(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
02 de noviembre de 2023 (02.11.2023) WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2023/209262 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
A61K 6/20 (2020.01) *A61K 6/60* (2020.01)
A61K 35/57 (2015.01) *A61K 6/75* (2020.01)
A61K 6/50 (2020.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2023/070274

(22) Fecha de presentación internacional:
28 de abril de 2023 (28.04.2023)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P202230390 28 de abril de 2022 (28.04.2022) ES

(71) Solicitantes: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; Av. María Luisa s/n - Pabellón de Perú, 41013 Sevilla (ES). **UNIVERSIDAD DE OVIEDO** [ES/ES]; Calle San Francisco, 3, 33003 Oviedo (Asturias) (ES). **UNIVERSIDAD DE GRANADA** [ES/ES]; Hospital Real . Avda. del Hospicio s/n, 18071 Granada (ES). **UNIVERSIDAD DE JAÉN** [ES/ES]; OTRI Campus Las Lagunillas, s/n. Edif. B1, 23071 Jaén (ES). **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD** [ES/ES]; Avda. de la Constitución, 18, 41071 Sevilla (ES).

(72) Inventores: **GÓMEZ MORALES, Jaime**; Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra, Laboratorio de Estudios Cristalográficos, Avda. de Las Palmeras nº 4, 18100 Armilla (Granada) (ES). **FERNÁNDEZ PENAS, Raquel**; Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra, Laboratorio de Estudios Cristalográficos, Avda. de Las Palmeras nº 4, 18100 Armilla (Granada) (ES). **VERDUGO ESCAMILLA, Cristóbal**; Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra, Laboratorio de Estudios Cristalográficos, Avda. de Las Palmeras nº 4, 18100 Armilla (Granada) (ES). **ÁLVAREZ LLORET, Pedro Domingo**; UNIVERSIDAD DE OVIEDO, Facultad de Geología, C/ Jesús Arias de Velasco, s/n, 33005 Oviedo (Asturias) (ES). **TORRES MANSILLA, Adriana Carolina**; UNIVERSIDAD DE OVIEDO, Facultad de Geología, C/ Jesús Arias de Velasco, s/n, 33005 Oviedo (Asturias) (ES). **MARCHAL CORRALES, Juan Antonio**; UNIVERSIDAD DE GRANADA, Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada - CIBM, Av. del Conocimiento, 19, 18016 Granada (ES). **LÓPEZ RUIZ, Elena**; UNIVERSIDAD DE JAÉN, OTRI Campus Las Lagunillas, s/n. Edif. B1, 23071 Jaén (ES). **VOLTES MARTÍNEZ, Ana**; Fundación para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Orienta - FIBAO, Avda. de Madrid, 15, 18012 Granada (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Angel**; Glorieta de Ruben Dario, 4, 28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:
— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

(54) **Title:** MATERIAL FOR PULP CAPPING AND BONE REGENERATION

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

(57) **Abstract:** The present invention relates to a material comprising a membrane extracted from eggshell, coated with a layer of calcium phosphate. The invention also relates to a method for producing the material and to the use thereof as a pulp capping or bony tissue regenerator.

(57) **Resumen:** 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.

WO 2023/209262 A1

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.

ESTADO DE LA TÉCNICA

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 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 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.

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 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 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.

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 INVENCIÓN

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un material que comprende una etapa (i) de mineralización controlada de una membrana orgánica con un recubrimiento inorgánico mediante el método de cristalización por difusión de vapor.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento definido anteriormente,

donde la mineralización controlada se lleva a cabo sólo en la capa externa de la membrana orgánica.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento definido anteriormente, donde la membrana orgánica es una membrana extraída de cáscara de huevo.

Así, con el procedimiento descrito en la presente invención la capa interna de la membrana orgánica queda protegida del proceso de mineralización, de manera que la membrana adquiere propiedades osteoinductoras (capa externa) y de barrera (capa interna).

Este material se obtiene preferentemente por interacción de membrana extraída de cáscara de huevo con una capa de fosfato cálcico mediante mineralización controlada de dicho recubrimiento inorgánico.

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 (seta de cristalización) por difusión de vapores de CO_2 y NH_3 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.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al material obtenido por el procedimiento definido anteriormente, donde dicho material comprende una membrana extraída de cáscara de huevo donde las fibras que la componen están recubiertas por una capa de fosfato cálcico.

Otro aspecto de 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.

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.

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+}.

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.

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.

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.

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

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 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 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.

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.

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).

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 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 v_1PO_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 ± 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 → 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: 10µm. 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. 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.

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 ± 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 $p<0,005$ 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 → 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; OPN: Osteopontina; ST: Sin tratamiento.

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 ± 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 $p<0,05$ 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 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.

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.

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 con objeto de proteger la cara interna de la mineralización. Posteriormente, se deposita sobre ellas microgotas formadas al mezclar 20 microlitros de disolución 50 mM $Ca(CH_3COO)_2$ con 20 microlitros de disolución 30 mM de $(NH_4)_2HPO_4$, 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 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

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:

a) **F^-**: 20 microlitros de disolución 40 mM $Ca(CH_3COO)_2$ +10mM NaF mezcladas con 20 microlitros de disolución 30 mM de $(NH_4)_2HPO_4$.

b) **M^{2+}**= Mn^{2+}, Co^{2+}: 20 microlitros de disolución 40 mM $Ca(CH_3COO)_2$ +10mM $MCl_2.nH_2O$ mezcladas con 20 microlitros de disolución 30 mM de $(NH_4)_2HPO_4$ con una relación final $(Ca+M^{2+})/P$ de 5:3;

c) **M^{3+}**= Eu^{3+}, Tb^{3+}: 20 microlitros de disolución de composición 40 mM $Ca(CH_3COO)_2$ + 10mM $MCl_3{\cdot}nH_2O$ mezclados con 20 microlitros de disolución 30 mM de $(NH_4)_2HPO_4$ con una relación final $(Ca+M^{3+})/P$ de 5:3.

d) **Moléculas bioactivas** = ácido L-aspártico, ácido L-Glutámico: 15 microlitros de disolución 50 mM $Ca(CH_3COO)_2$ + 15 microlitros de disolución 30 mM $(NH_4)_2HPO_4$ (Ca/P = 5/3) +10 microlitros de molécula bioactiva de concentración 20 mM.

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.

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 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). 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 moleculares de fosfatos cristalinos (Figura 3b y 4b) asociados con apatito (v_1,v_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.

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 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.

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.

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

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

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 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.

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

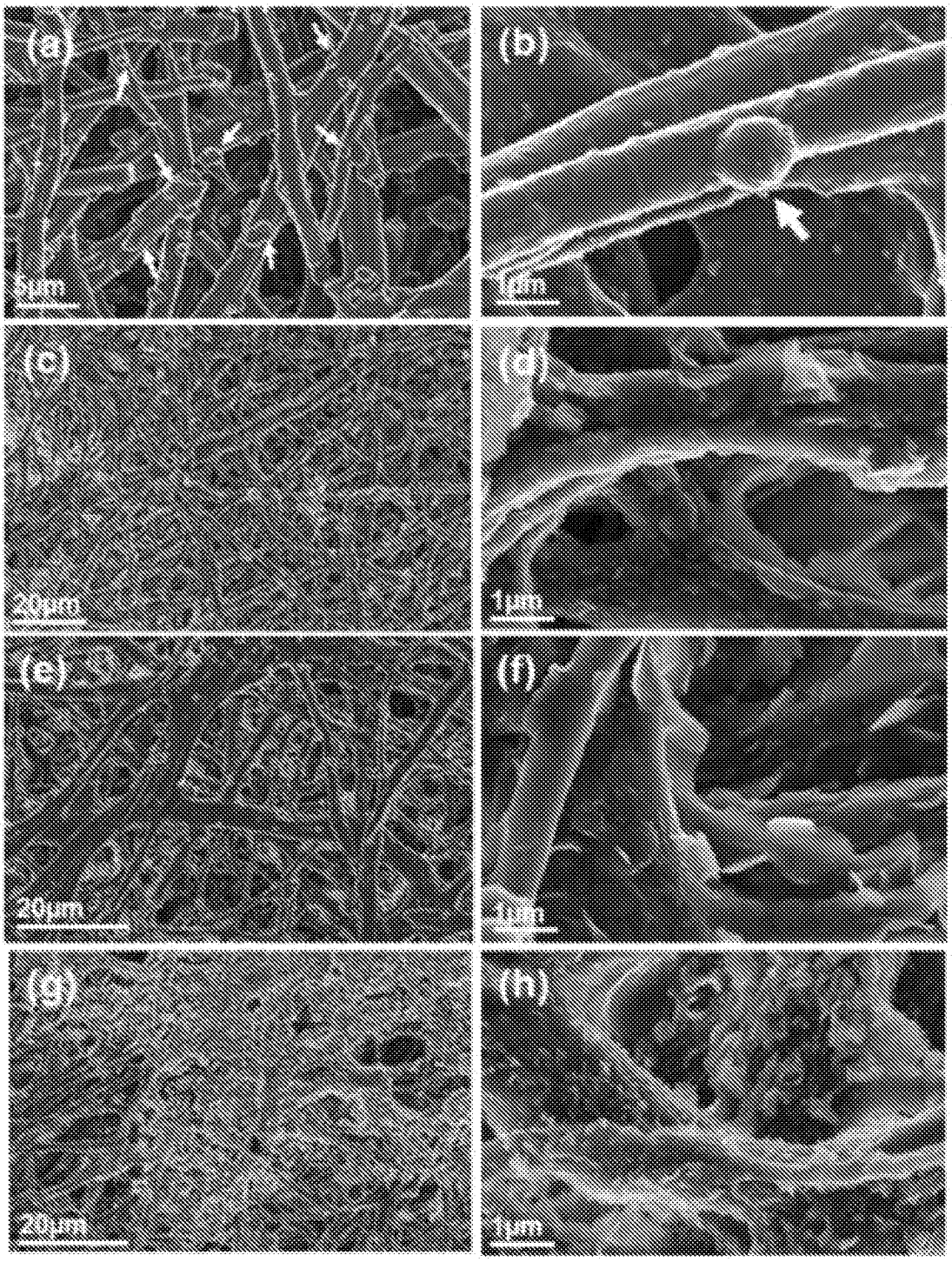


Fig. 1

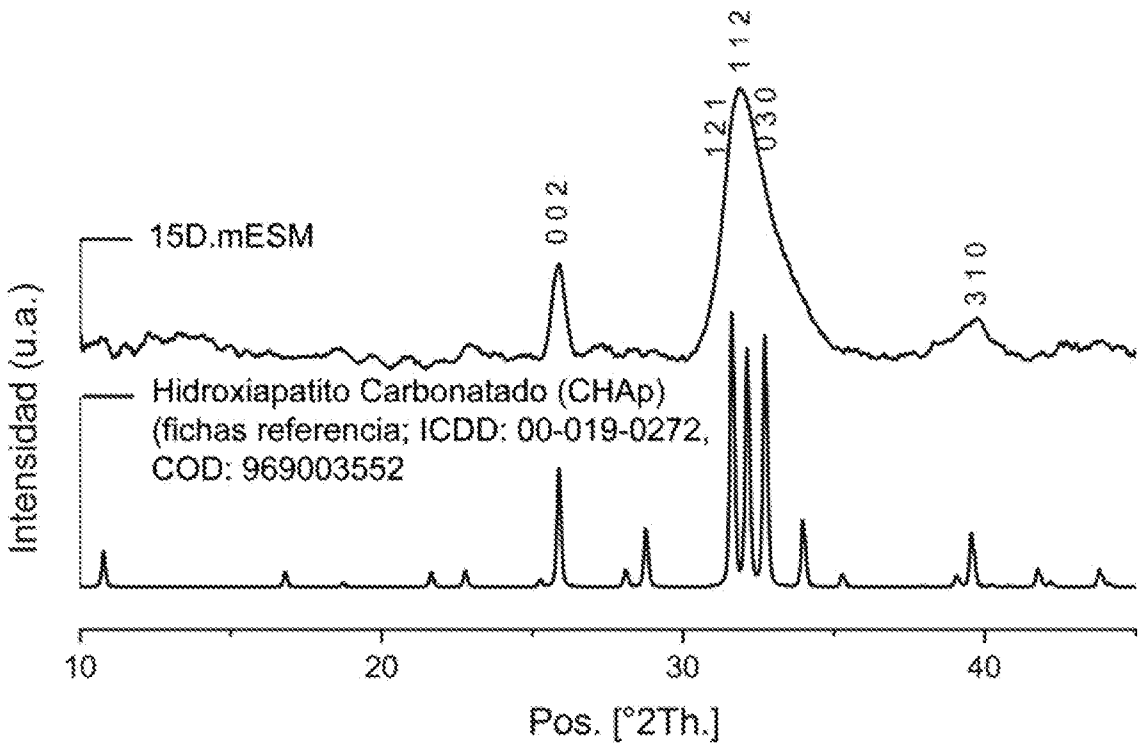

15D.mESM
Hidroxiapatito Carbonatado (CHAp)
(fichas referencia; ICDD: 00-019-0272,
COD: 969003552
Intensidad (u.a.)
0 0 2
1 2 1
0 3 0
1 1 2
3 1 0
10
20
30
40
Pos. [°2Th.]

Fig. 2

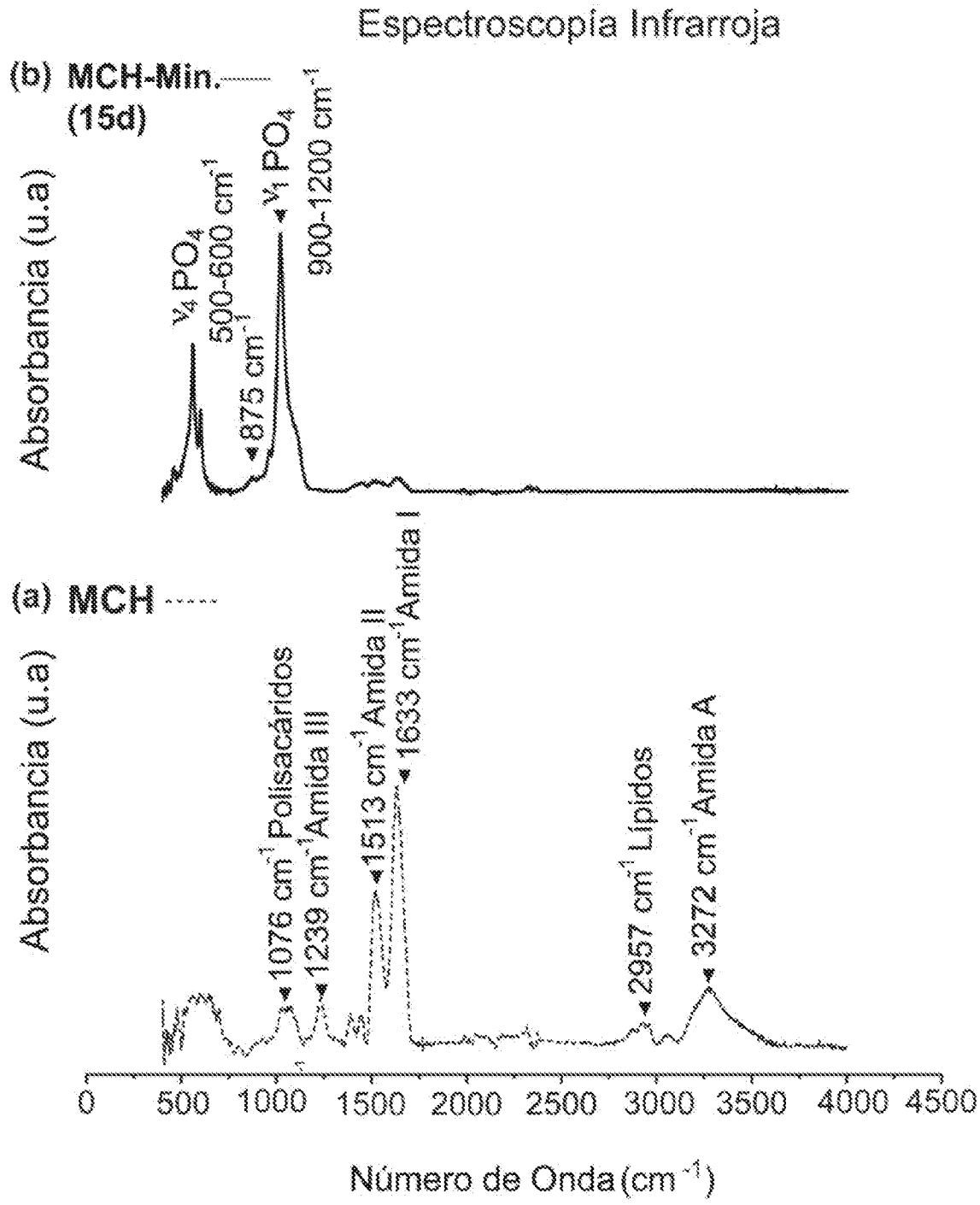

Espectroscopía Infrarroja
(b) MCH-Min. (15d)
Absorbancia (u.a)
ν4 PO4
500-600 cm-1
875 cm-1
ν1 PO4
900-1200 cm-1
(a) MCH
Absorbancia (u.a)
1076 cm-1 Polisacáridos
1239 cm-1 Amida III
1513 cm-1 Amida II
1633 cm-1 Amida I
2957 cm-1 Lípidos
3272 cm-1 Amida A
0 500 1000 1500 2000 2500 3000 3500 4000 4500
Número de Onda (cm-1)

Fig. 3

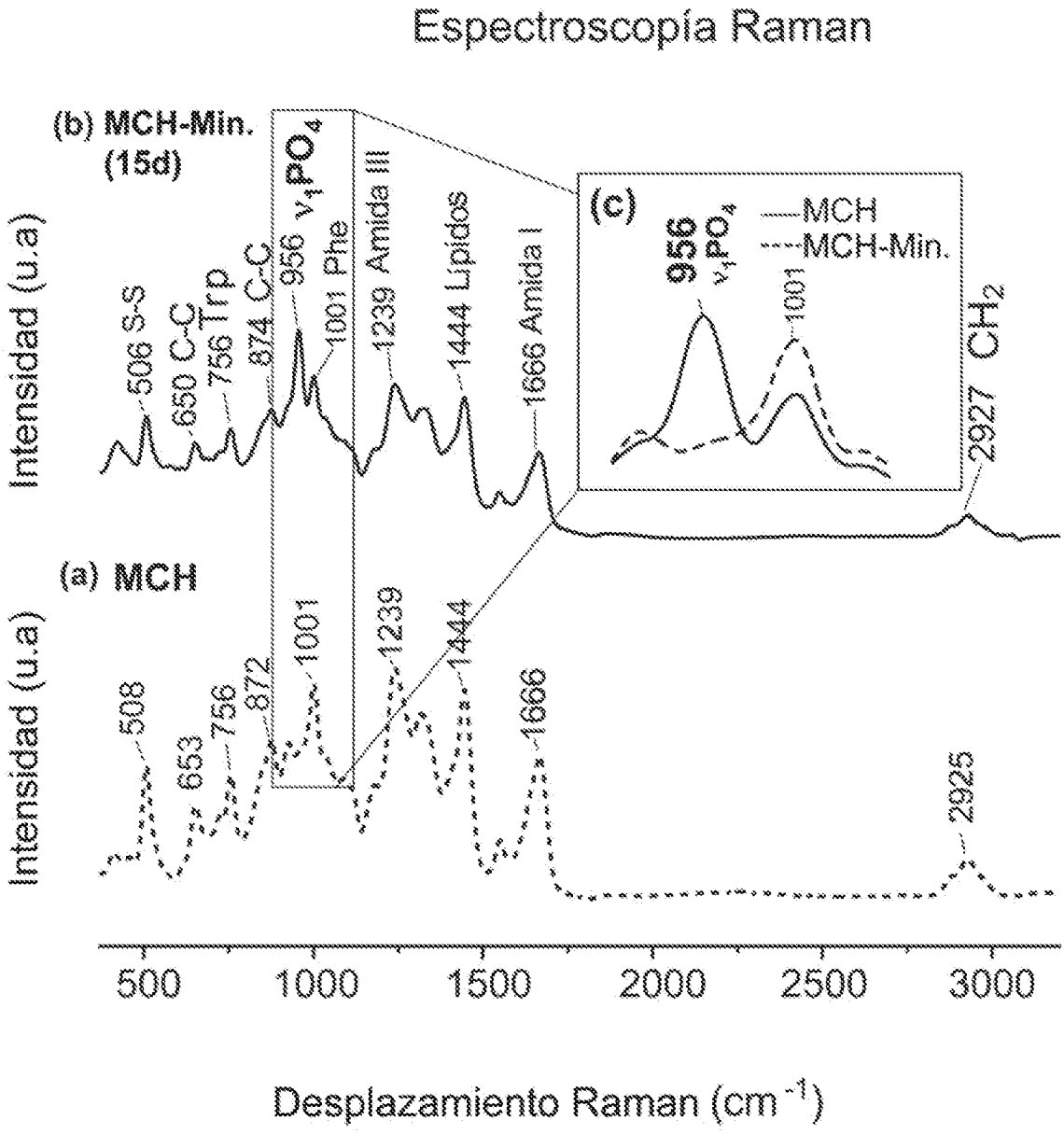

Espectroscopía Raman
(b) MCH-Min. (15d)
(a) MCH
(c)
MCH
MCH-Min.
956 ν_1PO_4
1001 Phe
1239 Amida III
1444 Lipidos
1666 Amida I
2927 CH_2
506 S-S
650 C-C
756 Trp
874 C-C
508
653
756
872
1001
1239
1444
1666
2925
Intensidad (u.a)
Intensidad (u.a)
500
1000
1500
2000
2500
3000
Desplazamiento Raman (cm^{-1})

Fig. 4

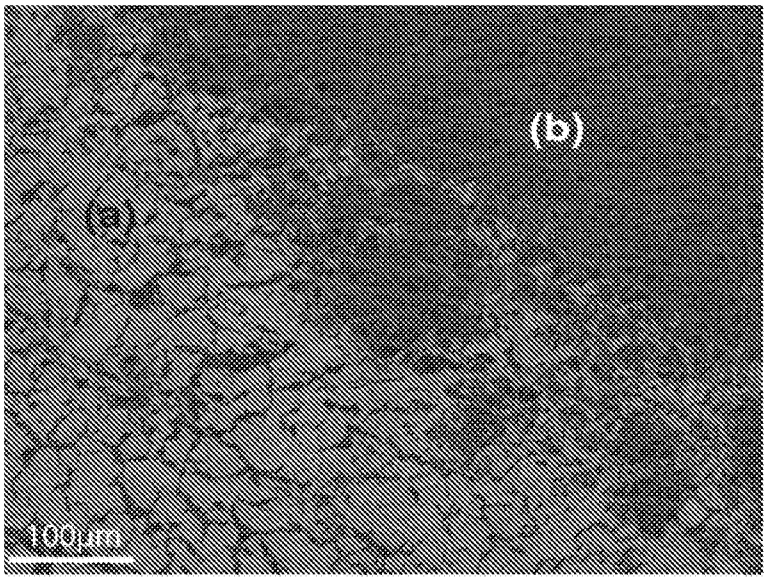


Fig. 5

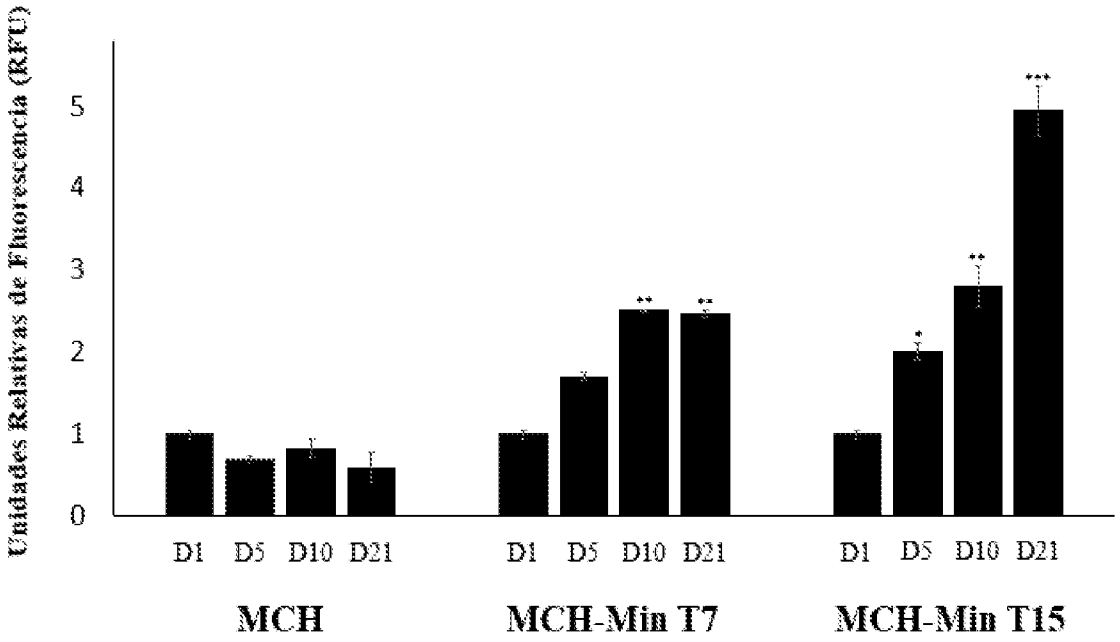

Unidades Relativas de Fluorescencia (RFU)
0
1
2
3
4
5
D1 D5 D10 D21
D1 D5 D10 D21
D1 D5 D10 D21
MCH
MCH-Min T7
MCH-Min T15

Fig. 6

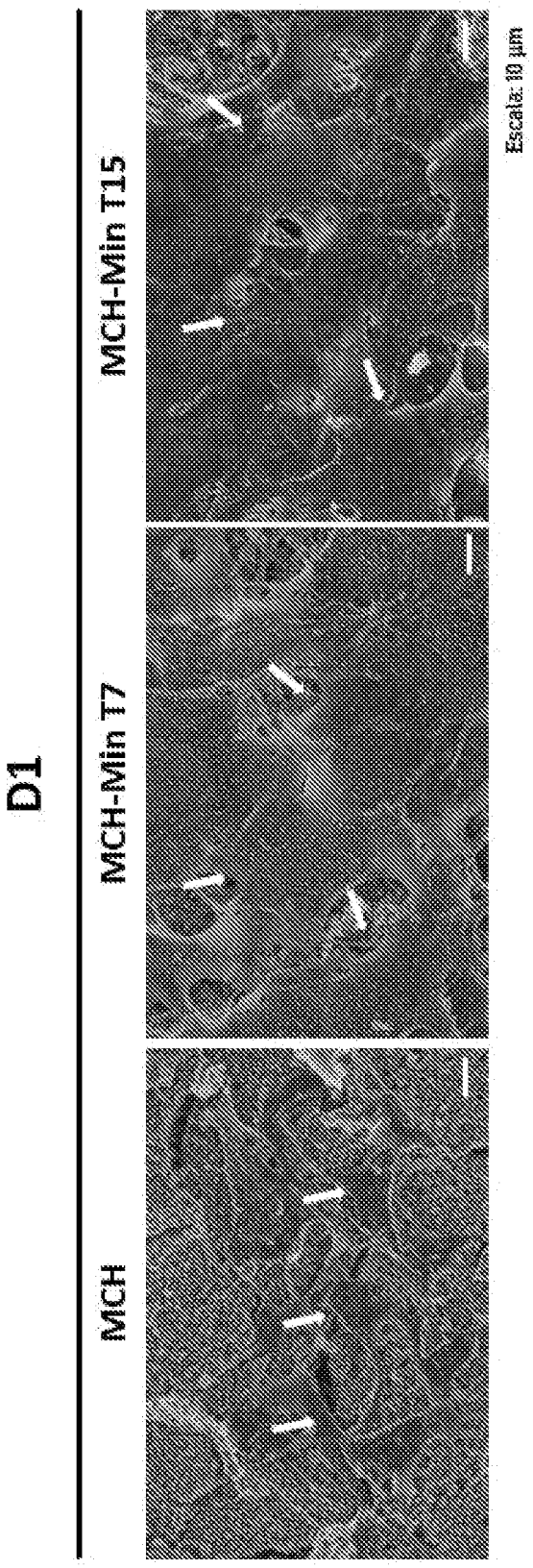


Fig. 7

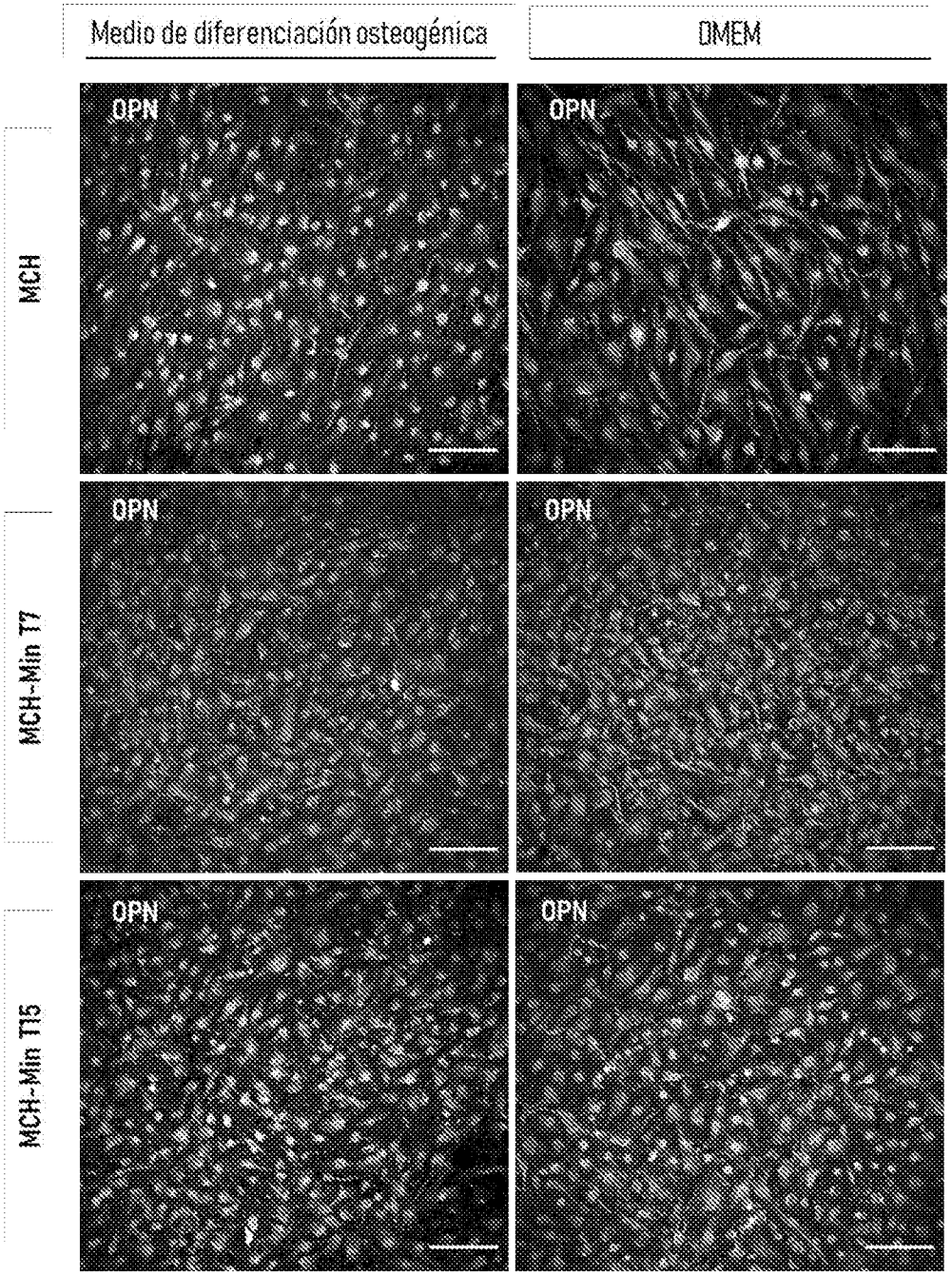

Medio de diferenciación osteogénica
DMEM
MCH
MCH-Min T7
MCH-Min T15
OPN
OPN
OPN
OPN
OPN
OPN

Fig. 8

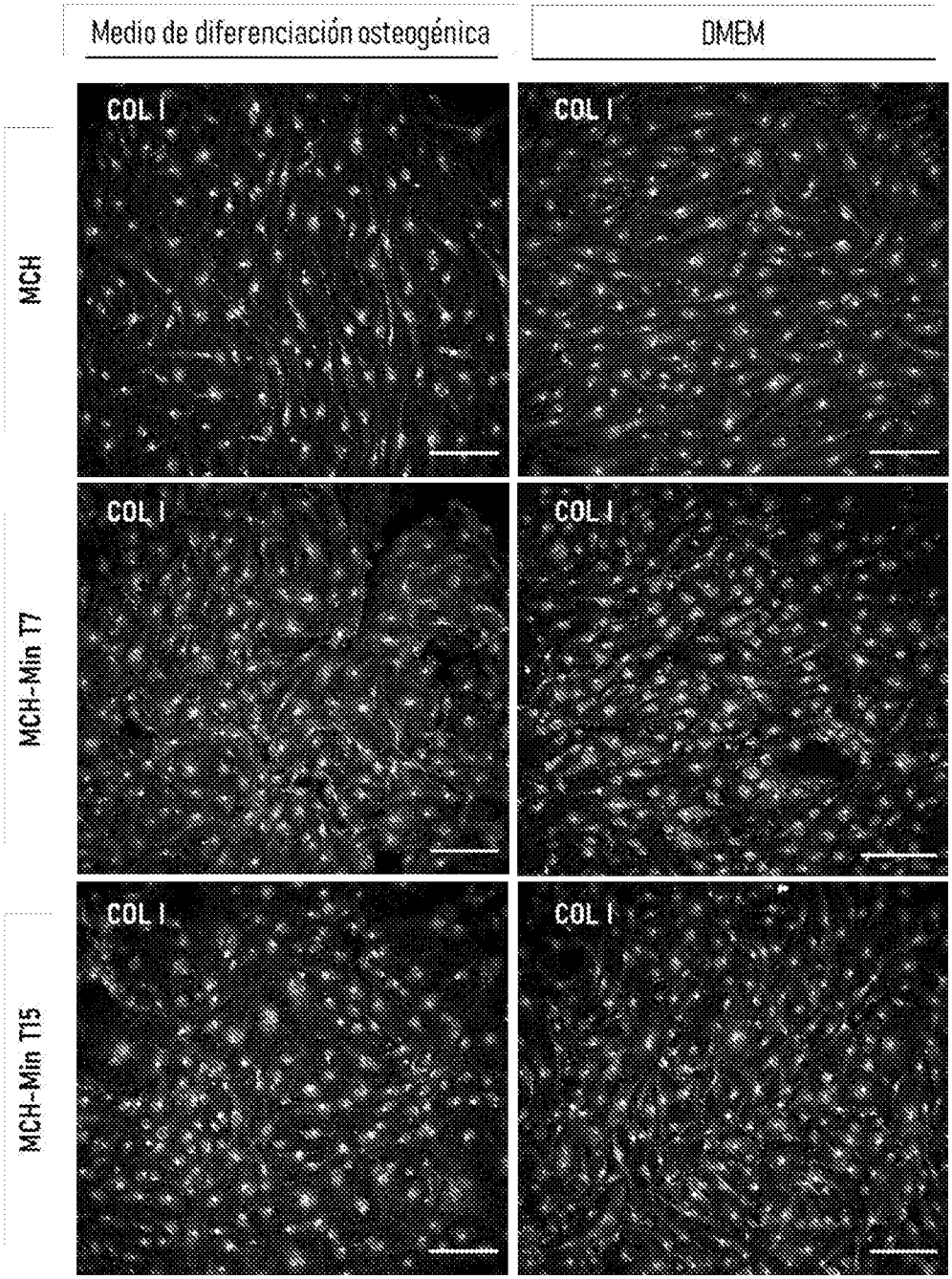

Medio de diferenciación osteogénica
DMEM
MCH
MCH-Min T7
MCH-Min T15
COL I
COL I
COL I
COL I
COL I
COL I

Fig. 9

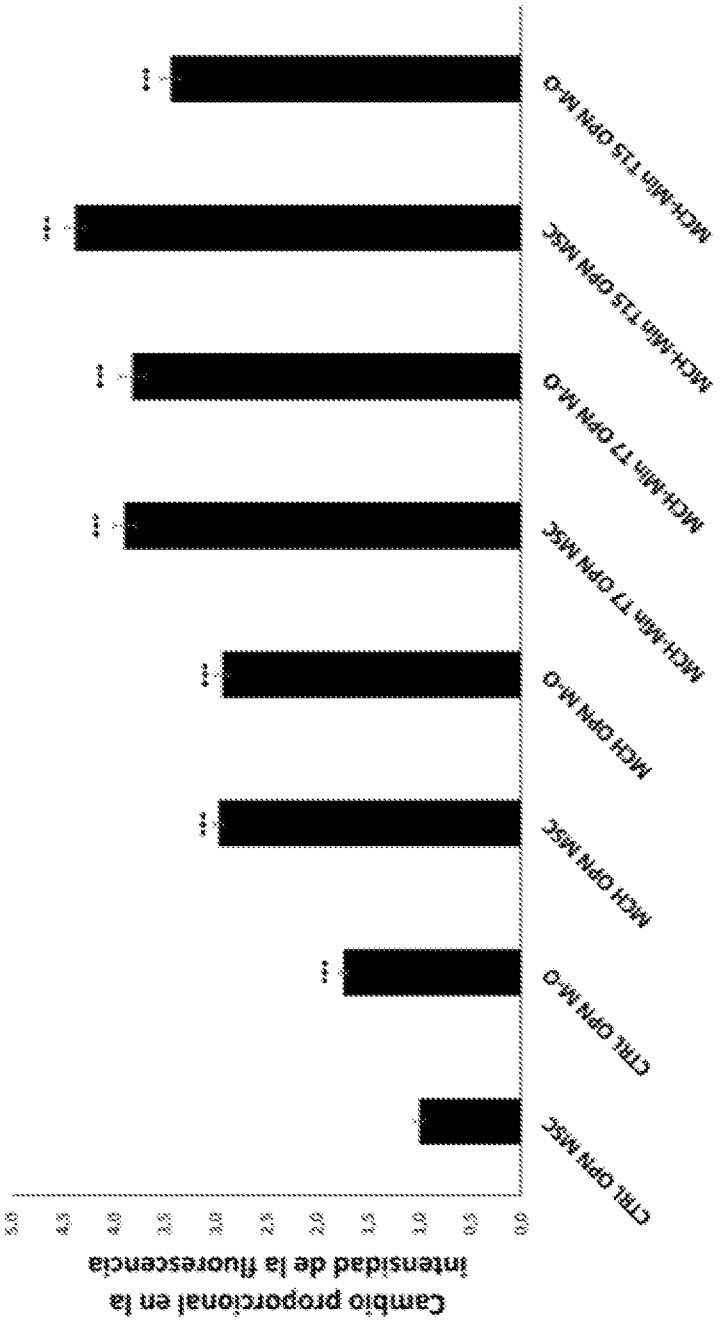

CTRL OPN MSC
CTRL OPN M-0
MCH OPN MSC
MCH OPN M-0
MCH-MBh T7 OPN MSC
MCH-MBh T7 OPN M-0
MCH-MBh T15 OPN MSC
MCH-MBh T15 OPN M-0
Cambio proporcional en la intensidad de la fluorescencia

FIG. 10

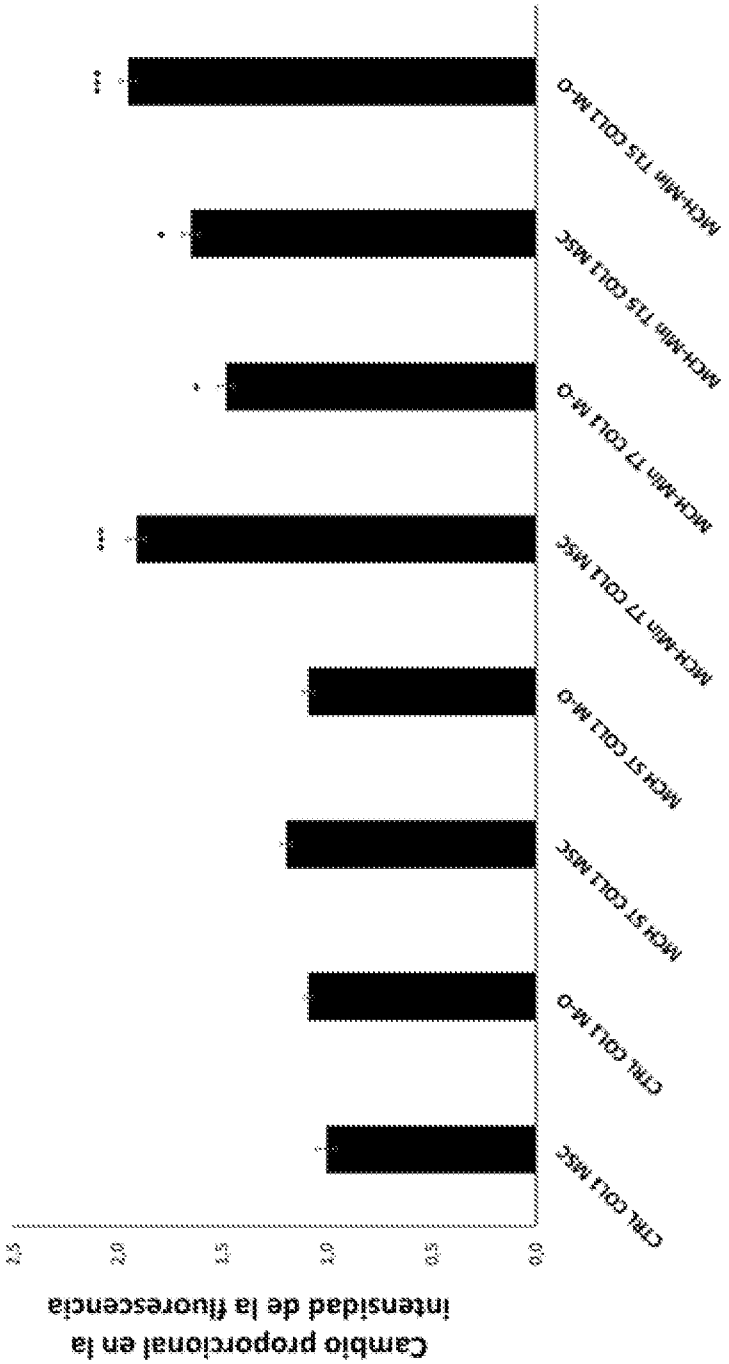

CTRL COLI MSC
CTRL COLI MO
MCH ST COLI MSC
MCH ST COLI MO
MCH-Mdn TT COLI MSC
MCH-Mdn TT COLI MO
MCH-Mdn T1S COLI MSC
MCH-Mdn T1S COLI MO
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
Cambio proporcional en la intensidad de la fluorescencia

FIG. 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2023/070274

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHANG Y *et al*. 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.Page 492, column izquierda, primer, tercer paragraph; page 493, column derecha, primer paragraph; page 496, column derecha, tercer paragraph; figure 6; abstract.	1-5
Y		6-9
Y	OCHOA I. *et al*. Síntesis and caracterización of polvos of hidroxiapatita carbonatada tipo b con diferentes contenidos of carbonato. Revista Colombiana Of Materials, 2021, Nº 17, pages 22-32 Retrieved from <URL: <URL: https://doi.org/10.17533/udea.rcm.n17a03 >>, ISSN 2256-1013 Abstract.	6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29/06/2023	**(30/06/2023)**
Name and mailing address of the ISA/ OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Facsimile No.: 91 349 53 04	Authorized officer S. González Peñalba Telephone No. 305025

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2023/070274

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
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, pages 1-198, abstract.	7-9
A	MOHAMED S, *et al.* Evaluation of eggshell powder as an experimental direct pulp capping material. Future Dental Journal,, 2018, Vol. 4, pages 160-164, abstract.	1-11
A	NAFI&APOS *et al*. 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, pages 012077 (6 pp.), ISSN 1742-6596 (print), <DOI: 10.1088/1742-6596/1170/1/012077> page 2, primer paragraph; page 3, second paragraph; page 5, first, second and last paragraph.	1-11
A	MAHDAVI S *et al.* 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, pages 17348 - 17364, ISSN 0888-5885 (print) ISSN 1520-5045 (electronic), <DOI: 10.1021/acs.iecr.1c03085> page 7, first paragraph.	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2023/070274

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K6/20 (2020.01)
A61K35/57 (2015.01)
A61K6/50 (2020.01)
A61K6/60 (2020.01)
A61K6/75 (2020.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2023/070274

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)
EPODOC, INVENES, WPI, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, NPL, INTERNET.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	ZHANG Y *et al*. 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.	1-5
Y		6-9
Y	OCHOA I. *et al*. Síntesis y caracterización de polvos de hidroxiapatita carbonatada tipo b con diferentes contenidos de carbonato. Revista Colombiana De Materiales, 2021, Nº 17, páginas 22-32 Recuperado de <URL: <URL: https://doi.org/10.17533/udea.rcm.n17a03 >>, ISSN 2256-1013 Resumen.	6

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.
"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
29/06/2023	**30 de junio de 2023 (30/06/2023)**
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Nº de fax: 91 349 53 04	Funcionario autorizado S. González Peñalba Nº de teléfono 305025

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2023/070274

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
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.	7-9
A	MOHAMED S, *et al.* Evaluation of eggshell powder as an experimental direct pulp capping material. Future Dental Journal, 2018, Vol. 4, páginas 160-164 resumen.	1-11
A	NAFI&APOS *et al.* 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: 10.1088/1742-6596/1170/1/012077> página 2, primer párrafo; página 3, segundo párrafo; página 5, primer, segundo y último párrafo.	1-11
A	MAHDAVI S *et al.* 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: 10.1021/acs.iecr.1c03085> página 7, primer párrafo.	1-11

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2023/070274

CLASIFICACIONES DE INVENCIÓN

A61K6/20 (2020.01)
A61K35/57 (2015.01)
A61K6/50 (2020.01)
A61K6/60 (2020.01)
A61K6/75 (2020.01)