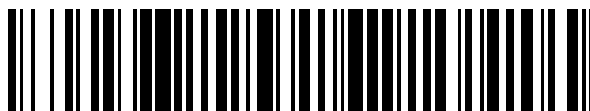


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 298**

51 Int. Cl.:

A61L 27/42 (2006.01)

A61K 35/618 (2015.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/58 (2006.01)

A61L 24/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2016** **PCT/FR2016/051497**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2016** **WO16207525**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2016** **E 16741662 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020** **EP 3313465**

54 Título: **Material semisintético pulverulento, obtenido por modificación de la composición de un biomaterial natural marino, su procedimiento de fabricación y sus aplicaciones**

30 Prioridad:

23.06.2015 FR 1555782

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

10.12.2020

73 Titular/es:

MBP (MAURITIUS) LTD (100.0%)
Suites 340-345, Barkly Wharf Le Caudan
Waterfront P.O.Box 1070
Port Louis, MU

72 Inventor/es:

CAMPRASSE, GEORGES y
CAMPRASSE, SERGE

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 798 298 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

Material semisintético pulverulento, obtenido por modificación de la composición de un biomaterial natural marino, su procedimiento de fabricación y sus aplicaciones

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un material semisintético pulverulento, bioabsorbible, procedente de un biomaterial natural marino, que proviene de la concha de moluscos bivalvos tales como Pinctadinas en general y en particular *Pinctada maxima*, *margaritifera*, y Tridacnas: *Tridacna gigas*, *maxima*, *derasa*, *tevaroa*, *squamosa*, *crocea*, *Hippopus*, *Hippopus porcelanus*.

Estado de la técnica

El documento WO9014111 describe un producto de sustitución de estructuras óseas producido a partir de una capa nacarada de la prueba de moluscos acuáticos.

En general, los materiales usados para rellenar las pérdidas de sustancia ósea de origen traumático, tumoral, distrófico o degenerativo son cementos fosfocálcicos, bio-copolímeros, materiales de origen animal o humano.

Con respecto al sellado de prótesis, solo se usa el poli(metacrilato de metilo) (PMMA), asociado opcionalmente con antibióticos, un iniciador, un activador, un opacificador o un colorante. Las endoprótesis en general se sellan con cementos de PMMA, cuyos inconvenientes son bien conocidos, en particular la reacción exotérmica producida durante la polimerización del cemento, la necrosis de células óseas resultante, la retracción del cemento con el tiempo y su envejecimiento, que provocan la movilidad de la prótesis y la necesidad de su recuperación en los 10 a 15 años postoperatorios, en la mayoría de los casos.

Todos estos materiales son biocompatibles, algunos de ellos, como los cementos fosfocálcicos, reivindican propiedades osteoconductoras; pocos son bioactivos, la mayoría son inertes.

Los cementos inyectables están constituidos por una fase mineral y una fase líquida que puede ser ácido fosfórico, una solución acuosa o gel de HPMC, agua estequiométrica de 0,1 moles, ácido sulfúrico, ácido cítrico.

Los biomateriales, sintéticos o de origen bovino, usados como sustitutos óseos, están esencialmente dotados de propiedades osteoconductoras y en general no son completamente bioabsorbibles.

Para algunos de ellos, especialmente los polímeros, se observa la liberación de productos de degradación que a largo plazo pueden tener efectos nocivos en los tejidos que los rodean o sistémicos mórbidos. Esta bioabsorción depende del paciente.

Además, la casi totalidad de sustitutos óseos no son bioactivos; lo que obliga a asociarlos con colágeno de origen animal, o con otras sustancias que, al ser bioabsorbidas, inducen una reacción inflamatoria importante del hospedante receptor, más importante y diferente de la reacción fisiológica.

El principal inconveniente de los sustitutos óseos en forma pulverulenta o de gránulos, está en el hecho de que cuando se aplican, ya sea con sangre autóloga, suero fisiológico o cualquier otro vehículo líquido, no forman un "coágulo" que tenga propiedades adhesivas y plásticas que favorecen su cohesión y su mantenimiento sobre y en el sitio.

Se sabe que el hueso humano está constituido por 43% de componentes inorgánicos, 32% de componentes orgánicos y 25% de agua. El componente orgánico está constituido por 90% por proteínas de colágeno, de las cuales 97% de colágeno tipo I, tipo III, IV y V, así como 10% de proteínas no colágenas representadas por osteocalcina, osteonectina, osteopontina, sialoproteína ósea, proteoglicanos, fibronectina, factores de crecimiento y proteínas morfogénicas. Son estas proteínas no colágenas las que tienen una función esencial en los procesos de osteogénesis y reparación de los tejidos dañados.

La fracción inorgánica está constituida en gran parte por hidroxiapatita en forma de cristales de fosfato de calcio; esta fracción también contiene otros minerales tales como sodio, potasio, cobre, zinc, estroncio, flúor, aluminio, silicio en cantidades muy pequeñas. Todos estos elementos tienen una función importante en el metabolismo celular, así como en la cicatrización y la regeneración ósea.

El estudio de la arquitectura y composición de la concha de moluscos bivalvos, tales como Pinctadinas en general y en particular *Pinctada maxima*, *margaritifera* y Tridacnas, en particular *Tridacna gigas*, *maxima*, *derasa*, *tevaroa*, *squamosa*, *crocea*, *Hippopus*, *Hippopus porcelanus*, ha mostrado que comprende una capa interna nacarada, compuesta de 3 a 5% de una fracción orgánica, constituida por proteínas colágenas y no colágenas, esencialmente

biopolímeros insolubles y solubles. La capa interna nacarada también contiene una fracción inorgánica que representa de 95 a 97%, constituida esencialmente por carbonato de calcio, minerales e iones metálicos, así como por 3% de agua. Este estudio de la arquitectura de la concha de los moluscos a los que se refiere la invención también muestra que está constituida por una capa externa de calcita, estructuralmente diferente de la capa interna de aragonito, pero que también contiene una fracción orgánica compuesta de biopolímeros insolubles y solubles.

Numerosas publicaciones han puesto de relieve las propiedades osteoinductoras y osteoconductoras del biomaterial natural procedente de la capa de aragonito de los moluscos marinos mencionados antes.

Estas propiedades surgen de la presencia de biopolímeros contenidos en la fracción orgánica, en la cual se han identificado proteínas estructurales análogas a las que contribuyen a la arquitectura de órganos como dientes, huesos, piel, músculos, mucosas, etc. También están presentes proteínas funcionales similares a las que intervienen en procesos metabólicos, bioquímicos (enzimología, inmunología, receptores de membrana, moléculas señal, etc.). Entre estas proteínas estructurales, están particularmente representados los colágenos: así es como se han identificado los colágenos de tipo I, II, III y relacionados.

Además de los aminoácidos libres, se ha puesto de manifiesto la presencia de proteoglicanos (glúcidos unidos a péptidos pequeños), glucoproteínas (asociación de colágeno y glúcidos) entre las cuales están las glucoproteínas de bajo peso molecular, consideradas generalmente como factores de crecimiento relacionados con BMP, TNF β , TGF β , PGF, etc.

Además, se conoce la función fundamental de ciertas moléculas no colágenas en el proceso de cicatrización fisiológica y en la regeneración celular y tisular.

In vitro e in vivo, se han puesto de relieve las propiedades de cicatrización, regeneración, angiogénesis y osteoinducción del complejo organomineral de la capa interna de la concha de los moluscos citados antes, propiedades relacionadas con la presencia de estos diferentes colágenos y factores de crecimiento.

Si se compara la composición fisicoquímica del tejido óseo y la del aragonito de las conchas de los moluscos considerados, se observa una gran similitud de componentes orgánicos presentes en un porcentaje de 32% en el tejido óseo y de 3 a 5% en el aragonito. Las fases minerales, 43% para el hueso, esencialmente fosfato de calcio, representan en el aragonito de 95 a 97% en forma de carbonato de calcio; estando muy cercanas las proporciones de los otros minerales.

Objeto de la invención

Teniendo en cuenta la función de los biopolímeros contenidos en la fracción orgánica del biomaterial natural marino, los autores de la invención han encontrado conveniente modificar la composición aumentando la proporción de estos biopolímeros en la composición de un nuevo biomaterial híbrido semisintético.

Se sabe que la fracción orgánica de las capas de aragonito interna y de calcita externa de las conchas de los moluscos en cuestión, contiene moléculas solubles, difusibles, que tienen propiedades osteogénicas que intervienen en la mineralización y el crecimiento de los tejidos calcificados. También se ha puesto de manifiesto la presencia de proteínas insolubles, estructurales, en las cubiertas pericristalinas e interlaminares del aragonito.

Además, las moléculas contenidas en la fracción orgánica de la capa de calcita externa de la concha son similares a las contenidas en la capa de aragonito interna de la concha de los moluscos a los que se refiere la invención.

Esta es la razón por la cual, parecía conveniente extraer y concentrar, no solo las moléculas orgánicas estrechamente ligadas a los biocristales y a las láminas intercristalinas de las que está constituido el aragonito de las pruebas nacaradas, sino también las contenidas en la capa de calcita externa de las conchas de los moluscos en cuestión.

La extracción del biopolímero de fracciones orgánicas de biomaterial tiene por objeto proporcionar moléculas solubles e insolubles. El objetivo es poder aumentar, mediante la complementación con biopolímeros insolubles y solubles extraídos, la relación estructural orgánico-inorgánico, con el fin de optimizar las propiedades de regeneración celular y tisular, cicatrización, osteoinducción, angiogénesis del biomaterial así obtenido.

Así, los presentes autores de la invención han encontrado que a partir de la concha de un molusco seleccionado entre *Tridacnae maxima*, *Tridacnae gigas*, *Tridacnae derasa*, *Tridacnae tevaroa*, *Tridacnae squamosa*, *Tridacnae crocea*, *Hippopus*, *Hippopus porcelanus*, *Pinctada maxima*, *Pinctada margaritifera*, y otras Pinctadinas, se puede obtener un material que satisface estos requisitos añadiendo como adyuvantes tanto biopolímeros solubles e insolubles como carbonato de calcio transformado por carbonatación.

Así modificado, el nuevo material bioabsorbible pulverulento semisintético según la invención está destinado a la

fabricación, por ejemplo, de sustitutos óseos, cementos inyectables o cementos para sellar endoprótesis, o incluso para la elaboración de dispositivos de osteosíntesis e implantes moldeados bioabsorbibles.

5 Por lo tanto, la invención tiene por objeto según un primer aspecto, un material pulverulento semisintético, derivado de un biomaterial natural marino, con biopolímeros insolubles y solubles y con carbonato de calcio transformado por carbonatación añadidos.

La invención también se refiere a un procedimiento de preparación de este material semisintético.

10 También se refiere a una composición que comprende los biopolímeros solubles e insolubles o el carbonato de calcio transformado por carbonatación usados en el material semisintético.

15 Finalmente, se refiere al uso del material semisintético o de la composición para la fabricación, por ejemplo, de sustitutos óseos, cementos inyectables o cementos de sellado de endoprótesis, o también en el desarrollo de dispositivos de osteosíntesis y de implantes "moldeados", bioabsorbibles.

20 Según un primer aspecto, la invención se refiere a un material pulverulento semisintético, procedente de un biomaterial natural marino, con biopolímeros insolubles y solubles y carbonato de calcio transformado por carbonatación añadidos.

El material según la invención se obtiene de un biomaterial natural marino que es la capa de aragonito interna de la concha de moluscos bivalvos seleccionados del grupo que comprende las Pinctadinas, en particular *Pinctada maxima*, *margaritifera* y *Tridacnas*, en particular *Tridacna gigas*, *maxima*, *derasa*, *tevaroa*, *squamosa*, *crocea*, *Hippopus*, *Hippopus porcelanus*, estando dicha capa de aragonito en forma pulverulenta.

25 El material semisintético pulverulento según la invención es bioabsorbible.

Según una realización, la granulometría es de 5 nm a 100 µm, preferiblemente de 20 nm a 50 µm, más preferiblemente todavía de 50 nm a 20 µm.

30 Los biopolímeros solubles e insolubles se extraen de la capa de aragonito interna y/o de la capa de calcita externa de la concha de moluscos bivalvos seleccionados del grupo que comprende Pinctadinas, en particular *Pinctada maxima*, *margaritifera* y *Tridacnas*, en particular *Tridacna gigas*, *maxima*, *derasa*, *tevaroa*, *squamosa*, *crocea*, *Hippopus*, *Hippopus porcelanus*.

35 Se describe a continuación un método para extraer estos polímeros.

Según una realización particular, la adición de biopolímeros solubles y biopolímeros insolubles extraídos se hace según una relación de biopolímeros solubles/biopolímeros insolubles que corresponde a la existente en el biomaterial de partida.

40 El carbonato de calcio transformado por carbonatación usado en el material semisintético de la invención proviene de un carbonato de calcio natural terrestre, marino o precipitado, o de la fracción inorgánica de la capa de aragonito después de extracción de los biopolímeros insolubles y solubles, que se ha transformado por carbonatación. Se sabe que el carbonato de calcio, cristalizado en el sistema ortorrómbico o romboédrico, cuando se somete a un tratamiento térmico entre 800 y 1100°C, adquiere por termólisis y oxidación, propiedades nuevas que se traducen en un importante poder adhesivo y una plasticidad que permiten un moldeado fácil. Este fenómeno es la carbonatación, de acuerdo con la siguiente reacción:

50
$$\text{CaCO}_3 + \text{tratamiento térmico} \rightarrow \text{Ca(OH)}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CaCO}_3 + \text{H}_2\text{O}$$

45 Durante esta reacción, en el transcurso de la cual se produce el aumento de la temperatura y su mantenimiento durante 20 a 40 minutos, el carbonato de calcio se transforma químicamente convirtiéndose en cal, y después bajo la acción del CO₂ y la higrometría ambiental se convierte en carbonato de calcio amorfo. Esta transformación química se extiende durante varios días dependiendo de la higrometría ambiental.

60 Por lo tanto, el material semisintético pulverulento según la invención comprende un polvo procedente de un material natural marino, cuya fracción orgánica se complementa con biopolímeros insolubles y solubles extraídos, y la fracción mineral con carbonato de calcio de origen marino, sedimentario o de madréporas, o de origen terrestre sedimentario o precipitado, transformado por un proceso de carbonatación.

Según una realización particular, el material pulverulento semisintético según la invención comprende aragonito en forma pulverulenta con una granulometría de 5 nm a 100 µm, preferiblemente de 20 nm a 50 µm, más preferiblemente todavía de 50 nm a 20 µm, biopolímeros insolubles y solubles extraídos y carbonato de calcio transformado por carbonatación.

Mediante la adición de biopolímeros insolubles y solubles extraídos, la proporción de la fracción orgánica del material inicial se incrementa dentro de un intervalo comprendido entre 1% y 10%, preferiblemente respetando las proporciones entre biopolímeros insolubles y biopolímeros solubles existentes en el material de partida. Mediante la adición de carbonato de calcio transformado por carbonatación, la proporción de la fracción mineral del material inicial se aumenta en un intervalo entre 1% y 10%, en función de las características fisicoquímicas deseadas.

Según una realización particular, el material semisintético según la invención comprende:

por 100 g de aragonito en forma pulverulenta de una granulometría de 5 nm a 100 µm, preferiblemente de 20 nm a 50 µm, más preferiblemente todavía de 50 nm a 20 µm;

de 1 g a 50 g, preferiblemente de 5 g a 25 g, más preferiblemente todavía de 10 g a 15 g de biopolímeros insolubles y solubles extraídos; y

de 0,5 g a 50 g, preferiblemente de 1 g a 25 g, más preferiblemente todavía de 2 g a 10 g de carbonato de calcio transformado por carbonatación.

Durante la extracción de los biopolímeros, los autores de la invención han puesto de relieve que en la capa de aragonito interna y la capa de calcita externa de los moluscos usados en la implementación de la invención, la parte de biopolímeros insolubles representa de 2,6% a 4,3% y la de los biopolímeros solubles de 0,4% a 0,7% del peso total. La adición de biopolímeros en el material según la invención se hace de modo que la relación de biopolímeros solubles/biopolímeros insolubles sea similar a la relación del producto natural original.

La invención también tiene por objeto un procedimiento para preparar un material semisintético pulverulento, como se ha descrito antes.

Según el procedimiento de la invención, los elementos constituyentes se preparan por separado y después se mezclan de manera que se obtenga el material según la invención. De este modo, se prepara el material pulverulento procedente de un biomaterial natural marino, los biopolímeros insolubles y solubles extraídos de un biomaterial natural marino y el carbonato de calcio transformado por carbonatación.

Más en particular, el procedimiento de preparación comprende mezclar un biomaterial natural molido, polímeros insolubles y solubles extraídos de la capa de aragonito interna y/o de la capa de calcita externa de la concha de moluscos bivalvos seleccionados del grupo que comprende Pinctadinas, en particular *Pinctada maxima*, *margaritifera*, y Tridacnas, en particular *Tridacna gigas*, *maxima*, *derasa*, *tevaroa*, *squamosa*, *crocea*, *Hippopus*, *Hippopus porcelanus* y carbonato de calcio transformado por carbonatación.

En una realización particular, el biomaterial natural molido es la capa de aragonito interna de la concha de los moluscos. La molienda se lleva a cabo de manera que se obtenga una granulometría media de 20 nm a 50 µm. Los granos obtenidos se pueden esferonizar para mejorar la fluidez y la compresibilidad del polvo.

En el procedimiento según la invención, los biopolímeros insolubles y solubles se extraen respectivamente, por supercentrifugación y por ultrafiltración tangencial, acoplados con una ósmosis inversa después de hidrólisis. Antes de la extracción, la capa de aragonito interna y/o la capa de calcita externa de la concha del molusco se puede(n) reticular. Para facilitar la extracción, la capa de aragonito interna y/o la capa de calcita externa de la concha de los moluscos se muele(n) y se tamiza(n) a una granulometría comprendida entre 250 µm y 50 µm.

Estas diferentes etapas se describen sucesivamente a continuación.

El biomaterial marino natural usado como materia prima se selecciona del grupo que comprende Pinctadinas, en particular *Pinctada maxima*, *margaritifera* y Tridacnas, en particular *Tridacna gigas*, *maxima*, *derasa*, *tevaroa*, *squamosa*, *crocea*, *Hippopus hippopus*, *Hippopus porcelanus*.

Cada uno de los componentes se puede obtener del mismo biomaterial marino o de biomateriales marinos diferentes.

Las conchas seleccionadas se limpian, descontaminan, opcionalmente se reticulan, la capa de calcita se separa de la capa interna. La capa interna se muele. Una parte de la capa interna molido constituye el componente base del material según la invención. Los biopolímeros solubles e insolubles se extraen de la capa de calcita y/o de la capa interna. El carbonato de calcio que puede provenir de la parte mineral recuperada después de la extracción de los biopolímeros se transforma por carbonatación. Los biopolímeros así extraídos y el carbonato de calcio transformado por carbonatación se añaden al componente base obtenido previamente.

Una realización específica del procedimiento según la invención se describe de forma detallada a continuación. Por supuesto, el experto en la técnica sabrá adaptar las condiciones de este procedimiento a los biomateriales específicos de partida y a los usos finales deseados.

I. Preparación de los componentes:

Después de eliminar los epibiontes por raspado, las conchas que provienen del biomaterial marino seleccionado se someten a los siguientes tratamientos:

I.1) Descontaminación de las conchas:

Las conchas se descontaminan por inmersión en un baño de agua de la red con una disolución añadida de hipoclorito al 2% de cloro activo.

I.2) Tratamiento con ultrasonidos de las conchas:

Las conchas después se aclaran y se tratan en una cubeta de ultrasonidos llena de agua de la red controlada microbiológicamente, por ejemplo, a una temperatura de 55°C, a la que se añade una disolución de limpieza y desinfectante con una dilución de 1 parte de disolución por 127 partes de agua. La duración del tratamiento es del orden de 30 minutos a una frecuencia de aproximadamente 40 kHz.

I.3) Aclarado y secado de las conchas:

Las conchas se aclaran, por ejemplo, durante 20 min en un baño de agua desmineralizada a una temperatura de 90°C, con Calbénium® añadido con una dilución de 2%, durante 30 minutos. Después se secan.

I.4) Reticulación de las conchas:

Según otra realización, con el fin de conferir al biomaterial de origen natural mayores propiedades biológicas, en particular en vista de optimizar el metabolismo celular y fortalecer las propiedades anti-radicales libres, las conchas se pueden reticular de la siguiente manera:

En un recipiente translúcido de vidrio o plástico de capacidad variable, se prepara una mezcla de agua de la red con 10% de riboflavina añadida; el conjunto se mantiene a una temperatura superior a 20°C, la agitación de la mezcla genera un flujo perpendicular a la radiación UVA.

Se ponen las conchas en vertical y se someten en sus dos caras a irradiación de lámparas UVA de una longitud de onda de 365 nanómetros segundo, bajo una intensidad de 2300 microjulios por centímetro cuadrado durante 180 minutos. El conjunto se mantiene al vacío durante toda la duración del tratamiento.

Las conchas a continuación se aclaran y secan mediante corriente de aire caliente a 40°C.

Se puede usar también el procedimiento descrito en la solicitud de patente FR 14 50204 presentada el 10 de enero de 2014.

I.5) Eliminación de la capa de calcita externa:

La capa de calcita externa de las conchas se elimina mediante pulido, con una muela de grano fino.

El producto se reserva y constituye el "lote de extracción de los biopolímeros de la capa de calcita externa".

I.6) Congelación de las pruebas nacaradas expuestas después de pulido:

Según la invención, las pruebas nacaradas se congelan a una temperatura de -18°C durante 120 minutos.

I.7) Trituración de las pruebas nacaradas y recuperación de lotes:

A continuación, se procede a la trituración de las pruebas nacaradas, por ejemplo, en una trituradora de mandíbula de carburo de tungsteno, con aspiración, para recuperar las partículas en suspensión, que también contienen nanogranos.

La operación de trituración se repite al menos 3 veces y se reservan 2 lotes después de tamizado:

- El primero, con una granulometría aleatoria de 20 micrómetros a 50 nanómetros, constituirá la porción mixta de aragonito del producto según la invención, denominada en lo sucesivo "lote mixto de aragonito". Se entiende por lote mixto de aragonito la forma pulverulenta obtenida después de molienda, que comprende los dos componentes orgánicos e inorgánicos.

- El segundo lote con una granulometría de 250 a 50 micrómetros se reserva para la extracción de biopolímeros

insolubles y solubles. Se llamará "lote de extracción de biopolímeros de la capa de aragonito interna".

El uso de un granulómetro láser determinará el tamaño y la gama de los granos de los polvos obtenidos.

5 I.8) Esferificación del lote mixto de aragonito:

El lote mixto de aragonito se somete a un tratamiento mecánico destinado a uniformizar los granos por esferificación, con el objetivo de redondear los ángulos y las aristas de los granos por rozamiento.

10 Este tratamiento tiene el efecto de favorecer la fluidez, la compresibilidad, del polvo obtenido y, por lo tanto, favorecer la densificación y las uniones entre partículas durante el uso del material según la invención, en particular como sustitutos óseos, cementos de sellado, cementos inyectables, dispositivos de osteosíntesis e implantes moldeados bioabsorbibles.

15 Para esta paso etapa esferificación, se puede proceder de la siguiente manera: se pone en un recipiente cilíndrico de vidrio o circonio, por ejemplo, con eje de rotación horizontal, que comprende palas de vidrio de anchura variable, una mezcla a partes iguales de material pulverulento del lote mixto de aragonito y virutas de unos pocos mm² de madera dura, por ejemplo roble, esterilizadas en autoclave.

20 El recipiente se pone a rotar durante un tiempo y una velocidad variables, dependiendo del tamaño del recipiente y la cantidad de producto a tratar.

25 Al final del tratamiento de esferificación, el conjunto de la mezcla, lote mixto de aragonito y virutas, se recupera en un recipiente inerte lleno de una cantidad adecuada de agua que se agita de manera constante durante aproximadamente 15 minutos. Después de descansar, las virutas de madera que flotan en la superficie se eliminan por aspiración.

Después la disolución se filtra sobre un filtro de nylon de malla de diámetro de 20 micrómetros, después el residuo se seca en el Rotavapor® a 40°C y se acondiciona.

30 Según otra realización, al lote mixto de aragonito también se le puede añadir a partes iguales cloruro de sodio en forma de granos de diámetros aleatorios que varían de 1 a 3 mm. Después de tratamiento, el cloruro de sodio se elimina por disolución en agua caliente a 90°C y filtración sobre filtro de nylon, seguido de un lavado con agua caliente a 90°C y secado por flujo de aire caliente a 40°C.

35 II. Extracción de biopolímeros

II.1 Extracción de biopolímeros insolubles:

40 Según la invención, una cantidad adecuada de polvo del lote de extracción de los biopolímeros de la capa de aragonito interna obtenida en la etapa I.5), se mezcla con una cantidad suficiente de agua desmineralizada, para ser inyectado en un reactor de hidrólisis, en el que se añade una cantidad determinada de ácido cítrico al 25%; el conjunto se enfría a una temperatura que oscila entre 4 y 5°C con agitación constante. Los autores de la invención han favorecido el uso de ácido cítrico debido a sus propiedades de disminución de pH y tensión superficial.

45 El pH, controlado por el pH-ímetro, se mantiene por encima de 4,5 por adición de sosa 2,5 N con el fin de evitar alterar los biopolímeros; después se vuelve a 7 al final de la etapa por adición de 0,1 litros de sosa 5 N por 100 litros de hidrolizado.

50 Una vez que se obtiene la disolución completa del polvo, el hidrolizado se transfiere a un tanque de almacenamiento, todavía con agitación constante, y después se transfiere a un separador centrífugo donde se somete a una fuerza de 18 a 20.000 G en el ciclón.

55 La operación se repite si es necesario después de controlar la disolución con el turbidímetro y corregir con ácido cítrico si es necesario, manteniendo la temperatura entre 4 y 5°C.

60 Dependiendo de los resultados proporcionados por el turbidímetro, el hidrolizado se puede volver a someter a una supercentrifugación. En cada ciclo de supercentrifugación, el residuo de los biopolímeros insolubles recogido se lava y se reserva. Las aguas de lavado de los residuos se tratan con ácido oxálico para verificar la presencia o no de calcio.

Al final de la última supercentrifugación, se obtiene un residuo que contiene todos los biopolímeros insolubles, en forma de una torta parduzca húmeda, que se seca por liofilización o zeodratación, resultando al final del tratamiento esferúlas grises de 2 a 3 mm de diámetro por el enrollamiento de proteínas bajo la acción de la fuerza centrífuga.

65 Los biopolímeros insolubles extraídos se muelen, por ejemplo, en un molino planetario hasta que se obtiene un

polvo con una granulometría aleatoria de 5 micrómetros a 100 nanómetros, recuperado después del tamizado.

II.2 Extracción de biopolímeros solubles:

- 5 El permeado y las aguas de lavado se envían para ser desalinizados a un dispositivo de ultrafiltración tangencial, por ejemplo con casetes que tienen un umbral de corte de 1 kD.

Se añade al permeado una cantidad suficiente de ácido sulfúrico 2,0 mol/l con el fin de hacer precipitar las sales de sulfato de calcio.

- 10 La solución se filtra, el permeado se concentra en el Rotavapor® a vacío a una temperatura de ebullición de 33°C con el fin de eliminar el ácido cítrico en forma de cristales.

- 15 El destilado que contiene las proteínas de bajo peso molecular, así como los iones mono y multivalentes, se extiende.

Dado que el umbral de corte de los casetes no retiene todas las proteínas y, en particular, las de muy bajo peso molecular, el destilado se somete a ósmosis inversa.

- 20 El destilado se transfiere para someterlo a un tratamiento de separación de fase líquida por permeación a través de membranas semiselectivas, por ejemplo de diámetro de poros de 0,0001 micrómetros, bajo el efecto de un gradiente de presión de 40 a 80 bares.

- 25 Se pasa el destilado con el fin de retener todos los iones mono y multivalentes tales como hierro, magnesio, zinc, etc.

El retenido recuperado en las membranas de ósmosis inversa se recoge y se extiende con agua exenta de pirógenos, después se concentra, por ejemplo, mediante Rotavapor®, a vacío, a una temperatura de 40°C, y después se liofiliza por zeodratación o criodesecación.

- 30 Se obtiene un polvo muy fino de color blanco grisáceo que se reserva, después se muele, por ejemplo, en un molino planetario con el fin de obtener después del tamizado un polvo de granulometría aleatoria que varía de 5 micrómetros a 100 nanómetros.

- 35 La presencia o ausencia de proteínas en el permeado se verifica tomando una parte alícuota de disolución que se trata por el método colorimétrico de Bradford.

II.3 Extracción de biopolímeros del lote de extracción de los biopolímeros de la capa de calcita externa

- 40 Según otra realización, la extracción de los biopolímeros de la capa de calcita externa se lleva a cabo de una manera idéntica a la de los biopolímeros de la capa de aragonito interna.

III. Carbonación del carbonato de calcio:

- 45 Se sabe que el carbonato de calcio, cristalizado en el sistema ortorrómbico o romboédrico, cuando se somete a un tratamiento térmico entre 800 y 1100°C, adquiere por termólisis y oxidación, nuevas propiedades que se traducen en un importante poder adhesivo y una plasticidad que permiten un moldeado fácil. Este fenómeno es la carbonatación, de acuerdo con la siguiente reacción:

- 50
$$\text{CaCO}_3 + \text{tratamiento térmico} \rightarrow \text{Ca(OH)}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CaCO}_3 + \text{H}_2\text{O}$$

Durante esta reacción, en el transcurso de la cual se produce el aumento de la temperatura y su mantenimiento durante 20 a 40 minutos, el carbonato de calcio se transforma químicamente convirtiéndose en cal, y después bajo la acción del CO₂ y la higrometría ambiental se convierte en carbonato de calcio amorfo. Esta transformación química se extiende durante varios días dependiendo de la higrometría ambiental.

- 60 Según otras realizaciones, todas las sales de calcio, distintas del carbonato de calcio, por reacciones de precipitación química pueden dar lugar a carbonato de calcio que se puede transformar por carbonatación. Así es como se puede, por ejemplo, obtener carbonato de calcio carbonatado a partir de hidróxido de calcio, acetato de calcio, oxalato de calcio, sulfato de calcio, citrato de calcio; corresponderá al experto en la técnica aplicar los procedimientos químicos conocidos específicos de estas precipitaciones.

- 65 El carbonato de calcio también puede provenir de la concha interna de aragonito de los moluscos bivalvos, tales como las Pinctadinas en general y en particular Pinctada: maxima, margaritifera y Tridacnas: gigas, maxima, derasa, tevaroa, squamosa, crocea, Hippopus, Hippopus porcelanus, después de la extracción de los biopolímeros. También puede ser de origen de madreporas.

IV. Formulación de una mezcla a partir del lote mixto de aragonito, bio-polímeros insolubles y solubles extraídos y carbonato de calcio transformado por carbonatación

5 Se mezcla una cantidad de los biopolímeros insolubles y solubles, extraídos de los dos lotes de aragonito interno y de calcita externo, determinada según la proporción de fracción orgánica deseada, y una cantidad determinada de carbonato de calcio transformado por carbonatación, con una cantidad definida del lote mixto de aragonito para constituir una formulación del producto según la invención.

10 La mezcla se lleva a cabo, por ejemplo, en una mezcladora de cuchillas hasta obtener un polvo homogéneo que después se acondiciona.

Según otro aspecto, la invención se refiere al uso del material según la invención como sustituto óseo de formulación extemporánea, para la cicatrización y regeneración de las pérdidas de sustancia, para el tratamiento de quemaduras, escaras, úlceras, lesiones cutáneas eritematosas o en la fabricación de dispositivos o implantes moldeados.

El material semisintético pulverulento según la invención también se puede usar en la fabricación de dispositivos o implantes moldeados con bioabsorción controlada que comprenden hilos de sutura con bioabsorción gradual en el tiempo.

También se puede usar para la formulación de preparaciones para sustitutos óseos para uso extemporáneo, sustitutos óseos de soporte de colágeno poroso, sustitutos óseos de trama mineral de origen animal o humano, dispositivos de osteosíntesis e implantes bioabsorbibles moldeados, dispositivos de bioabsorción controlada, cementos de sellado de endoprótesis, cementos inyectables para cirugía mínimamente invasiva en vertebroplastia, cifoplastia y cirugía de tumor óseo.

Según otra realización, el producto según la invención puede estar asociado con un soporte de colágeno poroso tal como *Spongia officinalis* que se ha sometido a un tratamiento mecánico y termoquímico dirigido a la descontaminación bacteriana y vírica, la eliminación de posibles pigmentos, neutralización de una manifestación inmunogénica. Se sabe que *Spongia officinalis* está compuesta de espongina, compuesta por fibras de una escleroproteína carbonatada relacionada con un colágeno. Esta proteína no es muy soluble y tiene una función de protección y soporte de todos los tejidos: tejido conectivo, tendones, tejidos óseos, fibras musculares, piel, pelos y uñas. La espongina es una proteína colágena de estructura y almacenamiento; es inerte, insoluble en agua, hidrófoba y no se desnaturaliza fácilmente. Constituye un soporte poroso, específico de la osteoconducción. Por lo tanto, se puede usar en combinación con el material según la invención para realizar sustitutos óseos.

El material según la invención se puede asociar con sales de calcio tales como sulfato de calcio deshidratado o semihidratado, calcita, hidroxifosfato de calcio anhidro, β -TCP, hidróxido de calcio. El material según la invención se puede asociar con la trama mineral de tejidos óseos de origen animal o humano.

También se puede asociar con polímeros bioabsorbibles tales como el colágeno, ácido hialurónico, quitosano, almidón, alginato o también con polímeros sintéticos absorbibles tales como poliglicólido, poli(DL-Lactida-co-glicólido) poli(L-lactida) o con polímeros acrílicos tales como polihidroxietilo, metacrilato de metilo, poli(metacrilato de metilo), así como sustancias medicinales en forma pulverulenta, tales como antiinflamatorios no esteroideos, antibióticos, antimicrobianos o cualquier otra sustancia de tipo terapéutico.

Teniendo en cuenta los inconvenientes ligados al uso de cementos de sellado de metacrilato de metilo, los autores de la invención proponen cementos de sellado fabricados con el producto según la invención, que, naturalmente radioopaco, lleva a cabo una retención mecánica primaria de la endoprótesis por sus propiedades adhesivas, para conducir en segundo lugar a la integración tisular debido a sus propiedades osteomiméticas, osteoinductores, osteoconductoras, bioactivas, inducidas por la presencia de moléculas señal, iniciadores de la biomineralización. Estas moléculas señal estimulan in situ los factores endógenos locales de la biomineralización, para conducir a la formación de hueso metaplásico.

Según otro objeto, la invención se refiere al uso de carbonato de calcio que se ha sometido a carbonatación tal como se aplica en el material según la invención o tal como se prepara según la etapa III del procedimiento descrito antes en composiciones que comprenden sales de calcio, polímeros naturales o sintéticos, colágeno, tramas minerales de tejido óseo de origen animal o humano.

También se puede asociar con polímeros bioabsorbibles tales como el colágeno, ácido hialurónico, quitosano, almidón, alginato o también con polímeros sintéticos absorbibles tales como poliglicólido, poli(DL-Lactida-co-glicólido) poli(L-lactida) o con polímeros acrílicos tales como polihidroxietilo, metacrilato de metilo, poli(metacrilato de metilo), así como con sustancias medicamentosas en forma pulverulenta, tales como antiinflamatorios no esteroideos, antibióticos, antimicrobianos o cualquier otra sustancia de tipo terapéutico.

Se sabe que los biopolímeros insolubles y solubles contenidos en la fracción orgánica de las capas de aragonito y de calcita tienen propiedades de cicatrización y regeneración, tanto de los tejidos duros como el hueso y cartílago, como de los tejidos blandos tales como la piel, músculos y mucosas. Podemos relacionar algunos de estos biopolímeros no colágenos, en particular las glucoproteínas de bajo peso molecular, con factores de crecimiento como BMP, TNF β , EGPF, TGF β , IGF, FGF, etc. y también con citoquinas, mediadores de la inflamación.

La invención también se refiere al uso de los biopolímeros solubles e insolubles usados en el material según la invención o cuando se extraen en la etapa II del procedimiento descrito antes como adyuvantes de composiciones pulverulentas que comprenden sales de calcio, polímeros naturales o sintéticos, colágeno, tramas minerales de tejido óseo de origen animal o humano. También se pueden asociar con polímeros bioabsorbibles tales como colágeno, ácido hialurónico, quitosano, almidón, alginato o también con polímeros sintéticos absorbibles tales como poliglicólido, poli(DL-Lactida-co-glicólido) poli(L-lactida) o polímeros acrílicos tales como polihidroxietilo, metacrilato de metilo, poli(metacrilato de metilo), así como sustancias medicamentosas en forma pulverulenta, tales como antiinflamatorios no esteroides, antibióticos, antimetabólicos o cualquier otra sustancia de tipo terapéutico. También se pueden asociar con carbonato de calcio transformado por carbonatación.

Descripción de las figuras

La invención se describirá con más detalle con la ayuda de los siguientes ejemplos dados a modo de ilustración solamente y de los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 y la Figura 2 son fotografías de mezclas:

- de polvo de nácar y carbonato de calcio con sangre completa (Nº 1) y
- de polvo de nácar y carbonato de calcio que se ha sometido a carbonatación con sangre completa (nº 2)

tomadas respectivamente 2 min y luego 15 minutos después de la adición de sangre completa.

Descripción detallada de la invención

Con el fin de verificar las propiedades farmacológicas del producto según la invención, los autores de la invención han procedido a la formulación de preparaciones de tipo terapéutico y su uso en registros de observaciones clínicas.

Ejemplo 1:

El material semisintético pulverulento según la invención se preparó como sigue:

I. Preparación de los componentes:

Después de eliminar los epibiontes por raspado, las conchas se someten a los siguientes tratamientos:

I.1) Descontaminación de las conchas:

Las conchas se descontaminan por inmersión en un baño de agua de la red con una disolución añadida de hipoclorito al 2% de cloro activo.

I.2) Tratamiento con ultrasonidos de las conchas:

Las conchas después se aclaran y se tratan en una cubeta de ultrasonidos llena de agua de la red microbiológicamente controlada, a una temperatura de 55°C, a la que se añade una disolución de limpieza y desinfectante con una dilución de 1 parte de disolución por 127 partes de agua. La duración del tratamiento es del orden de 30 minutos a una frecuencia de aproximadamente 40 kHz.

I.3) Aclarado y secado de las conchas:

Las conchas a continuación se aclaran durante 20 min en un baño de agua desmineralizada a una temperatura de 90°C, con Calbénium® añadido con una dilución del 2% , durante 30 minutos. Después se aclaran y se secan.

I.4) Eliminación de la capa de calcita externa:

La capa de calcita externa de las conchas se elimina mediante pulido, con una muela de grano fino. El producto se reserva y constituye el "lote de extracción de los biopolímeros de la capa de calcita externa".

I.5) Congelación de las pruebas nacaradas expuestas después de pulido:

Las pruebas nacaradas obtenidas en la etapa I.4) se congelan a una temperatura de -18°C durante 120 minutos.

I.6) Trituración de las pruebas nacaradas y recuperación de lotes:

A continuación, se procede a la trituración de las pruebas nacaradas en una trituradora de mandíbula de carburo de tungsteno, de la marca ESSA®, con aspiración, para recuperar las partículas en suspensión, que también contienen nanogranos.

La operación de trituración se repite al menos 3 veces y se reservan 2 lotes después del tamizado:

- El primero, con una granulometría aleatoria de 20 micrómetros a 50 nanómetros, constituirá la parte mixta de aragonito del producto según la invención, en lo sucesivo denominada "lote mixto de aragonito". Se entiende por lote mixto de aragonito la forma pulverulenta obtenida después de molienda que comprende los dos componentes orgánicos e inorgánicos.

- El segundo lote con una granulometría de 250 a 50 micrómetros está reservado para la extracción de los biopolímeros insolubles y solubles. Se denominará "lote de extracción de los biopolímeros de la capa de aragonito interna".

El tamaño y la gama de los granos de polvos obtenidos se determinan mediante un granulómetro láser.

I.7) Esferificación del lote mixto de aragonito:

El lote mixto de aragonito se somete a un tratamiento mecánico destinado a uniformizar los granos por esferificación, con el objetivo de redondear los ángulos y las aristas de los granos por rozamiento.

Se pone en un recipiente cilíndrico de circonio con eje de rotación horizontal, que comprende palas de vidrio de anchura variable, una mezcla a partes iguales de material pulverulento del lote mixto de aragonito y virutas de 5 mm² de madera dura, por ejemplo roble, esterilizadas en autoclave.

Las rotaciones del recipiente continúan durante un tiempo y una velocidad variables, dependiendo del tamaño del recipiente y la cantidad de producto a tratar.

Al final del tratamiento de esferificación, el conjunto de la mezcla, lote mixto de aragonito y virutas, se recupera en un recipiente inerte lleno de una cantidad adecuada de agua que se agita de manera constante durante 15 min. Después de reposo de 30 min, las virutas de madera que flotan en la superficie se eliminan por aspiración.

Después la disolución se filtra sobre un filtro de nylon de malla de diámetro de 20 micrómetros, después el residuo se seca en el Rotavapor® a 40°C y se acondiciona.

II. Extracción de biopolímeros

II.1 Extracción de biopolímeros insolubles:

Una cantidad adecuada de polvo del lote de extracción de los biopolímeros de la capa de aragonito interna, se mezcla, por aspiración en la cuba de admisión de la zona I, con una cantidad suficiente de agua desmineralizada, para ser inyectado en la zona II en el reactor de hidrólisis, en el que se añade una cantidad determinada de ácido cítrico al 25%; el conjunto se enfría a una temperatura que oscila entre 4 y 5°C con agitación constante. El pH, controlado por el pH-ímetro, se mantiene por encima de 4,5 por adición de hidróxido de sodio 2,5 N con el fin de evitar alterar los biopolímeros; después se vuelve a 7 al final de la etapa por adición de 0,1 litros de hidróxido de sodio 5 N por 100 litros de hidrolizado.

Una vez obtenida la disolución completa del polvo, el hidrolizado se transfiere a la cuba de almacenamiento, todavía con agitación constante, y después se transfiere a un separador centrífugo donde se somete a una fuerza de 18 a 20.000 G en el ciclón.

La operación se repite si es necesario después de controlar la disolución con el turbidímetro y corregir con ácido cítrico si es necesario, manteniendo la temperatura entre 4 y 5°C.

Dependiendo de los resultados proporcionados por el turbidímetro, el hidrolizado se somete de nuevo a una supercentrifugación.

En cada ciclo de supercentrifugación, el residuo de los biopolímeros insolubles recogido se lava y se reserva. Las aguas de lavado de los residuos se tratan con ácido oxálico para verificar la presencia o no de calcio.

Al final de la última supercentrifugación, se obtiene por lo tanto un residuo que contiene todos los biopolímeros insolubles, en forma de una torta parduzca húmeda, que se seca por liofilización o zeodratación, resultando al final

del tratamiento esférulas grises de 2 a 3 mm de diámetro por el enrollamiento de proteínas bajo la acción de la fuerza centrífuga.

5 Los biopolímeros insolubles extraídos se muelen en un molino planetario hasta que se obtiene un polvo con una granulometría aleatoria de 5 micrómetros a 100 nanómetros recuperado después del tamizado.

II.2 Extracción de biopolímeros solubles:

10 El permeado y las aguas de lavado se envían para ser desalinizados a un dispositivo de ensamblaje de casetes de ultrafiltración tangencial, Millipore® de 1 kD cada uno, montados en serie para una superficie de 15 m², a una presión de 5 bar con un caudal de 10 a 15 litros por hora, a una temperatura de 40°C.

15 Se añade al permeado una cantidad suficiente de ácido sulfúrico 2,0 mol/l con el fin de producir la precipitación de las sales de sulfato de calcio.

La disolución se filtra, el permeado se concentra en el Rotavapor® a vacío a una temperatura de ebullición de 33°C con el fin de eliminar el ácido cítrico en forma de cristales.

20 El destilado que contiene las proteínas de bajo peso molecular, así como los iones mono y multivalentes, se extiende.

Dado que el umbral de corte de los casetes no retiene todas las proteínas y, en particular, las de muy bajo peso molecular, el destilado se somete a una ósmosis inversa.

25 El destilado se transfiere entonces para someterlo a un tratamiento de separación de fase líquida por permeación a través de membranas semiselectivas, cuyo diámetro de poros de la membrana es de 0,0001 micrómetros, bajo el efecto de un gradiente de presión de 40 a 80 bar y.

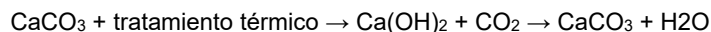
30 Se pasa el destilado con el fin de retener todos los iones mono y multivalentes tales como hierro, magnesio, zinc, etc. El retenido recuperado en las membranas de ósmosis inversa se recoge y se extiende con agua exenta de pirógenos, después se concentra mediante Rotavapor®, a vacío, a una temperatura de 40°C, y después se liofiliza por zeodratación.

35 Se obtiene un polvo muy fino de color blanco grisáceo que se reserva, después se muele en un molino planetario con el fin de obtener después del tamizado un polvo de granulometría aleatoria que varía de 5 micrómetros a 100 nanómetros.

40 La presencia o ausencia de proteínas en el permeado se verifica tomando una parte alícuota de disolución que se trata por el método colorimétrico de Bradford.

III. Carbonación del carbonato de calcio:

45 El carbonato de calcio recuperado después de la extracción de biopolímeros anterior se somete a un tratamiento térmico entre 800 y 1100°C, de 20 a 40 min, después se enfría al aire libre de forma lenta. Este fenómeno es la carbonatación, según la siguiente reacción:



50 Durante esta reacción, el carbonato de calcio se transforma químicamente convirtiéndose en cal, y después bajo la acción del CO₂ y la humedad se convierte de nuevo en carbonato de calcio amorfo. Esta transformación química se extiende durante varios días dependiendo de la higrometría ambiental.

IV. Formulación de una mezcla a partir del lote mixto de aragonito, bio-polímeros insolubles y solubles extraídos y carbonato de calcio transformado por carbonatación

55 Durante la extracción de los biopolímeros, se ha puesto de manifiesto que en la capa de aragonito interna y la capa de calcita externa de las conchas usadas, la proporción de los biopolímeros insolubles representaba de 2,6% a 4,3% y la de los biopolímeros solubles de 0,4% a 0,7%.

60 El material según la invención se preparó mezclando el lote mixto de aragonito, los polímeros insolubles obtenidos en la etapa II.1, los polímeros solubles obtenidos en la etapa II.2 y carbonato de calcio que se ha sometido a una carbonatación obtenido en la etapa III anterior. Las cantidades específicas de los diferentes componentes se especifican en cada uno de los ejemplos de aplicación que se dan a continuación.

65 La mezcla se lleva a cabo en un mezclador de cuchillas hasta obtener un polvo homogéneo que después se acondiciona.

Ejemplo 2:

Se procede como en el ejemplo 1 anterior, excepto que se añade una etapa de reticulación como se describe a continuación al final de la etapa I.3.

En un recipiente translúcido de vidrio o plástico, se prepara una mezcla de agua de la red con 10% de riboflavina añadida; el conjunto se mantiene a una temperatura superior a 20°C, generando la agitación de la mezcla un flujo perpendicular a la radiación UVA.

Las conchas se colocan en vertical en el mismo y se someten en sus dos caras a irradiación de lámparas UVA con una longitud de onda de 365 nanómetros segundo, bajo una intensidad de 2300 microjulios por centímetro cuadrado durante 180 minutos. El conjunto se mantiene con vacío durante toda la duración del tratamiento.

Las conchas a continuación se aclaran y se secan con una corriente de aire caliente a 40°C.

Ejemplo 3:

Con el fin de verificar las propiedades adhesivas y de cohesión del carbonato de calcio carbonatado, se procede de la siguiente forma:

En dos vasos Dappen, denominados respectivamente Dappen N°1 y N°2, conteniendo cada uno 1 g del polvo de nácar obtenido al final de la etapa I.7 del procedimiento del ejemplo 1, se añaden:

- 0,1 g de carbonato de calcio natural (Dappen N° 1),
- 0,1 g de carbonato de calcio natural que se ha sometido a una carbonatación, procedente de la etapa III del procedimiento del ejemplo 1 (Dappen N°2).

Después de mezclar, el contenido de cada vaso Dappen se mezcla con 2 cc de sangre completa.

Se toma una fotografía de cada vaso Dappen 2 minutos (figura 1) y después de 15 minutos (figura 2) después de mezclar con sangre completa.

Como se ilustra en la figura 1(1), la mezcla del Dappen N°1 permanece en forma de polvo rojo, no se forma ningún *coágulo*. Después de 15 minutos, no se ha formado ningún *coágulo* (figura 2(1)).

Como se ilustra en la figura 1(2), la mezcla del Dappen N°2 forma rápidamente un *coágulo* y gradualmente cambia de rojo a marrón, aumenta de masa, se puede moldear, se vuelve pegajosa y se endurece después de 15 minutos (figura 2(2)).

Ejemplo 4: Formulación para sustituto óseo extemporáneo

Se presenta un caso de situación clínica crítica en forma de una fractura de bisel del cañón de una potranca de 1 año, tratada por osteosíntesis. Después del fracaso de la osteosíntesis traducida por la fractura de 4 tornillos, una pseudoartrosis con septicemia, seguida de una fractura secundaria conminuta con pequeños fragmentos, dejando como única alternativa la eutanasia del animal, se toma la decisión de usar el material según la invención en la siguiente formulación:

- 40 g de lote mixto de aragonito con una granulometría de 50 nanómetros a 20 micrómetros, que procede de la etapa I.8 del ejemplo 1;
- 0,070 g de biopolímeros insolubles extraídos obtenidos en la etapa II.2 del ejemplo 1;
- 0,010 g de biopolímeros solubles extraídos obtenidos en la etapa II.1 del ejemplo 1;
- 2 g de carbonato de calcio carbonatado procedente de la etapa III del procedimiento del ejemplo 1;
- 10 ml de sangre venosa autóloga para formar un coágulo, moldeado en forma de un cilindro de 10 cm de largo por 2 cm de diámetro, colocado en la pérdida de sustancia después de la extracción de los secuestros óseos.

El miembro protegido por compresas se enyesó. Las radiografías postoperatorias mostraron la presencia y adhesión del sustituto óseo según la invención, tras una consolidación a los 4 meses al final de la cual la potranca podía galopar y saltar los obstáculos. Las radiografías de control realizadas más tarde mostraron la restitución ad *integrum* del tronco óseo con reconstrucción del canal espinal.

La misma formulación también se usó haciendo un coágulo extemporáneamente con 2,5 ml de agua para preparación inyectable (PPI) a temperatura ambiente.

Ejemplo 5: Formulación de una crema cicatrizante cutánea.

Se lleva a cabo una preparación del producto según la invención según la siguiente formulación porcentual:

- 10 g de lote mixto de aragonito con granulometría de 50 nanómetros a 20 micrómetros obtenido según el ejemplo 2;
- 5 - 0,035 g de biopolímeros insolubles extraídos obtenidos en la etapa II.2 del ejemplo 1;
- 0,005 g de biopolímeros solubles extraídos obtenidos en la etapa II.1 del ejemplo 1;
- 0,5 g de carbonato de calcio carbonatado
- 15 gotas de un complejo de aceites esenciales que comprende por 100 ml:
- 10 Lavandula spica: 1 ml
- Salvia officinalis: 2 ml
- Rosa rubiginosa: 10 ml
- Helychrisum italicum: 1,5 ml
- Aceite vegetal de germen de trigo: 50 ml
- 15 Aceite de onagra: 10 ml
- Aceite de almendras dulces: 20 ml
- Emulsión H.E. csp 100 g

20 Esta preparación se aplicó sobre una necrosis cutánea del plastrón esternal de un caballo, que va de la base del cuello hasta el pecho, sobre una altura de 32 cm y una anchura de 18 cm. La observación clínica ha demostrado una curación excepcional de 1 cm por día en altura y anchura con reconstrucción de los diferentes planos aponeuróticos, subcutáneos y cutáneos, y la regeneración simultánea del pelo sin decoloración, con cicatrización completa de los tegumentos en 28 días.

25 Ejemplo 6: Formulación para una preparación dermatológica para el tratamiento de psoriasis

Se sabe que la psoriasis es una afección inflamatoria de la piel, caracterizada por la renovación acelerada de las células, sin apoptosis, lo que conduce a la formación de costras espesas en placas. Además de la terapia con corticosteroides y los tratamientos locales basados en el alquitrán y la puvaterapia, cuyos resultados son

30 inconstantes y decepcionantes, existen tratamientos más pesados con efectos secundarios peligrosos para el paciente.

Se lleva a cabo una preparación centesimal del producto según la invención según la siguiente formulación:

- 35 - 3 g de biopolímeros insolubles extraídos obtenidos en la etapa II.2 del ejemplo 1;
- 0,45 g de biopolímeros solubles extraídos obtenidos en la etapa II.1 del ejemplo 1;
- 0,5 g de carbonato de calcio carbonatado obtenido en la etapa III del ejemplo 1;
- 10 gotas de un complejo de aceites esenciales que contiene por 100 ml:
- 40 Lavandula spica: 1 ml
- Salvia officinalis: 2 ml
- Rosa rubiginosa: 10 ml
- Helychrisum italicum: 1,5 ml
- Aceite vegetal de germen de trigo: 50 ml
- 45 Aceite de onagra: 10 ml
- Aceite de almendras dulces: 20 ml
- Emulsión H.E. csp 100 g

50 Esta emulsión se aplica diariamente sobre las lesiones de psoriasis severa en el torso, espalda, brazos y piernas. Al final de la tercera aplicación, se constata la desaparición del enrojecimiento, que caracteriza la sedación del fenómeno inflamatorio, las escamas y la sedación del prurito y las infecciones sobrepuestas con una ganancia estética notable. La mejora de los signos clínicos es la traducción de las propiedades eutróficas, antiflogísticas y regenerativas de los biopolímeros insolubles y solubles.

55 Ejemplo 7: Formulación de un apósito cutáneo para quemaduras

Las excepcionales propiedades de regeneración de tejidos blandos de los biopolímeros insolubles y solubles extraídos según la etapa II del ejemplo 1, se pusieron de manifiesto en un caso de quemadura profunda de segundo y tercer grado después del fracaso del injerto de queratinocitos, con la siguiente formulación:

- 60 Para 100 g:
- 50 g de lote mixto de aragonito con una granulometría de 50 nanómetros a 20 micrómetros obtenido según el ejemplo 2;
- 65 - 0,174 g de biopolímeros insolubles extraídos obtenidos en la etapa II.2 del ejemplo 1;
- 0,026 g de biopolímeros solubles extraídos obtenidos en la etapa II.1 del ejemplo 1;

- Cera de Gallien con agua de laurel cereza csp 100 g.

La preparación se aplica a todas las superficies quemadas bajo apósito oclusivo y se renueva cada 72 horas.

5 Los exámenes clínicos repetidos han mostrado una sedación del fenómeno exudativo, una angiogénesis significativa, una sedación del dolor, una reepitelización de las zonas cruentas y una disminución notable en la tensión fibroplástica.

Ejemplo 8: Formulación para sustituto óseo bioabsorbible moldeado

10 El material de acuerdo con la invención se puede usar para la fabricación de dispositivos de osteosíntesis e implantes moldeados bioabsorbibles.

Según la invención, se prepara para 100 g:

15 - 80 g de lote mixto de aragonito con una granulometría de 50 nanómetros a 20 micrómetros obtenido en la etapa I.8 del ejemplo 1;
 - 0,139 g de biopolímeros insolubles extraídos obtenidos en la etapa II.2 del ejemplo 1;
 - 0,021 g de biopolímeros solubles extraídos obtenidos en la etapa II.1 del ejemplo 1;
 20 - 20 g de macrogol de gradiente 400;
 - 4 g de carbonato de calcio carbonatado obtenido en la etapa III del ejemplo 1.

El conjunto se amasa en una mezcladora durante 10 minutos a temperatura ambiente hasta que se obtiene una pasta homogénea plástica, extruible y moldeable.

25 Se realizan impresiones de formas adecuadas, basadas en la modelización digital de la anatomía de las posibles zonas de inserción de los dispositivos de osteosíntesis y/o los implantes.

30 Se inyecta una cantidad suficiente de la pasta obtenida anteriormente en la cámara de compresión de un molde que comprende una o más impresiones.

Después, el conjunto se comprime bajo una presión progresiva que va de 100 a 220 N; la presión se mantiene durante un tiempo variable y disminuye gradualmente hasta el valor 0.

35 El dispositivo una vez desmoldado y secado a 40°C, acondicionado con doble envasado, se esteriliza mediante radiación ionizante a 25 KGy.

Ejemplo 9: Preparación para sustituto óseo con bioabsorbilidad controlada

40 Se ha constatado que la bioabsorción de un sustituto óseo, o de un dispositivo bioabsorbible, está directamente relacionada con los diámetros de los poros interconectados, que deben variar de 5 a 100 micrómetros, para permitir su colonización por los neovasos y las células implicadas en el remodelado óseo.

45 Esta es la razón por la cual los autores de la invención proponen la formación de sustitutos óseos o implantes moldeados, cuya porosidad interconectada estaría controlada. Para hacer esto, se preparan, para 100 g:

- 80 g de lote mixto de aragonito con una granulometría de 50 nanómetros a 20 micrómetros obtenido en el ejemplo 2;
 - 0,139 g de biopolímeros insolubles extraídos obtenidos en la etapa II.2 del ejemplo 1;
 50 - 0,021 g de biopolímeros solubles extraídos obtenidos en la etapa II.1 del ejemplo 1;
 - 20 ml de una disolución de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) al 50%;
 - 20 mm³ de hebras de hilos de sutura sintética monofilamento, absorbibles, de 5 mm de largo, con un diámetro de 5/0 a 12/0.

55 Estos hilos absorbibles son polímeros tales como el ácido glicólico, copolímero glicólico, ε-coprolactona poliglactina (Vicryl rápido o irradiado), quitosano. Estos hilos presentan una absorción gradual de 12 a 90 días.

60 Como en el ejemplo precedente, la pasta se inyecta en las impresiones de un molde y después se comprime. Después, los dispositivos o implantes se sacan del molde, se secan, se acondicionan en doble envasado y se esterilizan como antes a 25 KGy.

Ejemplo 10: Preparación para sustituto óseo inyectable y cemento de sellado de endoprótesis

Se preparan cementos cuya composición es la siguiente por 100 g:

65 - 80 g del material según la invención, compuesto de:

- 73 g de lote mixto de aragonito con una granulometría de 50 nanómetros a 20 micrómetros obtenido al final de la etapa I.8;
- 2,702 g de biopolímeros insolubles extraídos obtenidos en la etapa II.2 del ejemplo 1;
- 0,405 g de biopolímeros solubles extraídos obtenidos en la etapa II.1 del ejemplo 1;
- 3,699 g de carbonato de calcio carbonatado procedente de la etapa III del ejemplo 1;
- 20 g de HPMC en disolución acuosa de alta viscosidad al 50%.

El producto así obtenido se acondiciona a vacío o bajo atmósfera controlada en jeringas de capacidad variable, por ejemplo, de 0,5 cm³ a 1 cm³, con puntas rectas o acodadas conservadas en frío a una temperatura de aproximadamente 4°C.

Esta preparación, que también se puede usar como cemento de sellado, permite evitar, durante el sellado de la cola de la prótesis en la cavidad medular por ejemplo, el paso del producto de sellado al sistema circulatorio.

Además, teniendo en cuenta su composición, no provoca la liberación de sustancias volátiles que pueden afectar al sistema pulmonar.

Dicha composición también se propone para la vertebroplastia y la cifoplastia en cirugía mínimamente invasiva.

Ejemplo 11. Preparación para sustituto óseo con soporte colágeno

Se producen sustitutos óseos con la siguiente composición:

Se prepara para 100 g:

- 50 g de lote mixto de aragonito con una granulometría de 50 nanómetros a 20 micrómetros obtenido en la etapa I.8 del ejemplo 1;
- 0,087 g de biopolímeros insolubles extraídos obtenidos en la etapa II.2 del ejemplo 1;
- 0,013 g de biopolímeros solubles extraídos obtenidos en la etapa II.1 del ejemplo 1;
- 2,5 g de carbonato de calcio carbonatado obtenido en la etapa III del ejemplo 1;
- 50 g de macrogol de gradiente 400.

El conjunto se amasa hasta que se obtiene un gel con una viscosidad de aproximadamente 10 Pa-s.

Se añaden a este gel 30 g de Spongia officinalis reducido a fragmentos de un tamaño de 2 mm.

El conjunto se amasa hasta obtener una pasta homogénea con una viscosidad de aproximadamente 10⁸ Pa-s. El conjunto se inyecta en un molde que comprende impresiones de dispositivos de osteosíntesis o implantes. Después del desmoldeo, los dispositivos o implantes se secan, bajo una corriente de aire caliente a 40°C, se acondicionan en doble envasado y se esterilizan de acuerdo con el protocolo vigente.

Ejemplo 12: Preparación para sustituto óseo

Según otra realización, los biopolímeros extraídos de la fracción de aragonito sola y/o de la fracción de calcita se pueden añadir a cualquier otro biomaterial de origen sintético o natural con el fin de optimizar o inducir ciertas propiedades, en particular propiedades osteoinductores u osteomiméticas, de las que carecían.

Así es como los sustitutos osteoconductores, como ciertas sales de calcio, se han complementado con los biopolímeros extraídos de la capa de aragonito, según la formulación para 100 g:

- 95 g de gránulos de β TCP, con una granulometría que va de 50 a 250 micrómetros
- 4,4 g de biopolímeros insolubles extraídos obtenidos en la etapa II.2 del ejemplo 1;
- 0,6 g de biopolímeros solubles extraídos obtenidos en la etapa II.1 del ejemplo 1.

Esta preparación mezclada con sangre autóloga se inserta en un defecto óseo creado por la extirpación de un quiste en el vértice del incisivo central superior.

Al mismo tiempo, β TCP solo, se compacta en una pérdida de sustancia creada por la extirpación de un granuloma pariapical en el canino superior.

Un examen radiológico realizado a las 2 semanas ha mostrado una densificación ósea más importante y más rápida en la cavidad quística tratada con la mezcla de β TCP + biopolímeros insolubles y solubles extraídos, que en la segunda cavidad en la que los gránulos de β TCP están bien objetivados donde solo se ha expresado la osteoconducción, mientras que en la cavidad quística, la osteoinducción es concomitante con la osteoconducción, lo que significa la adquisición por β TCP de una nueva propiedad.

REIVINDICACIONES

1. Material semisintético, pulverulento, derivado de un biomaterial natural marino, con biopolímeros insolubles y solubles y carbonato de calcio transformado por carbonatación añadidos,
5
siendo dicho material semisintético bioabsorbible y el biomaterial natural marino es la capa de aragonito interna de la concha de moluscos bivalvos.
2. Material semisintético según la reivindicación 1, caracterizado por que los moluscos bivalvos se eligen del grupo que comprende Pinctadinas, en particular *Pinctada maxima*, *margaritifera* y Tridacnas, en particular *Tridacna gigas*, *maxima*, *derasa*, *tevaroa*, *squamosa*, *crocea*, *Hippopus*, *Hippopus porcelanus*, estando dicha capa de aragonito en forma pulverulenta.
10
3. Material semisintético según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por el hecho de que el biomaterial natural en forma pulverulenta presenta una granulometría de 5 nm a 100 µm, preferiblemente de 20 nm a 50 µm, incluso más preferiblemente de 50 nm a 20 µm.
15
4. Material semisintético según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que los biopolímeros insolubles y solubles se extraen de la capa de aragonito interna y/o de la capa de calcita externa de la concha de los moluscos bivalvos seleccionados del grupo que comprende Pinctadinas, en particular *Pinctada maxima*, *margaritifera* y Tridacnas, en particular *Tridacna gigas*, *maxima*, *derasa*, *tevaroa*, *squamosa*, *crocea*, *Hippopus*, *Hippopus porcelanus*.
20
5. Material semisintético según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el carbonato de calcio transformado por carbonatación proviene de un carbonato de calcio natural terrestre, marino o precipitado, o de la fracción inorgánica de la capa de aragonito después de extracción de los biopolímeros insolubles y solubles.
25
6. Procedimiento de preparación de un material según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende la mezcla de un biomaterial natural molido, polímeros insolubles y solubles extraídos de la capa de aragonito interna y/o la capa de calcita externa de la concha de los moluscos bivalvos seleccionados del grupo que comprende Pinctadinas, en particular *Pinctada maxima*, *margaritifera* y Tridacnas, en particular *Tridacna gigas*, *maxima*, *derasa*, *tevaroa*, *squamosa*, *crocea*, *Hippopus*, *Hippopus porcelanus* y carbonato de calcio transformado por carbonatación.
30
7. Procedimiento de preparación según la reivindicación 6, caracterizado por que el biomaterial natural molido se obtiene moliendo la capa de aragonito interna de la concha de los moluscos bivalvos seleccionados del grupo que comprende Pinctadinas, en particular *Pinctada maxima*, *margaritifera* y Tridacnas, en particular *Tridacna gigas*, *maxima*, *derasa*, *tevaroa*, *squamosa*, *crocea*, *Hippopus*, *Hippopus porcelanus*.
35
8. Procedimiento de preparación según la reivindicación 6 o 7, caracterizado por el hecho de que comprende una etapa de esferificación después de la molienda.
40
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizado por que los biopolímeros insolubles y solubles se extraen respectivamente por supercentrifugación y por ultrafiltración tangencial acoplada a una ósmosis inversa después de hidrólisis.
45
10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado por el hecho de que la capa de aragonito interna y/o la capa de calcita externa de la concha de los moluscos se reticula(n) antes de la extracción.
11. Procedimiento según la reivindicación 9 o 10, caracterizado por el hecho de que la capa de aragonito interna y/o la capa de calcita externa de la concha de los moluscos se muele(n) y se tamiza(n) antes de la extracción a una granulometría comprendida entre 250 µm y 50 µm.
50
12. Material semisintético pulverulento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, u obtenido según el procedimiento de una de las reivindicaciones 6 a 11, para usar como sustituto óseo para la formulación extemporánea, para la cicatrización y la regeneración de pérdidas de sustancia, para el tratamiento de quemaduras, escaras, úlceras, lesiones eritematosas cutáneas.
55
13. Uso del material semisintético pulverulento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, u obtenido según el procedimiento de una de las reivindicaciones 6 a 11, en la fabricación de dispositivos o implantes moldeados.
60
14. Uso del material semisintético pulverulento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, u obtenido según el procedimiento de una de las reivindicaciones 6 a 11, en la fabricación de dispositivos o implantes moldeados con bioabsorción controlada que comprenden hilos de sutura de bioabsorción gradual en el tiempo.
15. Uso del material semisintético pulverulento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, u obtenido según el procedimiento de una de las reivindicaciones 6 a 11, para la formulación de preparaciones para sustitutos óseos
65

para uso extemporáneo, para sustitutos óseos extruibles, en particular acondicionados en una jeringa a vacío, sustitutos óseos con soporte colágeno poroso, sustitutos óseos de trama mineral de origen animal o humano, dispositivos de osteosíntesis e implantes moldeados bioabsorbibles, dispositivos con bioabsorción controlada, cementos para sellado de endoprótesis, cementos inyectables para cirugía mínimamente invasiva en vertebroplastia y cifoplastia.

5

16. Uso del carbonato de calcio que se ha sometido a una carbonatación implementado en el material según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, como adyuvante plástico, modelable y adhesivo, en composiciones que comprenden sales de calcio, polímeros naturales o sintéticos, colágeno y tramas minerales de tejidos óseos de origen animal o humano.

10

17. Uso de los biopolímeros insolubles y solubles extraídos implementados en el material según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, como adyuvantes en composiciones pulverulentas que comprenden sales de calcio, polímeros naturales o sintéticos, colágeno, tramas minerales de tejidos óseos de origen animal o humano.

15

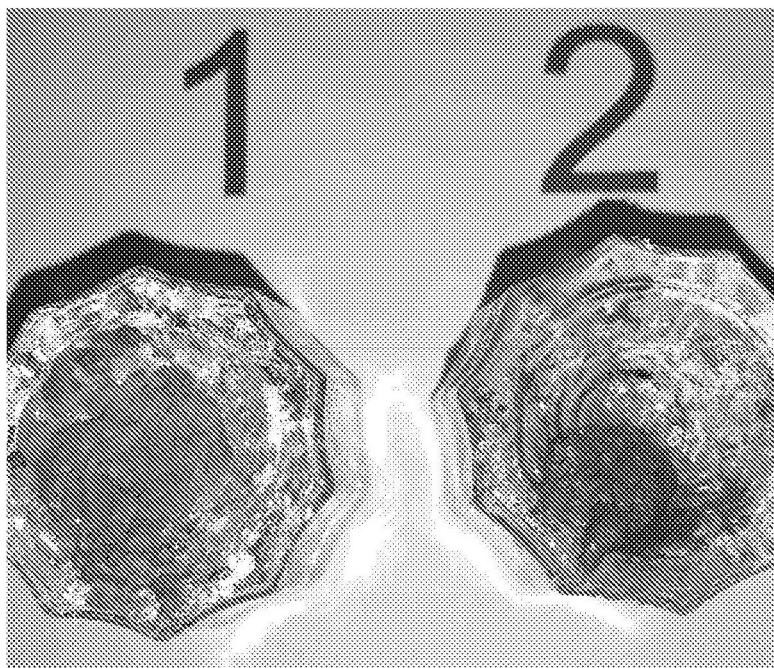


Figura 1

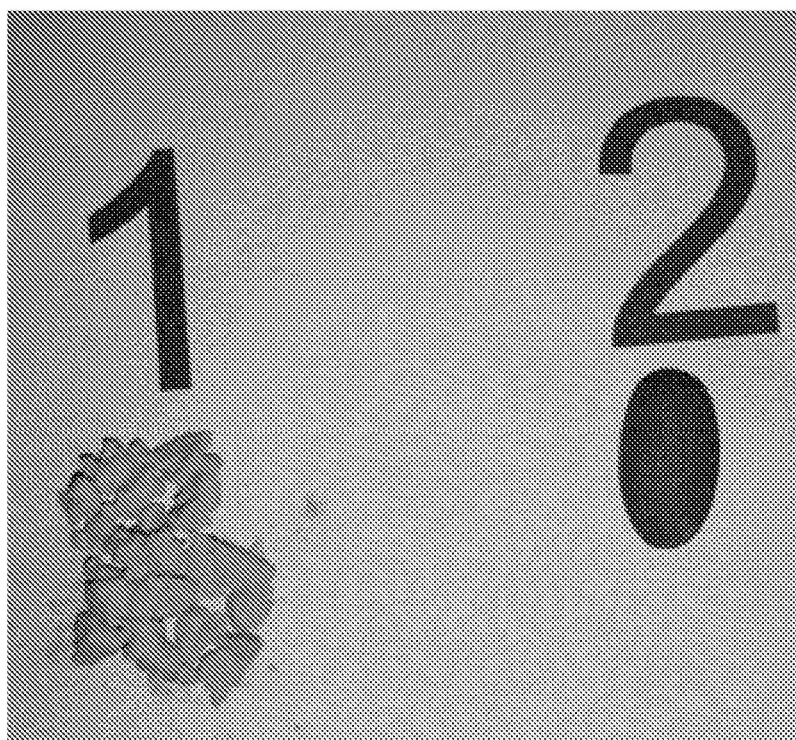


Figura 2