

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 959 339**

51 Int. Cl.:

A61K 33/14 (2006.01)
A61F 2/28 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)
A61L 27/10 (2006.01)
A61L 27/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2018 PCT/EP2018/064378**
87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2018 WO18220141**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2018 E 18729624 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2023 EP 3634433**

54 Título: **Partículas de calcio con liberación de iones controlada, procedimiento para producir las mismas y uso de las mismas**

30 Prioridad:

01.06.2017 EP 17382325

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.02.2024

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA (50.0%)
Jordi Girona 31
08034 Barcelona, ES y
FUNDACIÓ INSTITUT DE BIOENGINYERIA DE CATALUNYA (IBEC) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ENGEL LÓPEZ, ELISABETH;
CASTAÑO LINARES, OSCAR;
MARTÍ MUÑOZ, JOAN y
PLANELL ESTANY, JOSEP ANTON**

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 2 959 339 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

Partículas de calcio con liberación de iones controlada, procedimiento para producir las mismas y uso de las mismas

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a partículas de calcio que muestran propiedades de liberación de iones controlada y a un procedimiento para producir dichas partículas, para biomateriales de ingeniería de tejidos que contienen dichas partículas de calcio, así como a las partículas de calcio que se pueden obtener a partir del mismo.

10

ANTECEDENTES

[0002] El daño de los tejidos duros y blandos generalmente desencadena una respuesta de cicatrización de heridas sólida y exitosa, que se asocia con un aumento en la concentración de calcio alrededor del tejido dañado (véase, por ejemplo, Wood W. y col., Wound healing calcium flashes illuminate early events, Current Biology, 2001, 22(1), R14-R16 y Wood, W y col., Calcium flashes orchestrate the wound inflammatory response through DUOX activation and hydrogen peroxide release, Current Biology, 2003, 23(5), 424-429).

[0003] Los andamios biocompatibles que comprenden calcio se conocen desde los años 70. En particular, los vidrios a base de fosfato (P_2O_5 -CaO- Na_2O - TiO_2) tienen propiedades de disolución únicas en fluidos a base de agua. Las velocidades de degradación (y solubilidad) pueden variar de horas a varias semanas ajustando su composición química. Además, estos vidrios se pueden sintetizar para incluir óxidos modificadores que son capaces de inducir una función biológica específica, mejorar la biocompatibilidad e inducir la liberación controlada de ciertos iones (véase, por ejemplo, el documento EP 2 386 525 A1). Se sabe que los iones de calcio estimulan la migración dirigida celular y la proliferación celular, y se ha demostrado que los vidrios a base de fosfato de calcio son biocompatibles (véase Navarro M. y col., Cellular response to calcium phosphate glasses with controlled solubility, Journal of Biomedical Materials Research, 2003, 67(3), 1009-1015). Por lo tanto, los vidrios a base de fosfato de calcio encuentran usos clínicos potenciales como rellenos de cavidades óseas, sistemas de administración de fármacos, fases de refuerzo biodegradables en el caso de materiales compuestos para dispositivos de fijación ósea, andamios de ingeniería tisular, pero también en el procedimiento de ingeniería de regeneración tisular.

[0004] La mayoría de los vidrios a base de fosfato se preparan mediante procedimientos de enfriamiento rápido de la masa fundida. Una mezcla de precursores de óxido se funde en un horno a temperaturas superiores a 1000 °C; la composición final del vidrio depende de la relación de los precursores. Una vez que se ha logrado una fusión homogénea, el vidrio se forma colando diferentes formas como placas. Para eliminar la tensión residual, las masas fundidas normalmente se recuecen a la temperatura de transición vítrea (T_g) y se enfrían muy lentamente a temperatura ambiente.

[0005] El procedimiento sol-gel ofrece un procesamiento a baja temperatura junto con la mezcla homogénea de los reactivos, lo que conduce a vidrios de mejor calidad con una morfología más fácilmente controlada. Un procedimiento típico comienza con una solución de los elementos comprendidos involucrados en el producto final, que reacciona con el agua para producir partículas coloidales. Esta suspensión se conoce comúnmente como "sol". Los precursores típicos son alcóxidos inorgánicos, que experimentan reacciones de hidrólisis y policondensación para formar un coloide, y cloruros metálicos.

45

[0006] El documento WO 2011/141896, y su solicitud de prioridad EP2386525, describen materiales nanoestructurados de sol-gel para la regeneración de tejido óseo que comprenden un vidrio con la siguiente composición molar sobre una base de óxido: del 5 al 60 % de CaO, del 30 al 60 % de P_2O_5 , hasta el 60 % de MgO, 0 % < TiO_2 < 25 %, hasta el 25 % de Na_2O y/o hasta el 25 % de K_2O .

50

[0007] El documento EP0275688 describe un procedimiento de fabricación para obtener óxidos metálicos a partir de compuestos organometálicos mediante reacciones de hidrólisis alcalina en un medio orgánico. Los ligandos orgánicos son generalmente un grupo hidrocarburo unido por medio de un átomo de oxígeno, tal como un alquilo o alquileo inferior.

55

[0008] En Uskokovic V. y Desai T.A., J. Biomed. Mater. Res. Parte A, 2013, 101A, 1416-1426 y en Dasgupta, S. y col., Acta Biomater., 2009, 5(8), 3112-3121, los autores describen nanopartículas de fosfato de calcio (CAP) para la administración de fármacos ajustable.

[0009] Yu, Bobo, y col., Langmuir, 2012, 28(50), 17465-17476 describen el uso de diferentes precursores de calcio (nitrato, cloruro o 2-metoxietóxido) para la síntesis sol-gel a baja temperatura (<130 °C) (Si, P y Ca) y evalúan su potencial para la producción de híbridos bioactivos para la regeneración ósea compuestos por Si, Ca y también P.

[0010] El documento WO 2003/101471 describe una composición que contiene calcio obtenida de tejido óseo animal para tratar trastornos relacionados con el crecimiento o la consolidación de huesos o tejido óseo, donde la

65

composición es un complejo de fosfato de calcio que tiene un contenido de proteína de menos del 25 % en peso.

[0011] El documento US 5.618.549 describe sales de calcio biocompatibles y bioabsorbibles en forma de partículas para el tratamiento de ciertas enfermedades óseas.

[0012] Sin embargo, todos los materiales mencionados anteriormente implican mezclas complejas de materiales precursores y muestran propiedades de biomateriales implantables eficaces lejos de ser ideales, ya que no se dispersan de manera estable dentro de matrices poliméricas de biomateriales típicas, tales como ácido poliláctico. Además, en algunos casos, la velocidad de liberación de iones de dichos materiales es extremadamente lenta, en el intervalo de cientos de días (hasta 500 días) y en todos ellos la velocidad de liberación depende de la concentración inicial de los componentes (por ejemplo, la relación de titanio), por lo que, para obtener diferentes relaciones de liberación, se requiere un procedimiento sintético completamente nuevo con diferentes concentraciones de precursores. Adicionalmente, los materiales de vidrio a base de fosfato no solo liberan iones de calcio, sino también iones de sodio, fosfatos y titanio que pueden tener efectos secundarios indeseables, tales como producir hipernatremia u otros problemas de toxicidad. La evidencia reciente muestra que la ingesta de TiO_2 perjudica la homeostasis inmunitaria intestinal y sistémica, inicia lesiones preneoplásicas y promueve el desarrollo de criptas aberrantes en el colon de rata (Bettini, S. y col., Scientific Reports, 2017, vol. 7, pág. 40373).

[0013] El estado de la técnica también contiene una serie de descripciones de materiales alternativos para su uso en la regeneración ósea:

- Rajzer y col., Mat. Sc. Engineer., 2014, C44, 183-90 se refiere a una gelatina que contiene nanopartículas de pentóxido de fósforo, tetraisopropóxido de titanio, 2-metóxido de sodio y calcio (CMOE).
- Sun y col., Chinese Chem. Lett., 2013, 24(2), 170-2 se refiere a nanopartículas de silicato de calcio bioactivo hechas de ortosilicato de tetraetilo (TEOS) y CMOE
- Wang y col., Appl. Mater. Interfaces, 2014, 6(7), 4935-9 también se refiere a nanopartículas de silicato de calcio bioactivo hechas de ortosilicato de tetraetilo (TEOS) y CMOE
- Martin y col., Phil. Trans R. Soc., 2012, A370(1963), 1422-43, también se refiere a nanopartículas de silicato de calcio bioactivo hechas de ortosilicato de tetraetilo (TEOS) y CMOE
- Greasley y col., J. Colloid Interface Sc., 2016, 469, 213-23, también se refiere a nanopartículas de silicato de calcio bioactivo hechas de ortosilicato de tetraetilo (TEOS) y CMOE
- El documento US 5 591 453 A describe en los ejemplos 10-12 vidrio a base de sílice derivado de sol-gel que contiene Ca y P sintetizado mezclando fosfato de trietilo (TEP), TMOS y CMOE
- El documento US 2007/258916 A1 partículas de vidrio bioactivo para aplicación dental también hechas de TEP, TMOS y CMOE.

[0014] Por lo tanto, aún no se ha propuesto una solución para un material biodegradable con liberación de calcio libre de componentes de Ti, P o Na, que muestre una velocidad de liberación controlable en una cantidad de tiempo biológicamente relevante y que no requiera procedimientos sintéticos complicados.

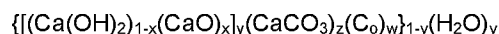
DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0015] La presente invención ofrece ahora una solución a estos problemas, está relacionada con un procedimiento de preparación de un material de calcio caracterizado por que muestra propiedades de liberación de calcio ajustables, donde la velocidad de liberación de dicho material de calcio puede ajustarse seleccionando la temperatura de tratamiento de las partículas del alcóxido de calcio utilizadas en la preparación del material de calcio. La presente invención también se refiere a materiales que comprenden exclusivamente $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaCO_3 , CaO y una fracción orgánica (<1,5 %).

[0016] En general, someter un alcóxido de calcio en forma sólida a un tratamiento de temperatura moderada (entre 70 y 200 °C) produce partículas de calcio que muestran altas velocidades de liberación inicial del calcio (estallidos de liberación altos) con velocidades de liberación muy bajas después de la primera hora inicial (véase la figura 4). Sorprendentemente, los inventores han encontrado que cuando se someten dichos materiales de alcóxido de calcio a temperaturas que varían de 300 a 600 °C, muestran una velocidad de liberación de Ca^{2+} lenta y constante (al menos 5 días) junto con una velocidad de liberación de calcio inicial reducida (estallido inicial). Por lo tanto, cuanto mayor es la temperatura, menor es el estallido inicial y mayor es la liberación sostenida de iones de calcio. Contrariamente a una composición química específica tal como CaCO_3 que se caracteriza por un perfil de liberación de calcio específico, la presente invención describe un procedimiento simple para obtener una variedad de composiciones químicas que simplemente surgen del ajuste del tratamiento de temperatura del material de

alcoxialcóxido de calcio, lo que permite el ajuste de los perfiles de liberación de calcio. Por lo tanto, la presente invención se refiere al campo de la liberación de iones controlada con fines de ingeniería de tejidos.

[0017] Por consiguiente, en un primer aspecto, la invención se refiere a un material de calcio, de fórmula general (I):



donde $0 \leq x \leq 1$, $0,06 \leq y \leq 0,75$, $0,14 \leq z \leq 0,93$, $0,01 \leq w \leq 0,11$, $0 \leq v \leq 0,44$ y C_o designa una fracción que contiene carbono que comprende uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en alcoxialcóxido de calcio, alcoxialcohol, alcohol, alcóxido de calcio, grafito y combinaciones de los mismos donde el alcoxialcóxido en el alcoxialcóxido de calcio es un alcoxialcóxido de fórmula general R_1OAO^- , donde A es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ divalente, opcionalmente sustituida, lineal o ramificada y R_1 es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal o un arilo $\text{C}_6\text{-C}_{12}$; el alcoxialcohol es un alcoxialcohol de fórmula general R_1OAOH , donde A es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ divalente, opcionalmente sustituida, lineal o ramificada y R_1 es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal o un arilo $\text{C}_6\text{-C}_{12}$; el alcohol es un alcohol de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal o ramificado, opcionalmente sustituido, o alcohol de arilo $\text{C}_6\text{-C}_{12}$ y el alcóxido de calcio es alcóxido de calcio de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal o ramificado, opcionalmente sustituido, o alcóxido de calcio de arilo $\text{C}_6\text{-C}_{12}$ y cuando cada aparición de A o R_1 está sustituida, el sustituyente se selecciona de $-(\text{CH}_2)_n\text{OR}'$ y $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'\text{R}'$, donde n es un número entero seleccionado de 0 a 6 y R' se selecciona independientemente de H y cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal.

[0018] En un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un material de calcio de fórmula general (I), que comprende las etapas de:

- a) preparar al menos un alcoxialcóxido de calcio de fórmula general $\text{Ca}(\text{OAO}\text{R}_1)_2$ en forma sólida, donde A es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ divalente, opcionalmente sustituida, lineal o ramificada y R_1 es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal o un arilo $\text{C}_6\text{-C}_{12}$; y
- b) someter el al menos un alcoxialcóxido de calcio en forma sólida de la etapa (a) a un tratamiento de temperatura de entre 70°C y 600°C .

[0019] Los inventores han observado que al variar la temperatura de tratamiento, el material de calcio como se definió anteriormente muestra diferentes perfiles de liberación de calcio.

[0020] Por lo tanto, en un tercer aspecto, la invención se refiere a una matriz biocompatible que comprende el material de calcio del primer aspecto.

[0021] En un cuarto aspecto, la invención se refiere al material de calcio del primer aspecto o a la matriz biocompatible del tercer aspecto para su uso en la regeneración de tejidos, preferentemente seleccionada del grupo que consiste en cicatrización de heridas, regeneración ósea, regeneración cutánea, regeneración muscular, regeneración cardíaca y promoción de la vascularización.

[0022] En un quinto aspecto, la invención se refiere al uso del material de calcio del primer aspecto o la matriz biocompatible del tercer aspecto para la regeneración cosmética del cabello.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0023] Estas y otras características y ventajas de la invención se entenderán claramente en vista de la descripción detallada de la invención que se hace evidente a partir de las realizaciones preferidas de la invención, dadas sólo como un ejemplo y sin limitarse a las mismas, con referencia a las figuras.

Figura 1: Espectro de espectroscopía dispersiva de energía (EDS) de la muestra Ca400 que muestra la presencia de elementos Ca, O y C.

Figura 2: Difractogramas de rayos X de las muestras Ca100 (Fig. 2A); Ca300 (Fig. 2B) y Ca500 (Fig. 2C), así como difractogramas comparativos de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y CaCO_3 , y CaCO_3 y CaO , en la figura 2A, 2B y 2C, respectivamente.

Figura 3: Carbono Orgánico Total (TOC, Δ) y Contenido de Carbono Total (TCC, $\square$) en función del tratamiento de temperatura (muestras Ca100, Ca200, Ca300, Ca400 y Ca500) obtenidos mediante análisis elemental.

Figura 4A: Liberación de Ca^{2+} acumulada (μm de Ca^{2+} por mg de muestra) para las muestras Ca100 (o), Ca200 ($\blacklozenge$), Ca300 (Δ), Ca400 ($\blacksquare$) y Ca500 (X) en función del tiempo de inmersión, hasta 4 días. Las barras de error representan la variabilidad de los datos obtenidos de tres réplicas.

Figura 4B: Liberación de Ca^{2+} acumulada (μm de Ca^{2+} por mg de muestra) para las muestras Ca100 (o), Ca200 (♦), Ca300 (Δ), Ca400 (■) y Ca500 (X) en función del tiempo de inmersión, durante las primeras 6 horas del experimento. Las barras de error representan la variabilidad de los datos obtenidos de tres réplicas.

Figura 5A: Resultados de dispersión de luz dinámica (DLS) de la muestra Ca400.

Figura 5B: Análisis de potencial zeta de la muestra Ca400.

Figura 6: Liberación de Ca^{2+} acumulada (μm de Ca^{2+} por mg de muestra) para nanopartículas de vidrio de fosfato comparativas (relación atómica P:Ca 6:7)) para muestras tratadas a 25 °C (●), 200 °C (♦) y 300 °C (A) en función del tiempo de inmersión, durante las primeras 24 horas del experimento.

Figura 7: Difractogramas de rayos X de las muestras Ca400 (Ca400-control), Ca400-1, Ca400-2 y Ca400-3, así como difractogramas comparativos de CaCO_3 y CaO .

Figura 8: Imágenes de FE-SEM de nanopartículas dispersas de las partículas precursoras Ca400, Ca400-1, Ca400-2 y Ca400-3.

Figura 9: Liberación de Ca^{2+} acumulada (μm de Ca^{2+} por mg de muestra) para las muestras Ca400, Ca400-1, Ca400-2 y Ca400-3 en función del tiempo de inmersión. Las barras de error representan la variabilidad de los datos obtenidos de tres réplicas.

Figura 10: Evaluación del área de cicatrización de heridas en diferentes puntos de tiempo. Imágenes representativas del grupo tratado con apósito comercial y PLA-Ca400 los días 0, 2, 4, 6 y 8 después del tratamiento.

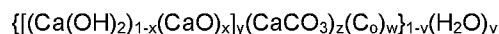
Figura 11: Evaluación del área de cicatrización de heridas en diferentes puntos de tiempo en los días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8. Porcentaje del tamaño de la herida en relación con el tamaño inicial durante el transcurso del experimento. Los datos se expresan como la media $\pm$ SD (n=8). * $p < 0,05$ (frente a PLA-Ca400), *** $p < 0,0001$ (frente a PLA-Ca400).

Figura 12: Obtención de imágenes y cuantificación de vasos sanguíneos inmunomarcados para CD31. A) Imágenes representativas de inmunotinción contra CD31 de secciones de heridas tratadas con apósito comercial y PLA-Ca400 8 días después de la herida. B) Cuantificación del número de vasos de las imágenes inmunoteñidas. * $p < 0,05$ (frente a PLA-Ca400).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0024] A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y expresiones científicas utilizadas en esta invención tienen el mismo significado tal como se entienden normalmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta descripción. Cada aspecto o realización como se define en esta invención se puede combinar con cualquier otro aspecto o realización a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida se puede combinar con cualquier otra característica indicada como preferida.

[0025] El primer aspecto de la invención se refiere a un material de calcio, de fórmula general (I):



donde $0 \leq x \leq 1$, $0,06 \leq y \leq 0,75$, $0,14 \leq z \leq 0,93$, $0,01 \leq w \leq 0,11$, $0 \leq v \leq 0,44$ y C_0 designa una fracción que contiene carbono que comprende uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en alcoxiálcoxido de calcio, alcoxiálcohol, alcohol, alcóxido de calcio, grafito y combinaciones de los mismos, donde el alcoxiálcoxido en el alcoxiálcoxido de calcio es un alcoxiálcoxido de fórmula general R_1OAO^- , donde A es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ divalente, opcionalmente sustituido, lineal o ramificado y R_1 es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal o arilo $\text{C}_6\text{-C}_{12}$; el alcoxiálcohol es un alcoxiálcohol de fórmula general R_1OAOH , donde A es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ divalente, opcionalmente sustituido, lineal o ramificado y R_1 es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal o arilo $\text{C}_6\text{-C}_{12}$; el alcohol es un alcohol de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal o ramificado, opcionalmente sustituido o alcohol de arilo $\text{C}_6\text{-C}_{12}$ y el alcóxido de calcio es alcóxido de calcio de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal o ramificado, opcionalmente sustituido o alcóxido de calcio de arilo $\text{C}_6\text{-C}_{12}$ y cuando cada aparición de A o R_1 está sustituida, el sustituyente se selecciona de $-(\text{CH}_2)_n\text{OR}'$ y $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'\text{R}'$, donde n es un número entero seleccionado de 0 a 6 y R' se selecciona independientemente de H y cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal.

[0026] En una realización particular, la fracción de carbono puede comprender además moléculas de hidrocarburos saturados o insaturados seleccionadas de alcanos, alquenos, alquinos, cicloalcanos y/o hidrocarburos aromáticos.

- [0027]** La fracción que contiene carbono debe entenderse como la cantidad relativa de compuestos resultantes de someter un alcoxicalcóxido de calcio como se define a continuación al procedimiento de la invención. Por lo tanto, en una realización, el material de calcio de la invención es un material donde la fracción que contiene carbono es el resultado de someter un alcoxicalcóxido de calcio de fórmula general $\text{Ca}(\text{OAOR}_1)$, donde A es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ divalente lineal o ramificado y R_1 es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal, a un procedimiento de termólisis.
- [0028]** En otra realización, dichos A y R_1 son cadenas de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal. En otra realización preferida, al menos uno de A o R_1 es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal. En otra realización particular más, A es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal opcionalmente sustituida.
- [0029]** En una realización, A es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ ramificado. En otra realización preferida, al menos uno de A o R_1 es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ no sustituido lineal. En una realización particular, dichos A y R_1 son cadenas de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal no sustituidas.
- [0030]** En una realización preferida, el material de calcio de la invención es un material como se define en las reivindicaciones donde la fracción que contiene carbono es el resultado de someter un alcoxicalcóxido de calcio de fórmula general $\text{Ca}(\text{OAOR}_1)$, donde A es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ divalente, opcionalmente sustituida, lineal o ramificada y R_1 es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal o un arilo $\text{C}_6\text{-C}_{12}$, a un procedimiento de termólisis.
- [0031]** En una realización preferida adicional de la invención, en el material de calcio de la invención, la fracción que contiene carbono es el resultado de someter un alcoxicalcóxido de calcio de fórmula general $\text{Ca}(\text{OAOR}_1)$, seleccionado de aquellos en los que R_1 es metilo, etilo, propilo o fenilo, y A es $(\text{CH}_2)_n$ con $n = 1, 2$ o 3 opcionalmente sustituido y opcionalmente ramificado como se define a continuación, a un procedimiento de termólisis.
- [0032]** En una realización preferida adicional de la invención, en el material de calcio de la invención, la fracción que contiene carbono es el resultado de someter un alcoxicalcóxido de calcio de fórmula general $\text{Ca}(\text{OAOR}_1)$, seleccionado de aquellos en los que R_1 es metilo, etilo o propilo y A es $(\text{CH}_2)_n$ con $n = 1, 2$ o 3 , más preferentemente, en los que R_1 es metilo y A es $(\text{CH}_2)_2$ a un procedimiento de termólisis.
- [0033]** En una realización preferida de la invención, la fracción que contiene carbono es una fracción que contiene carbono donde el alcoxicalcóxido en el alcoxicalcóxido de calcio es un alcoxicalcóxido de fórmula general R_1OAO^+ , donde A es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ divalente, lineal o ramificada y R_1 es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal; el alcoxicalcóhol es un alcoxicalcóhol de fórmula general R_1OAOH , donde A es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ divalente, lineal o ramificada y R_1 es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal; el alcohol es un alcohol de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal o ramificado y el alcóxido de calcio es un alcóxido de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal o ramificado.
- [0034]** En una realización preferida adicional de la invención, la fracción que contiene carbono es una fracción que contiene carbono donde el alcoxicalcóxido en el alcoxicalcóxido de calcio es un alcoxicalcóxido de fórmula general R_1OAO^+ , donde A es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ divalente, opcionalmente sustituida, lineal o ramificada y R_1 es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal o arilo $\text{C}_6\text{-C}_{12}$; el alcoxicalcóhol es un alcoxicalcóhol de fórmula general R_1OAOH , donde A es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ divalente, lineal o ramificada y R_1 es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal o arilo $\text{C}_6\text{-C}_{12}$; el alcohol es alcohol de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal o ramificado, opcionalmente sustituido, o alcohol de arilo $\text{C}_6\text{-C}_{12}$ y el alcóxido de calcio es alcóxido de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal o ramificado, opcionalmente sustituido, o alcóxido de arilo $\text{C}_6\text{-C}_{12}$.
- [0035]** En otra realización preferida de la invención, la fracción que contiene carbono se selecciona del grupo que comprende 2-metoxietóxido de calcio, 2-metoxipropóxido de calcio, 3-metoxipropóxido de calcio, 3-metoxibutóxido de calcio, 4-metoxibutóxido de calcio, 2-etoxietóxido de calcio, 2-propoxietóxido de calcio, 3-propoxipróxido de calcio, etóxido de calcio, metóxido de calcio, 2-metoxietanol, 2-metoxipropanol, 3-metoxipropanol, 3-metoxibutanol, 4-metoxibutanol, 2-etoxietanol, 2-propoxietanol, 3-propoxipropanol, metanol, etanol, propanol, butanol, grafito o combinaciones de los mismos.
- [0036]** En el contexto de la presente invención, y como se describe a continuación, los precursores de calcio son fácilmente reconocibles por el experto en la materia como complejos de calcio que comprenden dos ligandos.
- [0037]** En otra realización preferida más de la invención, la fracción que contiene carbono se selecciona del grupo que comprende 2-metoxietóxido de calcio, 1,3-dietoxi-2-propóxido de calcio, 2-metoxipropóxido de calcio, 3-metoxipropóxido de calcio, 3-metoxibutóxido de calcio, 4-metoxibutóxido de calcio, 2-etoxietóxido de calcio, 1-etoxi-2-propóxido de calcio, 2-propoxietóxido de calcio, 3-propoxipropóxido de calcio, 1-metoxi-2-propóxido de calcio, 1-metoxi-2-butóxido de calcio, 2-fenoxietóxido de calcio, etóxido de calcio, metóxido de calcio, 2-metoxietanol, 1,3-dietoxi-2-propanol, 2-metoxipropanol, 3-metoxipropanol, 3-metoxibutanol, 4-metoxibutanol, 2-etoxietanol, 1-etoxi-2-propanol, 2-propoxietanol, 3-propoxipropanol, 1-metoxi-2-propanol, 1-metoxi-2-butanol, 2-fenoxietanol, metanol, etanol, propanol, butanol, grafito o combinaciones de los mismos.
- [0038]** En el contexto de la presente invención, los términos alcóxido, metóxido y etóxido se refieren a la base conjugada de un alcohol que porta calcio como contraión. Por lo tanto, el término alcóxido debe entenderse como

alcóxido de calcio.

[0039] Tanto en el contexto de la presente invención como es ampliamente reconocido en la técnica, "cadena de alquilo ramificado" se refiere a una cadena de alquilo que comprende al menos una cadena de alquilo C₁-C₆ secundario unida a cualquiera de los átomos de carbono que forman la cadena de alquilo primario. De esta manera, los ejemplos no limitantes de una cadena de alquilo C₁-C₆ secundaria son -CH₃, -CH₂CH₃ o -CH₂CH₂CH₃. Naturalmente, una cadena de alquilo primario ramificado tendrá al menos uno de los H en un resto CH₂ reemplazado por dicha cadena de alquilo secundario.

[0040] El término "sustituido" o su antónimo "no sustituido" se refiere a la presencia o ausencia, respectivamente, de grupos sustituyentes comúnmente conocidos en la técnica. En una realización preferida, el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en -(CH₂)_nOR', -(CH₂)_nNR'R' y -(CH₂)_nCONR'R', donde n es un número entero seleccionado de 0 a 6 y R' se selecciona independientemente de H, cadena de alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado. En otra realización preferida, el número entero n descrito anteriormente es un número entero seleccionado de 0 a 3 y R' descrito anteriormente se selecciona independientemente de H, cadena de alquilo C₁-C₃ lineal. Un ejemplo no limitante de un grupo sustituyente sería -OH o -CH₂-O-CH₂CH₃.

[0041] El término "arilo" se refiere a un grupo arilo C₆-C₁₂. Un "arilo C₆-C₁₂" se refiere a un sustituyente radical que comprende de 1 a 2 anillos aromáticos condensados que comprenden de 6 a 12 átomos de carbono, preferentemente 6 átomos de carbono. En una realización particular, arilo es fenilo.

[0042] En el contexto de la presente invención, el material de calcio es una mezcla sólida de compuestos en la que la mayoría de dichos compuestos comprenden cationes de calcio.

[0043] En una realización preferida de la invención, el material de calcio de la invención es un material que tiene un contenido de calcio comprendido entre el 35 %-55 % en peso, preferentemente del 40 % al 51 % en peso. El resto de elementos que se suman al peso total de dicho material de calcio son C, O y H. Por tanto, es evidente que el material de la invención está sustancialmente desprovisto de átomos de P o Ti. En una realización preferida, el material de la invención no comprende átomos de P ni Ti.

[0044] En otra realización particular más de la invención, el material de calcio como se definió anteriormente es un material de calcio en forma de partículas, preferentemente micropartículas y nanopartículas. En una realización preferida, el material de calcio tal como se definió anteriormente está en forma de nanopartículas. El término "nanopartícula" usado en esta invención puede abarcar una partícula que tiene todas las dimensiones de 1 a 100 nm. El término "micropartícula" usado en esta invención puede abarcar una partícula que tiene todas las dimensiones superiores a al menos 100 nm. Por ejemplo, cuando las partículas tienen la forma de una esfera, la dimensión será el diámetro de la esfera. Los tamaños de partícula pueden determinarse mediante técnicas tales como técnicas de microscopía electrónica (TEM/Fe-SEM) o de dispersión dinámica de luz (DLS).

[0045] El segundo aspecto de la invención proporciona un procedimiento para la preparación de un material de calcio, que comprende las etapas de:

a) Preparar al menos un material de alcóxido de calcio de fórmula general Ca(OAOR₁)₂ en forma sólida, donde A es una cadena de alquilo C₁-C₆ divalente, lineal o ramificado y R₁ es una cadena de alquilo C₁-C₆ lineal o arilo C₆-C₁₂; y

b) Someter el al menos un alcóxido de calcio en forma sólida de la etapa (a) a un tratamiento de temperatura de entre 70 °C y 600 °C.

[0046] En una realización particular del segundo aspecto, A en la etapa (a) es una cadena de alquilo C₁-C₆ divalente, opcionalmente sustituido, lineal o ramificado y R₁ es una cadena de alquilo C₁-C₆ lineal.

[0047] La composición precisa de la fórmula del material de calcio (I) de la presente invención (es decir, los valores de x, y, z, w y v) se puede ajustar dentro de intervalos definibles simplemente seleccionando la temperatura de la etapa (b). Al ajustar dicha temperatura, los inventores han descubierto sorprendentemente que se obtiene una gama de varios materiales de calcio con diferentes perfiles de liberación.

[0048] En el contexto de la presente invención, una cadena de alquilo C₁-C₆ es una cadena de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono derivada de un alcano que carece de un átomo de hidrógeno. En una realización particular, la cadena de alquilo del alcóxido de calcio es una cadena de alquilo lineal. En otra realización particular más, dicha cadena de alquilo es una cadena de alquilo ramificado. La cadena de alquilo C₁-C₆ divalente, lineal o ramificado, A debe entenderse como una cadena de alquilo como se definió anteriormente pero que carece de un átomo de hidrógeno de cada extremo de la cadena, por lo que forma una cadena puente entre dos átomos de oxígeno del alcóxido de calcio. En una realización particular, la cadena de alquilo divalente A es una cadena de alquilo divalente lineal. En otra realización particular más, la cadena de alquilo divalente es una cadena de alquilo divalente

ramificado. En una realización particular, las cadenas de alquilo descritas anteriormente, A y R₁, son cadenas lineales no sustituidas.

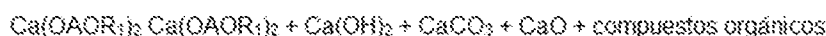
[0049] Los ejemplos no limitativos de alcoxiálcoxidos de calcio de fórmula general Ca(OAOR₁)₂ como se mencionó anteriormente son 2-metoxietóxido de calcio, 1,3-dietoxi-2-propóxido de calcio, 2-metoxipropóxido de calcio, 3-metoxipropóxido de calcio, 3-metoxibutóxido de calcio, 4-metoxibutóxido de calcio, 2-etoxietóxido de calcio, 1-etoxi-2-propóxido de calcio, 2-propoxietóxido de calcio, 3-propoxipropóxido de calcio, 1-metoxi-2-propóxido de calcio, 1-metoxi-2-butóxido de calcio y 2-fenoxietóxido de calcio. En una realización particular, R₁ se selecciona de metilo, etilo y fenilo. En otra realización particular, A se selecciona de una cadena de alquilo C₁-C₃ lineal o ramificado, opcionalmente sustituido. Preferentemente, el alcoxiálcoxido de calcio se selecciona de 2-metoxietóxido de calcio, 1,3-dietoxi-2-propóxido de calcio, 2-etoxietóxido de calcio, 1-etoxi-2-propóxido de calcio, 1-metoxi-2-propóxido de calcio, 1-metoxi-2-butóxido de calcio y 2-fenoxietóxido de calcio. En una realización particular, R₁ es metilo y A es (CH₂)₂, es decir, en una realización preferida, el al menos un alcoxiálcoxido de calcio es 2-metoxietóxido de calcio.

[0050] En una realización particular, el alcoxiálcoxido de calcio en forma sólida de la etapa (a) se aísla antes de someterlo al tratamiento de temperatura de la etapa (b). Es evidente para el experto en la materia en el contexto de la presente invención, que el aislamiento de un producto sólido implica generalmente una o varias de las siguientes etapas: filtración o filtración al vacío, centrifugación, evaporación, sublimación. En una realización particular, la etapa de aislamiento se realiza mediante centrifugación. En otra realización particular, la etapa de aislamiento se realiza mediante filtración o filtración al vacío. En otra realización particular, el alcoxiálcoxido de calcio aislado en forma sólida se seca a una temperatura de entre 25 °C y 75 °C durante un periodo de 30 minutos a 8 horas. Opcionalmente, el alcoxiálcoxido de calcio sólido seco se muele antes de someterlo a la etapa (b).

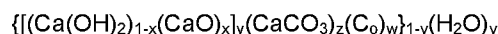
[0051] Los inventores han observado que al variar la temperatura de tratamiento, el material de calcio obtenible mediante el procedimiento definido anteriormente muestra sorprendentemente diferentes perfiles de liberación de calcio.

[0052] Sin restringirse a la teoría, se cree que es la energía térmica aplicada sobre el alcoxiálcoxido de calcio lo que permite ajustar la composición química del material de calcio resultante, produciendo partículas de calcio que cumplen con un perfil de liberación de Ca²⁺ específico. Una vez sometidas al tratamiento de temperatura, las partículas de calcio ya no están compuestas estrictamente por un solo alcoxiálcoxido de calcio y su composición exacta es una mezcla de compuestos de calcio en diferentes relaciones, relaciones que dependen de las condiciones del tratamiento térmico aplicado.

[0053] El aumento de la temperatura descompone las moléculas orgánicas conduciendo a la formación de hidróxido de calcio, Ca(OH)₂ y compuestos orgánicos como se definió anteriormente. El aumento adicional de la temperatura da como resultado la formación de carbonato de calcio, CaCO₃ a costa de Ca(OH)₂ y compuestos orgánicos. Finalmente, al calentar a 500 °C, se cree que el material de calcio resultante es predominantemente carbonato de calcio y CaO (<10 %). El procedimiento de la presente invención permite obtener una variedad de composiciones, con una variedad de perfiles de liberación de calcio, todo a partir de una única composición química específica de al menos un alcoxiálcoxido de calcio. Por lo tanto, dependiendo de la temperatura aplicada, se cree que la siguiente reacción proporciona a los productos una relación molar de 0 a 1:



donde A, R₁ y los compuestos orgánicos son como se definió anteriormente. Con el fin de caracterizar la composición de los materiales de calcio obtenibles mediante el procedimiento de la presente invención, los inventores han medido la cantidad total de átomos de carbono (contenido total de carbono, TCC) que comprende átomos de carbono tanto de CaCO₃ como de compuestos orgánicos de muestras de material de calcio de ejemplo. Además, también se ha medido la cantidad total de átomos de carbono que se encuentran en las moléculas orgánicas (carbono orgánico total) de las mismas muestras de material de calcio de ejemplo. Por consiguiente, la composición del material de calcio que se puede obtener mediante el procedimiento de la invención como se definió anteriormente, tiene la siguiente fórmula:



donde 0 ≤ x ≤ 1, 0,06 ≤ y ≤ 0,75, 0,14 ≤ z ≤ 0,93, 0,01 ≤ w ≤ 0,11, 0 ≤ v ≤ 0,44 y C_o designa una fracción que contiene carbono que comprende uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en alcoxiálcoxido de calcio, alcoxiálcohol, alcohol, grafito y combinaciones de los mismos.

[0054] El término "potencial Z", como se usa en esta invención, puede abarcar la diferencia de potencial entre un medio de dispersión y la capa estacionaria de fluido unida a una partícula dispersada. El potencial Z se puede medir mediante técnicas basadas en electroforesis.

[0055] Las partículas producidas por este procedimiento tienen una superficie cargada positivamente (potencial Z) en contraste con los óxidos de partículas metálicas principalmente (Chem. Mater., 2015, 27 (7), págs. 2400-2407). Este aspecto mejora las interacciones polímero-partícula en poliésteres alifáticos termoplásticos como el ácido poliláctico o la policaprolactona, que se caracterizan por estar cargados negativamente. Se mejora la humectabilidad y también sus propiedades mecánicas (esfuerzo cortante) debido a la minimización de los poros y la maximización de la superficie de contacto en la interfaz entre la partícula y la matriz polimérica.

[0056] Además, las partículas producidas mediante este procedimiento no son completamente inorgánicas y generalmente son blandas en comparación con los óxidos y carbonatos. Eso reduce la rigidez de los materiales compuestos donde están involucradas estas partículas haciéndolas más compatibles para la regeneración de tejidos blandos (Curr. Org. Chem. 18, 18, 2299-2314, 2014) en contraste con las nanopartículas inorgánicas completas, que aumentan la rigidez de los materiales compuestos dirigidos a la regeneración ósea (Bone Research 2, número de artículo: 14017 2014).

[0057] En una realización particular de la invención, el procedimiento para la preparación de un material de calcio como se definió anteriormente es un procedimiento donde en la etapa (b) el al menos un alcoxiálcoxido de calcio en forma sólida de la etapa (a) se somete a un tratamiento de temperatura de entre 70 °C y 600 °C, más preferentemente 100 y 600 °C, incluso más preferentemente 100 y 500 °C. En general, los inventores han observado dos regímenes de temperatura: uno entre 70 °C y 200 °C en el que el material de calcio con liberación controlable como se definió anteriormente muestra una velocidad de liberación de calcio caracterizada por un estallido inicial de liberación de calcio con velocidades de liberación muy bajas después de la primera hora inicial; y un segundo entre 200 °C y 600 °C en el que el material de calcio con liberación controlable como se definió anteriormente muestra una velocidad de liberación de calcio caracterizada por un estallido inicial mucho más bajo de liberación de calcio seguido de una liberación controlada sostenida y prácticamente lineal de calcio durante todo el experimento (hasta varios días).

[0058] Sorprendentemente, los inventores han descubierto que el presente material de calcio muestra un comportamiento de liberación controlable de calcio completamente inesperado, ya que los materiales previamente conocidos en la técnica requieren mezclas complejas para lograr el mismo resultado, que generalmente comprenden átomos de titanio y/o fósforo. Ejemplos de dichas mezclas complejas son vidrios de fosfato de fórmula $P_2O_5-CaO-Na_2O-TiO_2$. Además, otras formulaciones relacionadas no muestran el mismo comportamiento, como se detalla a continuación en el ejemplo comparativo 9.

[0059] En otra realización preferida de la presente invención, el procedimiento para la preparación de un material de calcio con liberación controlable es un procedimiento donde el material de alcoxiálcoxido de calcio se somete a un tratamiento de temperatura durante un período de tiempo de 1 a 24 horas, preferentemente de 6 a 14 horas.

[0060] En una realización preferida de la invención, la etapa de preparar al menos un alcoxiálcoxido de calcio en forma sólida como se definió anteriormente comprende:

a1. disolver calcio metálico a temperatura de reflujo en un alcoxiálcohol de fórmula general R_1OAOH , donde A es una cadena de alquilo C_1-C_6 divalente, lineal o ramificada y R_1 es una cadena de alquilo C_1-C_6 lineal;

a2. opcionalmente, enfriar a temperatura ambiente;

a3. diluir con un disolvente orgánico;

a4. añadir una base acuosa; y

a5. envejecer la solución obtenida en la etapa (a4) a temperatura ambiente.

[0061] En una realización particular en la etapa a1 de la realización preferida anterior, A es una cadena de alquilo C_1-C_6 divalente, opcionalmente sustituida, lineal o ramificada y R_1 es una cadena de alquilo C_1-C_6 lineal o un arilo C_6-C_{12} .

[0062] La etapa (a1) se lleva a cabo opcionalmente en atmósfera inerte, preferentemente en atmósfera de argón. En una realización particular, la etapa (a1) implica mantener la temperatura de reflujo durante un período de tiempo comprendido entre 6 horas y 4 semanas, preferentemente de 12 horas a 3 semanas, dependiendo del tiempo requerido para lograr el consumo completo de los reactivos.

[0063] Los disolventes de alcoxiálcohol adecuados de fórmula general $RiOAOH$ son, por ejemplo, pero sin limitación, aquellos en los que R_1 es metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo y fenilo y A es $(CH_2)_n$ con $n = 1$ a 6 o cadena de alquilo C_1-C_3 opcionalmente sustituido, ramificado como se definió anteriormente. Los ejemplos no limitantes de alcoxiálcoholes contemplados en esta invención son 2-metoxietanol, 1,3-dietoxi-2-propanol, 2-metoxipropanol, 3-metoxipropanol, 3-metoxibutanol, 4-metoxibutanol, 2-etoxietanol, 1-etoxi-2-propanol, 2-

propoxietanol, 3-propoxipropanol, 1-metoxi-2-propanol, 1-metoxi-2-butanol y 2-fenoxietanol.

[0064] En una realización preferida, R_1 es metilo, etilo o propilo y A es $(CH_2)_n$ con $n = 1, 2$ o 3 , más preferentemente, R_1 es metilo y A es $(CH_2)_2$. En una realización más preferida, R_1 es metilo, etilo o fenilo y A es $(CH_2)_n$ con $n = 1, 2$ o 3 o cadena de alquilo C_1 - C_3 ramificado como se definió anteriormente, más preferentemente, R_1 es metilo o etilo y A es $(CH_2)_2$, $-CH(CH_3)CH_2-$, $-CH(CH_2CH_3)CH_2-$ o $-CH(CH_2OCH_2CH_3)CH_2-$. En una realización aún más preferida, el disolvente de alcohalcohol es 2-metoxietanol, 1,3-dietoxi-2-propanol, 2-etoxietanol, 1-etoxi-2-propanol, 1-metoxi-2-propanol, 1-metoxi-2-butanol y 2-fenoxietanol.

10 **[0065]** La etapa (a2) puede estar opcionalmente precedida por una etapa de filtración.

[0066] Los disolventes orgánicos adecuados para diluir la solución obtenida en la etapa (a2) como se describió anteriormente incluyen disolventes tanto hidrófilos como hidrófobos, polares y no polares. En una realización preferida, los disolventes orgánicos en la etapa (a3) comprenden acetato de etilo, acetona, N,N'-dimetilformamida, dimetilsulfóxido, metanol, etanol, 2-metoxietanol, 2-etoxietanol, 2-metoxipropanol, 1-metoxi-2-propanol, 2-etoxipropanol, 1-etoxi-2-propanol, n-propoxipropanol, 1-metoxi-2-metil-2-propanol, 1-propoxi-2-propanol, 2-propoxi-1-propanol, 2-(2-etoxietoxi)etanol, 2-isopropanol, n-butanol, hexano, heptano, octano o combinaciones de los mismos. Como la presencia de cantidades catalíticas de moléculas de agua es obligatoria, se prefiere usar disolventes capaces de disolver al menos cantidades menores de agua. En vista de su baja toxicidad, el etanol es un disolvente preferido.

20 **[0067]** Las bases acuosas adecuadas para la etapa (a4) como se describió anteriormente son aquellos compuestos que, cuando se disuelven en agua, generan un exceso de aniones OH^- a partir de moléculas de agua, tienen la capacidad de formar un enlace con un protón, tienen un donador de pares de electrones o una combinación de los anteriores. Los ejemplos de dichas bases acuosas son, pero sin limitación, NH_3 o soluciones acuosas de NH_3 , cualquier compuesto de amina (derivado de amoníaco) de carácter básico tal como anilina, piridina, metilamina, trimetilamina o trietilamina, bases inorgánicas tales como hidróxido de sodio o hidróxido de potasio. En una realización preferida, la base acuosa de la etapa (a4) se selecciona del grupo que comprende amoníaco, anilina, piridina, trietilamina, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o combinaciones de los mismos. Sin desear quedar limitado a la teoría, se cree que los aniones OH^- sufren un ataque de nucleófilo S_N2 en el átomo metálico del alcohalcóxido de calcio, formando las partículas de la invención.

[0068] La etapa de envejecer la solución, etapa (a5) implica dejar la solución a un lado, agitada, opcionalmente en la oscuridad, durante una cantidad de tiempo dada de 5 minutos a varios días. Preferentemente, la etapa de envejecimiento se lleva a cabo de 1 a 24 horas, más preferentemente en 12 horas.

35 **[0069]** Un tercer aspecto de la invención se refiere a una matriz biocompatible que comprende el material de calcio como se define en el primer o tercer aspecto de la invención.

[0070] Por lo tanto, la invención se refiere al uso del material de calcio de la invención en aplicaciones de ingeniería y regeneración de tejidos. En una realización particular, dicho tejido es tejido óseo o tejido vascular. En una realización preferida, dicho tejido vascular está involucrado en el procedimiento de cicatrización de heridas. En esta memoria descriptiva, el término "tejido" debe interpretarse en el contexto biológico, lo que significa que "tejido" se refiere a un nivel de organización celular intermedio entre las células y un órgano completo. En general, tejido puede referirse a cualquiera de los tejidos animales conectivo, muscular, nervioso y epitelial.

45 **[0071]** Por tanto, en un cuarto aspecto, la invención se refiere al material de calcio del primer aspecto o a la matriz biocompatible del tercer aspecto para su uso en la regeneración de tejidos, preferentemente seleccionada del grupo que consiste en cicatrización de heridas, regeneración ósea, regeneración cutánea, regeneración muscular, regeneración cardíaca y promoción de la vascularización. En el contexto de la presente invención, los ejemplos no limitantes de aplicaciones de regeneración de tejidos también incluyen la promoción de fenómenos de vascularización rápida.

[0072] Como se usa en esta invención, el término "matriz biocompatible" se refiere a la biocompatibilidad de un andamio o matriz para productos de ingeniería tisular. Se refiere a la capacidad de dicho andamio o matriz para funcionar como un sustrato que soportará la actividad celular apropiada, incluida la facilitación de sistemas de señalización molecular y mecánica, con el fin de optimizar la regeneración de tejidos, sin provocar ningún efecto indeseable en esas células, o inducir ninguna respuesta local o sistémica indeseable en el huésped final. En el presente caso, el material es biodegradable. El material también se puede metabolizar.

60 **[0073]** Debe entenderse que el término "biodegradable" usado en esta invención se refiere a aquellos materiales que se descomponen por el efecto del entorno fisiológico.

[0074] El término "andamio" en la presente invención se refiere a un biomaterial procesado que actúa como una plantilla y proporciona el soporte necesario para el crecimiento y la diferenciación celular en el que se puede regenerar un nuevo tejido.

[0075] La invención también se refiere al uso de una matriz biocompatible que comprende el material de calcio como se define en el primer aspecto de la invención, o mediante la combinación de realizaciones particulares del procedimiento de la presente invención, en la regeneración de tejidos. Preferentemente, dicho uso es en procedimientos de cicatrización de heridas y aplicaciones de ingeniería de tejidos. Ejemplos no limitantes de dicha regeneración de tejidos son la regeneración ósea, la regeneración cutánea y capilar, la regeneración muscular, la regeneración cardíaca, los fenómenos de vascularización rápida.

[0076] En un aspecto final de la invención, la invención se refiere al uso del material de calcio del primer aspecto o la matriz biocompatible del tercer aspecto para la regeneración cosmética del cabello.

EJEMPLOS

[0077] La presente invención se describirá ahora por medio de ejemplos que sirven para ilustrar la construcción y prueba de realizaciones ilustrativas. Sin embargo, se entiende que la presente invención no se limita de ninguna manera a los ejemplos a continuación.

Ejemplo 1. Procedimiento de fabricación de partículas precursoras de 2-metoxietóxido de calcio

[0078] El 2-metoxietóxido de calcio se sintetizó sometiendo a reflujo calcio metálico (98 %, Panreac) en 2-metoxietanol anhidro (99,8 %, Sigma Aldrich) hasta alcanzar una concentración de 1 M. En resumen, se pusieron 10,12 g de calcio metálico dentro de un matraz de fondo redondo de 500 ml. Se añadieron 200 ml de 2-metoxietanol en atmósfera de Ar(g) usando una jeringa. A continuación, la mezcla se agitó a 134 °C a reflujo durante 24 horas para disolver el calcio metálico. A continuación, la solución se filtró usando un filtro de poro de 450 µm. La solución se llevó a 250 ml añadiendo 2-metoxietanol y usando un matraz volumétrico de 250 ml. La solución se colocó en una atmósfera de Ar(g) en un vial de vidrio de 250 ml hermético a los gases y se almacenó a -20 °C durante un máximo de 6 meses.

[0079] Se diluyeron 10 ml de la solución anterior de 2-metoxietóxido de calcio (1 M) con 90 ml de etanol absoluto (99,5 %, PanReac) en un matraz de fondo redondo de 250 ml. Adicionalmente, se añadieron aproximadamente 30 ml de amoníaco (30 %, PanReac) con agitación. La solución se envejeció durante la noche a temperatura ambiente con agitación. A continuación, se centrifugó a 20.000 rpm durante 20 minutos para recoger las partículas precipitadas. Las partículas se lavaron dos veces con etanol absoluto y se centrifugaron una segunda vez a 20.000 rpm durante 20 minutos. Se realizó un último lavado con hexano y de nuevo las partículas se centrifugaron a 20.000 rpm durante 20 minutos. El secado de las partículas centrifugadas a 70 °C durante 2 horas produce la muestra Ca70. El rendimiento es de aproximadamente 700-800 mg de nanopartículas para los volúmenes mencionados anteriormente.

Ejemplo 2. Procedimiento de fabricación del material de calcio con liberación controlable de la invención.

[0080] Las partículas de 2-metoxietóxido de calcio obtenidas mediante el procedimiento de fabricación del ejemplo 1 se molieron en primer lugar y a continuación se trataron en un horno/horno de mufla en las condiciones dadas en la siguiente tabla, dando lugar a las muestras Ca100, Ca200, Ca 300, Ca400 y Ca500.

ID de la muestra	Temperatura	Tiempo de calentamiento (total)
Ca100	100 °C	12 horas
Ca200	200 °C	12 horas
Ca300	300 °C	12 horas
Ca400	400 °C	12 horas
Ca500	500 °C	12 horas

Ejemplo 3. Mediciones de espectroscopia dispersiva de energía.

[0081] Las muestras se prepararon para EDS recubriéndolas con una fina capa de carbono.

[0082] El material de calcio obtenido de la presente invención comprende una mezcla de al menos un precursor de alcóxido de calcio, hidróxido de calcio y carbonato de calcio a diferentes relaciones molares. La relación de dichos componentes puede variar con el tratamiento de temperatura, debido a la descomposición incompleta del material orgánico y/o la incorporación incompleta de CO₂ en Ca(OH)₂. Los experimentos de espectroscopia dispersiva de energía (EDS) en muestras obtenidas en el ejemplo 2 (2-metoxietóxido de calcio) muestran que todas las muestras de material de calcio con liberación controlable del ejemplo 2 comprenden Ca, O y C. Un ejemplo ilustrativo se

encuentra en la figura 1, donde el espectro de EDS de la muestra Ca400 muestra la presencia de elementos Ca, O y C.

Ejemplo 4. Caracterización por difracción de rayos X en polvo del material de calcio.

[0083] Las muestras del ejemplo 2 (2-metoxietóxido de calcio) se prepararon para difracción de rayos X en polvo (XRD, PANalytical, Bragg-Brentano, $\text{CuK}\alpha=0,15406$ nm) mediante prensado manual de algunos de los materiales en polvo, por medio de una placa de vidrio para obtener una superficie plana, en soportes de muestras estándar cilíndricos de 16 milímetros de diámetro y 2,5 milímetros de altura. Las muestras se analizaron usando un difractómetro de polvo X'Pert PRO MPD Alpha1 de PANalytical en geometría Bragg-Brentano 9/29 de 240 milímetros de radio.

[0084] Las figuras 2A, 2B y 2C muestran los difractogramas de rayos X de las muestras Ca100, Ca300 y Ca500, respectivamente, del ejemplo 2 (precursor de 2-metoxietóxido de calcio). Los experimentos de difracción de rayos X en polvo en las muestras del ejemplo 2 mostraron una mayor cristalinidad en tratamientos térmicos más altos. Mientras que el perfil de XRD de la muestra Ca100 muestra un patrón que se asemeja al de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ puro, el perfil de XRD para la muestra Ca300 se asocia con un patrón que coincide con una relación en peso de 65:35 $\text{Ca}(\text{OH})_2:\text{CaCO}_3$. El aumento del tratamiento de temperatura a 500 °C conduce a la obtención de la muestra Ca500, que se caracteriza por un patrón de XRD que se asemeja al de CaCO_3 . Por tanto, se observa que la composición final del material de calcio evoluciona con el tratamiento de temperatura (debido posiblemente a la calcinación del material orgánico y la incorporación de CO_2), lo que finalmente afecta al perfil de liberación de calcio, como se muestra a continuación en el ejemplo 7.

Ejemplo 5. Análisis elemental del material de calcio.

[0085] Los valores porcentuales de contenido total de carbono (TCC) y carbono orgánico total (TOC) se obtuvieron midiendo los valores de CO_2 mediante análisis elemental de combustión usando un equipo Elemental Analyzer EA CE 1108 (Thermo Fisher Scientific) en condiciones estándar. La combustión se logró mediante la aplicación de una temperatura de oxidación de 1060 °C. Se usó una mezcla de pentóxido de vanadio y polvo de estaño como aditivos para la combustión. Se usó atropina como referencia.

[0086] En el caso de las mediciones de carbono orgánico total, todas las muestras (de los ejemplos 1 y 2, 2-metoxietóxido de calcio) se sometieron en primer lugar a un tratamiento destinado a retirar todo el carbono inorgánico, con el fin de eliminar los carbonatos a través de la formación de CO_2 antes de la combustión teniendo en cuenta el carbono inorgánico total. Esto se logró mediante el tratamiento de las muestras con HCl 6 N en cápsulas de Ag.

[0087] Los valores de TCC y TOC obtenidos del análisis elemental para las muestras preparadas en los ejemplos 1 y 2 se resumen en la siguiente tabla y se muestran en la figura 3, que muestra claramente que se puede obtener una variedad de composiciones ajustando el tratamiento de temperatura.

ID de la muestra	Temperatura	TOC /%	TCC /%
Ca70	70 °C (durante 2 h) ^a	0,54	3,15
Ca100	100 °C (durante 12 h)	0,40	3,80
Ca200	200 °C (durante 12 h)	0,36	4,75
Ca300	300 °C (durante 12 h)	0,24	7,74
Ca400	400 °C (durante 12 h)	0,16	8,26
Ca500	500 °C (durante 12 h)	0,13	11,68
^a Para la muestra Ca70 se parte de que el secado a 70 °C durante 2 horas es insuficiente para modificar la estructura química de la muestra.			

[0088] Los resultados se muestran como porcentaje en masa (masa del TCC medido o masa del TOC medido dividida por la masa total de la muestra, multiplicada por 100).

Ejemplo 6. Caracterización del material de calcio con liberación controlable mediante DLS y potencial Z.

[0089] Los estudios de dispersión dinámica de luz (DLS) en la muestra Ca400 preparada en el ejemplo 2 revelaron que el tamaño de nanopartícula es de aproximadamente $324,16 \pm 103,9$ nm y que su valor de potencial Z es de aproximadamente $30,66 \pm 16,3$ mV, como se muestra en las figuras 5A y 5B, respectivamente.

Ejemplo 7. Liberación acumulada de Ca^{2+} .

[0090] Las muestras del ejemplo 2 (2-metoxietóxido de calcio) se molieron y cada polvo de muestra resultante se suspendió en 10 ml de agua milli-Q purificada a 1 mg/ml en tubos de 15 ml. Para cada muestra se prepararon tres réplicas. Los tubos se mantuvieron a 37 °C con agitación suave.

[0091] Cada punto de datos correspondiente a un tiempo dado corresponde a la misma muestra de polvo molido que se expone a agitación suave a 37 °C durante una cantidad de tiempo creciente. En detalle, después de un tiempo de agitación dado (1 h, 5 h, 21 h, 45 h, 69 h, 94 h y 120 h), las muestras se centrifugaron a 4500 rpm durante 6 minutos y 1 ml del sobrenadante se diluyó en 9 ml de HNO_3 al 0,6 % (v/v) y se almacenó a 4 °C para el análisis de ICP (ICP-OES PerkinElmer, modelo Optima 3200 RL, condiciones estándar). Después de recoger la alícuota de 1 ml, el sobrenadante restante de la muestra centrifugada se renovó para todas las muestras. Para este fin, después de la etapa de centrifugación, el volumen de sobrenadante se retiró cuidadosamente hasta que se dejó 1 ml del disolvente del sobrenadante para evitar la retirada de partículas. Se añadió nueva agua milli-Q purificada fresca hasta alcanzar el volumen inicial de 10 ml. El polvo depositado se resuspendió agitando suavemente los tubos, que se almacenaron a 37 °C con agitación suave para una exposición adicional de los polvos al agua.

[0092] Los estudios de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) proporcionaron los datos para la cantidad de calcio liberado en función del tiempo, una indicación de la velocidad de liberación para las muestras descritas anteriormente, que se representa en las figuras 4A y 4B. Sorprendentemente, el análisis reveló que cuanto mayor es la temperatura en el tratamiento térmico de las partículas, más lenta es la liberación de Ca^{2+} . Los resultados también muestran una clara tendencia de liberación de Ca^{2+} por debajo y por encima de 200 °C. A tratamientos de temperatura de 100 °C o 200 °C, las muestras muestran intensas velocidades de liberación inicial (estallidos iniciales de 9,5 μmol de Ca^{2+} por mg de material de calcio en solo 1 hora) de iones de calcio que agotan rápidamente el calcio liberable ya que después de 2 días no hay un aumento significativo en la liberación acumulada de iones de calcio. Dicho perfil puede ser importante para aplicaciones que requieren concentraciones iniciales intensas de calcio, tales como vascularización rápida, aumento del valor de pH para aplicaciones antitumorales (Nanoscale, 2016, 8, 12639) o liberación de fármacos (Z. Dong y col., Biomaterials, 2016, 110, 60-70). A temperaturas de tratamiento más altas, la velocidad de liberación medida de las muestras preparadas muestra una velocidad de liberación inicial mucho más lenta (1,1 μmol de Ca^{2+} por mg de material de calcio en la primera hora) y una velocidad de liberación constante que se extiende más en el tiempo (6,5 μmol de Ca^{2+} por mg de material de calcio) y se mantiene estable incluso después de 4 días. Cabe destacar que la cantidad total de iones de calcio liberados de la muestra de Ca500 después de 4 días de inmersión sigue siendo muy inferior a los iones de Ca^{2+} liberados inicialmente para la muestra de Ca100 después de 1 hora de inmersión.

Ejemplo 8. Biomaterial que comprende el material de calcio de la invención

[0093] El siguiente procedimiento es general y se puede aplicar a cualquiera de los materiales de la invención. Como ejemplo particular, las nanopartículas del ejemplo 2 se dispersaron en una matriz de ácido poliláctico (PLA) de una composición del 70 % en peso del isómero L y el 30 % en peso del copolímero que incluye los dos isómeros, usando 2,2,2-trifluoroetanol como disolvente y un par ultrasónico como dispersor mecánico. La dispersión resultante contenía aproximadamente el 4 % de ácido poliláctico y el 1 % de nanopartículas de vidrio en peso. La suspensión se puede acoplar a una bomba de infusión y conectarse a una fuente de energía de alto voltaje. Los parámetros experimentales habituales son 1 ml/h de flujo, 10 kV, 15 cm de distancia de punta a colector y un mandril giratorio que funciona a 100 rpm para obtener fibras de PLA de tamaño nanométrico aleatorio. Los experimentos in vitro con osteoclastos mostraron una buena adhesión, así como los experimentos in vivo con modelos de membrana corioalantoidea (CAM) de embrión de pollo y ratones para la cicatrización de heridas, mostrando una mejora en la vascularización y la reducción de heridas, respectivamente.

Ejemplo 9. Material de calcio comparativo.

[0094] El material de calcio comparativo de fórmula P:Ca 3:7 (los números se refieren al volumen usado de precursores de P y Ca, respectivamente) se preparó de acuerdo con el siguiente procedimiento.

[0095] El fosfato de etilo se sintetizó sometiendo a reflujo pentóxido de fósforo metálico (98 %, Panreac) en 2-metoxietanol anhidro (>99,99 %, Sigma Aldrich) hasta alcanzar una concentración de 4 M. En resumen, se pusieron 28,39 g de pentóxido de fósforo dentro de un matraz de fondo redondo de 500 ml en atmósfera de Ar(g) . Se añadieron 80 ml de etanol absoluto destilado (99,5 %, PanReac) usando una jeringa y manteniendo el matraz inferior en un baño de hielo. A continuación, la mezcla se agitó a 84 °C a reflujo durante 12 horas para disolver el pentóxido de fósforo. A continuación, la solución se filtró usando un filtro de poro de 450 μm . La solución se llevó a 100 ml añadiendo etanol absoluto destilado y usando un matraz volumétrico de 100 ml. La solución se colocó en una atmósfera de Ar(g) en un vial de vidrio de 100 ml hermético a los gases y se almacenó a -20 °C durante un máximo de 6 meses.

[0096] 7 ml de la solución de metoxietóxido de calcio (1 M) preparada según el ejemplo 1 y 3 ml de soluciones de fosfato de etilo (4 M) se diluyeron con 90 ml de etanol absoluto (99,5 %, PanReac) en un matraz de fondo redondo

de 250 ml. Adicionalmente, se añadieron aproximadamente 30 ml de amoníaco (30 %, PanReac) con agitación. La solución se envejeció durante la noche a temperatura ambiente con agitación. A continuación, se centrifugó a 20.000 rpm durante 20 minutos para recoger las partículas precipitadas. Las partículas se lavaron dos veces con etanol absoluto y se centrifugaron una segunda vez a 20.000 rpm durante 20 minutos. Se realizó un último lavado con hexano y de nuevo las partículas se centrifugaron a 20.000 rpm durante 20 minutos. El secado de las partículas centrifugadas a 70 °C durante 2 horas produce la muestra comparativa P:Ca. El rendimiento es de aproximadamente 700-800 mg de nanopartículas para los volúmenes mencionados anteriormente.

[0097] El material comparativo P:Ca se sometió al tratamiento térmico del ejemplo 2 (a temperaturas de 25 °C (●), 200 °C (♦) y 300 °C (A), y la liberación acumulada de calcio se midió como en el ejemplo 7. Los resultados de la figura 6 muestran que las partículas carecen de liberación controlable de calcio, ya que liberan todo el calcio en un estallido inicial (25 °C) o no liberan calcio en absoluto (200 °C y 300 °C).

Ejemplo 10. Procedimiento de fabricación de otras partículas precursoras de alcoxicalcóxidos de calcio.

[0098] El material de la presente invención también se preparó a partir de otros alcoxicalcóxidos precursores. Para preparar dichas partículas precursoras, los alcoxicalcóholes correspondientes se sometieron al procedimiento descrito en el ejemplo 1, excepto cuando se indique lo contrario.

ID de la muestra	Ligando alcoxicalcóxido	Alcoxicalcóhol	Tiempo de reflujo
Ca400-1	1,3-dietoxi-2-propóxido	1,3-dietoxi-2-propanol	24 horas
Ca400-2	2-etoxietóxido	2-etoxietanol	24 horas
Ca400-3	1-etoxi-2-propóxido	1-etoxi-2-propanol	48 horas

Ejemplo 11. Procedimiento de fabricación del material de calcio con liberación controlable de la invención a partir de otros precursores.

[0099] Las partículas obtenidas en el ejemplo 10 (Ca400-1, Ca400-2 y Ca400-3) se sometieron al mismo procedimiento de calentamiento que el descrito en el ejemplo 2, excepto que en el presente ejemplo las muestras solo se sometieron a una temperatura de 400 °C.

[0100] Los resultados en la Fig. 7 muestran los difractogramas de rayos X de las muestras preparadas en el ejemplo 10, siguiendo el mismo protocolo que se describe en el ejemplo 4. Los datos mostrados demuestran que se obtiene un producto similar independientemente del precursor.

Ejemplo 12. Caracterización del material de calcio con liberación controlable obtenido a partir de 1,3-dietoxi-2-propóxido, 2-etoxietóxido y 1-etoxi-2-propóxido mediante SEM y potencial Z.

[0101] Las imágenes de microscopía electrónica de barrido, la dispersión dinámica de la luz y las mediciones del potencial Z de las muestras Ca400 (ejemplo 2) y Ca400-1 Ca400-2 y Ca400-3 preparadas en el ejemplo 11 se resumen en la tabla a continuación.

ID de la muestra	Alcoxicalcóxido	Tamaño /nm (FE-SEM)	Potencial Z 6 STD /mV
Ca400	2-metoxietóxido	84,5-149,5	25,3 ± 24,6
Ca400-1	1,3-dietoxi-2-propóxido	89,9-118,6	44,2 ± 15,3
Ca400-2	2-etoxietóxido	50,8-70,0	48,1 ± 22,2
Ca400-3	1-etoxi-2-propóxido	59,0-134,5	35,9 ± 14,4

[0102] La figura 8 muestra las imágenes de SEM de las cuatro muestras.

Ejemplo 13. Liberación acumulada de Ca²⁺ a partir de otros precursores.

[0103] Las muestras del ejemplo 11 (obtenidas a partir de 1,3-dietoxi-2-propóxido de calcio, 2-etoxietóxido y 1-etoxi-2-propóxido) se probaron siguiendo el mismo procedimiento que el descrito en el ejemplo 7.

[0104] Los estudios de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) proporcionaron los datos para la cantidad de calcio liberado en función del tiempo, una indicación de la velocidad de liberación para las muestras descritas anteriormente, que se representa en la figura 9. Los resultados muestran un comportamiento similar al obtenido para el control, muestra Ca400 del ejemplo 2.

Ejemplo 14. Efecto de las partículas de Ca400 (2-metoxietoxi de calcio) en la cicatrización de heridas cutáneas.

[0105] El objetivo de este estudio era evaluar la capacidad de cicatrización de heridas de la muestra Ca400 para la regeneración cutánea en un modelo en ratones obesos y diabéticos con una mutación en el receptor de leptina (Db/Db). Específicamente, evaluar la actividad de los biomateriales basados en partículas de la presente invención en la mejora de la cicatrización de heridas de las lesiones cutáneas inducidas en ratones diabéticos y estudiar la neovascularización del tejido regenerado.

[0106] Modelo animal. Ocho ratones obesos y diabéticos con una mutación en el receptor de leptina, conocida como db/db, se obtuvieron de Charles River Laboratory y se usaron a las 8 semanas de edad. Para evitar la interferencia hormonal en la cicatrización de heridas, se usaron ratones macho.

[0107] Generación de una herida de úlcera por presión. Para generar úlceras por presión en el lado dorsal de ratones se usó un modelo previamente notificado que consistió en realizar ciclos de isquemia-reperfusión (IR) con la aplicación externa de dos imanes (Stadler y col., 2004; Saito y col., 2008; Wassermann y col., 2009). Este procedimiento produce dos úlceras circulares cubiertas por tejido necrótico separadas por un puente de piel sana.

[0108] Aplicación de apósitos. Las partículas de Ca400 como se describe en el ejemplo 2 se electrohilaron con nanofibras de ácido poliláctico (PLA), se cortaron en cuadrados y se aplicaron en las heridas. Se usó un apósito comercial neutro para heridas como apósitos de control. Los apósitos se cubrieron con yeso adhesivo (Coverplast® sin látex, BSNmedical) y se aseguraron con gasa elástica (Genove Dermatologics). Los apósitos se cambiaron cada 24 h. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical bajo anestesia. Las heridas se extirparon dejando 2 mm de margen, se cortaron por la mitad y se fijaron en solución de formalina tamponada neutra al 10 % durante 24 h para el análisis histológico.

[0109] Formación de imágenes de la herida. El día 0 y antes de cada reemplazo del apósito, se fotografiaron las heridas con una cámara digital Mavica FD91 (Sony, Minato, Tokio, Japón) y el sistema de formación de imágenes ORCA-2BT (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japón) provisto de una cámara C4742-98-LWG-MOD equipada con un dispositivo de acoplamiento de carga (CCD) de 512x512 píxeles enfriado a -80 °C. El área de la herida de las imágenes se cuantificó usando el software de análisis de imágenes Wasabi (Hamamatsu Photonics) y se normalizó para el área de la herida en el día 0.

[0110] Tinción de CD31 y análisis. Se evaluaron los cambios histológicos en toda la dermis e hipodermis. En cada muestra se seleccionaron manualmente cuatro regiones de interés -ROI- (dermis no lesionada, dermis lesionada, hipodermis no lesionada e hipodermis lesionada) en cada sección de tejido.

[0111] Los tejidos cutáneos heridos fijados con formalina se incluyeron en parafina, se cortaron a 4-5 µm y se tiñeron con anticuerpo anti-CD31 (ab28364) o el control de isotipo correspondiente (ab27478) para el control negativo. Se usó el anticuerpo contra CD31 como marcador de células endoteliales para cuantificar el área de los vasos sanguíneos. Los vasos se definieron como marcaje positivo para CD31. Las muestras negativas teñidas con el control de isotipo fueron negativas (no se muestran los datos).

[0112] Las imágenes completas de las secciones inmunoteñidas con CD31 fueron adquiridas por un escáner NanoZoomer-2.0 HT C9600 (Hamamatsu) a un aumento de 20X, en el que 1 píxel corresponde a 0,46 µm. Se usó el software QuPath para realizar el análisis de imágenes. El algoritmo de recuento de píxeles positivos en el que los píxeles de la imagen se segmentan en positivos (marcados con CD31 - píxeles positivos DABb) o negativos (píxeles negativos DAB - hematoxilina) se usó con los siguientes valores:

• Factor de pérdida de resolución = 1,0

• Sigma gaussiana: 1

[0113] Para la dermis, los resultados son el porcentaje de píxeles positivos siguiendo la ecuación:

% de píxeles positivos a DAB = $\frac{\text{número de píxeles positivos a DAB}}{\text{píxeles positivos a DAB} + \text{píxeles negativos a DAB}} \times 100$.

[0114] No se incluyeron las áreas blancas (artefacto de tejido/ fondo).

60 Resultados

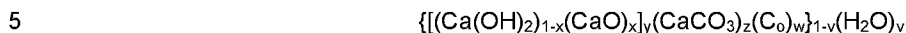
[0115] La cuantificación del área de la herida mostró una reducción significativa con el tiempo en las heridas tratadas con apósitos PLACa400. Las heridas tratadas con el apósito comercial no mostraron ninguna reducción en el área de la herida. El análisis estadístico en el área de la herida indica una disminución significativa en el área de la herida en las heridas tratadas con PLACa400 en comparación con el tratamiento con apósito comercial (figuras 10 y

11). Las secciones de tejido de las heridas tratadas con PLA-Ca400 presentaron un mayor porcentaje de marcado positivo para CD31 en comparación con las secciones de tejido tratadas con apósito comercial (figura 12).

[0116] Los apósitos a base de Ca400 promueven la cicatrización de heridas isquémicas en un modelo in vivo
5 en ratones diabéticos. Además, Ca400 promovió una mayor vascularización que puede ser responsable de la mejora de la cicatrización de heridas.

REIVINDICACIONES

1. Material de calcio, de fórmula general (I):



donde $0 \leq x \leq 1$, $0,06 \leq y \leq 0,75$, $0,14 \leq z \leq 0,93$, $0,01 \leq w \leq 0,11$, $0 \leq v \leq 0,44$ y C_o designa una fracción que contiene carbono que comprende uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en alcoxiálcoxido de calcio, alcoxiálcohol, alcohol, alcóxido de calcio, grafito y combinaciones de los mismos, donde el alcoxiálcoxido en el alcoxiálcoxido de calcio es un alcoxiálcoxido de fórmula general R_1OAO^- , donde A es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ divalente, opcionalmente sustituido, lineal o ramificado y R_1 es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal o arilo $\text{C}_6\text{-C}_{12}$; el alcoxiálcohol es un alcoxiálcohol de fórmula general R_1OAOH , donde A es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ divalente, opcionalmente sustituido, lineal o ramificado y R_1 es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal o arilo $\text{C}_6\text{-C}_{12}$; el alcohol es alcohol de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal o ramificado, opcionalmente sustituido o alcóxido de calcio es alcóxido de calcio de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal o ramificado, opcionalmente sustituido o alcóxido de calcio de arilo $\text{C}_6\text{-C}_{12}$ y cuando cada aparición de A o R_1 está sustituida, el sustituyente se selecciona de $-(\text{CH}_2)_n\text{OR}'$ y $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}'\text{R}'$, donde n es un número entero seleccionado de 0 a 6 y R' se selecciona independientemente de H y cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal.

20 2. El material de calcio según la reivindicación 1, donde el 35 %-55 % del peso total de dicho material es calcio.

3. El material de calcio según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el material de calcio está en forma de nanopartículas.

25 4. Procedimiento para la preparación del material de calcio de fórmula general (I) según la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

30 a) preparar al menos un alcoxiálcoxido de calcio de fórmula general $\text{Ca}(\text{OAO}\text{R}_1)_2$ en forma sólida, donde A es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ divalente, opcionalmente sustituida, lineal o ramificada y R_1 es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal o un arilo $\text{C}_6\text{-C}_{12}$; y
b) someter el al menos un alcoxiálcoxido de calcio en forma sólida de la etapa (a) a un tratamiento de temperatura de entre 70 °C y 600 °C.

35 5. El procedimiento según la reivindicación 4, donde en la etapa (b) el alcoxiálcoxido de calcio de la etapa (a) se somete a un tratamiento de temperatura de 100 °C a 500 °C.

6. El procedimiento según las reivindicaciones 4 o 5, donde en la etapa (b) el alcoxiálcoxido de calcio de la etapa (a) se somete a dicho tratamiento de temperatura durante un periodo de tiempo de 1 a 24 horas, preferentemente de 6 a 14 horas.

7. El procedimiento según las reivindicaciones 4 a 6, donde la etapa (a) de preparar al menos un alcoxiálcoxido de calcio en forma sólida comprende las siguientes etapas:

45 a1. disolver calcio metálico a temperatura de reflujo en un alcoxiálcohol de fórmula general R_1OAOH , donde A es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ divalente, opcionalmente sustituida, lineal o ramificada y R_1 es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ lineal o un arilo $\text{C}_6\text{-C}_{12}$;
a2. opcionalmente, enfriar a temperatura ambiente;
a3. diluir con un disolvente orgánico;
50 a4. añadir una base acuosa; y
a5. envejecer la solución obtenida en la etapa (a4) a temperatura ambiente.

8. El procedimiento según la reivindicación 7, donde el alcoxiálcohol de fórmula general R_1OAOH , se selecciona de aquellos en los que R_1 es metilo, etilo, propilo o fenilo y A es una cadena de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_3$ lineal o ramificada, opcionalmente sustituida, preferentemente, donde R_1 es metilo, etilo o fenilo.

9. El procedimiento según la reivindicación 7, donde el disolvente orgánico en la etapa (a3) se selecciona del grupo que comprende acetato de etilo, acetona, N,N'-dimetilformamida, dimetilsulfóxido, metanol, etanol, 2-metoxietanol, 2-etoxietanol, 2-metoxipropanol, 1-metoxi-2-propanol, 2-etoxipropanol, 1-etoxi-2-propanol, n-propoxipropanol, 1-metoxi-2-metil-2-propanol, 1-propoxi-2-propanol, 2-propoxi-1-propanol, 2-(2-etoxietoxi)etanol, 2-iso-propanol, n-butanol, hexano, heptano, octano o combinaciones de los mismos, preferentemente etanol.

10. El procedimiento según la reivindicación 7, donde la base acuosa en la etapa (a4) se selecciona del grupo que comprende amoníaco, anilina, piridina, trietilamina, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o combinaciones de los mismos.

11. Una matriz biocompatible que comprende el material de calcio como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 5 12. Material de calcio como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una matriz biocompatible como se define en la reivindicación 11 para su uso en la regeneración de tejidos, preferentemente seleccionada del grupo que consiste en cicatrización de heridas, regeneración ósea, regeneración cutánea, regeneración muscular, regeneración cardíaca y promoción de la vascularización.
- 10 13. Uso de un material de calcio como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una matriz biocompatible como se define en la reivindicación 11 para la regeneración cosmética del cabello.

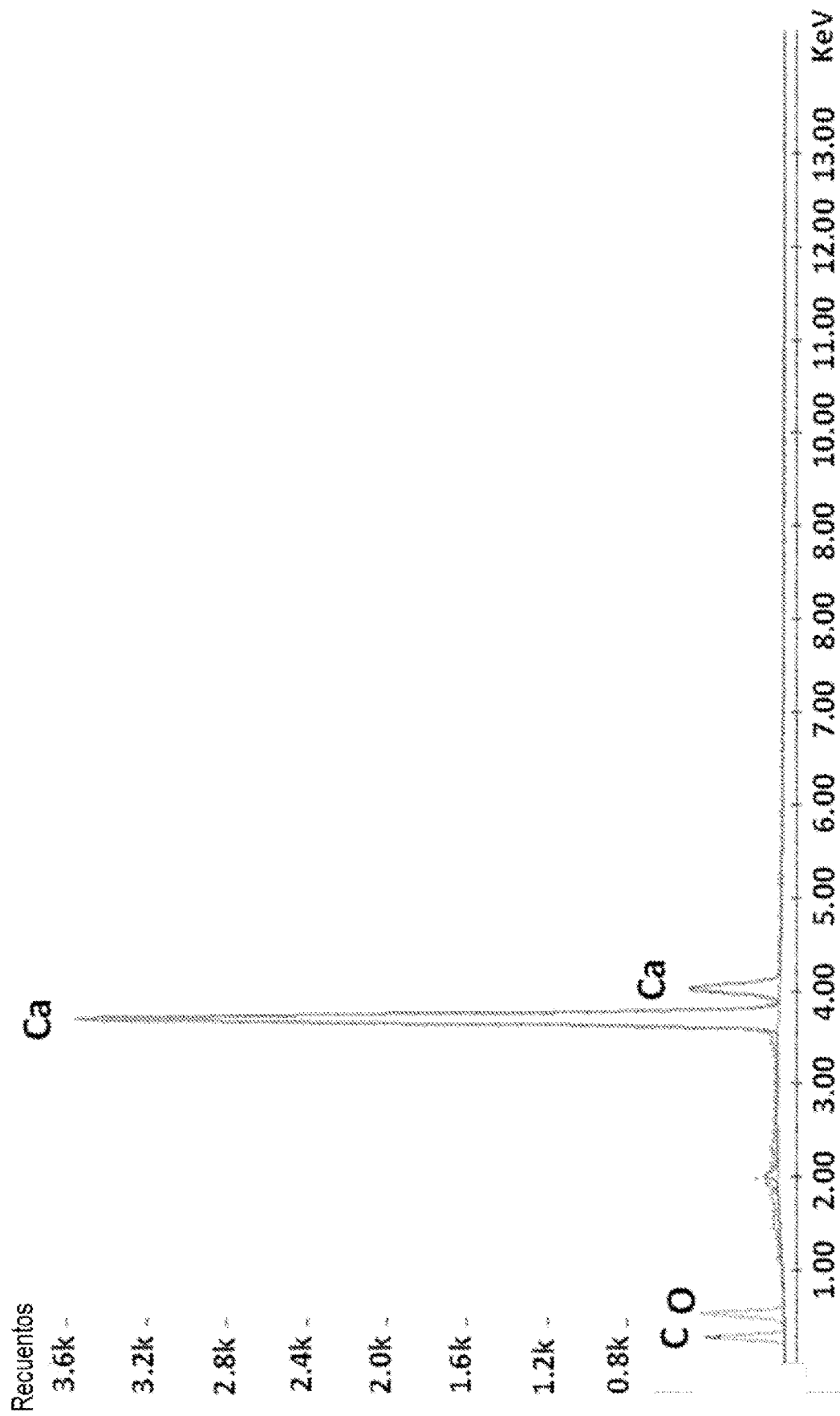


Fig.1

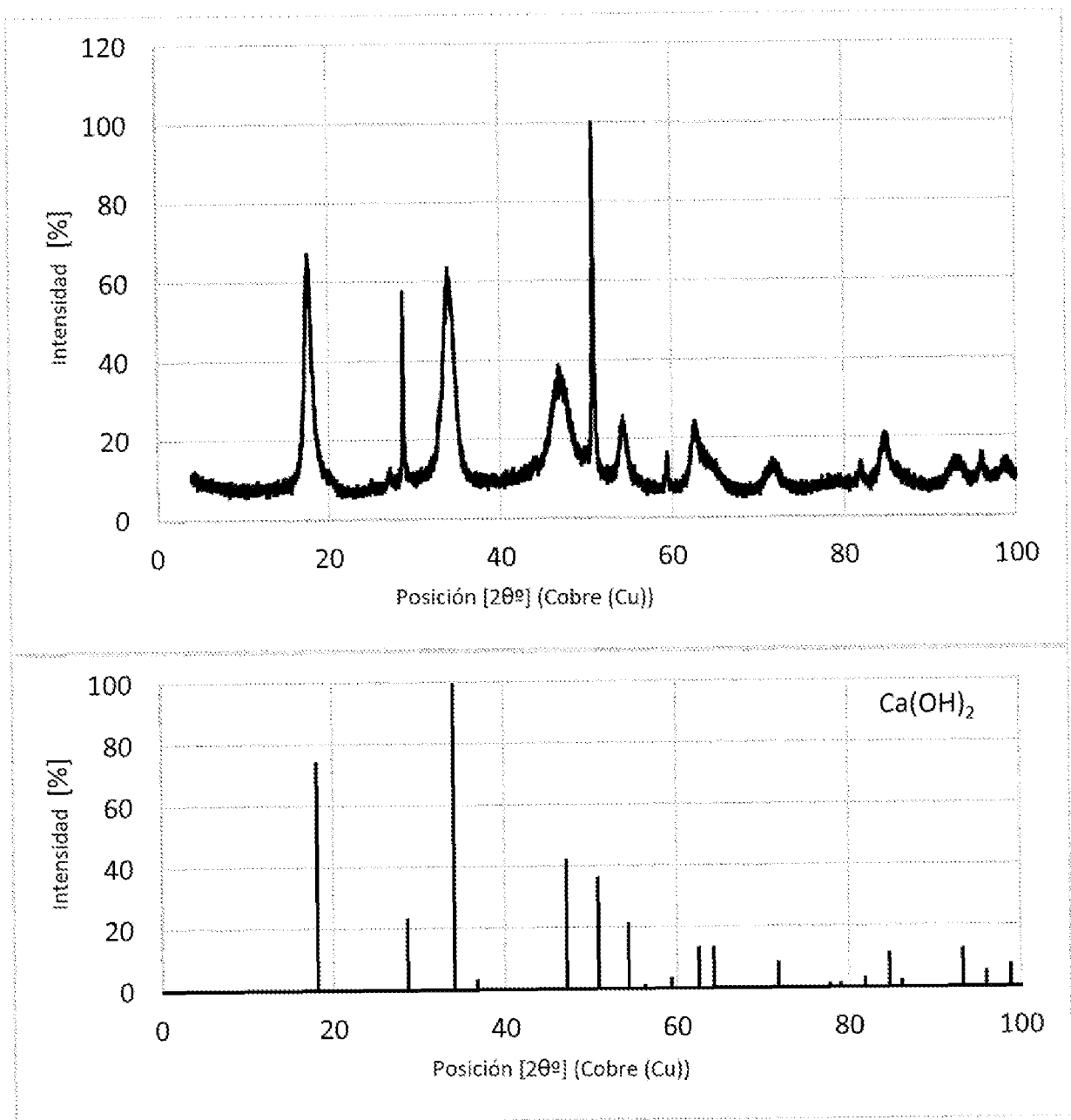


Fig. 2A

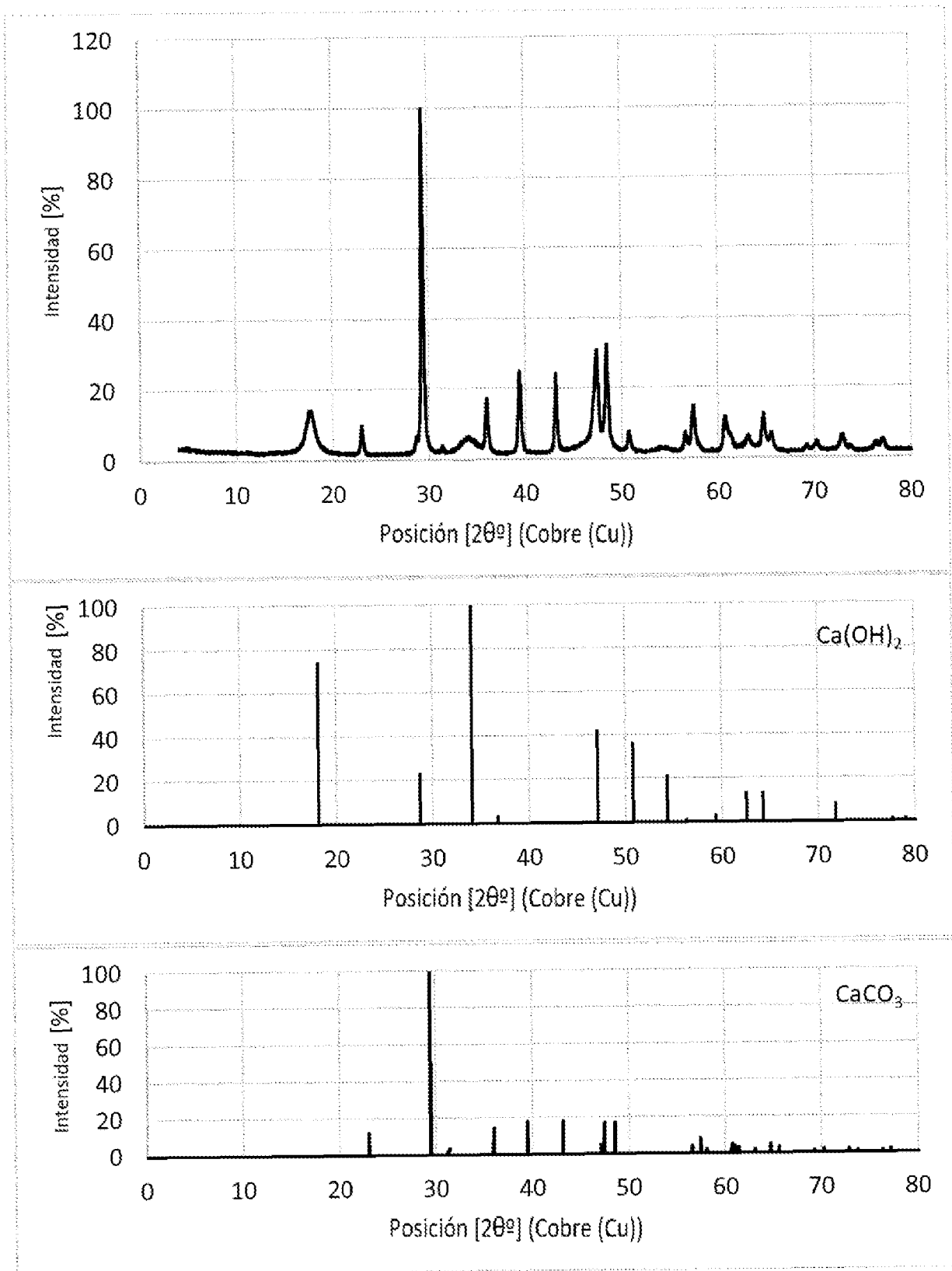


Fig. 2B

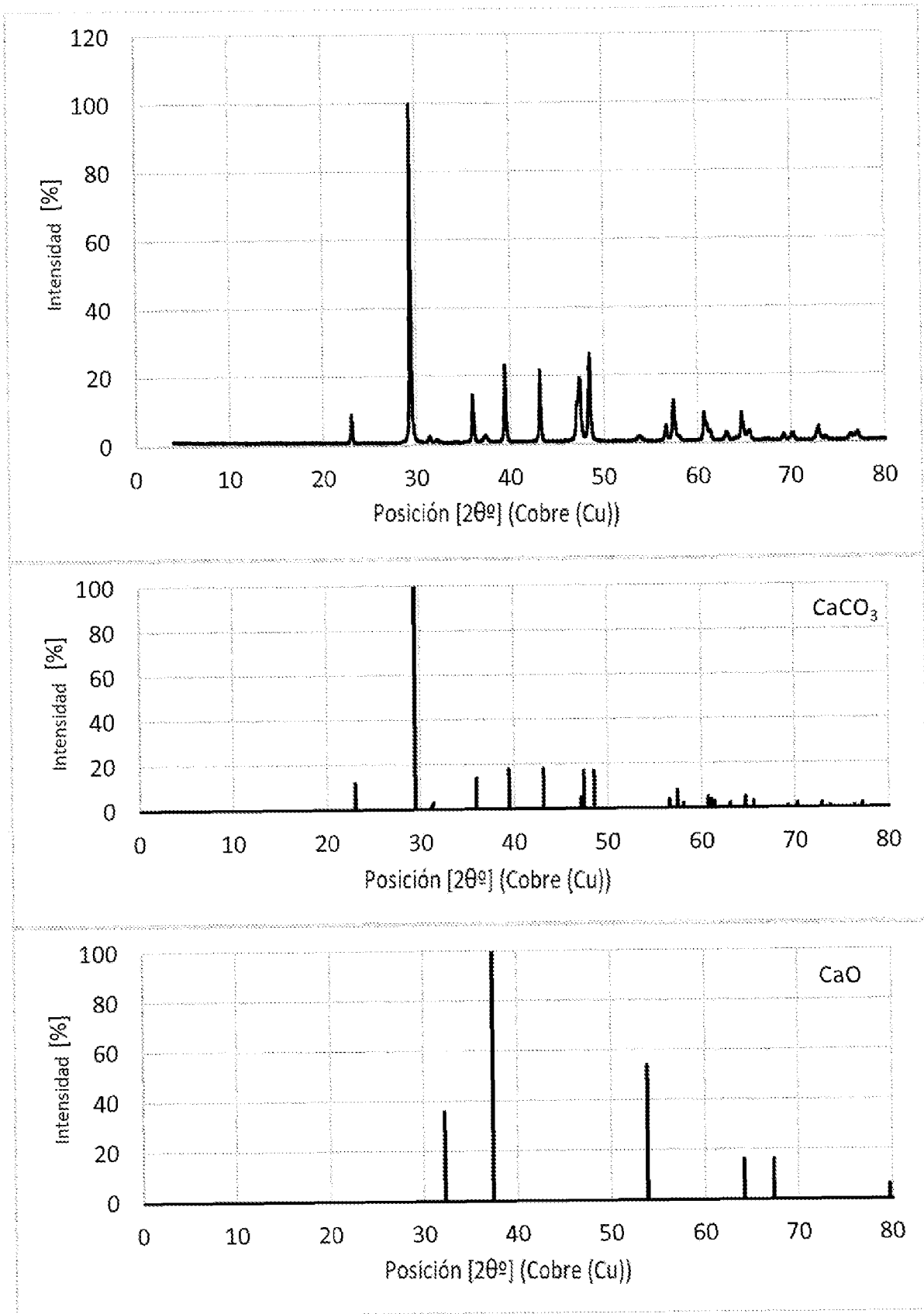


Fig. 2C

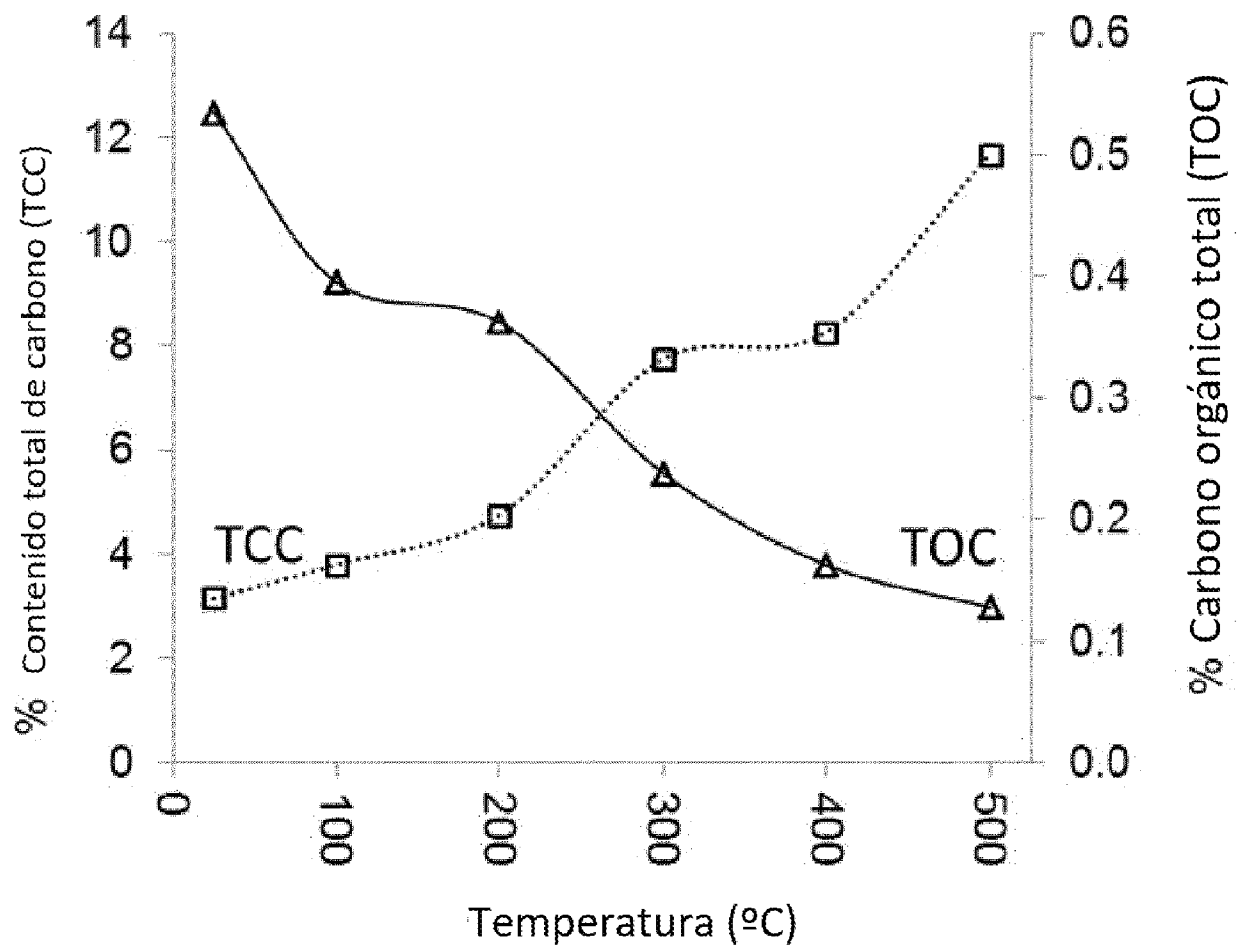
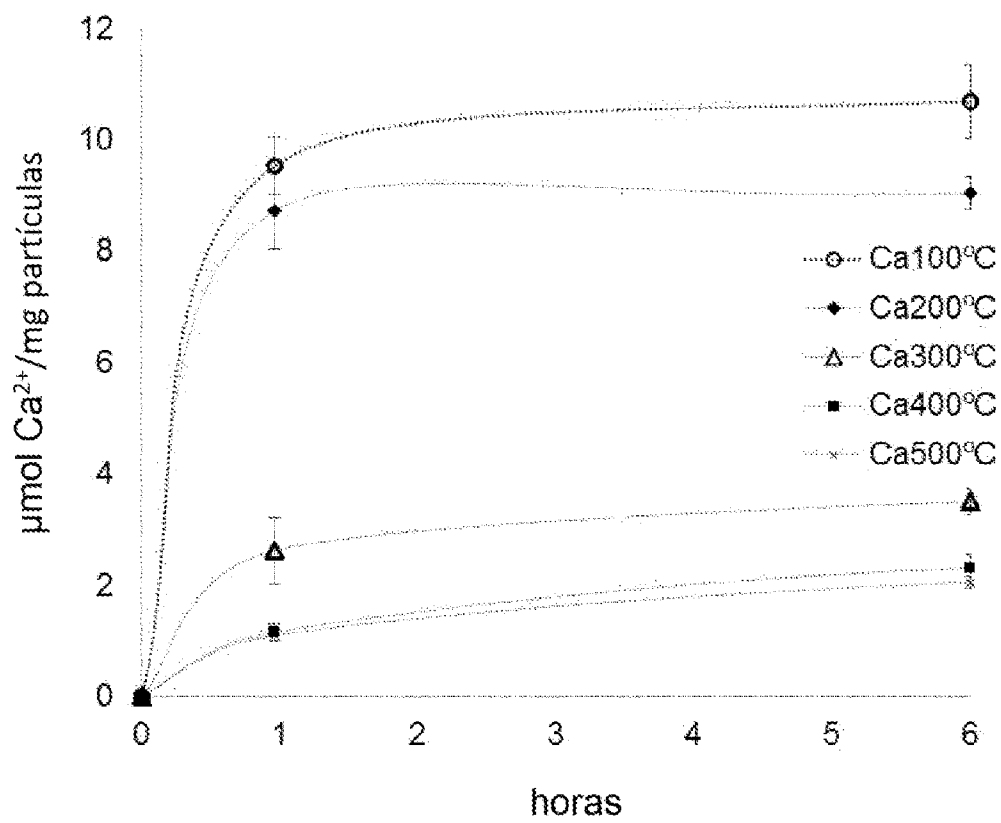
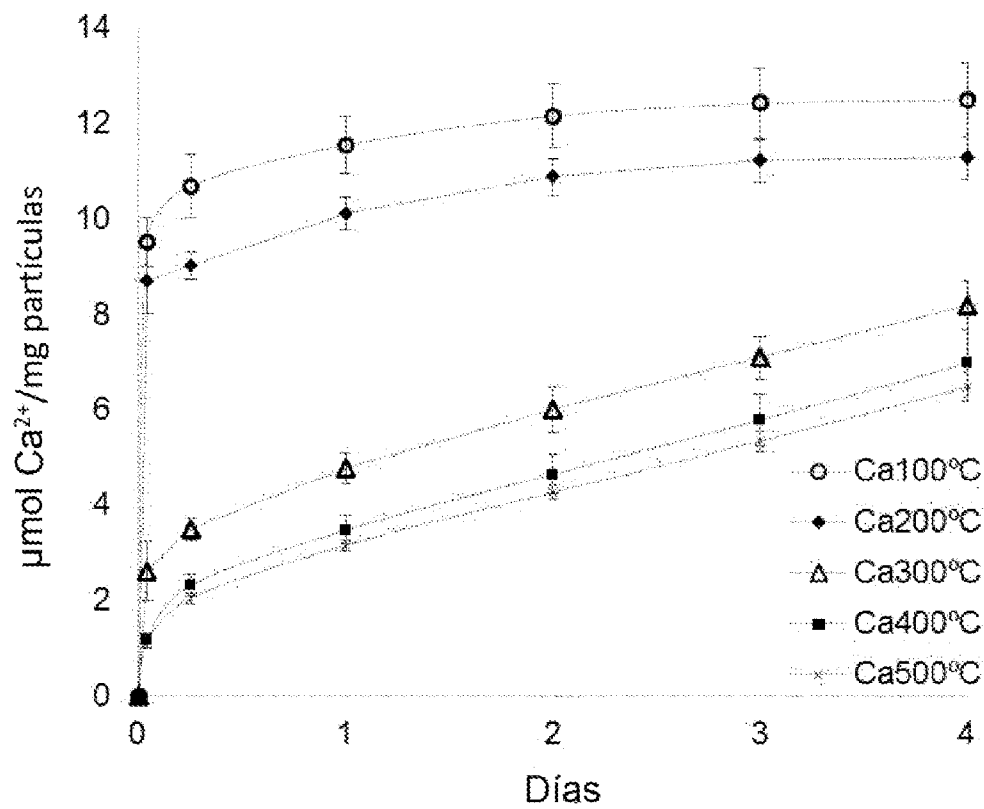


Fig. 3



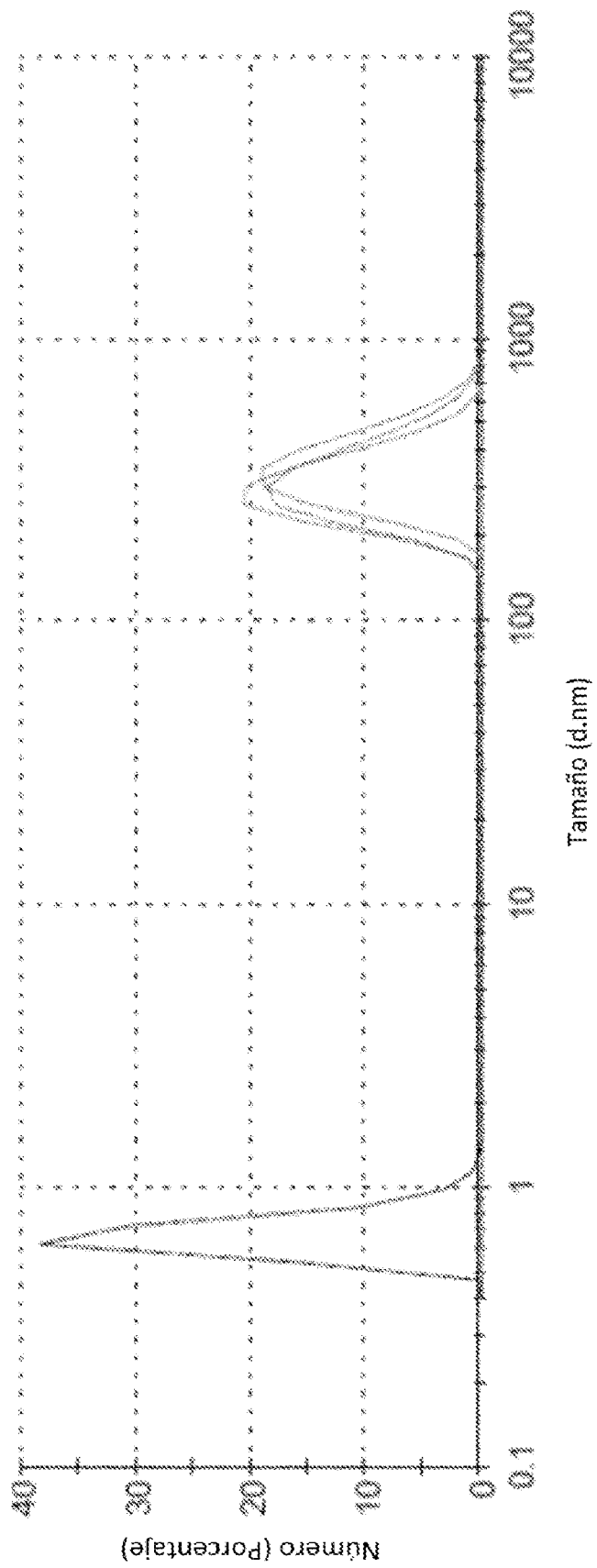


Fig. 5A

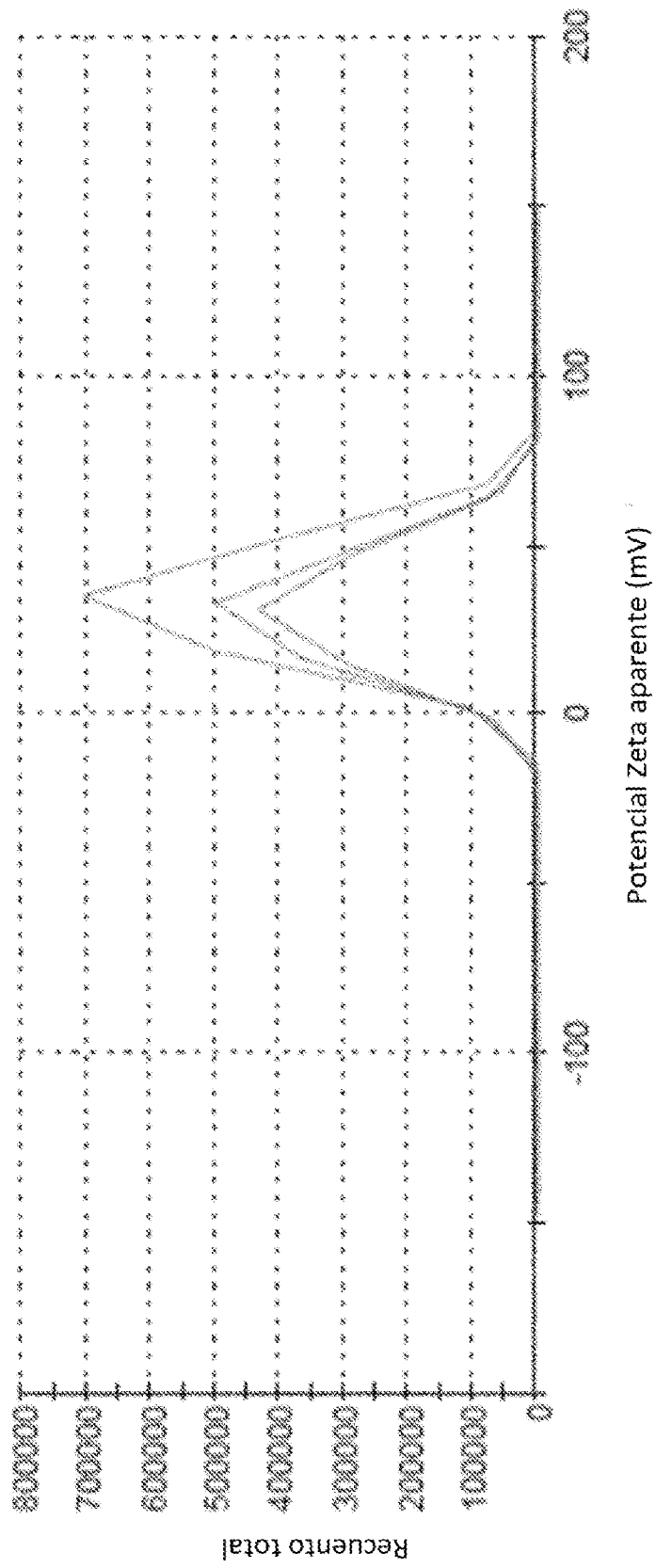


Fig. 5B

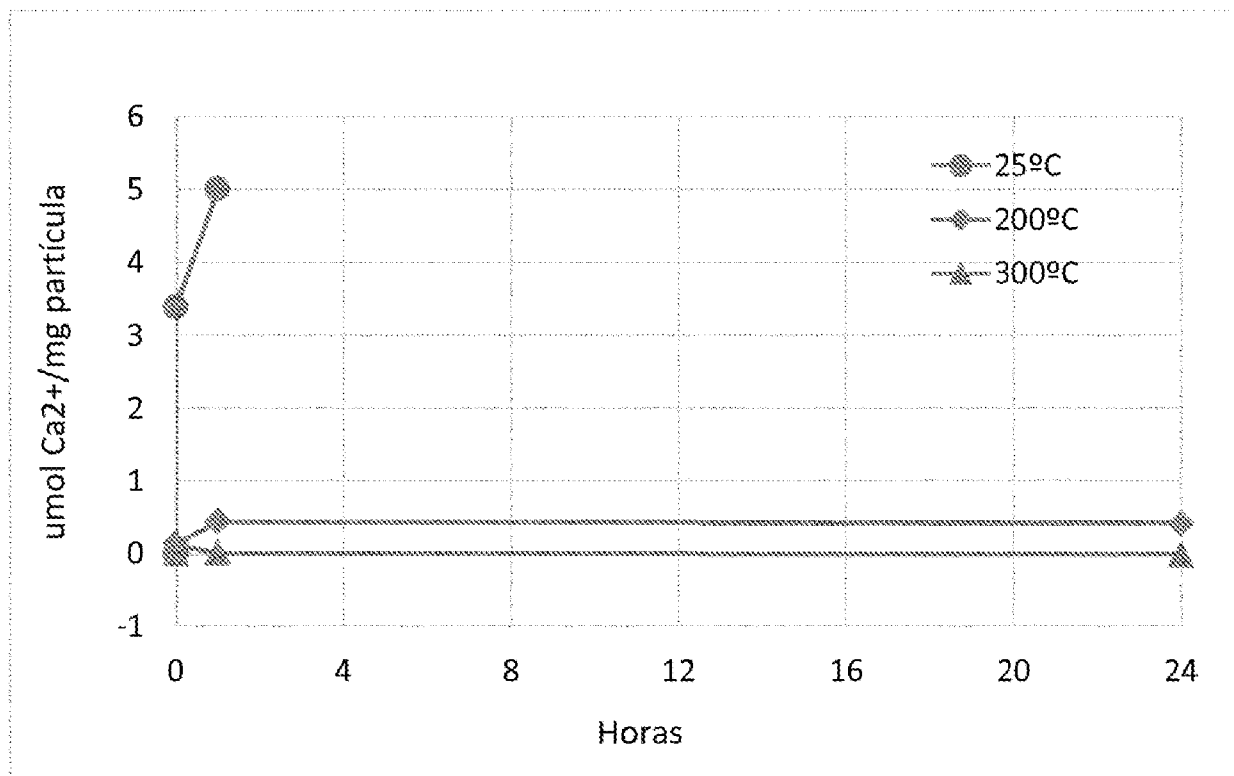


Fig. 6

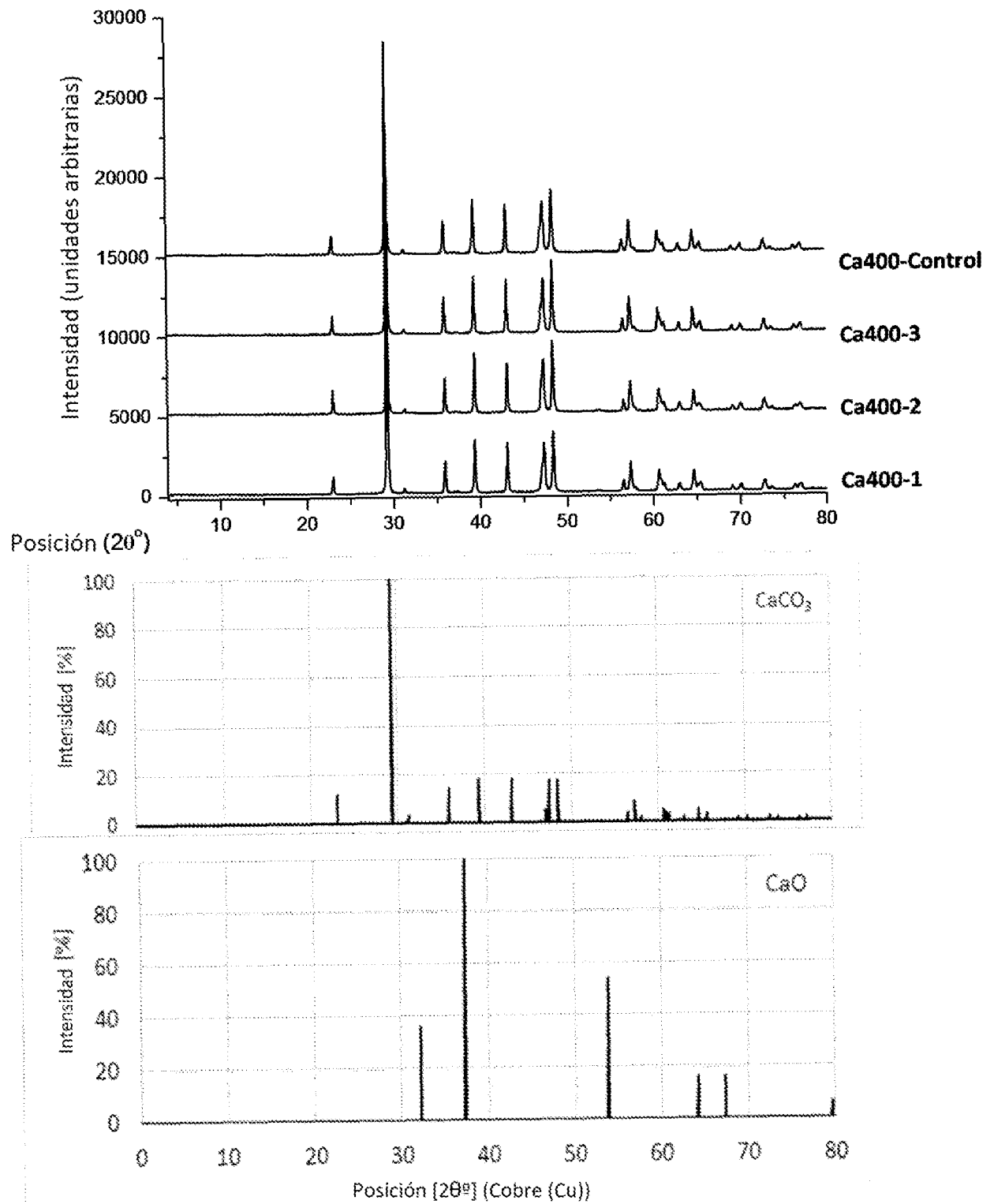
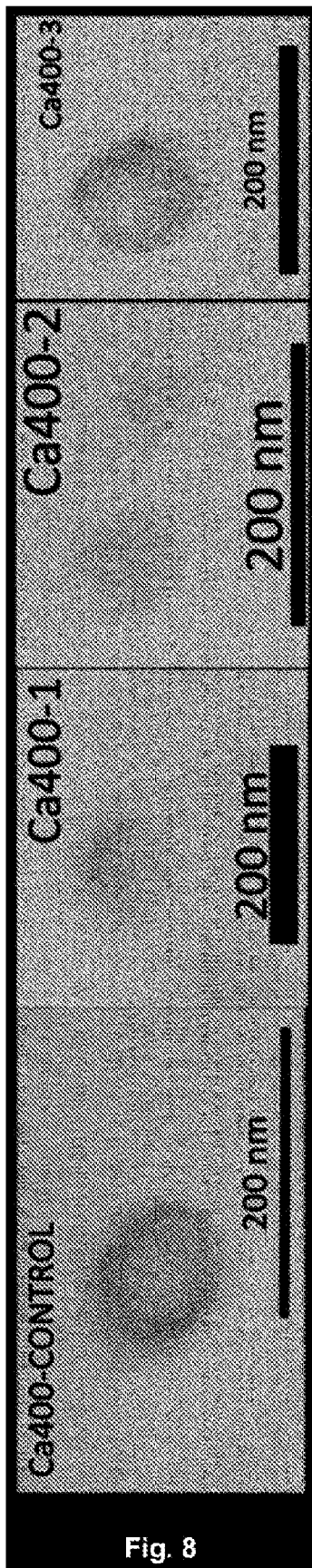


Fig. 7



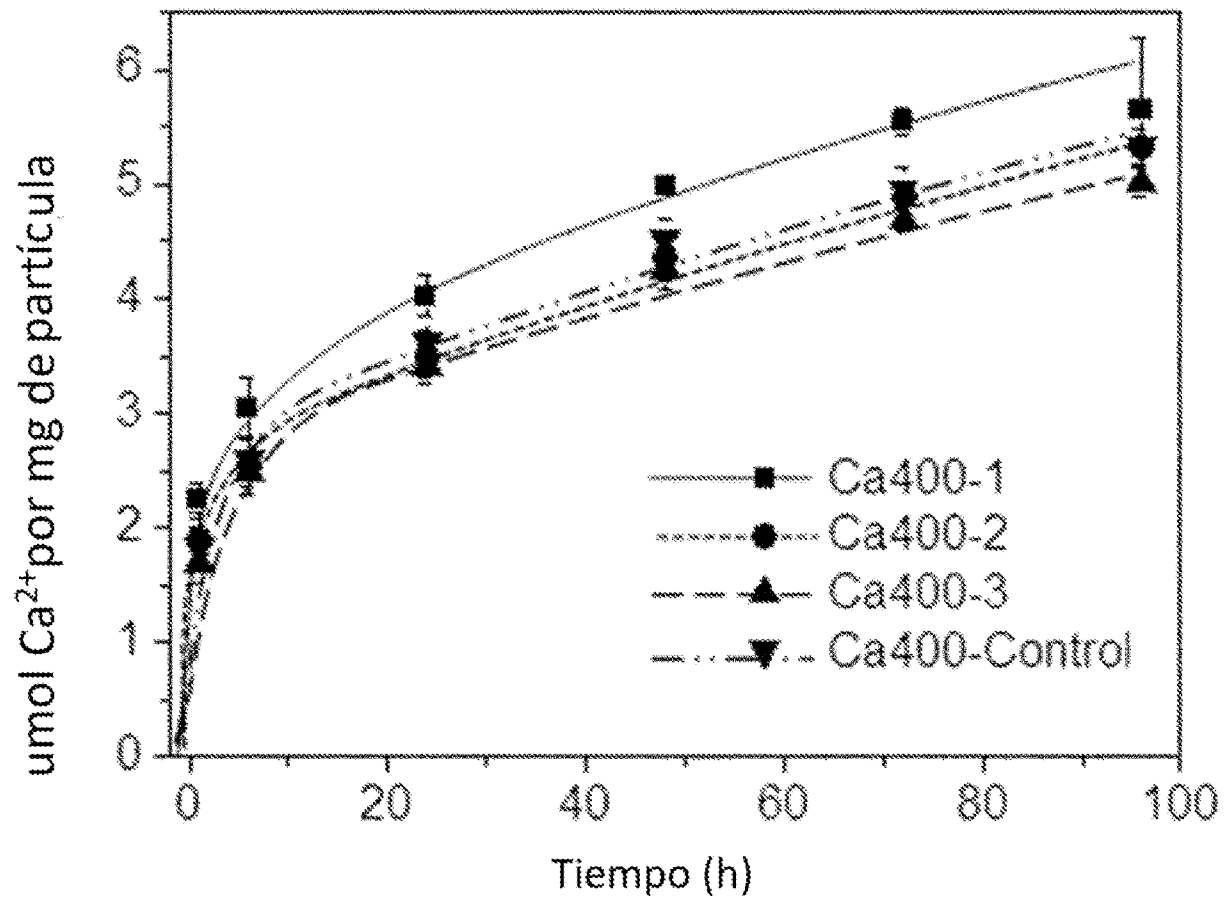
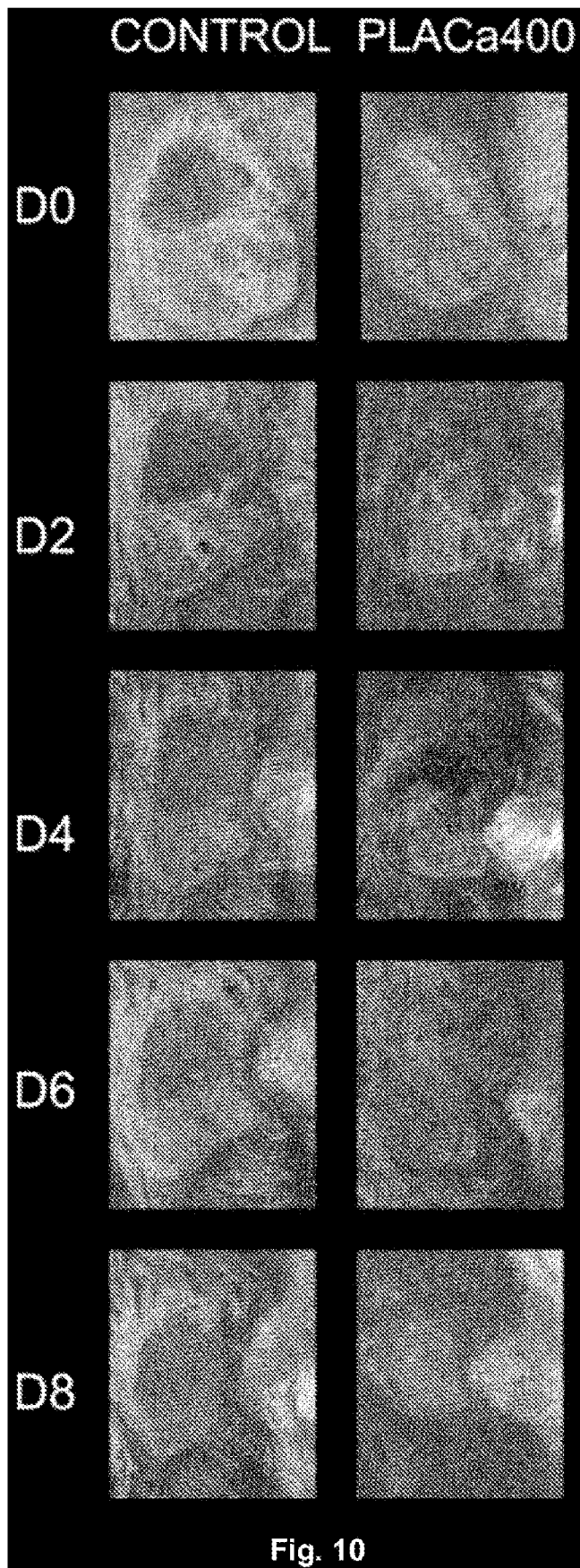


Fig. 9



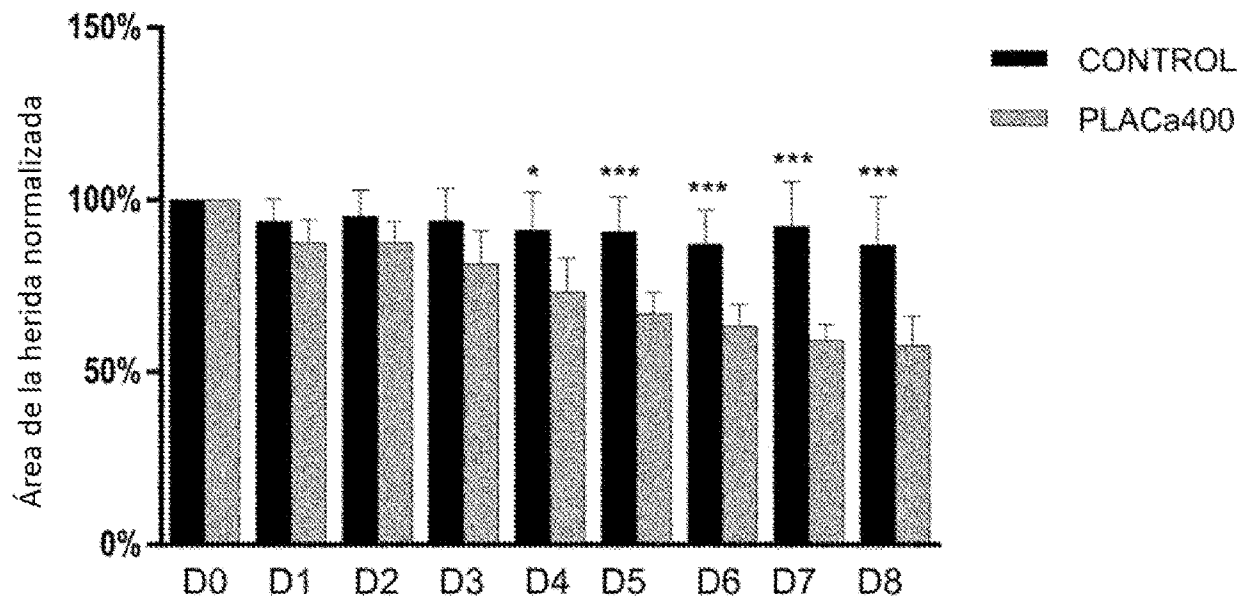
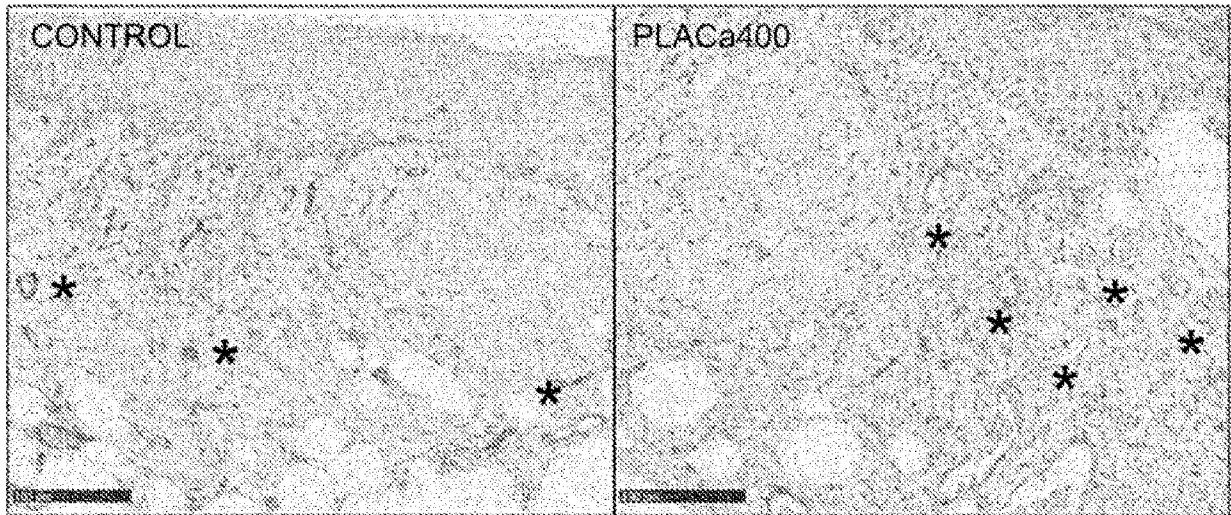


Fig. 11

A



B

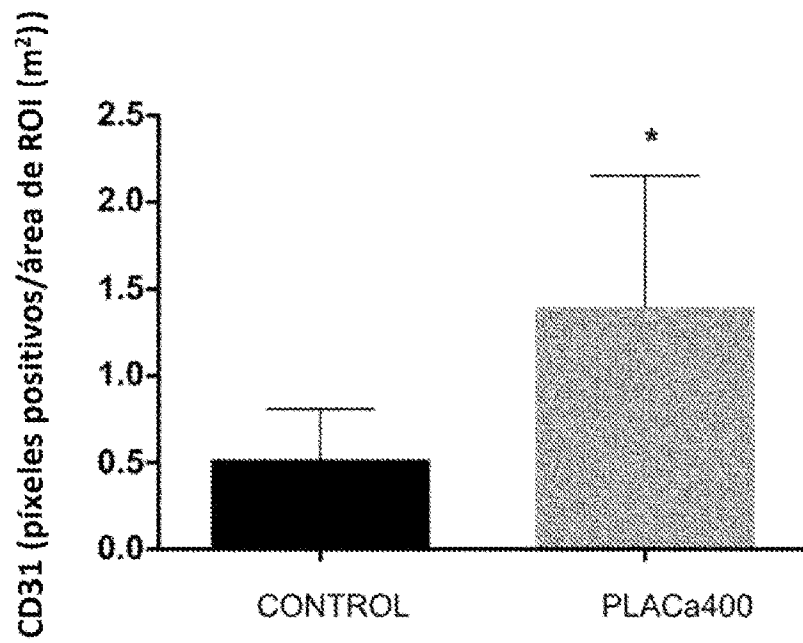


Fig. 12