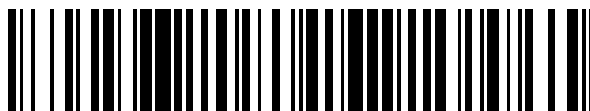


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 158**

51 Int. Cl.:

A61L 27/56 (2006.01)

A61L 27/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2010** **E 10726639 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015** **EP 2421570**

54 Título: **Compuesto bioactivo y procedimiento para la producción del compuesto bioactivo**

30 Prioridad:

24.04.2009 PL 38787209

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

17.06.2015

73 Titular/es:

**MEDICAL INVENTI SPÓLKA AKCYJNA (100.0%)
16 Wincentego Witosa Av.
20-315 Lublin, PL**

72 Inventor/es:

**BELCARZ, ANNA;
GINALSKA, GRAZYNA;
SLÓSARCZYK, ANNA y
PASZKIEWICZ, ZOFIA**

74 Agente/Representante:

DE PABLOS RIBA, Juan Ramón

ES 2 538 158 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

COMPUESTO BIOACTIVO Y PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DEL COMPUESTO BIOACTIVO

5 La presente invención se refiere a un compuesto bioactivo y un procedimiento para la producción del compuesto bioactivo.

10 Durante mucho tiempo se han usado materiales cerámicos como matrices para el relleno de defectos óseos en ortopedia y cirugía maxilofacial. Esta denominada biocerámica incluye materiales a base de fosfatos de calcio, especialmente hidroxiapatitas (HAp) y whitlockita ((β -TCP- β -fosfato tricálcico) y también materiales bifásicos (BCP) compuestos por HAp y TCP. Otros materiales cerámicos usados como los implantables se basan en óxidos de aluminio, circonio y titanio y carbonato de calcio (exoesqueleto de coralina).

15 La biocerámica de HAp es extremadamente importante entre los materiales implantables modernos. Se aplica ampliamente en cirugía maxilofacial, para la ampliación del borde atrofiado del hueso del proceso alveolar, para el relleno de defectos óseos después de hemisecciones, radectomías, amputaciones de la raíz del diente o después de extirpaciones de quistes, en estomatología en el tratamiento de los bolsillos gingivales profundos, en ortopedia para el relleno de defectos óseos resultantes de un trauma o neoplasias y durante la reconstrucción de articulaciones de cadera y rodilla. La hidroxiapatita es un material preferido por su similitud
20 química y mineralógica a compuestos inorgánicos de los huesos y los dientes y por su falta de efecto citotóxico y oncogénico en el organismo humano. La biocerámica de HAp también está caracterizada por una elevada osteoconductividad y biocompatibilidad con el tejido óseo y el cartílago. El contenido de calcio y fosfato permite el efecto beneficioso de la hidroxiapatita en el proceso de curación y regeneración de los huesos. Las preparaciones de hidroxiapatita aplicadas con fines médicos tienen normalmente una estructura
25 porosa y se usan en forma de gránulos o matrices.

La biocerámica de HAp, para las características mencionadas, es un buen material implantable para la sustitución de defectos óseos. Su porosidad, en el caso del tratamiento de dichos defectos, es una característica beneficiosa porque - después de la implantación - los poros del material crecen en exceso por
30 el tejido óseo vivo, lo que contribuye a crear una conexión biológica más estrecha entre el implante y el hueso (Lu J.X. y col., J. Mater. Sci. Mater. Res. 10, 111-120, 1999; Liu D.M., Sci. Forum 250, 183-208, 1997). Una condición importante de la conexión duradera entre el implante y tejido óseo, obligatoria para una colocación eficaz de HAp en un defecto, es una dimensión apropiada de los macroporos abiertos (mínimo 100 μ m), permitiendo que el tejido vivo crezca. Los macroporos contribuyen a la osteogénesis facilitando los
35 osteoblastos y los iones en los gránulos porosos (Bignon A. y col., J. Mater. Sci. Mater. Med. 14, 1089-97, 2003; Hulbert S.F. y col., J. Biomed. Mater. Res. 6, 347-374, 1972) o matrices. Además, la microestructura macroporosa de los implantes es una condición para la neovascularidad (Henno S. y col., Biomaterials 24, 3173-3181, 2003; Freyman T.M. y col., Prog. Mater. Sci. 46, 273-282, 2001; Jones J.R. y col., J. Sol-Gel Sci. Tech. 29, 179-188, 2004). La microporosidad (poros de varios micrómetros) - característica también de la
40 cerámica de HAp - también tiene una función importante en la cicatrización de los implantes, ya que los microporos proporcionan puntos de unión para los osteoblastos (Bignon A. y col., J. Mater. Sci. Mater. Med. 14, 1089-1097, 2003) y aumentan el área superficial para la adsorción de proteínas (Hing K.A. y col., J. Mater. Sci. Mater. Med. 16, 467-475, 2005). Hay informes sobre los efectos negativos de las partículas

pequeñas de polvo de hidroxiapatita. Algunos autores señalan que las partículas de 1 μm de tamaño pueden estimular los macrófagos para secretar el factor proinflamatorio - $\text{TNF}\alpha$ - estimulando de este modo el proceso inflamatorio en el sitio del implante. Las partículas de un tamaño de 15 μm no ejercen tal efecto dañino (Nadra I. y col., Arteriosclerosis 196, 98-105, 2008).

5

A pesar de las numerosas ventajas, los gránulos de HAp no son un material implantable perfecto. Por su friabilidad, demuestran la falta de la denominada manejabilidad quirúrgica y son difíciles de manejar y de mantener en los sitios quirúrgicos lo que conduce a una traslocación en el sitio de implantación. Los parámetros mecánicos de la cerámica de HAp, especialmente la porosa, tampoco son ventajosos. Se refiere tanto a los gránulos como matrices sinterizadas. Son muy frágiles y no lo suficientemente elásticos para convertirse en un material implantable satisfactorio. El módulo de Young para un hueso humano es aprox. 20 GPa mientras que para el material de HAp aproximadamente 5-10 veces mayor, lo que confirma la baja elasticidad de este material.

10

15

Hasta ahora, la investigación relativa a la mejora de los parámetros mencionados de hidroxiapatita cerámica se limita a su modificación por plastificación del polvo de hidroxiapatita usando una suspensión acuosa de curdlano, incubada a 40 $^{\circ}\text{C}$ (Patente de Estados Unidos 5132255). El procedimiento anterior permite obtener una composición plástica que, sin embargo, no es resistente a carga mecánica. Además, el uso de polvo compuesto por partículas de 1 μ de tamaño no permite obtener la porosidad en la microestructura compuesta obtenida. La modificación de este procedimiento, basado en el calentamiento de una masa de plástico obtenida a una temperatura de 800 $^{\circ}\text{C}$ o superior, conduce a la obtención de matrices duras (Patente de Estados Unidos 5132255). Los autores de la patente no dan los datos referentes a la tensión compresiva de dichas muestras preparadas, sin embargo, en vista de tal elevada temperatura de producción, es probable que las muestras estén privadas de la fracción biopolimérica calentada y evaporada, por lo tanto, carecen de plasticidad y elasticidad. Se elaboro un procedimiento similar de calentamiento que condujo a la obtención de matrices cerámicas para la composición de gránulos de fosfato de calcio con metilcelulosa como compuesto de unión, evaporándose durante la quema (Patente de Estados Unidos 6187046).

20

25

30

Otro concepto de combinación de los gránulos de cerámica en una masa compacta se refiere al pegamento de fibrina, conocido por sus propiedades estimulantes de la angiogénesis (Takei A. y col., In Vitro Cell Dev Biol Anim 31, 467-472, 1995). Se realizaron experimentos relevantes por - entre otros - Nakamura y col., (Biomaterials 19, 1901-1907, 1998 que cimentaron el producto de la descomposición térmica de hidroxiapatita con pegamento de fibrina y mostraron las propiedades osteogénicos de dicho compuesto obtenido. Sin embargo, no dieron la información relativa a su resistencia mecánica. Se realizaron experimentos similares por Abiraman S. y col. (Biomaterials 23, 3023-3031, 2002), que obtuvieron la composición del pegamento de fibrina y los gránulos de hidroxiapatita y la implantaron por vía intramuscular en ratones. Tampoco dieron información alguna sobre los parámetros mecánicos de sus compuestos. Sin embargo, cabe señalar que la evaluación a largo plazo (hasta 8 años después de la operación) de los efectos de la implantación en caso de un biomaterial compuesto por gránulos porosos de HAp y pegamento de fibrina mostró el buen crecimiento del tejido óseo en la estructura del implante (Fortunato G. y col., J. Cranio-Maxillofacial Surg. 25, 124-135, 1997).

35

40

Se realizaron otros experimentos referentes a la aplicación de pegamento de fibrina para combinar la

biocerámica en gránulos de fosfato de calcio relacionado con hidroxiapatita hechos de TCP (Le Nihouannen D. y col., Biomaterials 27, 2716-2722, 2006). Se descubrió que dicho compuesto preparado induce la mineralización de las fibrillas de fibrina. Sin embargo, los autores no dan la información relativa a las propiedades mecánicas del compuesto obtenido y la única información se refiere al sobrecrecimiento de Young por el hueso humano. El módulo de Young de la muestra recogida de los implantes en este caso fue aprox. 7 GPa (Le Nihouannen D. y col., J. Mater. Sci.: Mater. Med. 18, 225-235, 2007).

En caso del compuesto mencionado, su preparación no era tan beneficiosa ya que el pegamento de fibrina bifásico requería una esterilización previa separada de tanto el compuesto como la mezcla con gránulos de HAp antes de la implantación. Otra desventaja se refiere al período de polimerización relativamente largo. Estos factores afectan la evaluación crítica de los compuestos creados, especialmente que el riesgo de contaminación bacteriana postoperatoria del implante aumenta en tal caso.

La solicitud de patente Americana US5017627A1 desvela un material de compuesto para su uso en ortopedia basado en un polímero sintético. El documento proporciona un compuesto de una homo o copolioléfina que tiene un peso molecular medio en peso (Pm) mayor de 20.000 con hasta el 80 % en volumen de un sólido inorgánico particulado. La solución incluye compuestos que muestran los valores del módulo de Young dentro del intervalo de 2 GPa a 40 GPa. Estos valores son típicos para hueso compacto.

El objetivo de la presente invención es la preparación de un biomaterial implantable de elevada manejabilidad quirúrgica y parámetros mecánicos y biológicos óptimos, parecidos a los del hueso humano natural.

El objetivo se obtuvo por la creación de una nueva fórmula de compuesto de polisacárido de fosfato de calcio, que contiene gránulos porosos de fosfato de calcio y β -1,3-glucano, denominado adicionalmente curdlano, en las proporciones apropiadas.

El compuesto relacionado con la invención está caracterizado por que contiene β -1,3-glucano, denominado adicionalmente curdlano, y biocerámica de fosfato de calcio en forma de gránulos microporosos (HAp, HAp-TCP, TCP, HAp modificado) de tamaño: 0,1-1,0 mm y porosidad abierta: 50-70 %, donde los compuestos están en cantidades (gramos por 100 g de H₂O) de acuerdo con la proporción:

$$\frac{x}{y} = \frac{8,1 \div 25}{2 \div (0,0701x^2 - 5,8175x + 120,68)^{(*)}}$$

donde:

- x - masa del curdlano (en g por 100 g de agua)
- y - masa de los gránulos (en g por 100 g de agua)
- (*) - fórmula obtenida experimentalmente por el cálculo de la cantidad máxima de gránulos introducidos en el compuesto: $(0,0701x^2 - 5,8175x + 120,68)$

El curdlano, de acuerdo con la invención, sirve como un pegamento combinando los gránulos para obtener una composición compacta.

5 El compuesto, preparado de acuerdo con la invención, que posee parámetros biológicos y mecánicos mucho mejores en comparación con los gránulos de fosfato de calcio en solitario, se convierte en una nueva y buena generación de material implantable para el relleno de defectos óseos. El compuesto preparado puede cortarse en las dimensiones apropiadas usando una lanceta o un cuchillo. El compuesto seco (24 horas a 40 °C) no es susceptible a un sobrecrecimiento de moho y puede almacenarse durante al menos 12 meses
10 sin cambio en sus propiedades. El compuesto seco, después del remojo con líquido (agua, sal fisiológica, solución de gentamicina, solución de proteínas) durante 1-60 minutos (dependiendo de las dimensiones y la forma de la muestra) absorbe este, restaurando de este modo sus bajas propiedades dúctiles y puede almacenarse adicionalmente, si se esteriliza.

15 El procedimiento para la preparación del compuesto de fosfato de calcio--curdlano también es el objeto de la invención.

El procedimiento, de acuerdo con la invención, consiste en la idea de que la suspensión en agua de β-1,3-glucano, denominado adicionalmente curdlano, en una cantidad de 8,1 ÷ 25 g por 100 g de agua, se combina
20 con biocerámica de fosfato de calcio en forma de gránulos microporosos, con un tamaño de 0,1-1,0 mm y una porosidad abierta del 50-70 % (en un intervalo de 0,05-1,0 μm) y se somete a una mezcla precisa, además de que los compuestos se usan en las proporciones descritas en la fórmula:

$$\frac{x}{y} = \frac{8,1 - 25}{2 - (0,0701x^2 - 5,8175x + 120,68)^{(*)}}$$

25 donde:

x - masa del curdlano (en g por 100 g de agua)
y - masa de los gránulos (en g por 100 g de agua)

30 mientras que el efecto más beneficioso es cuando la masa de los gránulos marcada como "y" constituye el 95-100 % de la cantidad calculada a partir de la fórmula (*): $y = 0,0701x^2 - 5,8175x + 120,68$ y posteriormente la mezcla de compuestos escogidos se coloca en placas quimiorresistentes, batiendo cuidadosamente para evitar la introducción de burbujas de aire, se cierra y se calienta durante 5-30 minutos a una temperatura de 80 °C-100 °C.

35 La ventaja de esta invención es un procedimiento de fácil preparación del material implantable de compuesto hecho de fosfato de calcio y curdlano para rellenar los defectos óseos, que posee, de acuerdo con la invención, un valor ventajoso del módulo de Young y una buena manejabilidad y compacidad sin el riesgo de traslocación en el sitio de implantación. Tal compuesto es bioactivo porque contiene cerámica de fosfato de

calcio, que - después de la implantación - puede liberar los iones de calcio y fosfato en el entorno, sirviendo posteriormente como una fuente para la síntesis de una fase inorgánica nativa del hueso. El compuesto también está caracterizado por una buena compacidad debido a la microporosidad de la fase cerámica, que permite que la fase biopolimérica migre a los poros de los gránulos, uniendo de este modo toda la estructura del compuesto. El material se convierte beneficiosamente en plástico, gracias a lo cual puede ajustarse en cierta medida a la forma del defecto y sellar el sitio del implante-articulación ósea (la tensión compresiva para el compuesto fue del 20-42 %). El compuesto de fosfato de calcio-curdano, en caso de implante, aumentará la velocidad de la regeneración del tejido óseo vivo natural. Puede realizarse por interacciones mecánicas con bordes en el sitio del trauma y bioestimulación de la angiogénesis, proliferación celular y procesos de diferenciación.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención en más detalle.

Ejemplo I. El curdlano en una cantidad de 0,625 g se mezcló con 5 ml de agua desionizada y se combinó adicionalmente durante 10 minutos con 3 g de gránulos microporosos de HAp (mezcla de gránulos de 0,2-0,3 mm:0,5-0,6 mm en una proporción de 1:3). La porción mezclada cuidadosamente del compuesto se puso en tubos de vidrio cerrados (8 mm de diámetro) y se calentó durante 10 minutos a 95 °C. El compuesto se enfrió hasta temperatura ambiente, se extrajo de los tubos y se secó a 45 °C durante 24 horas. El módulo de Young para las muestras secas y humedecidas durante 1 hora en una solución salina fisiológica fue aprox. 0,8 GPa y 0,2 GPa, respectivamente. La tensión compresiva para estas muestras fue aprox. del 23 % y del 42 %, respectivamente, y la resistencia a la compresión aprox. 6 MPa y 0,3 MPa, respectivamente. El compuesto, en forma seca, se almacenó a temperatura ambiente y no se vio afectado por la colonización bacteriana o fúngica.

Ejemplo II. El curdlano en una cantidad de 0,625 g se mezcló con 5 ml de agua desionizada y se combinó adicionalmente durante 10 minutos con 3 g de gránulos microporosos de HAp-TCP (fracción de 0,2-0,3 mm). La porción mezclada cuidadosamente de compuesto se puso en tubos de vidrio cerrados (8 mm de diámetro) y se calentó durante 7 minutos a 95 °C. El compuesto se enfrió hasta temperatura ambiente, se extrajo de los tubos y se secó a 45 °C durante 24 horas. El módulo de Young para las muestras secas y humedecidas durante 1 hora en una solución salina fisiológica fue aprox. 0,6 GPa y 0,2 GPa, respectivamente. La tensión compresiva para estas muestras fue aprox. del 24 % y del 32 %, respectivamente, y la resistencia a la compresión aprox. 5 MPa y 0,2 MPa, respectivamente.

Ejemplo III. El curdlano en una cantidad de 0,625 g se mezcló con 5 ml de agua desionizada y se combinó adicionalmente durante 10 minutos con 3 g de gránulos microporosos de TCP (fracción de 0,3-0,4 mm). La porción mezclada cuidadosamente de compuesto se puso en tubos de vidrio cerrados (8 mm de diámetro) y se calentó durante 15 minutos a 90 °C. El compuesto se enfrió hasta temperatura ambiente, se extrajo de los tubos y se secó a 45 °C durante 24 horas. El módulo de Young para las muestras secas y humedecidas durante 1 hora en una solución salina fisiológica fue aprox. 0,6 GPa y 0,2 GPa, respectivamente. La tensión compresiva para estas muestras fue aprox. del 24 % y del 22 %, respectivamente, y la resistencia a la compresión aprox. 5 MPa y 0,3 MPa, respectivamente.

Ejemplo IV. El curdlano en una cantidad de 0.5 g se mezcló con 5 ml de agua desionizada y se combinó

adicionalmente durante 10 minutos con 3,5 g de gránulos microporoso de HAp (mezcla de gránulos de 0,2-0,3 mm:0,5-0,6 mm en una proporción de 1:3). La porción mezclada cuidadosamente del compuesto se puso en tubos de vidrio cerrados (12 mm de diámetro) y se calentó durante 9 minutos a 100 °C. El compuesto se enfrió a temperatura ambiente, se extrajo de los tubos y se secó a 45 °C durante 24 horas. El módulo de Young para s muestras secas y humedecidas durante 1 hora en una solución salina fisiológica fue aprox. 0,5 gPa y 0,2 GPa, respectivamente. La tensión compresiva para estas muestras fue aprox. del 23 % y del 42 %, respectivamente, y la resistencia a la compresión aprox. 5 MPa y 0,25 MPa, respectivamente. El compuesto se sometió a esterilización por autoclave (20 minutos a 121 °C) sin cambio en sus propiedades mecánicas.

Ejemplo V. El curdlano en una cantidad de 1 g se mezcló con 10 ml de agua desionizada y se combinó adicionalmente durante 10 minutos con 7 g de gránulos microporosos de HAp carbonatada de porosidad abierta al 60 % y un diámetro de poro medio de 0,25 mm (fracción de 0,2-0,3 mm). La porción mezclada cuidadosamente del compuesto se puso en una placa de vidrio cerrada (38 mm de diámetro) y se calentó durante 15 minutos a 95 °C. El compuesto se enfrió hasta temperatura ambiente, se extrajo de la placa y se secó a 45 °C durante 24 horas. El módulo de Young para las muestras secas y humedecidas durante 1 hora en una solución salina fisiológica fue aprox. 0,4 GPa y 0,2 GPa, respectivamente. La tensión compresiva para estas muestras fue aprox. del 20 % y la resistencia a la compresión aprox. 3 MPa y 0,15 MPa, respectivamente. El compuesto se sometió a esterilización por óxido de etileno (55 °C, 5 horas, con ventilación durante una noche para eliminar el gas posterior al proceso) y no tuvo ningún cambio en sus propiedades mecánicas.

Ejemplo VI. El curdlano en una cantidad de 0,5 g se mezcló con 5 ml de agua desionizada y se combinó adicionalmente durante 10 minutos con 3,5 g de gránulos microporosos de HAp (mezcla de gránulos de 0,2-0,3 mm:0,5-0,6 mm en una proporción de 1:3). La porción mezclada cuidadosamente del compuesto se puso en tubos de vidrio cerrados (10 mm de diámetro) y se calentó durante 10 minutos a 95 °C. El compuesto se enfrió hasta temperatura ambiente, se extrajo de los tubos y se secó a 45 °C durante 24 horas. El módulo de Young para las muestras secas fue aprox. 0,4 GPa. La tensión compresiva fue del 23 % y la resistencia a la compresión aprox. 4 MPa. Tal compuesto obtenido se humedeció durante 2 horas en una solución salina fisiológica y conservó sus propiedades de baja ductilidad.

Ejemplo VII. El curdlano en una cantidad de 0,5 g se mezcló con 5 ml de agua desionizada y se combinó adicionalmente durante 10 minutos con 3,5 g de gránulos microporosos de HAp (fracción de 0,5-0,6 mm). La porción mezclada cuidadosamente de compuesto se puso en tubos de vidrio cerrados (8 mm de diámetro) y se calentó durante 20 minutos a 86 °C. El compuesto se enfrió hasta temperatura ambiente, se extrajo de los tubos y se secó a 45 °C durante 24 horas. El módulo de Young para las muestras secas y humedecidas durante 1 hora en una solución salina fisiológica fue aprox. 0,6 GPa y 0,2 GPa, respectivamente. La tensión compresiva para estas muestras fue aprox. del 19 % y la resistencia a la compresión aprox. 4 MPa y 0,2 MPa, respectivamente. Las muestras secas del compuesto se humedecieron durante 30 minutos en PBS pH 7,4 y conservaron sus propiedades de baja ductilidad.

Ejemplo VIII. El curdlano en una cantidad de 0,81 g se mezcló con 10 ml de agua desionizada y se combinó adicionalmente durante 10 minutos con 7,81 g de gránulos microporosos de HAp (fracción de 0,3-0,4 mm). La

5 porción mezclada cuidadosamente del compuesto se puso en tubos de vidrio cerrados (8 mm de diámetro) y se calentó durante 15 minutos a 90 °C. El compuesto se enfrió a temperatura ambiente, se extrajo de los tubos y se secó a 45 °C durante 24 horas. La tensión compresiva para las muestras secas y humedecidas durante 1 hora en una solución salina fisiológica fue aprox. del 13 % y del 20 %, respectivamente, y la resistencia a la compresión aprox. 3,3 MPa y 0,2 MPa, respectivamente

10 Ejemplo IX. El curdlano en una cantidad de 0,81 g se mezcló con 10 ml de agua desionizada y se combinó adicionalmente durante 10 minutos con 3,3 g de gránulos microporosos de HAp (fracción de 0,3-0,4 mm). La porción mezclada cuidadosamente del compuesto se puso en tubos de vidrio cerrados (8 mm de diámetro) y se calentó durante 10 minutos a 95 °C. El compuesto se enfrió hasta temperatura ambiente, se extrajo de los tubos y se secó a 45 °C durante 24 horas. La tensión compresiva para las muestras secas y humedecidas durante 1 hora en una solución salina fisiológica fue aprox. del 21 % y del 52 %, respectivamente, y la resistencia a la compresión aprox. 6,7 MPa y 0,2 MPa, respectivamente. Las muestras secas del compuesto se humedecieron durante 15 minutos en PBS pH 7,4 y conservaron sus propiedades de baja ductilidad.

15 Ejemplo X. El curdlano en una cantidad de 2,5 g se mezcló con 10 ml de agua desionizada y se combinó adicionalmente durante 10 minutos con 1,9 g de gránulos microporosos de HAp (fracción de 0,3-0,4 mm). La porción mezclada cuidadosamente del compuesto se puso en tubos de vidrio cerrados (8 mm de diámetro) y se calentó durante 12 minutos a 95 °C. El compuesto se enfrió hasta temperatura ambiente, se extrajo de los tubos y se secó a 45 °C durante 24 horas. La tensión compresiva para las muestras secas y humedecidas durante 1 hora en una solución salina fisiológica fue aprox. del 35 % y del 47 %, respectivamente, y la resistencia a la compresión aprox. 27,8 MPa y 0,3 MPa, respectivamente. Las muestras secas del compuesto se humedecieron durante 2 horas en PBS pH 7,4 y conservaron sus propiedades de baja ductilidad.

20

REIVINDICACIONES

1. Compuesto bioactivo a base de fosfato de calcio, **caracterizado por que** contiene β -1,3-glucano, denominado adicionalmente curdlano, y biocerámica de fosfato de calcio en forma de gránulos microporoso de tamaño: 0,1-1,0 mm, y porosidad abierta: 50-70 %, donde los compuestos están en cantidades (gramos por 100 g de H₂O) de acuerdo con la proporción:

$$\frac{x}{y} = \frac{8,1 \div 25}{2 \div (0,0701x^2 - 5,8175x + 120,68)^{(*)}}$$

donde:

10

x - masa del curdlano (en g por 100 g de agua)

y - masa de los gránulos (en g por 100 g de agua)

2. El compuesto, de acuerdo con la reivindicación 1 está **caracterizado por que** la masa de los gránulos marcada como "y" constituye el 95-100 % de la cantidad calculada a partir de la fórmula (*).

15

3. Procedimiento para la preparación del compuesto de fosfato de calcio-curdlano está **caracterizado por que** la suspensión de agua de β -1,3-glucano, denominado adicionalmente curdlano, en una cantidad de 8,1 \div 25 g por 100 g de agua se combina con biocerámica de fosfato de calcio en forma de gránulos microporosos, con un tamaño de 0,1-1,0 mm y una porosidad abierta del 50-70 %, y se somete a una mezcla precisa, además de que los compuestos se usan en las proporciones descritas en la fórmula:

20

$$\frac{x}{y} = \frac{8,1 \div 25}{2 \div (0,0701x^2 - 5,8175x + 120,68)^{(*)}}$$

donde:

25

x - masa del curdlano (en g por 100 g de agua)

y - masa de los gránulos (en g por 100 g de agua)

- y posteriormente la mezcla de compuestos escogidos se coloca en placas quimiorresistentes, batiendo cuidadosamente para evitar la introducción de burbujas de aire, se cierra y se calienta durante 5-30 minutos a una temperatura de 80 °C-100 °C.

30

4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3 está **caracterizado por que** la masa de los gránulos marcada como "y" constituye el 95-100 % de la cantidad calculada a partir de la fórmula (*): $y = 0,0701x^2 - 5,8175x + 120,68$.

35