

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 955 740**

21 Número de solicitud: 202230390

51 Int. Cl.:

A61K 6/20 (2010.01)

A61K 35/57 (2015.01)

A61K 6/50 (2010.01)

A61K 6/60 (2010.01)

A61K 6/75 (2010.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

28.04.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

05.12.2023

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (34.0%)**

**Av. María Luisa s/n - Pabellón de Perú
28006 Sevilla (Sevilla) ES;**

UNIVERSIDAD DE OVIEDO (33.0%);

UNIVERSIDAD DE GRANADA (12.0%);

UNIVERSIDAD DE JAÉN (12.0%) y

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (9.0%)

72 Inventor/es:

GÓMEZ MORALES, Jaime;

FERNÁNDEZ PENAS, Raquel;

VERDUGO ESCAMILLA, Cristobal;

ALVAREZ LLORET, Pedro Domingo;

TORRES MANSILLA, Adriana Carolina;

MARCHAL CORRALES, Juan Antonio;

LÓPEZ RUIZ, Elena y

VOLTES MARTÍNEZ, Ana

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **MATERIAL PARA RECUBRIMIENTO PULPAR Y REGENERACIÓN ÓSEA**

57 Resumen:

Material para recubrimiento pulpar y regeneración ósea.

La presente invención se refiere a un material que comprende una membrana extraída de cáscara de huevo recubierta por una capa de fosfato cálcico. La invención también se refiere al procedimiento de obtención de dicho material y a su uso como recubrimiento pulpar o regenerador del tejido óseo.

ES 2 955 740 A1

DESCRIPCIÓN

Material para recubrimiento pulpar y regeneración ósea

5 La presente invención se refiere a un material que comprende una membrana extraída de cáscara de huevo recubierta por una capa de fosfato cálcico. La invención también se refiere al procedimiento de obtención de dicho material y a su uso como recubrimiento pulpar o regenerador del tejido óseo.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La pulpa dental es el único tejido vital del diente que puede quedar expuesto al medio oral por diferentes actuaciones clínicas odontológicas, como la remoción de una lesión de caries profunda, o en procedimientos de preparación prostodóntica (ver "AAE
15 Position Statement on Vital Pulp Therapy" *Journal of Endodontics* 2021, 47, 1340-1344; Duncan, H.F., et al. *European Society of Endodontology position statement: Management of deep caries and the exposed pulp. International Endodontic Journal* 2019, 52, 923–934; Duncan, H.F., n.d. "Present status and future directions—Vital pulp treatment and pulp preservation strategies" *International Endodontic Journal* n/a; and
20 Nicholson, J., Czarnecka, B. "Materials for pulp capping, in: Materials for the Direct Restoration of Teeth". Elsevier, 2016, pp. 177–196). Sin embargo, mediante una estrategia adecuada es posible controlar la exposición pulpar, protegiendo y aislando la pulpa con materiales biocompatibles que permitan un sellado biológico, reduciendo con ello el riesgo de infección y daños posteriores al diente.

25

En la actualidad los materiales empleados para el recubrimiento pulpar en la actividad clínica odontológica están basados en compuestos a base de hidróxido de calcio (producto comercial), silicatos de calcio (marcas comerciales: Biodentina (Septodont, Francia), MTA (Dentsply, Alemania), BioMTA (Cerkamed, Poland), y resinas
30 compuestas. Sin embargo, estos materiales presentan diferentes limitaciones en su aplicación odontológica. Estudios recientes (ver Manaspon et al., "Human dental pulp stem cell responses to different dental pulp capping materials". *BMC Oral Health* 2021, 21, 209; Parirokh, M. et al. "Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review—Part III: Clinical Applications, Drawbacks, and Mechanism of Action." *Journal*
35 *of Endodontics* 2010, 36, 400–413; y Torabinejad, et al. "Mineral trioxide aggregate and

other bioactive endodontic cements: an updated overview – part II: other clinical applications and complications." *International Endodontic Journal* 2010, 51, 284–317) han confirmado la alta toxicidad celular de los materiales con base en hidróxido de calcio y, por lo tanto, con resultados clínicos impredecibles e ineficaces.

5

Por otra parte, se han desarrollado materiales a base de silicato de calcio que, aunque presentan buenas capacidades reparadoras e inductivas (i.e., diferenciación de células pulpares) aún ofrecen desafíos debido a la presencia de elementos tóxicos dentro de su composición, la posible decoloración dental, su difícil manipulación, el largo tiempo de fraguado, el elevado coste del material, la ausencia de un disolvente conocido para este material y la dificultad de eliminación tras el fotocurado (polimerización) (Cervino *et al.*, "Mineral Trioxide Aggregate Applications in Endodontics: A Review" *Eur J Dent* 2020, 14, 683–691; Komabayashi *et al.*, "Current status of direct pulp-capping materials for permanent teeth." *Dental Materials Journal* 2016, 35, 1–12; Manaspon *et al.*, 2021; Parirokh and Torabinejad, 2010; Torabinejad *et al.*, 2018). Además, la base mineral de estos materiales silicatados difiere en cuanto a composición con respecto a las fases minerales presentes a nivel dentinal, principalmente fosfatos de calcio, reduciendo su compatibilidad y estabilidad química a nivel tisular. (De Menezes Oliveira *et al.*, "Microstructure and mineral composition of dental enamel of permanent and deciduous teeth." *Microscopy Research and Technique* 2010, 73, 572–577; and Pasteris *et al.*, Bone and Tooth Mineralization: Why Apatite? *Elements* 2008, 4, 97–104).

Finalmente, los productos con base polimérica o resinas presentan notables inconvenientes debido a la generación de subproductos irritantes durante la polimerización provocando en último término la inflamación del tejido pulpar (Krifka *et al.*, "Oxidative stress and cytotoxicity generated by dental composites in human pulp cells." *Clin Oral Invest* 2012, 16, 215–224; Schneider *et al.*, "Effects of dental composite resin monomers on dental pulp cells." *Dental Materials Journal* 2019, 38, 579–583).

Por otro lado, la regeneración del tejido óseo es un procedimiento clínico que puede emplear membranas en combinación con un injerto óseo (ya sea aloinjerto o xenoinjerto) (Urban, I.A. and Monje, A. "Guided Bone Regeneration in Alveolar Bone Reconstruction." *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America* 2019, 31, 331–338). Las membranas actúan como barreras que previenen la migración de células no deseadas al injerto, además de proveer estabilidad y evitar el colapso de los tejidos

blandos en el defecto que se desea reparar. Por tanto, los materiales han de ser biocompatibles y han de presentar buenas propiedades mecánicas que permitan su manipulación, exhiban capacidades osteoinductivas (por ejemplo, inducir la diferenciación de las células osteogénicas) y osteoconductivas (por ejemplo, proveer andamiaje para las células osteogénicas). Para comprobar esto, las membranas deben ser caracterizadas como se ha hecho previamente en el estudio de otros biomateriales para determinar si son óptimas para su uso en terapias óseas regenerativas (Modi *et al.* "Effect of calcium glucoheptonate on proliferation and osteogenesis of osteoblast-like cells in vitro." *PloS one*, 2019, 14(9)).

En la actualidad estas membranas empleadas para la regeneración tisular dentro de la actividad odontológica, consisten en polímeros sintéticos compuestos por ácido poliglicólico (PGA) y ácido poliláctico (PLA) así como polímeros biológicos como el colágeno entre otros (Agarwal, A. and Gupta, N. D. "Comparative evaluation of decalcified freeze-dried bone allograft use alone and in combination with polylactic acid, polyglycolic acid membrane in the treatment of noncontained human periodontal infrabony defects." *Quintessence Int* 2012, 43, 761–768; Elgali et al., "Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited." *European Journal of Oral Sciences* 2017, 125, 315–337; Sun et al., "Poly(Lactic-co-Glycolic Acid): Applications and Future Prospects for Periodontal Tissue Regeneration." *Polymers (Basel)* 2017, 9, E189; Young-Kyun Kim, D. D. S. "Guided bone regeneration." *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2020, 46, 361–366). Sin embargo, estos materiales presentan un alto coste económico debido, entre otros factores, a su necesario preprocesamiento y adicionalmente ciertas desventajas, como la carencia de propiedades osteoconductivas, la posible reacción inflamatoria frente a un compuesto sintético y la baja estabilidad del colágeno.

Por tanto, sería deseable disponer de un material osteoinductor útil en procesos odontológicos de recubrimiento pulpar y de regeneración del tejido óseo.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un material que comprende una membrana extraída de cáscara de huevo donde las fibras que la componen están recubiertas por una capa de fosfato cálcico.

En otra realización la invención se refiere al material definido anteriormente, que además está recubierto en su totalidad por una segunda capa de fosfato de calcio.

- 5 En otra realización la invención se refiere al material definido anteriormente, donde el fosfato cálcico corresponde a la fase cristalina de hidroxiapatito carbonatado.

- En otra realización la invención se refiere al material definido anteriormente, donde el fosfato cálcico está dopado con uno o más aniones, y preferiblemente donde el fosfato cálcico está dopado con uno o más aniones seleccionados de F^- , Cl^- , HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , SeO_3^{2-} , SeO_4^{2-} , SiO_4^{4-} , citrato y acetato.
- 10

- En otra realización la invención se refiere al material definido anteriormente, donde el fosfato cálcico está dopado con uno o más iones metálicos, preferiblemente donde los iones metálicos son alcalinos, alcalinotérreos, metales de transición, o lantánidos y más preferiblemente donde los iones metálicos se seleccionan de Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^+ , Sr^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ti^{4+} , Gd^{3+} , Eu^{3+} y/o Tb^{3+} .
- 15

- En otra realización la invención se refiere al material definido anteriormente, donde la capa de fosfato cálcico contiene una o más moléculas orgánicas, y preferentemente donde las moléculas orgánicas se seleccionan de ácido L-Aspártico, ácido L-glutámico y mezclas de los mismos.
- 20

- Este material se obtiene mediante la interacción de la membrana de cáscara de huevo con la capa de fosfato cálcico mediante mineralización controlada de dicho recubrimiento inorgánico.
- 25

- Así, otro aspecto de la invención se refiere al procedimiento de obtención del material definido anteriormente, que comprende la etapa (i) de mineralización controlada de la membrana orgánica con el recubrimiento inorgánico mediante el método de cristalización por difusión de vapor.
- 30

- El proceso controlado de mineralización mediante la técnica de cristalización por difusión de vapor genera la precipitación del recubrimiento inorgánico sobre la superficie del soporte orgánico. Dicho procedimiento se realiza en un dispositivo de cristalización
- 35

(seta de cristalización) por difusión de vapores de CO₂ y NH₃ sobre microvolúmenes de solución acuosa rica en iones calcio y fosfato, controlando cinéticamente la nucleación heterogénea del fosfato cálcico sobre la superficie de la membrana.

5 El material de la invención presenta propiedades mecánicas, morfológicas y composicionales que posibilitan su manejo clínico en la actividad odontológica en procesos de recubrimiento pulpar directo e indirecto y en regeneración del tejido óseo.

10 Así, otro aspecto de la invención se refiere al uso del material definido anteriormente para procesos odontológicos de recubrimiento pulpar y de regeneración de tejido óseo.

El material de la invención permite cubrir una exposición accidental de la pulpa y a su vez tiene una óptima compatibilidad con el tejido dentinal, por tanto, resulta útil en procesos de recubrimiento pulpar tanto directo como indirecto.

15 Por tanto, en otra realización, la invención se refiere al uso del material definido anteriormente, donde el recubrimiento pulpar es directo o indirecto.

20 Además, el material de la invención actúa como barrera límite en diversos procedimientos clínicos protegiendo al tejido pulpar de los subproductos irritantes de la polimerización de los composites de restauración. Este material aporta una ventaja considerable con respecto a los descritos en el estado de la técnica por presentar una composición compatible con tejidos mineralizados añadiendo un componente inorgánico (capa de fosfato cálcico) cuyas características pueden modularse para una óptima
25 aplicación en los tejidos dentales.

La particular composición y estructura proteica de la membrana de la cáscara de huevo en la superficie exterior del material de la invención actúa como soporte para la regeneración guiada del tejido óseo, aislando de forma efectiva el injerto óseo y
30 favoreciendo el desarrollo mineral gracias a su composición química altamente biocompatible. De esta manera se construye un soporte que mimetiza al tejido óseo en diferentes aspectos, como su dualidad orgánica e inorgánica y la presencia de fases minerales con características semejantes al apatito biológico.

35

Por tanto, el material de la invención es biocompatible y tiene la capacidad de inducir la diferenciación de células madre resultando útil en los procedimientos de regeneración ósea guiada al ser estable y presentar capacidad osteoinductiva y osteoconductiva. Además, el material de la invención puede comprender células, preferiblemente células humanas. Las células de la invención además pueden comprender células que pueden estar presentes en el tejido pulpar u óseo. Ejemplos de tipos de células que pueden estar presentes en el tejido pulpar u óseo, incluyen, osteocitos, osteoblastos, células del sistema inmune (neutrófilos, basófilos, linfocitos (incluyendo linfocitos B, linfocitos T y linfocitos T reguladores o Treg), eosinófilos, monocitos, macrófagos, células NK (por sus siglas en inglés, *Natural Killer*), (Abreu-Correa *et al.* "Complejo dentino pulpar. Estructura y diagnóstico." *Revista de Medicina Isla de la Juventud* 2013, 12(1), 82-99) células madre mesenquimales que pueden aislarse de tejidos u órganos de un sujeto, como por ejemplo y sin limitarse a, médula ósea, placenta, sangre del cordón umbilical, de gelatina de Wharton, tejido adiposo, membrana amniótica, y tejidos dentales.

A la vista de estas propiedades y aplicaciones, otro objeto de la presente invención se refiere al material definido anteriormente para su uso como medicamento o para la fabricación de un medicamento.

Otro aspecto de la invención se refiere al material definido anteriormente para su uso en el tratamiento de afecciones del tejido óseo mediante recubrimiento pulpar, y preferiblemente mediante recubrimiento pulpar directo o indirecto.

El término "recubrimiento pulpar directo" se refiere a un procedimiento que forma parte de la terapia pulpar vital que preserva la vitalidad de la pulpa dental que ha sido expuesta por acciones traumáticas tales como el efecto de caries o durante procedimientos odontológicos y consiste en aislar asépticamente el campo de trabajo y posicionar un biomaterial directamente en la pulpa expuesta, antes de la restauración permanente del diente, para promover la regeneración pulpar y la generación de dentina reparativa.

El término "recubrimiento pulpar indirecto" se refiere a un procedimiento que consiste en la preservación de una barrera dentinal sobre la pulpa dental tras la remoción de una lesión extensa de, por ejemplo, caries. Sobre dicha barrera se aplica un material que mantiene o promueve la vitalidad de toda o de parte de la pulpa.

- A lo largo de la invención los términos “dopado con uno o más aniones”, “dopado con uno o más iones metálicos” o “contiene una o más moléculas orgánicas”, independientemente significa la posibilidad de que el fosfato cálcico al que se refiere la invención de estar dopado o de que contenga uno o más, preferiblemente 1, 2, 3 ó 4 aniones, iones metálicos o moléculas orgánicas, más preferiblemente por 1, 2 ó 3 aniones, iones metálicos o moléculas orgánicas, y aún más preferiblemente por 1 ó 2 aniones, iones metálicos o moléculas orgánicas. Si están presentes, dichos aniones, iones metálicos o moléculas orgánicas pueden ser iguales o diferentes.
- A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Muestra imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de **(a,b)** membrana de la cáscara de huevo (MCH) anterior al proceso de mineralización (las flechas señalan las mamilas con morfología en agregados granulares) y **(c-h)** membrana de la cáscara de huevo mineralizada con fosfato de calcio (MCH-Min) mediante el método de cristalización por difusión de vapor en diferentes tiempos: **(c-d)** 1 día de mineralización; **(e-f)** 7 días de mineralización; **(g-h)** 15 días de mineralización.

25

Fig. 2. Muestra la identificación mediante difracción de rayos X de la fase mineral formada en la membrana de la cáscara (MCH-Min) mediante el método de cristalización por difusión de vapor. El diagrama de difracción de rayos X del precipitado obtenido mediante cristalización por difusión de vapor (curva superior) corresponde al patrón de difracción de rayos X de referencia del hidroxiapatito carbonatado (curva inferior) (Crystallographic Open Database, referencia COD: 969003552).

30

Fig. 3. Análisis de la membrana de la cáscara de huevo por espectroscopia Infrarroja. **(a)** Espectro de Infrarrojos de la membrana sin mineralizar (MCH). **(b)** Espectro de Infrarrojos de la membrana de cáscara de huevo mineralizada (MCH-Min) mediante el

35

método de cristalización por difusión de vapor.

Fig. 4. Análisis de la membrana de la cáscara de huevo por espectroscopia Raman. **(a)** Espectro Raman de la membrana de cáscara de huevo sin mineralizar (MCH), **(b)** Espectro Raman de la membrana de cáscara de huevo mineralizada (MCH-Min) mediante el método de cristalización por difusión de vapor; **(c)** Imagen ampliada de la banda $\nu_1\text{PO}_4$ Raman donde aparecen indicadas asignaciones de modos vibracionales asociados a la capa de fosfato cálcico y a la membrana.

Fig. 5. Muestra la imagen del microscopio electrónico de barrido (MEB) de una zona mineralizada y otra no mineralizada de una membrana donde se han hecho los análisis de composición elemental mediante energía dispersiva de rayos X (EDS).

Fig. 6. Muestra la biocompatibilidad in vitro de las MCH y MCH-Min. Tasa de proliferación de las células madre mesenquimales (MSC) cultivadas en las MCH y MCH-Min hasta 21 días. Los datos representan la media $\pm$ desviación estándar de la diferencia significativa entre grupos con respecto a las MSCs cultivadas en el día 0 (n=3). (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.005$. (RFU: Unidades de fluorescencia relativa). Abreviaturas $\rightarrow$ MCH-Min T7: membrana de la cáscara de huevo mineralizada con fosfato de calcio mediante el método de cristalización por difusión de vapor a 7 días; MCH-Min T15: membrana de la cáscara de huevo mineralizada con fosfato de calcio mediante el método de cristalización por difusión de vapor a 15 días

Fig. 7. Muestra la morfología y adhesión celular de MSCs sobre MCH y MCH-Min tras un día de cultivo celular. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de MSCs sobre MCH y MCH-Min. Las MSCs presentan una morfología estirada, con mejor adherencia y proliferación en los grupos MCH-Min con respecto al grupo MCH. Las flechas blancas señalan las MSCs adheridas al material objeto de estudio. Barra de escala: 10 μm . Magnificación de 2 KX.

Fig. 8. Muestra la evaluación biológica in vitro de las MCH y MCH-Min. Análisis de inmunofluorescencia para la detección de osteopontina tras 21 días de cultivo celular. Imágenes de microscopía confocal representativas de la presencia de osteopontina en MCH y MCH-Min. Comparación entre muestras cultivadas usando *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) y muestras cultivadas utilizando medio de cultivo celular de

diferenciación osteogénica. Barra de escala: 100µm.

Fig. 9. Muestra la evaluación biológica in vitro de las MCH y MCH-Min. Análisis de inmunofluorescencia para la detección de colágeno I tras 21 días de cultivo celular.

5 Imágenes de microscopía confocal representativas de la presencia de colágeno I en MCH y MCH-Min. Comparación entre muestras cultivadas usando *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) y muestras cultivadas utilizando medio de cultivo celular de diferenciación osteogénica. Barra de escala: 100µm.

10 **Fig. 10.** Muestra en valores cuantitativos la intensidad de marcaje de osteopontina de las MSCs cultivadas en MCH y MCH-Min. Los datos representan la media $\pm$ D.S. de la diferencia significativa entre grupos con respecto a las MSCs cultivadas en el día 0 (n=4). Comparación entre muestras cultivadas usando *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) y muestras cultivadas utilizando medio de cultivo celular de diferenciación osteogénica. La cuantificación de OPN muestra diferencia significativa
15 $p < 0,005$ entre todos los grupos con respecto a los controles de MSC en monocapa. Barra de escala: 100µm. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,005$. Abreviaturas $\rightarrow$ DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; MCH: membrana de la cáscara de huevo; MCH-Min T7: membrana de la cáscara de huevo mineralizada con fosfato de calcio mediante el
20 método de cristalización por difusión de vapor a 7 días; MCH-Min T15: membrana de la cáscara de huevo mineralizada con fosfato de calcio mediante el método de cristalización por difusión de vapor a 15 días; M-O: Células madre mesenquimales diferenciadas a Osteoblastos; MSC: Célula Madre Mesenquimal; OPN: Osteopontina; ST: Sin tratamiento.

25

Fig. 11. Muestra en valores cuantitativos la intensidad de marcaje de colágeno I de las MSCs cultivadas en MCH y MCH-Min. Los datos representan la media $\pm$ D.S. de la diferencia significativa entre grupos con respecto a las MSCs cultivadas en el día 0 (n=4). Comparación entre muestras cultivadas usando *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) y muestras cultivadas utilizando medio de cultivo celular de diferenciación osteogénica. La cuantificación de COL I muestra diferencia significativa
30 $p < 0,05$ entre MCH-MIN T7 cultivadas usando medio de diferenciación osteogénica y MCH-MIN T15 cultivadas usando medio estándar suplementado (DMEM) con respecto a los controles, y $p < 0,005$ entre MCH-MIN T7 DMEM y MCH-MIN T15 cultivadas usando
35 medio de diferenciación osteogénica con respecto a los controles de MSC en monocapa.

Barra de escala: 100µm. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.005$. Abreviaturas → Col I: Colágeno tipo I; DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; MCH: membrana de la cáscara de huevo; MCH-Min T7: membrana de la cáscara de huevo mineralizada con fosfato de calcio mediante el método de cristalización por difusión de vapor a 7 días; MCH-Min T15: membrana de la cáscara de huevo mineralizada con fosfato de calcio mediante el método de cristalización por difusión de vapor a 15 días; M-O: Células madre mesenquimales diferenciadas a Osteoblastos; MSC: Célula Madre Mesenquimal; ST: Sin tratamiento.

10 EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante una descripción del proceso de obtención y unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

15

Ejemplo 1: Procedimiento de obtención y caracterización química y estructural del material objeto de la invención

Las membranas de cáscara de huevo (MCH) se obtuvieron cuidadosamente mediante separación manual de la cáscara de huevo con ayuda de unas pinzas. A continuación, se lavaron con agua desionizada y se seccionaron en piezas circulares de Ø 8 mm utilizando un punzón de biopsia. Estas piezas se colocaron en la cámara superior de la “seta de cristalización” con la superficie activa (el lado que se encontraba en contacto con la cáscara, que muestra las mamilas de la figura 1) hacia arriba. Posteriormente, se deposita sobre ellas microgotas formadas al mezclar 20 microlitros de disolución 50 mM $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ con 20 microlitros de disolución 30 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, con una relación final Ca/P de 5:3 cada una. En la cámara inferior de la seta se añadieron 3 mL de disolución de 40 mM NH_4HCO_3 . Una vez tapada y sellada la seta con grasa de alto vacío de silicona, el NH_4HCO_3 se descompone en gases CO_2 y NH_3 , que difunden hasta la cámara superior a través de un agujero de 6 mm de diámetro, y de ahí difunden sobre las gotas, elevando el pH y favoreciendo la precipitación del fosfato cálcico sobre la sobre las piezas circulares de membrana (MCH). Los experimentos de cristalización se realizaron durante 1, 7, 15 y 21 días a temperatura ambiente y presión atmosférica. Al terminar los experimentos, se abrió el dispositivo y las membranas mineralizadas (MCH-Min) se lavaron con agua desionizada, se secaron al aire durante dos días y

almacenaron para su posterior caracterización.

Ejemplo 2. Procedimiento de obtención y caracterización química y estructural del material objeto de la invención dopado con iones y moléculas bioactivas

5

El método es similar al descrito en el Ejemplo 1, pero variando la composición inicial de las microgotas dependiendo del ion o molécula activa dopante, mezclando las disoluciones de la siguiente manera:

10 a) **F⁻**: 20 microlitros de disolución 40 mM $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ + 10mM NaF mezcladas con 20 microlitros de disolución 30 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

b) **M²⁺**= Mn^{2+} , Co^{2+} : 20 microlitros de disolución 40 mM $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ + 10mM $\text{MCl}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ mezcladas con 20 microlitros de disolución 30 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ con una relación final $(\text{Ca}+\text{M}^{2+})/\text{P}$ de 5:3;

15 c) **M³⁺**= Eu^{3+} , Tb^{3+} : 20 microlitros de disolución de composición 40 mM $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ + 10mM $\text{MCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ mezclados con 20 microlitros de disolución 30 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ con una relación final $(\text{Ca}+\text{M}^{3+})/\text{P}$ de 5:3.

d) **Moléculas bioactivas** = ácido L-aspártico, ácido L-Glutámico: 15 microlitros de disolución 50 mM $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ + 15 microlitros de disolución 30 mM $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ($\text{Ca}/\text{P} = 5/3$) + 10 microlitros de molécula bioactiva de concentración 20 mM.

20

Las imágenes obtenidas mediante microscopio electrónico de barrido (Figura 1) muestran la MCH por su lado activo (Figuras 1a y 1b) y después del proceso de mineralización MCH-Min a varios tiempos (Figuras 1c-h). La membrana posee una estructura de fibras entrecruzadas cubierta por pequeños agregados granulares de material orgánico (denominados “mamilas”). Tras el proceso de mineralización controlada mediante el método de cristalización por difusión de vapor, la membrana presenta un precipitado compuesto por fases minerales de fosfato cálcico recubriendo las fibras entrecruzadas.

30 La identificación mineral del precipitado (Min) formado sobre las fibras de la membrana de la cáscara (MCH-Min) corresponde a fosfato cálcico, fase cristalina identificada mediante difracción de rayos X como hidroxiapatito carbonatado (Figuras 2; fichas referencia; ICDD: 00-019-0272, COD: 969003552). Esta fase mineral se encuentra mayoritariamente presente en tejidos mineralizados de origen biológico, tales como

35 huesos y dientes.

- La caracterización química a nivel molecular del precipitado mineral formado en la membrana se realizó empleando técnicas espectroscópicas complementarias, específicamente mediante espectroscopías de infrarrojo (Figura 3) y Raman (Figura 4).
- 5 La membrana de la cáscara de huevo sin mineralizar (MCH) está compuesta principalmente por bandas proteicas de tipo amida, así como por bandas relacionadas con distintos tipos de lípidos y polisacáridos (Figura 3a y 4a). Posteriormente al proceso de mineralización controlada, el análisis de los espectros muestra una fase mineral donde se observan bandas relacionadas con modos vibracionales de grupos
- 10 moleculares de fosfatos cristalinos (Figura 3b y 4b) asociados con apatito (ν_1, ν_4 de PO_4^{3-}), y una pequeña banda a 875 cm^{-1} asociada a carbonato (Figura 3b), características del apatito carbonatado tal y como se identificó mediante difracción de rayos X.
- 15 Los análisis composicionales, obtenidos por espectroscopía de rayos X (EDS) acoplada al microscopio electrónico de barrido (Tabla 1) muestran la composición relativa de los elementos químicos presentes en la MCH-Min (zona mineralizada, Figura 5a) en comparación con la superficie de membrana no mineralizada (Figura 5b). Los resultados muestran como el proceso controlado de mineralización mediante cristalización por
- 20 difusión de vapor genera un precipitado que recubre la superficie de la membrana cuyas concentraciones relativas de los elementos calcio y fósforo (razón molar de aproximadamente 1,65) están asociadas a la relación estequiométrica presente en apatito.

25 Tabla 1. Análisis EDS de la MCH-Min en la zona mineralizada y no mineralizada

Composición elemental EDS (% atómico) de MCH-Min		
	Zona no mineralizada	Zona mineralizada
O	57.3	42.4
Ca	5.1	35.9
P	0	21.7
S	3.2	-

Los análisis composicionales obtenidos por espectroscopía de rayos X (EDS) de MCH-Min dopados con iones o conteniendo moléculas bioactivas siguiendo el ejemplo 2, se muestran en la Tabla 2. En ellos se puede observar un aumento en la concentración de

oxígeno, así como la presencia del ion dopante en la composición de la capa de fosfato cálcico. En los experimentos usando Flúor, L-Glu y L-Asp hay un aumento significativo de la concentración de Oxígeno.

5 Tabla 2. Análisis EDS de la MCH-Min dopada con iones y moléculas bioactivas

Composición elemental EDS (% atómico)								
Elemento	MCH-Min sin dopar	Elemento o molécula dopante						
		Mn	Co	F	Eu	Tb	L-Glu*	L-Asp
O	42.4	70.9	61.6	75.1	56.7	72.4	75.1	74.3
P	21.7	11.5	7.4	7.8	18.7	10.2	8.6	4.9
S	0	2.6	19.8	5.9	-	6.14	4.04	14.4
Ca	35.9	11.07	8.6	11.04	18.5	8.86	12.2	6.4
Dopante	-	3.71	2.4	-	6.01	2.27	-	-

Ejemplo 3: Ensayo de proliferación celular de las MSCs sembradas en la superficie del material objeto de la invención

- 10 La proliferación celular se determinó mediante el ensayo colorimétrico AlamarBlue (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Éste reveló una tendencia a mantener la proliferación celular a lo largo del cultivo en algunas condiciones y a aumentarla en otras (Figura 6). En el grupo MCH, se observa una ligera reducción no significativa de la proliferación celular a lo largo de los días. Sin embargo, la tasa de
- 15 proliferación en MCH-Min T7 aumentó desde el día 1 hasta el día 10 de cultivo, con un leve descenso no significativo en el día 21. Por otra parte, el biomaterial condicionado de la forma MCH-Min T15 mostró un aumento significativo de la tasa de proliferación después de 21 días. Ambas condiciones de estudio, MCH-Min T7 y MCH-Min T15, mostraron un aumento significativo en la proliferación celular en el tiempo con respecto
- 20 al grupo MCH. En esencia, estos resultados indican que el nuevo biomaterial consistente en membranas de huevo mineralizadas proporcionó un entorno favorable a las células, apoyando una buena proliferación celular en diferentes procesos de mineralización.

Ejemplo 4: Análisis morfológico y de adhesión celular mediante imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología y adherencia celular se examinaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Para ello, MCH y MCH-Min se fijaron en glutaraldehído frío al 2,5%. Tras varios lavados con PBS, las muestras se deshidrataron utilizando una serie graduada de etanol (30-100%) y se secaron mediante un secador de punto crítico Emscope CPD 750. Las muestras se fijaron a una seta de aluminio y se recubrieron con una aleación de oro y paladio, utilizando un Sputter Coater 108 Auto. Las imágenes de las muestras se obtuvieron utilizando un SEM Quanta 400 (FEI), a un aumento de 2KX. Las imágenes obtenidas mediante SEM (Figura 7) muestran que las MSCs presentan mejor adherencia y una mayor capacidad de proliferación en los grupos MCH-Min con respecto al grupo MCH. Las flechas blancas señalan las MSCs adheridas al material objeto de estudio. Magnificación de 2 KX.

15

Ejemplo 5: Evaluación de la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales sobre el material objeto de la invención

La diferenciación osteogénica se evaluó mediante técnicas de inmunofluorescencia. Las MCH y MCH-Min sembradas con MSCs se fijaron tras 21 días en cultivo celular con PFA al 4% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para el análisis por inmunofluorescencia, las muestras se trataron con un anticuerpo primario contra la osteopontina (Santa Cruz Biotechnology, 1:200), y colágeno tipo I (Abcam, 1:200). A continuación, las secciones se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con AlexaFluor 488 o 594 (ThermoFisher, 1:500) y se tiñeron con DAPI. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio Leica TCS-SP5 y se analizaron con el software Image J. La tinción de inmunofluorescencia reveló la presencia de osteopontina y colágeno I tras 21 días de cultivo (Figuras 8 y 9), lo que indica que la mineralización de la membrana del huevo promovió la diferenciación osteogénica de las MSC. La intensidad de marcaje de la osteopontina (OPN) y el colágeno I (COL I) presente en las MSCs sembradas sobre MCH y MCH-Min también fue evaluada, mostrando un aumento significativo de la presencia de estas proteínas. La cuantificación de OPN muestra diferencia significativa $p < 0,005$ entre todos los grupos con respecto al control de MSCs sembradas sin el material objeto de estudio en monocapa (Figura 10). La cuantificación de COL I muestra diferencia significativa $p < 0,05$ entre MCH-MIN T7 cultivadas usando medio de

35

diferenciación osteogénica y MCH-MIN T15 cultivadas usando medio estándar suplementado (DMEM) con respecto a los controles, y $p < 0,005$ entre MCH-MIN T7 (DMEM) y MCH-MIN T15 cultivadas con medio de diferenciación osteogénica con respecto a los controles de MSCs sembradas sin el material objeto de estudio en monocapa (Figura 11).

REIVINDICACIONES

1. Material que comprende una membrana extraída de cáscara de huevo donde las fibras que la componen están recubiertas por una capa de fosfato cálcico.
5
2. El material según la reivindicación 1, que además está recubierto en su totalidad por una segunda capa de fosfato de calcio.
3. El material según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el fosfato cálcico
10 corresponde a la fase cristalina de hidroxiapatito carbonatado.
4. El material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el fosfato cálcico está dopado con uno o más aniones.
- 15 5. El material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el fosfato cálcico está dopado con uno o más iones metálicos.
6. El material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la capa de fosfato cálcico contiene una o más moléculas orgánicas.
20
7. Procedimiento de obtención del material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende la etapa (i) de mineralización controlada del soporte orgánico con el recubrimiento inorgánico mediante cristalización por difusión de vapor.
- 25 8. Uso del material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para procesos odontológicos de recubrimiento pulpar y de regeneración de tejido óseo.
9. El uso del material según la reivindicación 8, donde el recubrimiento pulpar es directo o indirecto.

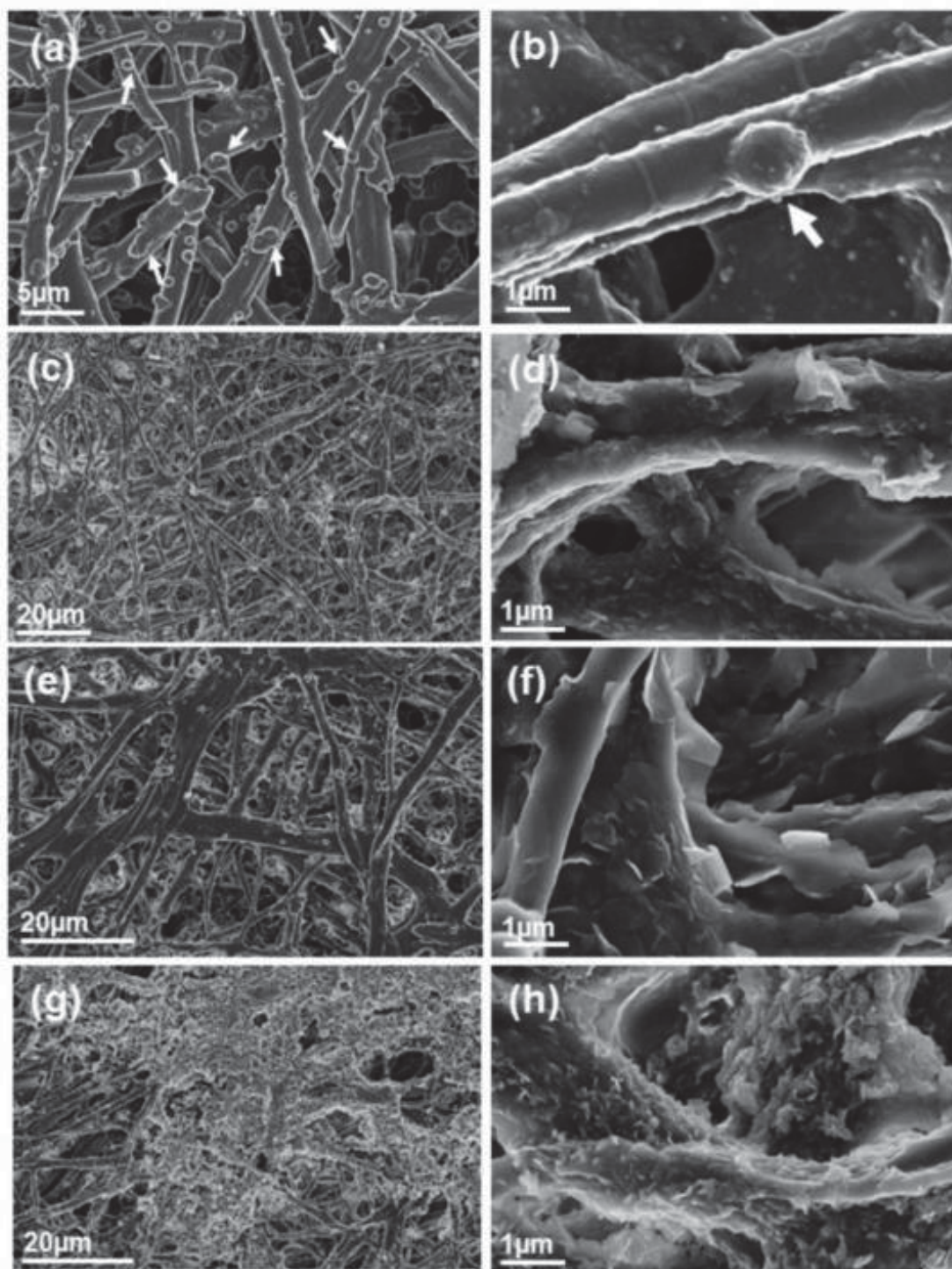


Fig. 1

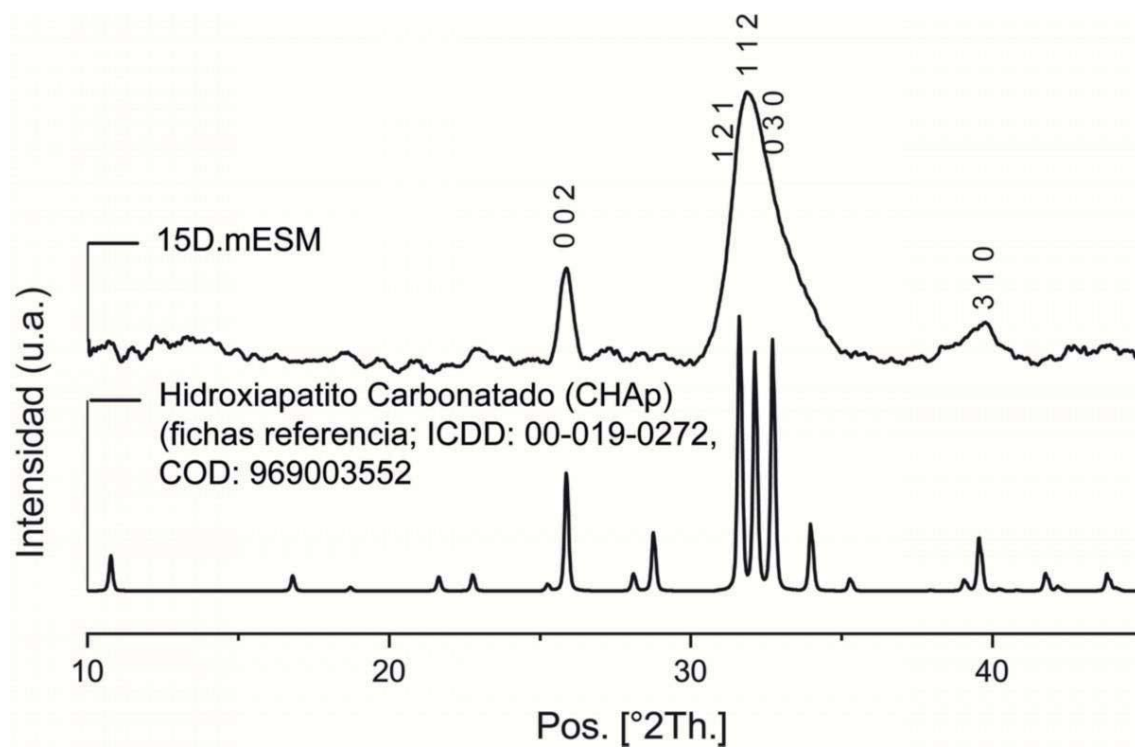


Fig. 2

Espectroscopía Infrarroja

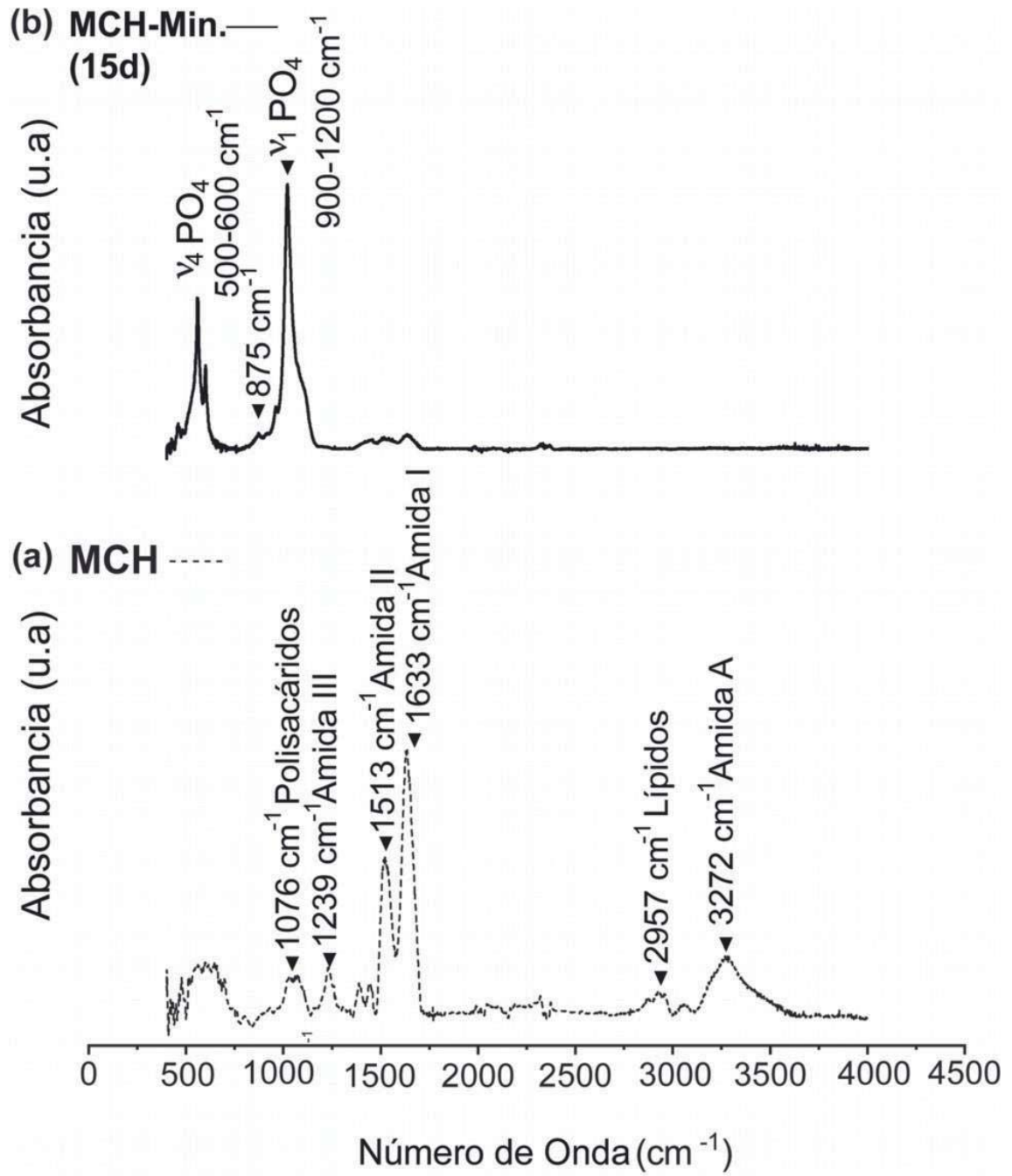


Fig. 3

Espectroscopía Raman

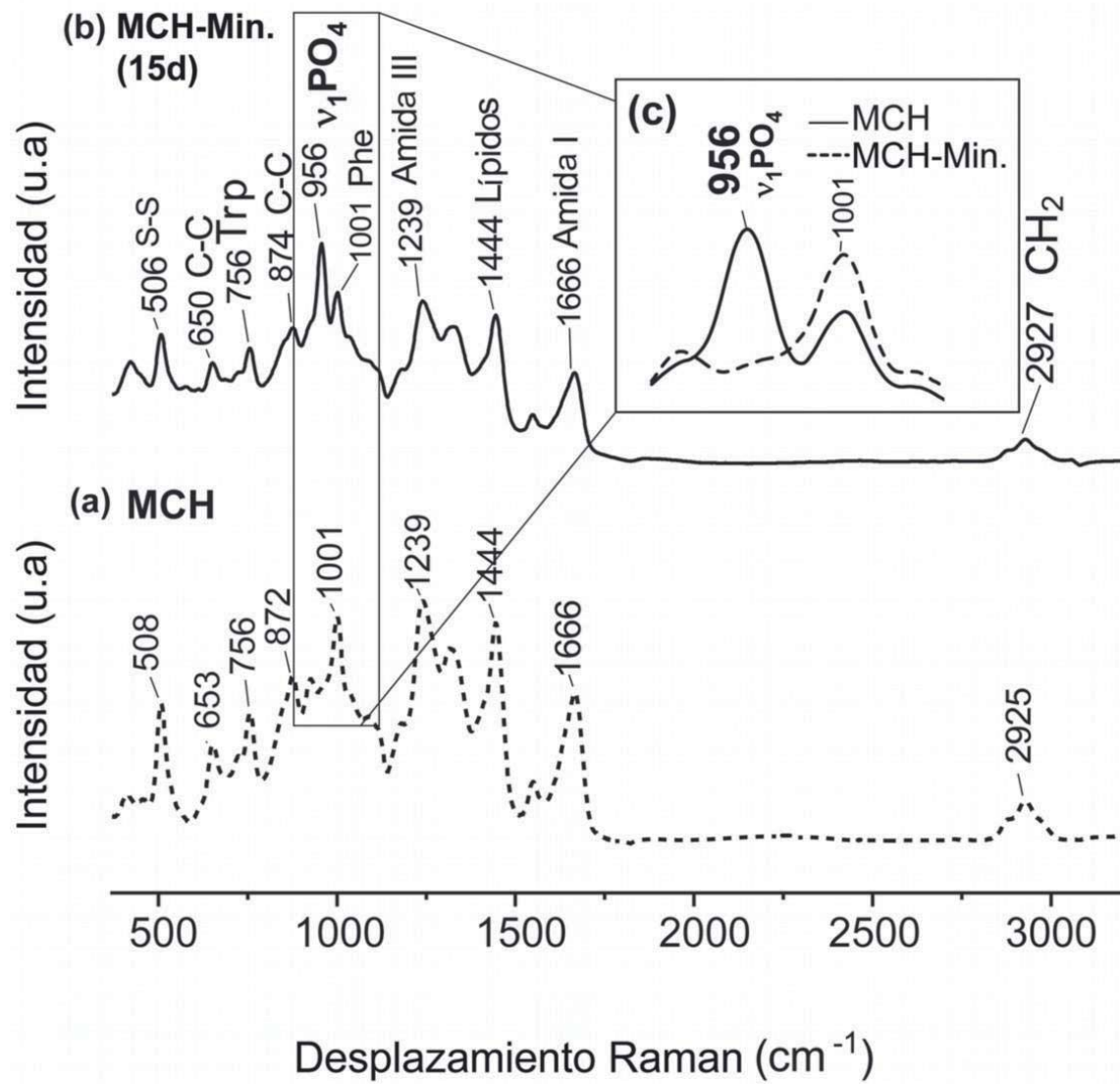


Fig. 4

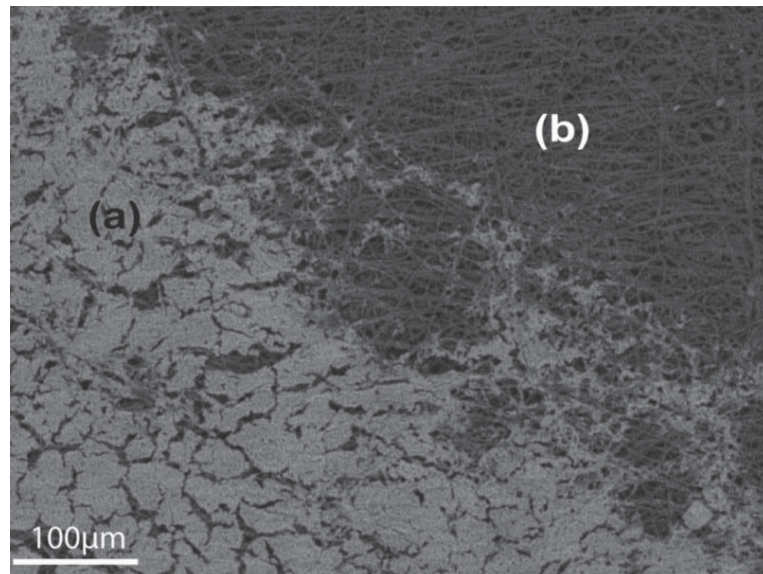


Fig. 5

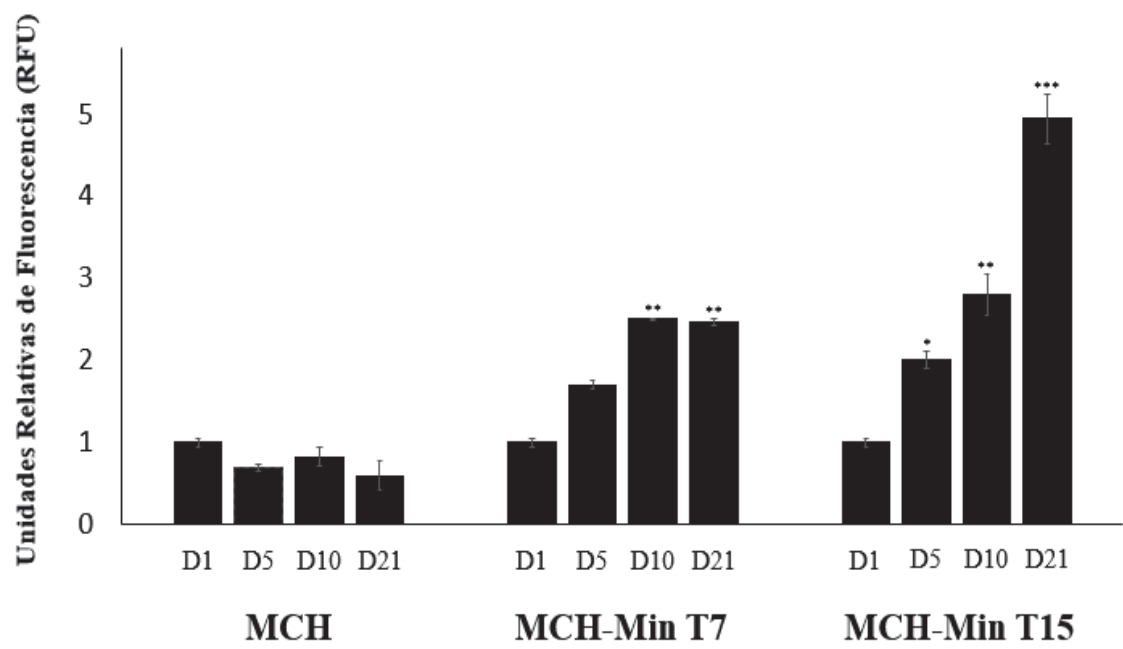


Fig. 6

D1

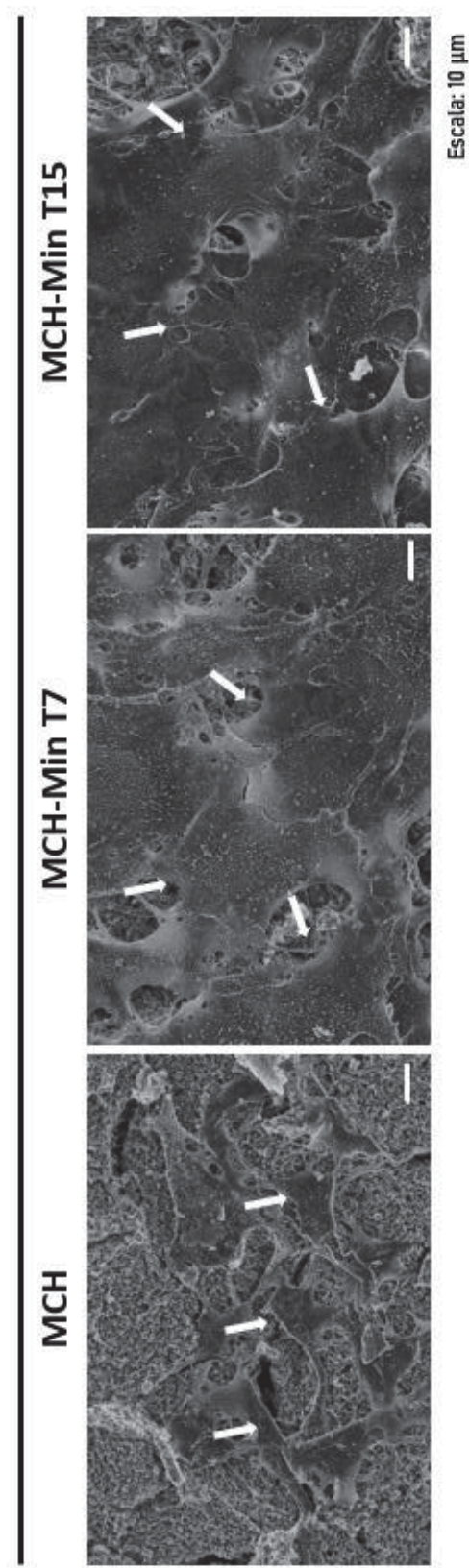


Fig. 7

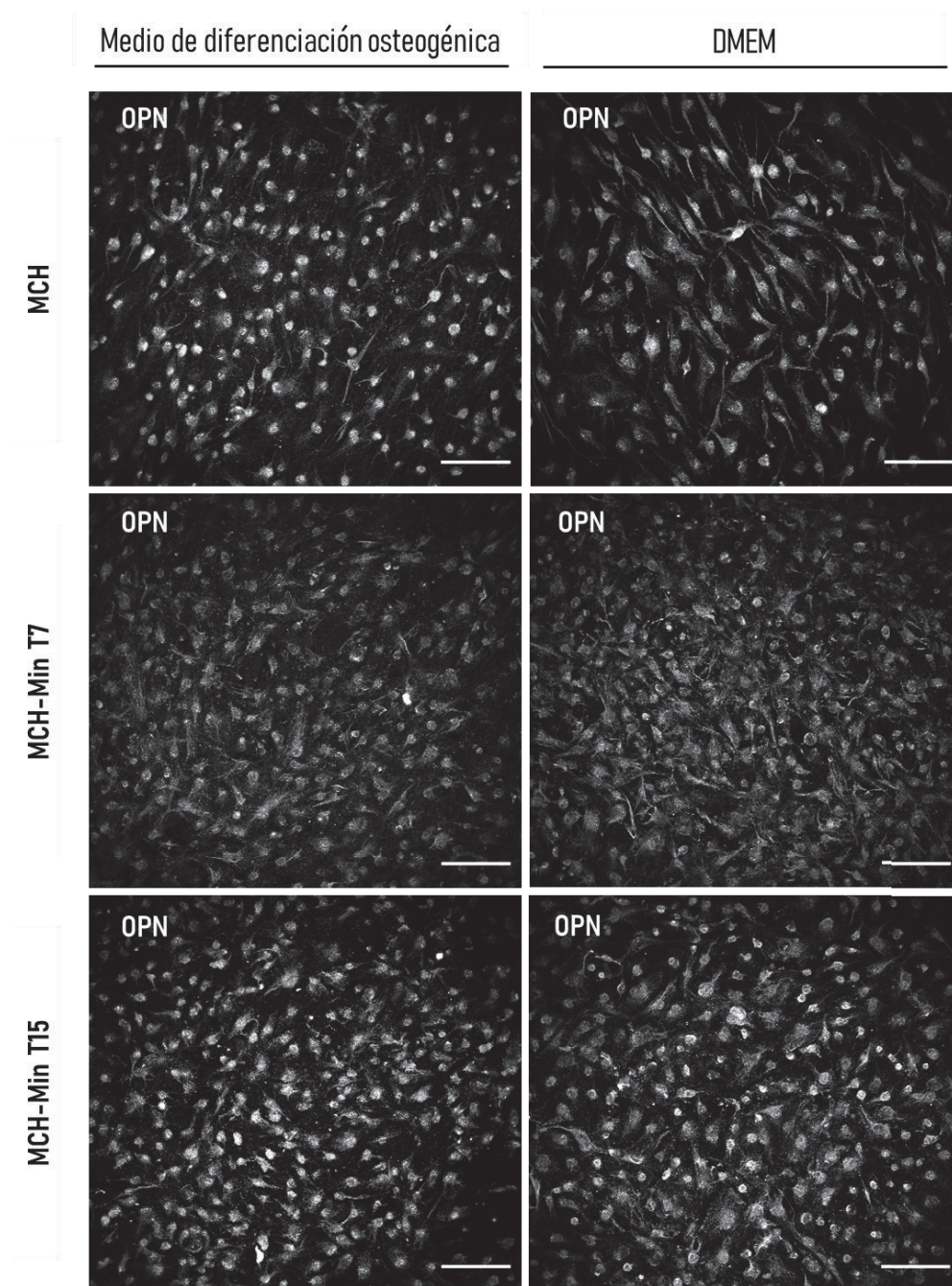


Fig. 8

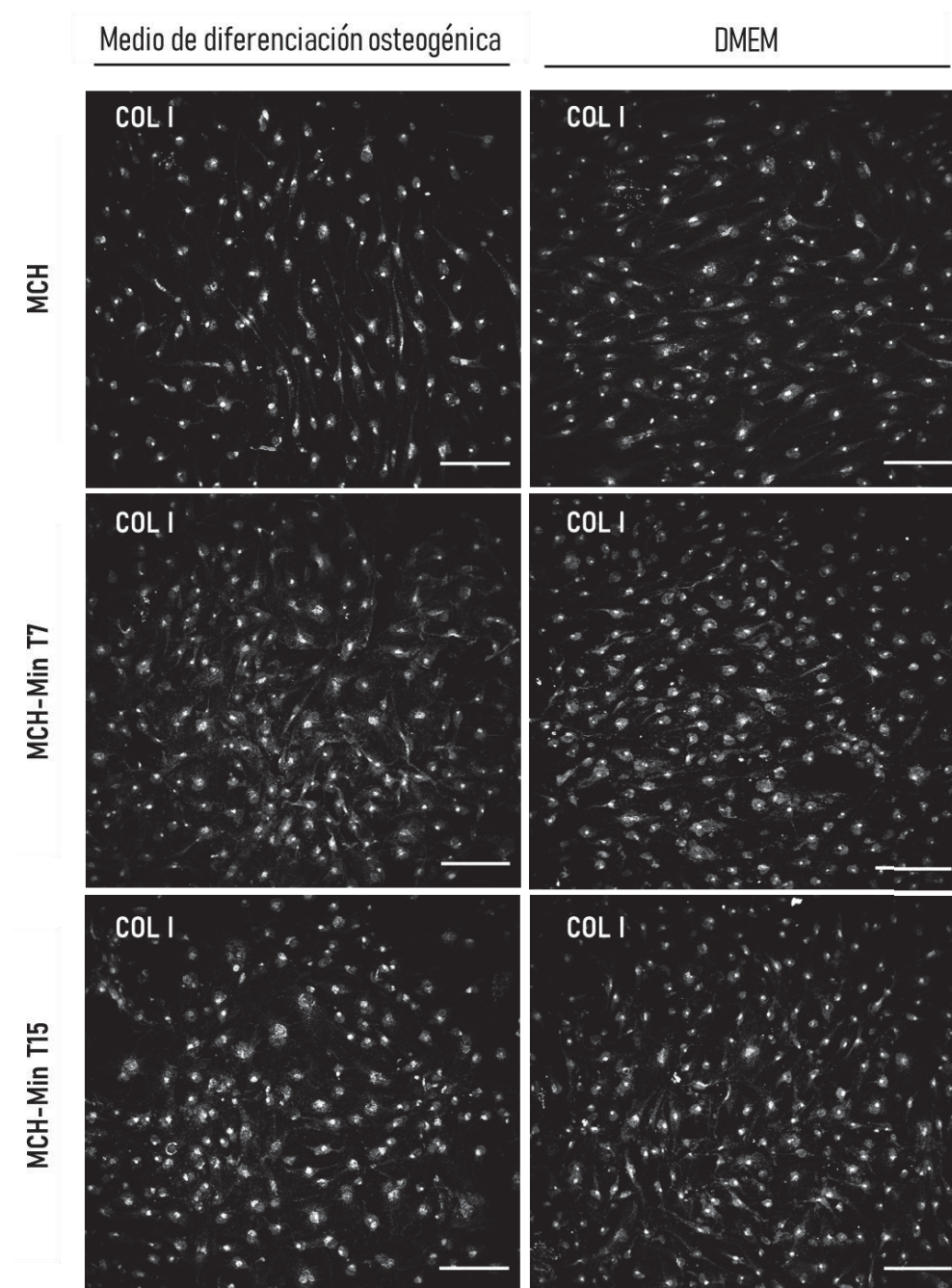


Fig. 9

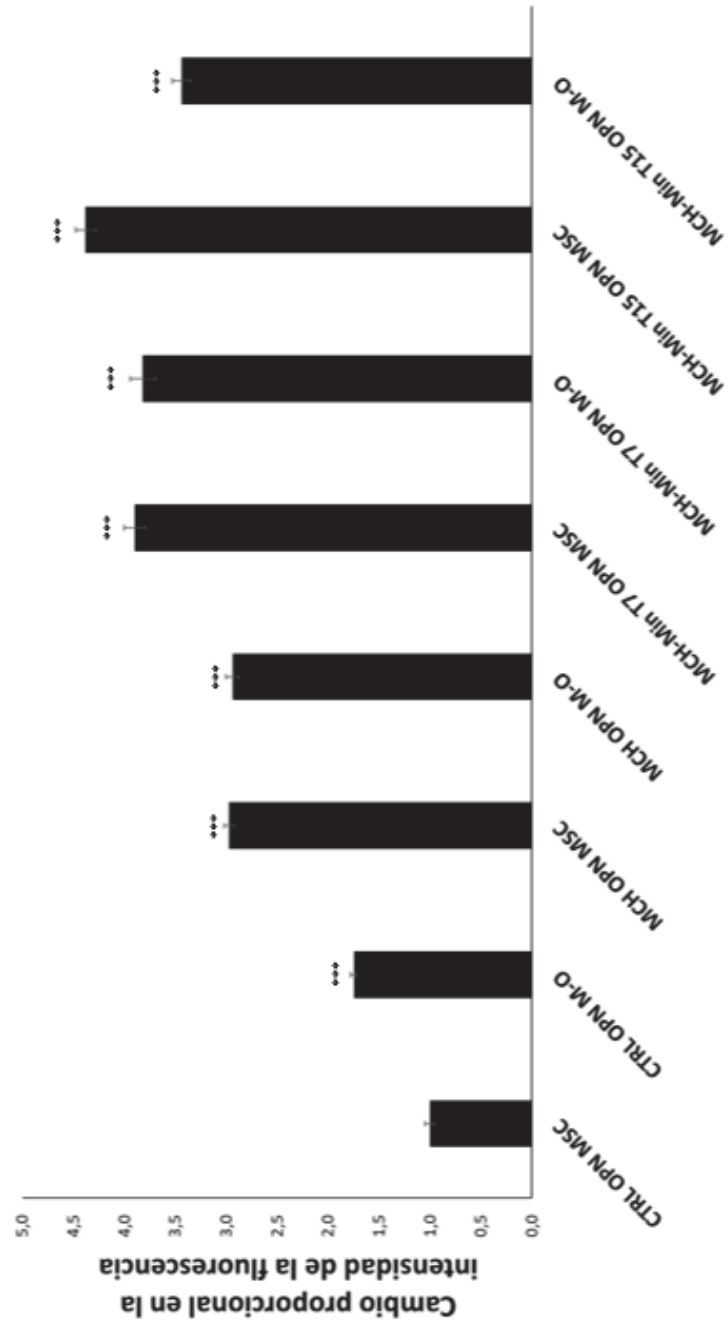


FIG. 10

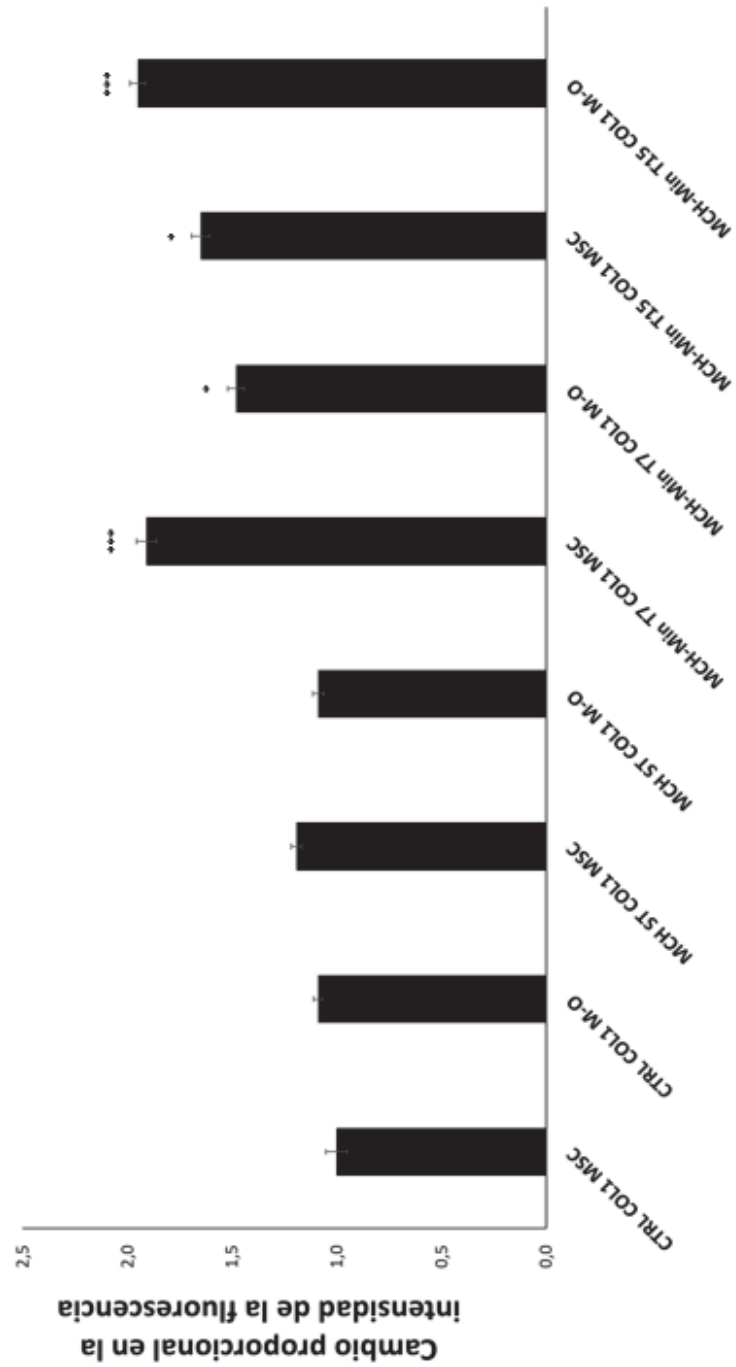


FIG. 11



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 202230390

②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.04.2022

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ZHANG Y <i>et al.</i> Flower-like agglomerates of hydroxyapatite crystals formed on an egg-shell membrane. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 20110201 Elsevier Amsterdam, NL. Danino Dganit; Stradner Anna, 01/02/2011, Vol. 82, Nº 2, Páginas 490 - 496, ISSN 0927-7765. página 492, columna izquierda, primer, tercer párrafo; página 493, columna derecha, primer párrafo; página 496, columna derecha, tercer párrafo; figura 6; resumen.	1, 2, 7
Y		3-6
Y	OCHOA I. <i>et al.</i> Síntesis y caracterización de polvos de hidroxiapatita carbonatada tipo b con diferentes contenidos de carbonato. Revista Colombiana de Materiales, 2021, No 17, 2021, Nº 17, Páginas 22-32 Recuperado de Internet <URL: https://doi.org/10.17533/udea.rcm.n17a03 >, ISSN 2256-1013. Resumen.	3
Y	ZHITONG ZHAO. Effect of Doping Ions and Organic Molecules on the Precipitation and Biological Interactions of Nanostructured Calcium Phosphates PhD Thesis Materials science and engineering doctoral program, 2015, Páginas 1-198. resumen.	4-6
A	MOHAMED S, <i>et al.</i> Evaluation of eggshell powder as an experimental direct pulp capping material. Future Dental Journal, 2018, Vol. 4, Páginas 160-164. resumen.	1-9
A	NAFI&APOS <i>et al.</i> Development of eggshell membrane as an alternative for black triangle reconstruction following orthodontic tooth movement. Journal of Physics: Conference Series 2019 IOP Publishing UK, 30/11/2018, Vol. 1170, Páginas 012077 (6 pp.), ISSN 1742-6596 (print), <DOI: doi:10.1088/1742-6596/1170/1/012077 >. página 2, primer párrafo; página 3, segundo párrafo; página 5, primer, segundo y último párrafo.	1-9
A	MAHDAVI S <i>et al.</i> Avian Egg: A Multifaceted Biomaterial for Tissue Engineering. Industrial and Engineering Chemistry Research 20211208 American Chemical Society usa., 08/12/2021, Vol. 60, Nº 48, Páginas 17348 - 17364, ISSN 0888-5885 (print) ISSN 1520-5045 (electronic), <DOI: doi: 10.1021/acs.iecr.1c03085 >. página 7, primer párrafo.	1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
29.03.2023

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K6/20 (2020.01)

A61K35/57 (2015.01)

A61K6/50 (2020.01)

A61K6/60 (2020.01)

A61K6/75 (2020.01)

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

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, NPL, INTERNET.