejos de río que tienen pesos dentro de un intervalo predeterminado;
- b) monitorizar el desarrollo de gastrolitos utilizando representación óptica digital de rayos X;
- c) opcionalmente, inducir la formación de gastrolitos por medios fisiológicos y endocrinológicos;
- d) obtener una imagen digital corregida del ruido de fondo, procedente de la imagen de rayos X sin tratar,
45 obtenida en la etapa (b), y estimar según ella el número de días que quedan hasta el desarrollo óptimo de los gastrolitos;
- e) clasificar los cangrejos de río según la fase de desarrollo de los gastrolitos, sobre la base del estimado de tiempo producido en la etapa (d); y
- f) seleccionar, para recolectar, aquellos cangrejos de río clasificados en la etapa (e) como que han
50 desarrollado óptimamente gastrolitos.

También se describe en esta memoria un procedimiento de preparación de una composición administrable por vía oral que comprende carbonato cálcico amorfo estable, en donde dicho procedimiento comprende las etapas de recolectar gastrolitos procedentes de cangrejos de río, moler dichos gastrolitos hasta obtener un polvo, y emplear dicho polvo para preparar una forma farmacéutica administrable por vía oral. En una realización predeterminada de este aspecto, la etapa de recolección de los gastrolitos se lleva a cabo utilizando un análisis digital de rayos X según se ha descrito anteriormente en esta memoria.

En la presente memoria se describe también un método para emplear como suplemento de la ingestión oral de calcio en sujetos necesitados de dicho empleo de suplemento, en donde dicho método comprende la administración oral de una composición que comprende ACC estable de origen de un crustáceo o, alternativamente, producido por síntesis, con componentes específicos de matriz incluidos para estabilizar el mineral de otro modo metaestable. Tal suplemento puede ser beneficioso como parte de un régimen preventivo, por ejemplo, con objeto de prevenir el comienzo de osteoporosis o de patologías similares.

En esta memoria se describe también un método para tratar una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en osteoporosis, reparación de huesos después de lesiones, osteomalacia, hipocalcemia y otras patologías óseas, en donde dicho método comprende la administración oral de una composición que comprende ACC estable.

Todo lo anteriormente expuesto y otras características y ventajas de la presente invención serán comprendidas adicionalmente con los ejemplos limitativos y no limitativos que siguen, de realizaciones preferidas de la misma, y de los dibujos que se acompañan.

Descripción breve de los dibujos

Figura 1: representa los resultados de un análisis de difracción de rayos X de gastrolitos y de cutículas de cangrejos de río, tomados en diversas fases de la muda.

Figura 2: representa los espectros FTIR de muestras de gastrolitos de cangrejos de río (gastrolitos tanto mineralizados como descalcificados) y de cutículas (muda y premuda).

Figura 3: es una imagen digital de rayos X que representa el tamaño de los gastrolitos de cangrejos de río en diferentes fases de la muda.

Figura 4: compara gráficamente el Índice de Mineralización de la Muda (MMI) y las concentraciones en sangre de ecdisonas como medios de validación del uso de MMI para determinar el punto óptimo en el ciclo de muda para recolectar gastrolitos.

Figura 5: es una fotografía de un gel de SDS-PAGE que expone el perfil de proteínas de la matriz extracelular del gastrolito de cangrejos de río. La calle indicada en el lado izquierdo (CB) fue teñida con azul de Coomassie, mientras que la calle del lado derecho (SA) fue teñida con el colorante "Stains all".

Figura 6: representa esquemáticamente el método de recolección de gastrolitos de cangrejos de río que se describe en esta memoria.

Figura 7: ilustra esquemáticamente las diversas fases del método actualmente descrito para la toma automática de decisiones con respecto a la recolección de gastrolitos basada en la representación óptica digital de rayos X (DXI).

Los ejemplos que siguen se proporcionan con fines de ilustración y con objeto de explicar y describir más particularmente la presente invención. La presente invención, no obstante, no se limita a las realizaciones particulares descritas en esos ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Análisis químico de gastrolitos de cangrejos de río

Cuando sus gastrolitos alcanzan el máximo tamaño, cerca del tiempo de la muda, los animales (de la especie de cangrejos de río *Cherax quadricarinatus*) fueron diseccionados y recolectados los gastrolitos. Los gastrolitos se lavaron después con agua, se secaron al aire y se almacenaron en un frigorífico hasta su empleo posterior. 10 g de los gastrolitos de cangrejo de río lavados y secos se prepararon después para realizar el análisis químico total.

El análisis químico se llevó a cabo utilizando los métodos que siguen: Los análisis se realizaron utilizando fotometría de llama de Plasma Copulado Inductivamente (ICP) y espectrofotometría UV. El contenido de humedad se determinó por calentamiento a 200°C. El contenido de carbonato se determinó mediante la pérdida de peso de la muestra por calentamiento a 900°C, debida al desprendimiento de dióxido de carbono.

Los resultados de los análisis químicos se exponen en la tabla que sigue:

El analito	Tanto por ciento en peso
Carbonato cálcico (CaCO ₃)	57,5
Carbonato (unido en caliente a Ca)	7
Humedad	13
Materia orgánica (biológica)	11
Fósforo (P ⁺³)	(2,2)
Como ortofosfato (P ₂ O ₅)	5,3
Magnesio (Mg ⁺²)	0,7
Sodio (Na ⁺¹)	2,3
Cloro (Cl ⁻¹)	0,01
Azufre (S ⁻²)	<0,01
Flúor (F ⁻¹)	n.d.
Potasio (K ⁺¹)	1,9
Estroncio (Sr ⁺²)	1,28
Total	100

Ejemplo 2

Análisis adicional de los gastrolitos de cangrejo de río

- 5 La composición de los gastrolitos y de las cutículas del cangrejo de río (*C. quadricarinatus*; preparados según se describe en el Ejemplo 1) se caracterizó adicionalmente utilizando un difractómetro de ratos X Philips 1050/70, de polvos, con la línea K α del cobre ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$). Los resultados de un análisis típico se exponen en la Figura 1. Se muestran cuatro difractogramas separados sobre un solo par de ejes. Las tres líneas superiores corresponden a muestras de cutícula tomadas (de arriba abajo) en las fases entre mudas (intermuda) antes de la muda (premuda) y después de la muda (posmuda). La línea más baja corresponde a una muestra de un gastrolito. La característica más notable de estos difractogramas es la ausencia de señal alguna que pudiera atribuirse a carbonato cálcico cristalino. Los picos anchos situados en aproximadamente $2\theta=30^\circ$ y en aproximadamente $2\theta=45^\circ$ son debidos a ACC, mientras que el pico situado en $2\theta=19^\circ$ se atribuye a quitina.

- 15 El análisis FTIR se llevó a cabo empleando un instrumento Bruker equinox 55. Los resultados del análisis FTIR de la cutícula y del material de gastrolito se muestran en la Figura 2. Las cuatro líneas, de la más alta a la más baja, corresponden a las siguientes muestras: Cutícula, premuda; Cutícula, muda; Gastrolito (mineralizado) y Gastrolito (descalcificado). Los picos que se observan en los espectros indican que la especie mineral predominante en las muestras es ACC (banda ancha de absorción centrada en 1500 cm^{-1} y pico en 870 cm^{-1}). La mayoría de los otros picos se debe a la presencia de los otros componentes de la matriz extracelular tales como quitina y diversas proteínas de la matriz.

- 20 La Figura 5 muestra un gel de SDS-PAGE (teñido con azul de Coomassie [CB] y "Stains All" [SA]) que representa el perfil de una proteína de la matriz extracelular del gastrolito del cangrejo de río. El procedimiento operatorio de la electroforesis se llevó a cabo según se indica en la publicación "Gel electrophoresis essential data" de D. Patel, John Wiley and Sons, 1994. Puede apreciarse que la matriz orgánica comprende una mezcla de proteínas. Las bandas más prominentes visualizadas por tinción con plata, tienen pesos moleculares de, aproximadamente, 218, 184, 138, 25 129, 71, 66, 55, 51, 43, 30, 25 y 17 kDa.

Ejemplo 3

Recolección de ACC estable procedente de cangrejo de río.

Se recolecta ACC estable asociado con una matriz orgánica (en forma de gastrolitos), de los gastrolitos y/o de los exoesqueletos de cangrejos de río por medios del esquema que se muestra en la Figura 6.

Utilizando el método de determinación de crecimiento de cangrejos de río desarrollado por el laboratorio de los inventores [Pames, S and Sagi, A. (2002) *Aquacult. Eng.* 26:251-262] en el que se emplea un sustrato similar a una alga marina, se seleccionan pesos de los cangrejos de río entre 30 y 40 g clasificándolos mediante dispositivos de graduación o trampas ajustadas al tamaño. En condiciones intensivas, el cangrejo de río comienza a alcanzar esos tamaños entre 50 a 70 días desde el comienzo del período de crecimiento [Manor, P. et al., (2002) *Aquacult. Eng.* 26:263-276] Después de realizar la selección por tamaño, los cangrejos de río son monitorizados para determinar el desarrollo de gastrolitos utilizando una representación óptica digital de rayos X (DXI) ((70kV a 7 mA/0,05 s,) y el Índice de Mineralización de la Muda (MMI, véase más adelante) desarrollado por los inventores. De conformidad con el esquema de recolección, los cangrejos individuales que alcanzan el umbral de 30-40 g son clasificados mediante representación óptica de rayos X con objeto de seleccionar los animales que tienen un MMI mayor que 0,1, cuyo valor es indicativo de animales que se aproximan a la muda. Ya que este método selecciona la máxima capacidad de producción natural de ACC en el cangrejo de río, en la muda, permite al mismo tiempo el rendimiento más alto de gastrolitos naturales y de productos de cáscara blanda.

La Figura 3 muestra imágenes de rayos X de cangrejos de río en diferentes fases de la muda, indicándose el desarrollo de los gastrolitos por flechas. Los días 0-11 representan las fases de premuda y de crecimiento de gastrolitos. La ecdisis ocurre entre el día 11 y el día 12. Los días 12-17 representan la fase de posmuda y la degradación del gastrolito.

Cálculo del Índice de Mineralización de la Muda (MMI)

El MMI, que ha sido desarrollado en el laboratorio de los inventores, se basa en la visualización del gastrolito empleando una unidad de rayos X dental (Instrumentarium Imaging, modo: Focus DC) y evaluación mediante el empleo de un sensor digital de Rayos X (Schick Technologies). La anchura del gastrolito se calcula por medio de una cuadrícula metálica calibrada (62 mm) que se coloca sobre la imagen. La calibración de la longitud se realiza utilizando el soporte lógico (software) CDR (Schick Technologies). La longitud del carapacho se mide utilizando un calibre y después se calcula el MMI como la razón entre la anchura del gastrolito y la longitud del carapacho.

La precisión fisiológica de este método se determinó por medio del procedimiento operatorio siguiente: .se determinó la 20-hidroxiecdisona (la hormona de la muda) existente en la hemolinfa que circula, retirando 100 μ l de hemolinfa del tercer segmento de la cola después de limpieza con etanol. Se produjo hemorragia usando una aguja de 0,65x32 mm, y se recogió la sangre en un tubo que contenía 300 μ l de metanol. Se llevó a cabo un radioinmunoensayo (RIA) con objeto de evaluar los niveles de ecdisona. Los resultados de esta determinación hormonal y la correlación con el MMI en todo el ciclo de muda se ilustran gráficamente en la Figura 4. En esta Figura los valores del MMI calculados están representados por los puntos de datos de cuadrados cerrados, mientras que los niveles de la 20-hidroxiecdisona están representados por los círculos cerrados.

Método computerizado para la toma automática de decisiones con respecto a la recolección de gastrolitos, basado en el DXI:

Si bien la decisión con respecto a la recolección de gastrolitos puede tomarse según como se describe anteriormente (es decir, obteniendo manualmente el MMI), un enfoque alternativo consiste en utilizar un programa de ordenador desarrollado por los inventores. Este programa es capaz de realizar el tratamiento de imágenes digitales de rayos X del gastrolito en crecimiento y decidir automáticamente cuando tendrá lugar la muda. En su forma actual el software está preparado para que funcione en un medio ambiente de trabajo de Matlab.

Como indica la Figura 7, el programa requiere la entrada de dos parámetros de usuario: el nombre de una imagen digital de rayos X, y una medida del tamaño del animal (p.ej., la longitud del carapacho en mm o el peso del animal). En primer lugar, el programa analiza la imagen digital utilizando un análisis matemático basado en la integración de la intensidad y la modificación del contraste de potencia. Después, el programa decide, empleando técnicas matemáticas variables basadas en normalización, función no lineal, si el gastrolito es pequeño o no está presente, o si es de tamaño mediano o grande.

Antes de intentar calcular el tamaño del gastrolito y de construir un modelo matemático que estipule cuando tendrá lugar la muda, se necesitó un modelo de lo que "parece" el gastrolito. La integración de la intensidad de las imágenes ha proporcionado la solución que se necesitaba. En este proceso, las regiones de mayor intensidad, regiones de mayor adsorción (blancas) se integran en un valor único, mientras que las regiones de menor intensidad, regiones de menor adsorción (negro grisáceo) se consideran ruido de fondo y se desechan. El modelo matemático actual incorporado en el software es capaz de identificar con claridad las fases de desarrollo de los gastrolitos.

Después del análisis de la imagen digital, se toma una decisión que concierne a la rapidez con la que ha progresado el proceso de crecimiento de los gastrolitos del cangrejo de río. Para este fin, el proceso ha sido dividido en tres fases: Fase 1, o bien no hay gastrolito o hay un gastrolito muy pequeño e insignificante; Fase 2 hay un gastrolito de tamaño mediano, con la posibilidad de un crecimiento adicional de 2-7 días; y Fase 3, en donde el gastrolito ha alcanzado o casi alcanzado el tamaño máximo y quedan a lo sumo 3 días hasta la muda. Con objeto de conseguir la máxima exactitud, se emplearon técnicas matemáticas que difieren, basadas en funciones no lineales, que

normalizaban los datos sin tratar, aumentando las diferencias de las intensidades integradas existentes entre las fases que diferían, al tiempo que hacían disminuir las diferencias de las intensidades integradas de las propias fases. Empleando este método, se hizo posible diferenciar entre la fase 1 y la fase 2 o la fase 3, después de lo cual, si era necesario, se determinaron la fase 2 o la fase 3.

5 Ejemplo 4

Preparación de comprimidos que comprenden ACC estable como ingrediente activo – formulación no 1 de comprimidos

10 Se identifican gastrolitos mediante la técnica de formación de imágenes de rayos X descrita anteriormente en esta memoria en el Ejemplo 3. Cuando los gastrolitos alcanzan su tamaño máximo, en la proximidad del tiempo de la muda, los animales son diseccionados y se recolectan los gastrolitos. Después los gastrolitos se lavan con agua, se secan al aire, y se almacenan en un frigorífico hasta su utilización posterior.

15 Los gastrolitos almacenados se muelen y luego se tamizan. Se pesan después gránulos de 50-100 mallas ó 100-500 mallas y se forman comprimidos que contienen o bien 1 g o bien 1,5 g de gránulos, utilizando una máquina de comprimir de laboratorio Carver (Modelo C, Fred S. Carver Inc.) que operaba a una presión de 3 toneladas métricas o 4 toneladas métricas, sin excipientes.

Ejemplo 5

Preparación de comprimidos que comprenden ACC estable como ingrediente activo – formulación no. 2 de comprimidos

20 Se preparan comprimidos según se describe en el Ejemplo 4, pero con la adición o bien de almidón carboximetilado o bien de carboximetilcelulosa como agente de desintegración. Se mezcla 1,0 g de ACC molido (100-500 mallas) con el agente de desintegración escogido, en una concentración final de 4 a 6% en peso, y seguidamente se comprime como se ha descrito anteriormente en esta memoria en el Ejemplo 4. Sumergiendo en agua doble destilada los comprimidos que contienen el agente de desintegración, dichos comprimidos se desintegran rápidamente.

25 Ejemplo 6

Preparación de cápsulas que comprenden ACC estable como ingrediente activo

Se obtienen cápsulas mediante preparación manual de cápsulas utilizando cápsulas duras de gelatina vacías o cápsulas de celulosa procedente de algas, de CAPSUGEL Quality®: 0,6 g de polvo de gastrolito molido de tamaño de grano de 100-500 mallas ó 0,65 g de 50-100 mallas, se encapsulan en cada cápsula.

30 Ejemplo 7

Preparación de ACC estable para uso como suplemento alimenticio

Los gastrolitos se lavan con agua, se secan al aire, se muelen y luego se tamizan: Se añaden gránulos de >500 mallas a yogur natural y/u otro producto alimenticio consumible de viscosidad similar o superior destinado a consumo humano.

35 Aun cuando han sido descritas realizaciones específicas de la invención con fines de ilustración, ha de entenderse que la invención puede ser puesta en práctica por personas expertas en la técnica con muchas modificaciones, variaciones y adaptaciones, sin apartarse del alcance de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 1.- Una composición administrable por vía oral que comprende carbonato cálcico amorfo (ACC) estable, presente en asociación con una matriz orgánica que comprende quitina, y proteínas que tienen pesos moleculares de aproximadamente 218, 184, 138, 129, 71, 66, 55, 51, 43, 30, 25, 17 kDa, determinados por análisis SDS-PAGE, en donde la composición está en una forma farmacéutica sólida, en la forma de una suspensión líquida o en la forma de un gel.
- 2.- La composición administrable por vía oral según la reivindicación 1, en donde el ACC se caracteriza, por análisis FTIR por presentar una banda de absorción ancha centrada en 1500 cm^{-1} y un pico en 870 cm^{-1} , indicativo de ACC, y un pico en 1650 cm^{-1} , indicativo de quitina.
- 3.- La composición administrable por vía oral según la reivindicación 2, en donde el ACC estable se caracteriza por tener un espectro de FTIR tal como muestra la Figura 2.
- 4.- La composición administrable por vía oral según la reivindicación 1, en donde el ACC estable se caracteriza por originar figuras de difracción de rayos X que presentan picos anchos centrados en aproximadamente $2\theta=30^\circ$ y en aproximadamente $2\theta=45^\circ$, indicativo de ACC, y un pico en aproximadamente $2\theta=19^\circ$, indicativo de quitina, estando dichas figuras desprovistas esencialmente de señal alguna indicativa de carbonato cálcico cristalino.
- 5.- La composición administrable por vía oral según la reivindicación 1, en donde el ACC estable se caracteriza por presentar un espectro de difracción de rayos X como se expone en la Figura 1.
- 6.- La composición administrable por vía oral según la reivindicación 1, en donde el ACC se obtiene de un crustáceo decápodo.
- 7.- la composición administrable por vía oral según la reivindicación 6. en donde el crustáceo decápodo es del género *Cherax*.
- 8.- La composición administrable por vía oral según la reivindicación 7, en donde el crustáceo decápodo es *Cherax quadricarinatus*.
- 9.- La composición administrable por vía oral según la reivindicación 8, en donde el ACC se obtiene a partir del gasterolito de *C. quadricarinatus*.
- 10.- La composición administrable por vía oral según la reivindicación 1, en donde la forma farmacéutica sólida se selecciona del grupo que consiste en comprimidos, cápsulas, polvos, granulados, trociscos y pastillas.
- 11.- La composición administrable por vía oral según la reivindicación 10. en donde la forma farmacéutica sólida es un comprimido obtenido por compresión directa.
- 12.- Una composición administrable por vía oral según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para uso como suplemento de la ingesta de calcio oral en un sujeto.
- 13.- Uso de carbonato cálcico amorfo (ACC) estable, en donde dicho ACC está presente en asociación con una matriz orgánica que comprende quitina y proteínas que tienen pesos moleculares de aproximadamente 218, 184, 138, 129, 71, 66, 55, 51, 43, 30, 25, 17 kDa, determinados por análisis SDS-PAGE, para la preparación de una composición administrable por vía oral, en donde la composición está en una forma farmacéutica sólida, en la forma de una suspensión líquida, o en la forma de un gel.
- 14.- El uso según la reivindicación 13, en donde la composición está en una forma farmacéutica sólida que es una cápsula o un comprimido.
- 15.- El uso según la reivindicación 13 ó 14, en donde la composición es para ser empleada en un método para tratar una patología seleccionada del grupo que consiste en osteoporosis, reparación ósea después de lesiones. osteomalacia, hipocalcemia y otras patologías óseas, en donde dicho método comprende la administración oral de dicha composición.
- 16.- El uso según la reivindicación 13 ó 14, en donde la composición es un suplemento alimenticio.
- 17.- El uso según la reivindicación 13 ó 14, en donde la composición es una composición farmacéutica.
- 18.- Un suplemento alimenticio que comprende una composición administrable por vía oral, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 19.- Preparación farmacéutica que comprende una composición administrable por vía oral, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

20.- Preparación farmacéutica según la reivindicación 19, para uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en osteoporosis, reparación ósea después de lesiones, osteomalacia, hipocalcemia y otras patologías óseas.

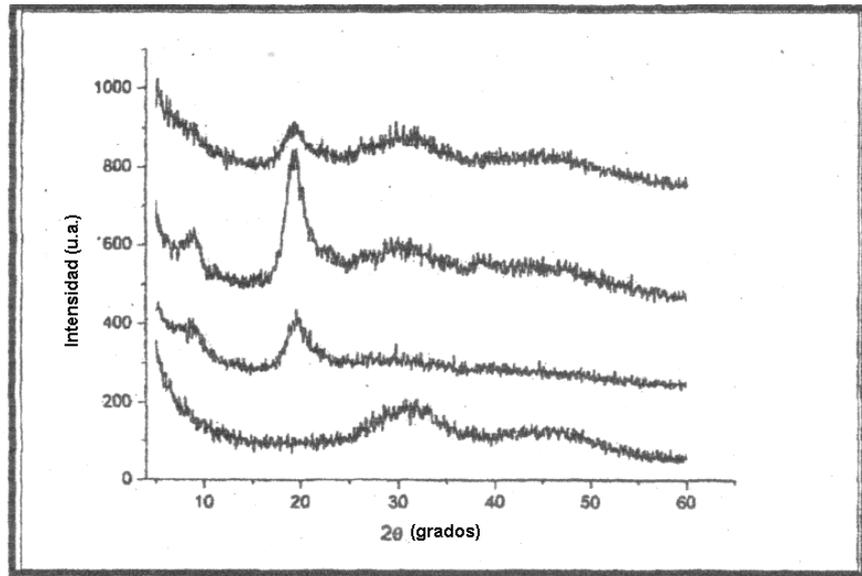


Fig. 1

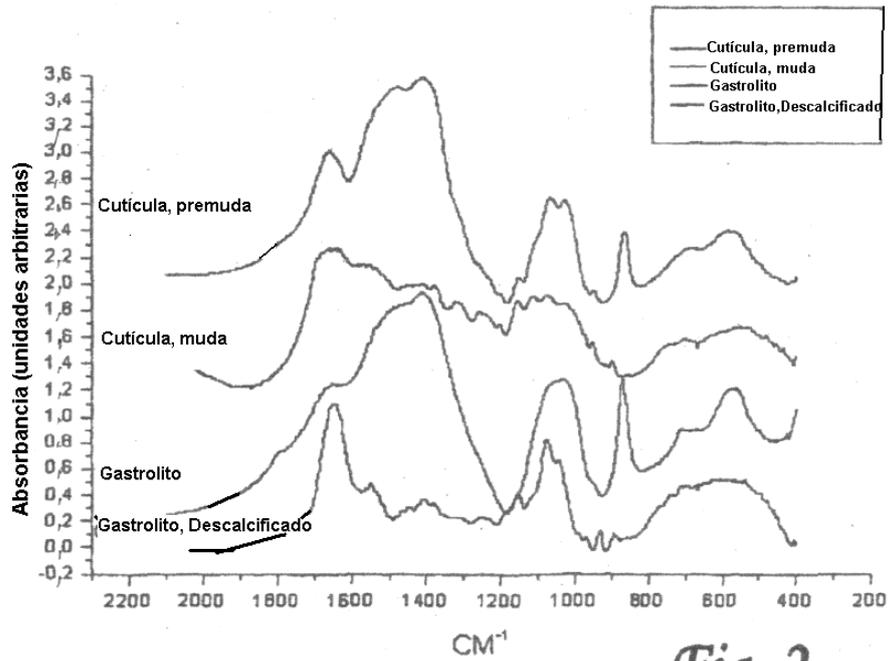


Fig. 2

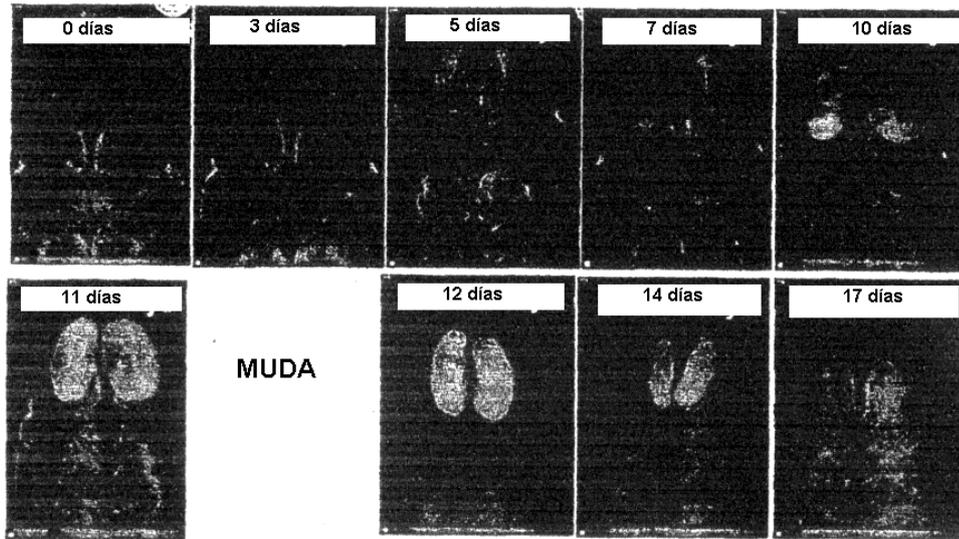


Fig. 3

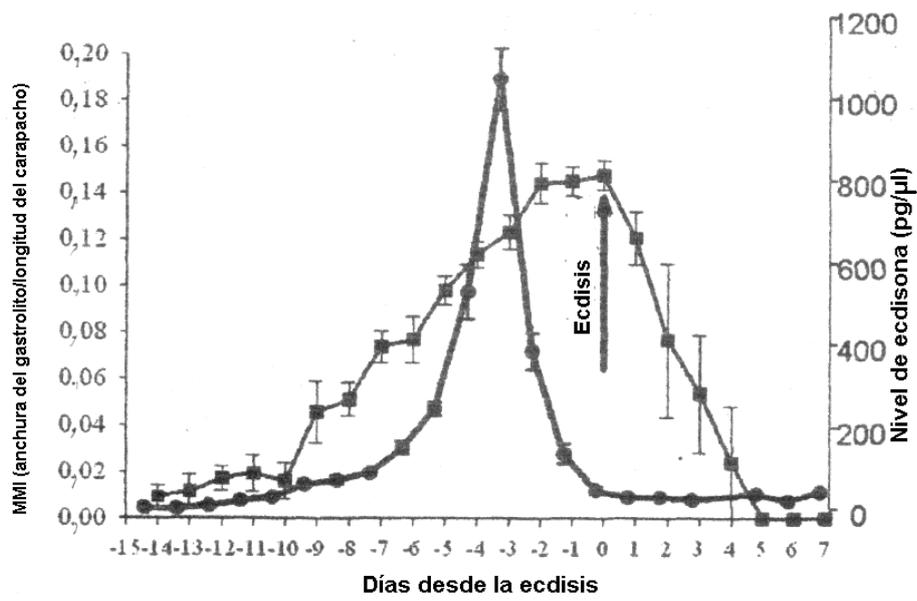


Fig. 4

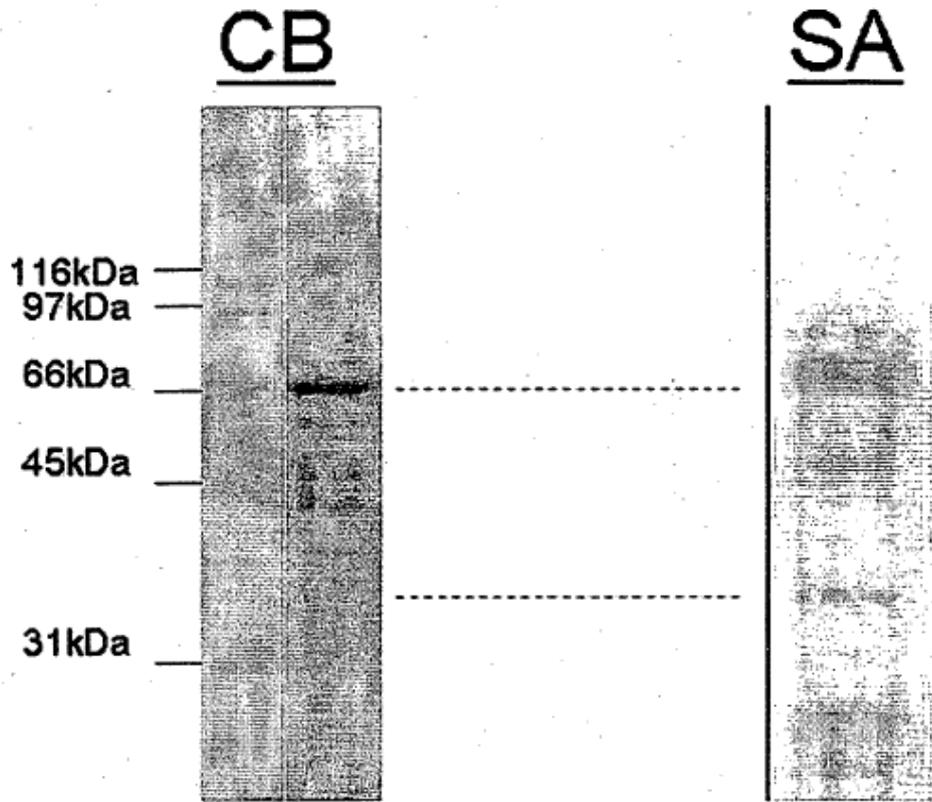


Fig. 5

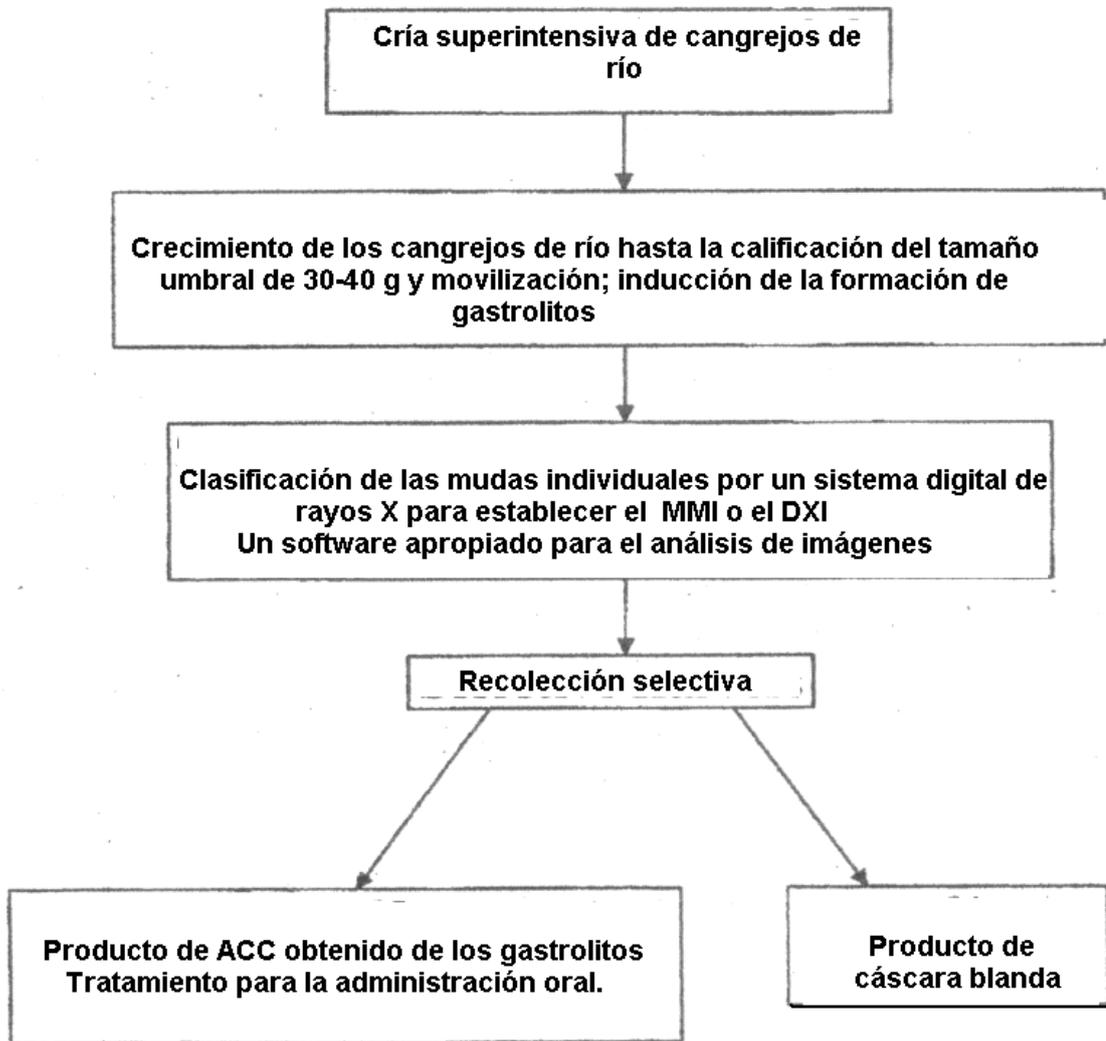


Fig. 6

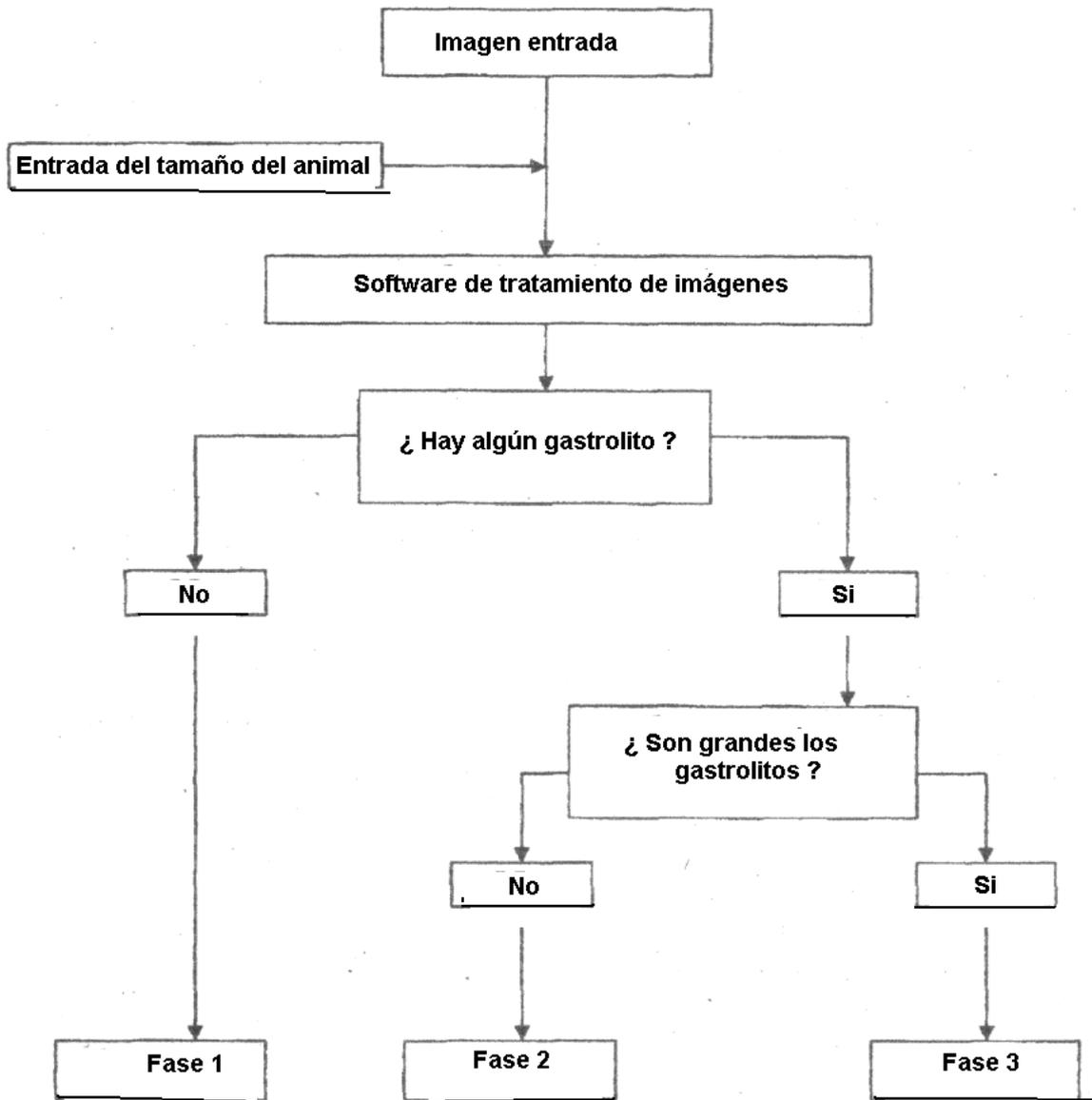


Fig. 7