(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 606 466**

(51) Int. CI.:

C01B 25/32 (2006.01)
C01B 25/16 (2006.01)
A61L 27/12 (2006.01)
A61L 27/46 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2006 PCT/IB2006/002844**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2007 WO07045954**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2006 E 06809000 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 1948561**

(54) Título: **Una hidroxiapatita plurisustituida y el material compuesto de la misma con un polímero natural y/o sintético, su preparación y usos de los mismos**

(30) Prioridad:

18.10.2005 IT MI20051966

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.03.2017

(73) Titular/es:

FIN - CERAMICA FAENZA S.P.A. (100.0%)
VIA GRANAROLO, 177/3
48018 FAENZA, IT

(72) Inventor/es:

LANDI, ELENA;
TAMPIERI, ANNA;
CELOTTI, GIANCARLO;
SPRIO, SIMONE;
PRESSATO, DANIELE y
DE LUCA, CLAUDIO

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

Una hidroxiapatita plurisustituida y el material compuesto de la misma con un polímero natural y/o sintético, su preparación y usos de los mismos

La presente invención se refiere a una hidroxiapatita multisustituida con especies iónicas fisiológicamente compatibles y a su material compuesto biohíbrido con un polímero natural y/o sintético, que se pueden usar en la preparación de un sustituto óseo biomimético para tratar defectos del tejido óseo.

Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para su preparación y usos.

La hidroxiapatita es un fosfato de calcio considerado uno de los materiales más útiles como implantes y/o sustitutos óseos, puesto que es un constituyente esencial de la parte inorgánica/mineral de los huesos y dientes de los mamíferos. Dicha parte inorgánica se representó durante un largo tiempo como hidroxiapatita estequiométrica, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$.

En realidad, la fase inorgánica fisiológica de los huesos y dientes no está hecha únicamente de un fosfato de calcio estequiométrico o hidroxiapatita (en aras de simplicidad, se denomina a continuación HA), como se menciona anteriormente.

De hecho, la hidroxiapatita fisiológica, que está presente en huesos y dientes, también comprende en su estructura una determinada cantidad de sustituciones químicas, tanto aniónicas como catiónicas, que, por un lado, hacen que sea más reabsorbible por el organismo vivo y, por otro lado, le dan una capacidad más alta para estimular el crecimiento de nuevo tejido óseo que la hidroxiapatita estequiométrica. Aunque presentes en pequeñas cantidades, dichos sustituyentes iónicos pueden estar ligados a las propiedades biológicas específicas de la hidroxiapatita fisiológica y pueden desempeñar un papel principal en la bioquímica del hueso, esmalte y dentina.

Por lo tanto, la presencia de estos sustituyentes iónicos es fundamental a fin de obtener un biomaterial que, al reproducir de una manera óptima (y posiblemente mejor) la bioestructura y bioquímica del tejido óseo natural, pueda integrarlo y sustituirlo, con tiempos de integración y regeneración óseas muy cortos, con respecto a la hidroxiapatita estequiométrica convencional (que, como tal, se reabsorbe en tiempos demasiado largos y provoca una activación de los osteoblastos insuficiente).

Entre los sustituyentes iónicos más importantes, que están presentes en la hidroxiapatita fisiológica, se pueden mencionar los siguientes:

- por un lado, aniones silicato y carbonato, que sustituyen parcialmente iones fosfato (en el llamado "sitio B" de la HA);
- por otro lado, cationes Mg^{2+} y Sr^{2+}, que sustituyen parcialmente iones calcio.

Además, el ion carbonato también sustituye parcialmente iones OH^- del sitio A de la HA, de esta manera, dando como resultado una sustitución parcial en ambos sitios A y B de la misma, principalmente en la posición de fosfato (sitio B) con respecto a la posición de hidroxilo (sitio A). De hecho, en la HA fisiológica están presentes tanto carbonaciones de tipo A como de tipo B, en una proporción molar mutua de A/B de aproximadamente 0,7 a aproximadamente 0,9 (correspondiente a una proporción molar en porcentaje de A/B de aproximadamente un 70 % a aproximadamente un 90 %), dependiendo de la especie y edad del sujeto.

El silicio es uno de los oligoelementos esenciales en los procesos biológicos. Se demostró la importancia del silicio para la formación ósea y calcificación mediante estudios científicos *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, la sustitución de iones fosfato con iones silicato en la hidroxiapatita incrementa la actividad de las células osteoblastos con respecto a la hidroxiapatita estequiométrica. De hecho, se observaron un depósito óseo más alto y una remodelación ósea más rápida sobre la superficie de los implantes de HA reemplazada con iones silicato (en aras de simplicidad, silicio-hidroxiapatita, SiHA), con respecto a la HA estequiométrica. El contenido de silicio en la apatita biológica varía aproximadamente de un 0,2 a un 0,8 % en peso.

La presencia de silicio también parece promover la adhesión celular y la formación de parte orgánica ósea, en particular, de colágeno.

En lo que respecta al magnesio, este parece desempeñar un papel importante en las modificaciones de la calidad de la matriz ósea, dando como resultado la fragilidad de la misma. La falta de Mg^{2+} afecta negativamente a todas las etapas del metabolismo del esqueleto, provocando la interrupción del crecimiento óseo, la reducción de la actividad de osteocitos y osteoblastos, osteopenia y fragilidad ósea.

Además, la hidroxiapatita sintética sustituida con Mg^{2+} (en aras de simplicidad, MgHA) es más soluble y, por lo tanto,

más reabsorbible que la HA no sustituida. Sin embargo, existe un límite a la incorporación de Mg^{2+} en la HA, puesto que las concentraciones altas de dicho ion tienden a desestabilizar su estructura. Las proporciones molares de Mg^{2+}/Ca^{2+} por encima de 0,3 hacen proporcionalmente probable la formación de fosfato tricálcico de magnesio en detrimento de la MgHA.

Se describe hidroxiapatita sustituida con Mg en I. V. Fadeev *et al*. "Synthesis and Structure of Magnesium-Substituted Hydroxyapatite", Inorganic Materials, vol. 39, n.º 9, 2003, pp. 947-950.

De todos modos, la sustitución del ion Ca^{2+} con Mg^{2+} se puede incrementar ventajosamente incorporando simultáneamente iones carbonato en el sitio de fosfato (sitio B) de la estructura de apatita. Como tal, el ion carbonato ya está normalmente presente en la estructura de HA fisiológica en una cantidad de un 3 % a un 8 % en peso, con respecto al peso de la HA, dependiendo de la edad del sujeto. Por lo tanto, se deben llevar a cabo las carbonaciones sintéticas preferentemente en el sitio B, también porque la carbonación de tipo A da como resultado una afinidad más baja de la apatita hacia las células osteoblastos, lo que da lugar a una adhesión celular más baja y a una producción de colágeno baja, con respecto a la HA no sustituida. Por lo tanto, es ventajoso dirigir únicamente la carbonación de la HA específicamente en su sitio B.

En lo que respecta al ion Sr^{2+}, su presencia varía dependiendo de la edad, tejido y ejercicio físico. La proporción molar de Sr^{2+}/Ca^{2+} en la HA fisiológica es generalmente de 0,02 a 0,30, asociándose los valores más altos con un hueso joven. Además, el Sr^{2+} tiene un efecto estabilizante sobre la estructura de la apatita.

La presencia de cada ion específico en cantidades convenientes da una contribución particular al proceso biológico de remodelación ósea y varía adicionalmente las características de solubilidad, reabsorción, estabilidad y resistencia mecánica de la HA sustituida gracias al gran número de defectos cristalinos debidos a su presencia. Por lo tanto, todas las sustituciones iónicas que están presentes de manera natural en la HA fisiológica contribuyen a determinar las características biológicas específicas del tejido óseo.

Por lo tanto, sería extremadamente importante tener un material sintético que pueda reproducir de una manera óptima (y posiblemente mejor) las características dadas al tejido óseo por su componente inorgánico fisiológico complejo (apatita) para obtener sustitutos óseos completamente biocompatibles y biomiméticos que se vayan a usar para tratar defectos óseos.

Por desgracia, no se conoce un material que cumpla satisfactoriamente las características a las que se hace referencia anteriormente.

Por lo tanto, todavía es necesario tener un material como el descrito anteriormente, que sea completamente biocompatible y biomimético, cuyas características de capacidad de reabsorción y osteogénesis sean tales que le hagan ser un sustituto óptimo del componente inorgánico del tejido óseo natural.

La finalidad de la presente invención es dar una respuesta adecuada a la necesidad divulgada anteriormente.

Esta finalidad y otras, que son evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, se han logrado por el solicitante, que ha descubierto inesperadamente que una hidroxiapatita sustituida con una cantidad eficaz de iones Sr^{2+} y opcionalmente que comprenda adicionalmente iones silicato y/o carbonato puede dar una respuesta adecuada a los problemas a los que se hace referencia anteriormente.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es una hidroxiapatita multisustituida con una cantidad eficaz de iones Sr^{2+} y, adicionalmente, con al menos otra especie iónica fisiológicamente compatible, como se divulga en la reivindicación independiente adjunta.

Otro objetivo de la presente invención es un procedimiento para preparar el compuesto anterior, cuyas características se divulgan en la reivindicación independiente adjunta.

Un objetivo adicional de la presente invención es el uso del compuesto anterior para preparar un sustituto óseo, como se divulga en la reivindicación independiente adjunta.

Todavía otro objetivo de la presente invención es el sustituto óseo obtenido con el compuesto anterior, como se divulga en la reivindicación independiente adjunta.

Se divulgan modos de realización preferentes de la presente invención en las reivindicaciones dependientes adjuntas.

Entre estos, un objetivo particularmente preferente de la presente invención es un material compuesto biohíbrido que comprenda la hidroxiapatita anterior y que comprenda adicionalmente una cantidad conveniente de un polímero natural y/o sintético, así como un procedimiento para preparar dicho material compuesto biohíbrido.

La presente invención se divulga en detalle en la siguiente descripción. Además, se divulga adicionalmente en algunos de sus aspectos preferentes mediante las figuras adjuntas 1 a 6, en las que:

- la FIG. 1 muestra la comparación entre la tendencia dependiente del pH de la conductividad en agua de una serie dada de suspensiones (acuosas) de los polvos de hidroxiapatitas multisustituidas;

- la FIG. 2 muestra un análisis por ESEM (microscopia electrónica de barrido ambiental) de un material compuesto (*is*_SrSiMgCHA/Coll 70/30 FFS, descrito en el ejemplo 2 divulgado a continuación) de acuerdo con la presente invención, hecho de una fase inorgánica de hidroxiapatita multisustituida (SrSiMgCHA), que se incorpora durante su síntesis en la fase de colágeno en el proceso de autoensamblaje de este último (nucleación directa *in situ*); el material compuesto está caracterizado por una estructura porosa que comprende poros con un tamaño extremadamente variable; se pueden ver tanto macroporos, con un tamaño por encima de 300 µm, que posibilitan la penetración de los osteoblastos, como micro-mesoporos, que posibilitan la permeación de toda la estructura por los fluidos fisiológicos;

- la FIG. 3 muestra un análisis por TEM (microscopia electrónica de transmisión) de un material compuesto de acuerdo con la presente invención (*is*_SrSiMgCHA/Coll 70/30 FFS) a partir del cual se puede deducir que el proceso de nucleación *in situ* de la apatita en colágeno posibilita reducir el tamaño de partícula del material compuesto con respecto al que se puede obtener con dopaje químico (sustitución) de la fase inorgánica únicamente; de hecho, mientras que las hidroxiapatitas multisustituidas, como tales, tienen un tamaño de 20 nm a 40 nm, dependiendo de los iones de dopaje, con nucleación en colágeno *in situ* se generan apatitas multisustituidas con núcleos que tienen un tamaño de 5 nm a 10 nm;

- la FIG. 4 muestra un análisis por XRD (difracción de rayos X; radiación Kα del Cu) de un material compuesto de acuerdo con la presente invención (*is*_SrSiMgCHA/Coll 70/30 FFS); el espectro es típico de una fase con cristalinidad baja, sin embargo, se pueden identificar los picos característicos de la fase de apatita (002) a aproximadamente 26 grados de 2-theta, (211) y (112), que tienden a crear una banda que incluye el pico en (300), alrededor de 32 grados de 2-theta (theta es el ángulo entre el rayo X incidente y el rayo X difractado por la muestra: por regla general, es la abscisa de un difractograma de rayos X); la apariencia del espectro es consistente con la composición del material hecho de una fase orgánica (colágeno) y de una fase inorgánica (apatita multisustituida) con un tamaño de cristalito extremadamente pequeño;

- la FIG. 5 muestra un análisis por FTIR (espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier) de un material compuesto de acuerdo con la presente invención (*is*_SrSiMgCHA/Coll 70/30 FFS), en el que la flexión del carbonato en el sitio B (874 $cm^{-1)}$ y la elongación del COO^- en el colágeno, desplazada hacia valores de número de onda más bajos (desde 1340 a aproximadamente 1336,5 cm^{-1}), señalan una estrecha interacción entre la apatita y el colágeno; esto confirma la nucleación de la apatita en el interior y sobre las fibras de colágeno, a diferencia de lo que se produce cuando la fase de apatita preformada se mezcla en la fase de colágeno (en este caso, las dos fases permanecen diferenciadas);

- la FIG. 6 muestra un análisis TGA (curva termogravimétrica y su derivado, extraído del análisis STA: STA incluye TGA y DTA, es decir, análisis termogravimétrico + análisis termodiferencial) de un material compuesto de acuerdo con la presente invención (*is*_SrSiMgCHA/Coll 70/30 FFS); la curva de pérdida de peso posibilita evaluar la cantidad relativa de las fases de apatita y colágeno; el material compuesto apatita/colágeno 70/30 está caracterizado por una proporción en peso real de apatita/colágeno de aproximadamente 67/33; de hecho, si se considera que la fase de apatita sola está caracterizada por una pérdida de peso dependiendo de su estequiometría (generalmente de aproximadamente un 10-15 %, carbonación, agua ocluida, adsorbida y así sucesivamente), se puede deducir el contenido relativo de la fase de colágeno a partir de la pérdida de peso total del material compuesto; el contenido en peso del carbonato en la apatita se deduce a partir de la pérdida de peso (eliminación de CO_2 como resultado del proceso de descarbonización) en el intervalo de 600-1000 °C.

La presente invención se refiere a una hidroxiapatita (o hidroxiapatita no estequiométrica, en aras de conveniencia también denominada nsHA) multisustituida con especies iónicas fisiológicamente compatibles, en la que dicha hidroxiapatita comprende una cantidad eficaz de iones Sr^{2+} y Mg^{2+} y, opcionalmente, que comprende adicionalmente iones silicato y/o carbonato y mezclas de los mismos. En dicha hidroxiapatita a la que se hace referencia anteriormente:

- la proporción molar de iones silicato con respecto a iones fosfato de la hidroxiapatita es de 0,001 a 0,25, correspondiente a un porcentaje de SiO_4/PO_4 de un 0,1 % a un 25 %; y

- la proporción molar de iones Sr^{2+} con respecto a iones Ca^{2+} de la hidroxiapatita es de 0,002 a 0,35, correspondiente a una proporción molar en porcentaje de Sr/Ca de un 0,2 % a un 35 %.

Preferentemente, dicha proporción de silicato con respecto a fosfato es de 0,005 a 0,20, correspondiente a una proporción molar en porcentaje de SiO_4/PO_4 de un 0,5 % a un 20 %.

Más preferentemente, dicha proporción de silicato con respecto a fosfato es de 0,01 a 0,10, correspondiente a una proporción molar en porcentaje de SiO_4/PO_4 de un 1 % a un 10 %.

A su vez, dicha proporción de Sr^{2+} con respecto a Ca^{2+} es preferentemente de 0,02 a 0,30, correspondiente a una proporción molar en porcentaje de Sr/Ca de un 2 % a un 30 %.

Más preferentemente, dicha proporción de Sr^{2+} con respecto a Ca^{2+} es de 0,03 a 0,25, correspondiente a una proporción molar en porcentaje de Sr/Ca de un 3 % a un 25 %.

En un modo de realización preferente de la invención, dicha hidroxiapatita comprende adicionalmente al menos el ion carbonato.

Dicho carbonato está presente en una proporción molar de carbonato con respecto a fosfato de hidroxiapatita de 0,01 a 0,80, correspondiente a una proporción molar en porcentaje de $CaCO_3/PO_4$ de un 1,00 % a un 80 %; preferentemente de 0,05 a 0,30, correspondiente a una proporción molar en porcentaje de $CaCO_3/PO_4$ de un 5 % a un 30 %.

Dicho Mg^{2+} está presente en una proporción molar de Mg^{2+} con respecto a Ca^{2+} de hidroxiapatita de 0,01 a 0,30, correspondiente a una proporción molar en porcentaje de Mg/Ca de un 1,00 % a un 30 %; preferentemente, en una proporción molar de 0,03 a 0,20, correspondiente a una proporción molar en porcentaje de Mg/Ca de un 3 % a un 20 %.

En un modo de realización preferente adicional de la invención, dicha hidroxiapatita comprende adicionalmente una mezcla de iones carbonato y Mg^{2+}, en la que dichos iones están presentes en las mismas proporciones molares a las que se hace referencia anteriormente.

En algunos de los modos de realización preferentes de la invención, dicha hidroxiapatita comprende los siguientes iones sustituyentes:

- silicato, Sr^{2+}, Mg^{2+}; o
- Sr^{2+}, carbonato, Mg^{2+};

en la que dichos iones están presentes en las mismas proporciones molares a las que se hace referencia anteriormente.

En un modo de realización preferente adicional de la invención, dicha hidroxiapatita comprende iones silicato, Sr^{2+}, carbonato y Mg^{2+} sustituyentes, en la que dichos iones están presentes en las mismas proporciones molares a las que se hace referencia anteriormente; preferentemente, dichos iones están presentes en las siguientes proporciones:

- el ion silicato está presente en una proporción molar de SiO_4/PO_4 de 0,01 a 0,10;
- el ion Sr^{2+} está presente en una proporción molar de Sr/Ca de 0,03 a 0,25;
- el ion carbonato está presente en una proporción molar de CO_3/PO_4 de 0,05 a 0,30;
- el ion Mg^{2+} está presente en una proporción molar de Mg/Ca de 0,03 a 0,20.

En un modo de realización (que no pertenece a la invención), la hidroxiapatita multisustituida consiste en una hidroxiapatita sustituida con: silicato, Sr^{2+}, carbonato (SrSiCHA), en la que dichos iones están presentes en las mismas proporciones molares a las que se hace referencia anteriormente.

En otro modo de realización particularmente preferente de la invención, la hidroxiapatita multisustituida consiste en una hidroxiapatita sustituida con: silicato, Sr^{2+}, Mg^{2+} (SrSiMgHA), en la que dichos iones están presentes en las mismas proporciones molares a las que se hace referencia anteriormente.

En otro modo de realización (que no pertenece a la invención), la hidroxiapatita multisustituida consiste en una hidroxiapatita sustituida con: silicato, carbonato, Mg^{2+} (SiMgCHA), en la que dichos iones están presentes en las mismas proporciones molares a las que se hace referencia anteriormente.

En otro modo de realización particularmente preferente de la invención, la hidroxiapatita multisustituida consiste en una hidroxiapatita sustituida con: Sr^{2+}, carbonato y Mg^{2+} (SrMgCHA), en la que dichos iones están presentes en las mismas proporciones molares a las que se hace referencia anteriormente.

En un modo de realización particularmente preferente adicional de la invención, la hidroxiapatita multisustituida consiste en una hidroxiapatita sustituida con: silicato, Sr^{2+}, carbonato y Mg^{2+} (SrSiMgCHA), en la que dichos iones están presentes en las mismas proporciones molares a las que se hace referencia anteriormente.

Se sinterizaron polvos de HA multisustituida de acuerdo con la presente invención con un procedimiento convenientemente estudiado y optimizado para obtener resultados que sean similares, en tanto como sea posible, a lo que se produce en la naturaleza.

Dicho procedimiento para preparar una hidroxiapatita multisustituida de acuerdo con la presente invención incluye neutralizar una suspensión acuosa básica a) de $Ca(OH)_2$, que comprenda una cantidad conveniente de iones Sr^{2+}, mediante adición de una solución acuosa b) de H_3PO_4, en el que, en dicha reacción de neutralización:

i) dicha suspensión acuosa a) comprende adicionalmente una cantidad eficaz de iones Mg^{2+} y opcionalmente iones silicato; y

ii) la adición de dicha solución b) se lleva a cabo simultáneamente a la adición de una solución acuosa de iones bicarbonato.

Dicha reacción de neutralización se llevó a cabo a temperatura ambiente o fisiológica (de 20 °C a 40 °C, preferentemente de 25 °C a 37 °C). Toda la síntesis se lleva a cabo en condiciones de pH autocontrolado a aproximadamente 12 (evitando de esta manera las adiciones continuas de agentes basificantes, tales como amoníaco), garantizando la estabilidad termodinámica de la fase de apatita con respecto al bifosfato de calcio, que compite con la misma a valores de pH bajo.

Se introducen los sustituyentes iónicos de fosfato y calcio deseados de la hidroxiapatita en el entorno de reacción usando como reactivos sales adecuadas de los mismos, tales como, preferentemente, aunque no necesariamente (se pueden usar otras sales de los mismos si se desea): cloruro de magnesio, bicarbonato de sodio, tetraacetato de silicio, nitrato de estroncio, disueltos en la solución acuosa en cantidades convenientes.

Preferentemente, se usan dichas sales y reactivos (iniciales) en las siguientes concentraciones:

- $Ca(OH)_2$: de 10 a 1000 g/l, preferentemente de 30 a 250 g/l;
- $Si(CH_3COO)_4$: de 5 a 500 g/l, preferentemente de 8 a 70 g/l;
- $Sr(NO_3)_2$: de 5 a 600 g/l, preferentemente de 25 a 300 g/l;
- $MgCl_2$ 6 H_2O: de 5 a 700 g/l, preferentemente de 25 a 250 g/l;
- H_3PO_4: de 5 a 1000 g/l, preferentemente de 50 a 200 g/l;
- $NaHCO_3$: de 2 a 600 g/l, preferentemente de 8 a 70 g/l.

En un modo de realización preferente, se añade una suspensión de hidróxido de calcio (con agitación y a temperatura ambiente o fisiológica) con cantidades convenientes de soluciones de nitrato de estroncio y cloruro de magnesio y opcionalmente tetraacetato de silicio.

Todavía bajo agitación, se hace gotear la cantidad necesaria de ácido ortofosfórico (y de bicarbonato de sodio, si se desea, haciéndolo gotear por separado del ácido ortofosfórico) en la suspensión anterior.

La tabla 1 contiene a modo de ejemplo las cantidades de reactivos usados para las síntesis de algunas apatitas multisustituidas de acuerdo con la invención.

Tabla I

	$Ca(OH)_2$	$Si(CH_3COO)_4$	$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	$Sr(NO_3)_2$	H_3PO_4	$NaHCO_3$
Intervalo de concentrac. de reactivos	**10-1000 g/l pref.: 30-250 g/l**	**2-500 g/l pref.: 8-70 g/l**	**5-700 g/l pref.: 25-250 g/l**	**5-600 g/l pref.: 25-300 g/l**	**5-1000 g/l pref.: 50-200 g/l**	**2-600 g/l; pref.: 8-70 g/l**
SiHA-1 (no forma parte de la invención)	20 g en 600 ml de H_2O	1,94 g en 200 ml de H_2O	-----	-----	16,63 g en 200 ml de H_2O	-----
SiHA-2 (no forma parte de la invención)	20 g en 600 ml H_2O	3,66 g en 200 ml de H_2O	-----	-----	15,65 g en 200 ml de H_2O	-----
SiHA-3 (no forma parte de la invención)	20 g en 600 ml de H_2O	6,55 g en 200 ml de H_2O	-----	-----	14,00 g en 200 ml de H_2O	-----
SiCHA-1 (no forma parte de la invención)	20 g en 600 ml de H_2O	1,94 g en 200 ml de H_2O	-----	-----	16,63 g en 200 ml de H_2O	8,12 g en 400 ml de H_2O
SiCHA-2	20 g en 600 ml	1,94 g en	-----	-----	16,63 g en	1,82 g en
(no forma parte de la invención)	de H_2O	200 ml de H_2O	-----	-----	200 ml de H_2O	200 ml de H_2O
SiCHA-3 (no forma parte de la invención)	20 g en 600 ml de H_2O	1,94 g en 200 ml de H_2O	-----	-----	16,63 g en 200 ml de H_2O	4,00 g en 300 ml de H_2O
siMgHA-1 (no forma parte de la invención)	20 g en 600 ml de H_2O	1,94 g en 200 ml de H_2O	7,86g en 200 ml de H_2O	-----	16,63 g en 200 ml de H_2O	-----
SiMgCHA-1 (no forma parte de la invención)	20 g en 600 ml de H_2O	1,94 g en 200 ml de H_2O	7,86 g en 200 ml de H_2O	-----	16,63 g en 200 ml de H_2O	8,12 g en 400 ml de H_2O
SiMgCHA-2 (no forma parte de la invención)	20 g en 600 ml de H_2O	1,94 g en 200 ml de H_2O	7,86 g en 200 ml de H_2O	-----	16,63 g en 200 ml de H_2O	1,82 g en 200 ml de H_2O
SiMgCHA-3 (no forma parte de la invención)	100 g en 700 ml de H_2O	9,72 g en 200 ml de H_2O	39,30 g en 300 ml de H_2O	-----	83,15 g en 300 ml de H_2O	9,09 g en 200 ml de H_2O
MgHA (no forma parte de la invención)	100 g en 800 ml de H_2O	-----	45,97 g en 200 ml de H_2O	-----	88,8 g en 600 ml de H_2O	-----
SrMgHA-1	100 g en 600 ml de H_2O	-----	45,97 g en 200 ml de H_2O	54,25 g en 200 ml de H_2O	88,8 g en 600 ml de H_2O	-----
SrMgHA-2	100 g en 600 ml de H_2O	-----	65,13 g en 200 ml de H_2O	54,25 g en 200 ml de H_2O	88,8 g en 600 ml de H_2O	-----
SrMgHA-3	100 g en 600 ml de H_2O	-----	86,83 g en 200 ml de H_2O	54,25 g en 200 ml de H_2O	88,8 g en 600 ml de H_2O	-----
SrSiMgCHA	20 g en 600 ml de H_2O	1,94 g en 200 ml de H_2O	7,86 g en 200 ml de H_2O	8,22 g en 200 ml de H_2O	16,63 g en 200 ml de H_2O	1,82 g en 200 ml de H_2O

Después de hacer gotear la solución de ácido ortofosfórico (y de bicarbonato de sodio, si se desea) en la suspensión de hidróxido de calcio, añadida con iones Sr^{2+} y Mg^{2+} y opcionalmente iones silicato, la mezcla resultante se deja bajo agitación durante 1 h y luego se deja reposar durante 2 h. Entonces se retira el licor madre, por ejemplo, mediante centrifugación (por ejemplo, a 5000 revoluciones durante 3 minutos). Se redispersa preferentemente la parte sólida en agua destilada y entonces se centrifuga de nuevo. Esta operación de lavado se puede repetir varias veces, si se desea. Al final de esta, el polvo se seca (por ejemplo, mediante liofilización o secado en un horno ventilado a 40-60 °C) y se reduce a la granulometría deseada para los siguientes usos. En un modo de realización de la invención, se tamiza a 150 µm el polvo de HA multisustituida obtenido de esta manera.

A modo de ejemplo, la tabla II contiene datos comparativos de proporciones molares de sustitución (ion sustituyente/ion sustituido) usadas en algunas de las soluciones de reactivo de partida en comparación con las obtenidas en los polvos sintetizados correspondientes de HA multisustituidas, con los rendimientos de sustitución correspondientes.

Tabla II

	SiO_4/PO_4 molar			CO_3/PO_4 molar			Mg/Ca molar			Sr/Ca molar		
	Sol. de react.	HA sust.	Rendimiento	Sol. de react.	HA sust.	Rendimiento	Sol. de react.	HA sust.	Rendimiento	Sol. de react.	HA sust.	Rendimiento
SiHA-1 (no forma parte de la invención)	0,05	0,04	0,8	---	0,065		---	---				
SiHA-2 (no forma parte de la invención)	0,1	0,081	0,81	---	0,066		---	---				
SiHA-3 (no forma parte de la invención)	0,2	0,163	0,81	---	0,069		---	---				
SiCHA-1 (no forma parte de la invención)	0,05	<0,01	0	0,67	0,153	0,23	---	---				
SiCHA-2 (no forma parte de la invención)	0,05	0,026	0,64	0,15	0,112	0,75	---	---				
SiCHA-3 (no forma parte de la invención)	0,05	0,006	0,12	0,33	0,111	0,34	---	---				
SiMgHA (no forma parte de la invención)	0,05	0,045	0,9	---	0,069		0,15	0,04	0,27			
SiMgCHA-1	0,05	<0,01	0	0,67	0,081	0,12	0,15	0,14	0,93			
(no forma parte de la invención)												
SiMgCHA-2 (no forma parte de la invención)	0,05	0,025	0,5	0,15	0,118	0,79	0,15	0,104	0,69			
SiMgCHA-3 (no forma parte de la invención)	0,05	0,028	0,56	0,15	0,135	0,9	0,15	0,046	0,3			
MgHA (no forma parte de la invención)	---	---	---	---	0,087		0,15	0,043	0,29	---	---	---
SrMgHA-1	---	---	---	---	0,09		0,15	0,061	0,41	0,2	0,083	0,41
SrMgHA-2	---	---	---	---	0,093		0,2	0,078	0,39	0,2	0,085	0,42
SrMgHA-3	---	---	---	---	0,094		0,25	0,126	0,5	0,2	0,091	0,45
SrSiMgCHA	0,05	0,014	0,28	0,15	0,098	0,65	0,15	0,093	0,62	0,2	0,08	0,42

ES 2 606 466 T3

A su vez, la tabla III contiene la composición química de los compuestos de la tabla II (contenido en % en peso de los iones sustituyentes en cuestión).

Tabla III

	% en peso de iones de sustituyentes en la hidroxiapatita			
	Si	**CO_3**	**Mg^{2+}**	**Sr^{2+}**
SiHA-1 (no forma parte de la invención)	0,63	2,48	---	---
SiHA-2 (no forma parte de la invención)	1,26	2,41	---	---
SiHA-3 (no forma parte de la invención)	2,41	2,35	---	---
SiCHA-1 (no forma parte de la invención)	<0,005	5,58	---	---
SiCHA-2 (no forma parte de la invención)	0,41	4,13	---	---
SiCHA-3 (no forma parte de la invención)	0,09	4,17	---	---
SiMgHA-1 (no forma parte de la invención)	0,70	2,59	0,96	---
SiMgCHA-1 (no forma parte de la invención)	<0,005	3,15	2,97	---
SiMgCHA-2 (no forma parte de la invención)	0,38	4,34	2,38	---
SiMgCHA-3 (no forma parte de la invención)	0,42	4,87	1,08	---
MgHA (no forma parte de la invención)	----	3,20	0,87	---
SrMgHA-1	---	3,35	1,48	7,97
SrMgHA-2	---	3,41	1,98	8,40
SrMgHA-3	---	3,45	2,98	8,39
SrSiMgCHA	0,20	3,70	2,03	6,64

A partir de las tablas II y III se puede deducir, entre otras cosas, que la hidroxiapatita sustituida con iones silicato (SiHa), preparada como se hace referencia anteriormente, tiene una eficacia (rendimiento) de sustitución molar SiO_4/PO_4 de aproximadamente un 80 %. Durante la síntesis, llevada a cabo en aire (atmósfera no inerte), se puede ver que los polvos incorporan del aire pequeñas cantidades de iones carbonato (tabla II, SiHA; SiMgHA; MgHA; SrMgHA, y tabla III, de un 2,35 a un 3,45 % en peso) en el sitio de fosfato, sea cual sea el contenido de Sr^{2+} (y opcionalmente silicato) en la solución.

El grado de sustitución iónica en el interior de la celda cristalina de la HA no es siempre directamente proporcional a la cantidad de ion usado como reactivo sustituyente. Esto se produce especialmente con la síntesis de apatitas multisustituidas, en la que la presencia simultánea de algunos iones puede afectar tanto positiva como negativamente a la eficacia y, por lo tanto, al rendimiento de las sustituciones. Preferentemente, el proceso de síntesis se ajusta para cada tipo de sustitución por medio de un procedimiento iterativo (es decir, llevando a cabo un número suficiente de pruebas variando repetidamente las proporciones molares mutuas entre los iones sustituyentes de reactivo). De esta manera, al optimizar las cantidades de los reactivos iniciales, fue posible obtener las sustituciones iónicas deseadas en el porcentaje deseado.

De esta manera, fue posible preparar hidroxiapatitas multisustituidas caracterizadas por las proporciones de sustitución iónica de fosfato y calcio como se describe anteriormente. Inesperadamente, el análisis por espectroscopia de infrarrojos mostró la ausencia de carbonación en el sitio A de la hidroxiapatita. Por lo tanto, la optimización del procedimiento de preparación de acuerdo con la presente invención como se describe anteriormente posibilitó obtener inesperadamente hidroxiapatitas multisustituidas selectivamente carbonadas en el sitio de fosfato B de la hidroxiapatita.

Se llevó a cabo la sustitución de Ca^{2+} de la hidroxiapatita con Mg^{2+} en tal grado que se obtuvo una proporción molar de Mg^{2+}/Ca^{2+} de 0,01 a 0,30, correspondiente a una proporción molar en porcentaje de Mg/Ca de un 1,00 % a un 30 %; preferentemente en una proporción molar de 0,03 a 0,20, correspondiente a una proporción molar en porcentaje de Mg/Ca de un 3 % a un 20 %.

En la hidroxiapatita sustituida con iones silicato y carbonato (SiCHA), se evaluó la sustitución simultánea de iones silicato y carbonato en el sitio de fosfato (sitio B) aplicando en la solución de reactivo una proporción molar de

SiO_4/PO_4 = 0,05 y una proporción molar de CO_3/PO_4 de 0,15 a 0,67 (tabla II). El resultado fue que el silicato no aparece en la estructura de apatita si están presentes concentraciones de carbonato altas (CO_3/PO_4 = 0,67) en la solución, mientras que puede existir una sustitución parcial de ambos iones si disminuye el contenido de carbonato en la solución. En particular, mientras que la CO_3/PO_4 molar real en el polvo final (HA sustituida) sea de aproximadamente 0,1, el contenido de SiO que sustituye en realidad a PO_4 se incrementa fuertemente si la síntesis se lleva a cabo aplicando en las soluciones de partida una proporción molar de CO_3/PO_4 = 0,15, en lugar de = 0,33. De manera similar, mientras que la fracción de carbonato en el polvo final esté ligeramente por encima de un 4 % en peso con respecto al peso del polvo (100 g de polvo sintético contienen 4 g de iones carbonato) en ambos casos, el porcentaje en peso de SiO_4 cambia desde un 0,1 a un 0,4 % (véase la tabla III).

Los polvos preparados aplicando una proporción molar de CO_3/PO_4 = 0,15 de partida tienen un contenido de iones sustituyentes similar a las cantidades en los tejidos biológicos.

El efecto del carbonato añadido en la reducción de la estabilidad de la hidroxiapatita es bastante evidente, puesto que la SiCHA-1, preparada usando una CO_3/PO_4 molar de 0,67, consiste en una fase de apatita de baja cristalinidad con pequeñas cantidades de calcita, mientras que en los polvos preparados aplicando proporciones molares CO_3/PO_4 = 0,15 y 0,33, no se forma $CaCO_3$.

La hidroxiapatita cosustituida con silicato y carbonato, SiCHA, es térmicamente altamente estable con respecto a la hidroxiapatita sustituida con silicato, SiHA. De hecho, después de un tratamiento térmico a 1400 °C, la apatita SiCHA muestra únicamente pequeñas cantidades de fases secundarias, por ejemplo, beta-fosfato tricálcico, β-TCP, aproximadamente un 1,5 % en volumen y, más raramente, CaO.

En la hidroxiapatita sustituida con iones silicato y Mg^{2+}, (SiMgHA), bajo las condiciones anteriores de síntesis comúnmente aplicadas, una determinada cantidad de carbonato presente en el aire y en el entorno de reacción entra espontáneamente en la estructura.

El rendimiento de sustitución del ion silicato, es decir, la cantidad que en realidad entra en la estructura de la HA con respecto a la cantidad introducida en la solución de reactivo, expresada como la proporción molar de SiO_4/PO_4, es de un 90 %, mientras que únicamente aproximadamente 1/3 del Mg^{2+} introducido en la solución de reactivo (expresado como la proporción molar de Mg/Ca) en realidad está presente en la HA sustituida sintetizada (tablas II y III).

Se prepararon las hidroxiapatitas sustituidas con iones silicato, Mg^{2+} y carbonato (SiMgCHA) aplicando, en las soluciones de partida, las proporciones molares de SiO_4/PO_4 = 0,05; CO_3/PO_4 = 0,15-0,67; Mg/Ca= 0,15. Aquí, de nuevo, los contenidos altos de carbonato en la solución (CO_3/PO_4 = 0,67) limitan la incorporación de SiO_4 en la estructura de la HA. Bajo estas condiciones, el carbonato por sí mismo muestra un rendimiento de sustitución limitado (12 %), pero, aplicando una proporción molar de CO_3/PO_4 = 0,15 entre la solución de reactivo, es posible obtener en la hidroxiapatita sintética multisustituida rendimientos de incorporación de hasta un 50 % para silicato y de hasta un 90 % para carbonato, con un contenido en % en peso de carbonato en el polvo final de un 4,5-5 %.

El efecto de los iones sustituyentes en la reducción de la pureza de la hidroxiapatita es bastante evidente, así como la cristalinidad del polvo y el tamaño cristalino promedio, debido al carácter de cristalinidad habitualmente baja de la hidroxiapatita multisustituida resultante.

Mientras que la apatita SiMgCHA obtenida usando un contenido inicial alto de carbonato en la solución (CO_3/PO_4 molar = 0,67) contiene aproximadamente un 7 % de calcita, al reducir el contenido de carbonato relativo a 0,15, se obtiene apatita sin fases secundarias y estable hasta a 1000 °C, cuando empiezan a aparecer trazas de βTCP.

También se obtuvo un efecto positivo al incrementar la concentración de Ca^{2+} y de PO_4^{3-} (y, por consiguiente, de todos los demás reactivos para mantener las mismas condiciones iniciales en lo que respecta a las proporciones molares) en las soluciones de reactivo. De hecho, se ven afectadas la cristalinidad del polvo y la eficacia de la sustitución por iones externos. Por ejemplo, al cambiar desde 20 g de $Ca(OH)_2$ (0,27 moles de Ca^{2+}) en un volumen total de aproximadamente 1000 ml de solución (concentración de $Ca(OH)_2$ de 20 g/l) a 100 g (1,28 moles de Ca^{2+}) en un volumen total de aproximadamente 1200 ml (concentración de $Ca(OH)_2$ de 83 g/l), y desde 16,63 g de H_3PO_4 (0,14 moles de PO_4) en 200 ml (concentración de H_3PO_4 de 83,15 g/l) a 83,15 g (0,72 moles de PO_4) en 300 ml (concentración de H_3PO_4 de 277,17 g/l) (SiMgCHA-2 y SiMgCHA-3), mientras que el contenido de SiO_4 en las apatitas sintéticas correspondientes, HA sustituidas, es similar, se incrementa el grado de carbonación y el contenido de Mg^{2+} es prácticamente la mitad.

Se observó que Mg^{2+} consigue penetrar en estas HA multisustituidas en una cantidad de aproximadamente un 2,5-3 % en peso, con respecto al peso del polvo sintético, con un contenido de carbonato por encima de un 4 % en peso con respecto al peso del polvo sintético, y con un contenido de Si de aproximadamente un 0,4 % en peso con respecto al peso del polvo sintético. Aquí, de nuevo, la sustitución simultánea de iones SiO_4 y carbonato fue posible si la cantidad de carbonato introducido como reactivo es de un 15 % de los moles de fosfato.

La cristalinidad y estequiometría de la HA sustituida en polvo afectan fuertemente a su estabilidad térmica: por ejemplo, SiMgCHA-2 y SiMgCHA-1 se descomponen térmicamente a 1000 °C, mientras que la SiMgCHA-3 es bastante estable hasta 1400 °C. Hidroxiapatita sustituida con iones Sr^{2+}, Mg^{2+} y carbonato (SrMgCHA).

La evaluación de la eficacia del ion Sr^{2+} como estabilizador de la apatita MgHA fue posible con la preparación de SrMgCHA. Se sabe que Mg^{2+} penetra con dificultad como sustituyente de Ca^{2+} en la celda de hidroxiapatita, debido a la gran diferencia de tamaño entre los dos iones (radio iónico de Ca^{2+} = 1,00 Å, radio iónico de Mg^{2+} = 0,72 Å). La introducción de un catión bivalente con tamaño más grande, tal como Sr^{2+} (radio iónico de Sr^{2+} = 1,12 Å), que está presente de todos modos en la apatita fisiológica, demostró poder contrarrestar el efecto desestabilizante de Mg^{2+}. La comparación de las propiedades químico-físicas de la apatita en polvo obtenida mediante síntesis con concentraciones variables de Mg^{2+} en la solución de partida, en presencia o ausencia de Sr^{2+} (los demás parámetros del procedimiento permanecen iguales), posibilitó observar que Sr^{2+} puede incrementar la incorporación de Mg^{2+} en la apatita. Por ejemplo, al usar en la solución de partida una proporción molar en porcentaje de Mg/Ca de un 15 %, una integración de Mg^{2+} de un 4,3 % en mol (expresada como % de Mg/Ca) y un 0,87 % en peso en la apatita en polvo en ausencia de estroncio, en comparación con los valores de un 6,1 % en mol y un 1,48 % en peso, respectivamente, obtenidos llevando a cabo la síntesis en presencia de Sr^{2+} (tablas I y II: SrMgHA-1 y MgHA en polvo).

Las HA cosustituidas con Sr^{2+} y Mg^{2+} son resistentes al tratamiento con calor en aire hasta aproximadamente 1000 °C sin generar fases secundarias, a diferencia de la hidroxiapatita sustituida únicamente con Mg, que tiende a convertirse en hidroxiapatita estequiométrica que disocia Mg en la fase de fosfato tricálcico. La posibilidad de cosustituir las SrMgHA con iones carbonato las hace sintetizables bajo condiciones adecuadas específicas (atmósfera de dióxido de carbono, ciclo térmico optimizado) a temperaturas relativamente bajas con respecto a la HA estequiométrica, obteniendo de esta manera una buena densificación. De esta manera, es posible explotar como sinergia la capacidad peculiar de Sr^{2+} y el efecto inducido por una buena densificación a fin de potenciar las propiedades mecánicas de la apatita (lo que es importante, por ejemplo, para la producción de sustitutos óseos porosos).

Hidroxiapatita sustituida con iones silicato, Sr^{2+}, Mg^{2+}, carbonato (SiSrMgCHA).

En un modo de realización preferente de la invención, se llevó a cabo la síntesis de apatita a la que se hace referencia anteriormente, multisustituida con contenidos de iones sustituyentes dentro del intervalo biológico, usando preferentemente concentraciones de los reactivos en la solución de tal manera que se obtuvieran las siguientes proporciones molares: SiO_4/PO_4 = 0,05; CO_3/PO_4 = 0,15; Mg/Ca = 0,15; Sr/Ca = 0,20.

El polvo final (HA sustituida) obtenido está caracterizado por valores de proporciones molares en porcentaje de SiO_4/PO_4 = 1,4 %; CO_3/PO_4 = 9,8 %; Mg/Ca = 9,3 %; Sr/Ca = 8 %, correspondientes a un contenido en peso de un 0,20 % de silicato, un 3,70 % de CO_3, un 2,03 % de Mg^{2+} y un 6,64 % de Sr^{2+}.

Con un propósito meramente indicativo, la hidroxiapatita no estequiométrica multisustituida de acuerdo con la presente invención puede estar representada en promedio por la siguiente fórmula:

$$Ca_{10-x/2-z-w}MgzSr_w(PO_4)_{6-x-y}(CO_3)_x(SiO_4)_y(OH)_{2-y}$$

Mediante un mero modo de ejemplo y sin ninguna intención limitativa, a continuación se divulga un ejemplo de preparación de una hidroxiapatita multisustituida particularmente preferente de acuerdo con la presente invención.

Preparación de SrSiMgCHA (multisustitución con cuatro tipos de iones sustituyentes).

Todo el procedimiento se lleva a cabo a temperatura ambiente (25 °C).

Se prepara una suspensión de hidróxido de calcio en un matraz (capacidad de 2 litros) dispersando 20 g de $Ca(OH)_2$ al 95 % en 600 ml de H_2O. Se mantiene la suspensión resultante bajo agitación a aproximadamente 300 rpm por medio de un agitador de palas mecánico. Por separado, se preparan las siguientes soluciones y se añaden consecutivamente a la suspensión de hidróxido de calcio:

- 1,94 g de tetraacetato de Si (pureza de un 98 %) en 200 ml de H_2O;
- 7,86 g de $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (pureza de un 99 %) en 200 ml de H_2O;
- 8,22 g de $Sr(NO_3)_2$ (pureza de un 99 %) en 200 ml de H_2O. Por separado, se preparan las siguientes soluciones:
- 16,63 g de H_3PO_4 (pureza de un 85 %) en 200 ml de H_2O;

- 1,82 g de $NaHCO_3$ en 200 ml de H_2O.

Estas dos soluciones se añaden gota a gota a la suspensión de $Ca(OH)_2$, preparada previamente, en aproximadamente 3 horas, simultáneamente, pero con alimentadores separados. Una vez que se ha completado el goteo, el sistema se mantiene bajo agitación durante 1 hora, entonces, se deja reposar durante una noche.

Entonces, el licor sobrenadante se retira mediante centrifugación y se llevan a cabo tres ciclos de lavado y centrifugación, cada uno con 1 1 H_2O. Entonces, se seca el producto obtenido de esta manera en un horno ventilado (40 °C) (o mediante liofilización) y, finalmente, se tamiza a 150 micrómetros.

Como se mencionó anteriormente, en todas las HA multisustituidas sintetizadas de acuerdo con la presente invención no existía carbonación en el sitio A (hidroxilo), confirmando de esta manera la eficacia del procedimiento de síntesis de acuerdo con la presente invención en la maximización de la carbonación de tipo B (sito de fosfato).

Todos los polvos de HA multisustituidas tienen un tamaño nanométrico; el tamaño de partícula promedio tiende a disminuir con el incremento en el número de cosustitución. A modo de ejemplo, para la HA multisustituida SiSrMgCHA se observaron tamaños promedio de 20-25 nm.

Los análisis por difractometría de rayos X (XRD) mostraron que todas las apatitas sintetizadas son puras (es decir, sin fases secundarias) y están caracterizadas por un bajo grado de cristalinidad, como consecuencia de las condiciones específicas óptimas del procedimiento (reactivos, temperatura, envejecimiento). Los espectros de XRD son muy similares al espectro de la fase inorgánica fisiológica.

Más en este punto, las hidroxiapatitas multisustituidas con al menos tres iones sustituyentes demostraron ser particularmente preferentes en lo que respecta a la biomimética y capacidad de reabsorción, es decir, la mejor similitud con el comportamiento biológico de la fase de apatita del tejido óseo natural.

Las hidroxiapatitas multisustituidas con cuatro iones sustituyentes, como se describe anteriormente, han demostrado ser todavía más preferentes.

Cuantas más cosustituciones se lleven a cabo, los valores de la densidad de los polvos de la HA multisustituida disminuyen desde un valor de 3,16 g/cm^3, lo que caracteriza la hidroxiapatita estequiométrica, de acuerdo con el incremento de los defectos estructurales y la desviación de la estequiometría relacionados con la misma.

Se evaluó indirectamente el efecto de la multisustitución iónica en la HA sobre su solubilidad y, por lo tanto, sobre su capacidad de reabsorción *in vivo* midiendo la conductividad de las suspensiones acuosas de los polvos de dicha HA multisustituida como una función del pH. Dichos análisis señalaron, como se muestra en la FIG. 1 adjunta, que la solubilidad varía de acuerdo con la secuencia SiHA<SiCHA, SiMgHA<SiMgCHA<SrSiMgCHA. La conductividad se incrementa, partiendo de valores de pH más básicos, de acuerdo con la secuencia anterior y, en particular, se puede observar que, de todos modos, para todas las apatitas, a pH 7,4 fisiológico, la curva de conductividad ha ascendido desde el valor meseta, a diferencia de lo se produce con una hidroxiapatita estequiométrica, que es prácticamente insoluble (Kps de aproximadamente 10^{-56}). Además, los valores de conductividad absoluta de SiMgCHA y SrSiMgCHA son más altos que los de otras apatitas comparadas, lo que las hace potencialmente más bioreabsorbibles que las últimas.

Las pruebas directas de solubilidad de hidroxiapatitas multisustituidas en un fluido fisiológico sintético (solución equilibrada de Hank) confirman básicamente la secuencia anterior, así como la consiguiente mejora *in vivo*.

Esto confirma lo que se ha señalado previamente sobre las ventajas relacionadas con hidroxiapatitas sintéticas multisustituidas con al menos tres iones sustituyentes (preferentemente cuatro) en lo que respecta a su biomimética y capacidad de reabsorción.

Las HA multisustituidas de acuerdo con la presente invención han demostrado ser extremadamente similares tanto estructural como biológicamente a la HA fisiológica presente en los tejidos óseos del organismo.

Como consecuencia, representan el sustituto sintético ideal de la HA fisiológica en la preparación de un sustituto óseo completamente biocompatible y biomimético.

Con este propósito, en un modo de realización particularmente preferente de la presente invención, se lleva a cabo el procedimiento para preparar HA multisustituida de acuerdo con la presente invención en presencia de una cantidad conveniente de un polímero natural y/o sintético adecuado; preferentemente, en presencia de fibrillas de colágeno, simultáneamente al proceso de autoensamblaje de dichas fibrillas. De esta manera, es posible obtener un material compuesto biohíbrido que tenga una alta biomimética composicional, morfológica y estructural, puesto que dicho material compuesto se produce simulando el proceso de osteogénesis.

Por lo tanto, un objetivo particularmente preferente de la presente invención es el material compuesto biohíbrido al que se hace referencia anteriormente, es decir, una hidroxiapatita sustituida, como se describe anteriormente, comprendiendo adicionalmente dicha hidroxiapatita una cantidad eficaz de un polímero biocompatible, natural o sintético (tal como, poli(ácido láctico)). Dicho polímero se elige preferentemente entre los polímeros naturales de origen proteico o polisacáridos: gelatinas, albúminas, alginatos, goma gellan, almidones, quitosanos, celulosas, colágeno y así sucesivamente. Más preferentemente, dicho polímero natural es colágeno, en particular, fibrillas de colágeno de autoensamblaje.

Dicho colágeno está presente en tal cantidad que la proporción en peso mutua (p/p) de la fase inorgánica de apatita final, nucleada en el interior y sobre las fibrillas de colágeno, con respecto a colágeno, SubstHA/Coll, es de aproximadamente 85 a 15; preferentemente, dicha proporción es de 80 a 20; más preferentemente de 75 a 25.

Es todavía más preferente una proporción de SubstHA/Coll de aproximadamente 70/30 p/p, que sea cercana a la proporción peso/peso de componente orgánico/apatita biológica del tejido óseo.

De acuerdo con un procedimiento preferente, la cantidad deseada de colágeno se mezcla con la solución de ácido ortofosfórico. La solución resultante se hace gotear, si se desea, simultáneamente en una solución de bicarbonato de sodio (u otra fuente de iones bicarbonato), en una suspensión acuosa de hidróxido de calcio, que contenga cantidades convenientes de iones Sr^{2+} e iones Mg^{2+} y opcionalmente iones silicato, estando presentes dichos iones en las proporciones descritas anteriormente en la sección relativa a la preparación de la HA multisustituida en polvo de acuerdo con la presente invención. Dichos iones sustituyentes mencionados anteriormente están presentes como sales solubles en agua; preferentemente, como tetraacetato de silicio, nitrato de estroncio, cloruro de magnesio u otras sales similares.

Al final del goteo, que se llevó a cabo usando el mismo procedimiento que se describe previamente, se forma la hidroxiapatita (nucleada) en el interior y sobre las fibrillas de colágeno de autoensamblaje.

El material compuesto biohíbrido obtenido de esta manera se lava varias veces con agua y se liofiliza.

La biomimética del procedimiento de preparación descrito anteriormente, y, por lo tanto, del producto biohíbrido obtenido, se puede optimizar si dicha preparación se lleva a cabo bajo condiciones fisiológicas de temperatura (37 °C) y pH (7,4) del agente de dispersión acuoso.

En un modo de realización particularmente preferente, se lleva a cabo la síntesis usando como disolvente para el componente básico, no agua pura, sino fluido fisiológico sintético (FFS) que contiene los mismos iones que están presentes en el plasma humano, y que tiene un pH = 7,4 (pH fisiológico). Las condiciones de dilución son críticas para obtener, como fase inorgánica, hidroxiapatita sustituida pura (es decir, no contaminada por otras fases). Dichas condiciones para una dilución óptima se encontrarán experimentalmente cada vez, dependiendo de la cantidad y calidad de la sustitución deseada (aquí, de nuevo, se usa un procedimiento iterativo como el descrito anteriormente).

Lo siguiente contiene, mediante un mero modo de ejemplo no limitativo, los procedimientos de síntesis preferentes de dos materiales compuestos HA multisustituida/colágeno en una proporción de 70/30 peso/peso.

Ejemplo 1 (no de la invención)

Preparación del material compuesto: SiMgCHA/Coll 70/30_FFS Condiciones iniciales (solución de reactivo), las proporciones molares iniciales son las siguientes:

proporción molar de Mg/Ca = 0,15;

proporción molar de SiO_4/PO_9 = 0,05;

proporción molar de CO_3/PO_4 = 0,15.

Procedimiento de funcionamiento:

Se prepara una solución acuosa A), que contiene: 120 g de gel de colágeno en acético al 1 % en peso (correspondiente a 1,2 g de colágeno) añadidos a una solución al 85 % de H_3PO_4 (0,0157 moles, correspondientes a 1,809 g) en 250 ml de agua.

Se prepara una solución acuosa B), que contiene: $NaHCO_3$ (0,00141 moles, correspondientes a 0,1184 g) en 100 ml de agua.

Se prepara una suspensión acuosa C), que contiene la cantidad necesaria de reactivos para la nucleación *in situ*, en el interior y sobre fibras de colágeno, de 2,8 g de HA multisustituida, es decir:

un 95 % de $Ca(OH)_2$ (0,0279 moles, correspondientes a 2,176 g) en 35 ml de FFS + 700 ml de H_2O;

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,00487 moles, correspondientes a 0,990 g) en 100 ml de H_2O;

un 98 % de $Si(CH_3COO)_4$ (0,000785 moles, correspondientes a 0,218 g) en 100 ml de H_2O.

Se hacen gotear simultáneamente las dos soluciones A) y B) (preferentemente, por separado) en la suspensión C), se mantiene bajo agitación a 37 °C, en aproximadamente 30-60 minutos.

Al final de la adición, la mezcla se deja reposar durante 1 h.

Se retira el licor sobrenadante por filtración (o centrifugación).

Se lava 3 veces el material compuesto, cada vez con 300 ml de agua.

Se filtra y liofiliza el producto.

El producto obtenido de esta manera tiene la siguiente composición:

Mg/Ca molar = 0,052; CO_3/PO_4 molar = 0,135; SiO_4/PO_4 molar = 0,005

Ejemplo 2 (de la invención)

Preparación del material compuesto SrSiMgCHA/Coll 70/30_FFS Condiciones iniciales (solución de reactivo), las proporciones molares iniciales son las siguientes:

proporción molar de Mg/Ca = 0,15;

proporción molar de SiO_4/PO_4 = 0,05;

proporción molar de CO_3/PO_4 = 0,15;

proporción molar de Sr/Ca = 0,20.

Procedimiento de funcionamiento:

Se prepara una solución acuosa A), que contiene: 120 g de gel de colágeno en acético al 1 % en peso (correspondiente a 1,2 g de colágeno) añadidos a una solución al 85 % de H_3PO_4 (0,0157 moles, correspondientes a 1,809 g) en 250 ml de agua.

Se prepara una solución acuosa B), que contiene: $NaHCO_3$ (0,00141 moles, correspondientes a 0,1184 g) en 100 ml de agua.

Se prepara una suspensión acuosa C), que contiene la cantidad necesaria de reactivos para la nucleación *in situ*, en el interior y sobre fibras de colágeno, de 2,8 g de HA multisustituida, es decir:

un 95 % de $Ca(OH)_2$ (0,0279 moles, correspondientes a 2,176 g) en 35 ml de FFS + 700 ml de H_2O;

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,00487 moles, correspondientes a 0,990 g) en 100 ml de H_2O;

$Sr(NO_3)_2$ (0,0058 moles, correspondientes a 1,1807 g) en 100 ml de H_2O;

un 98 % de $Si(CH_3COO)_4$ (0,000785 moles, correspondientes a 0,218 g) en 100 ml de H_2O.

Se hacen gotear simultáneamente las dos soluciones A) y B) (preferentemente, por separado) en la suspensión C), se mantiene bajo agitación a 37 °C, en aproximadamente 30-60 minutos.

Al final de la adición, la mezcla se deja reposar durante 1 h. Se retira el licor sobrenadante por filtración (o centrifugación).

Se lava 3 veces el material compuesto, cada vez con 300 ml de agua.

Se filtra y liofiliza el producto.

El producto obtenido de esta manera tiene la siguiente composición:

Mg/Ca molar = 0,067; Sr/Ca molar = 0,177; CO_3/PO_4 molar = 0,139, SiO_4/PO_4 molar = 0,006.

La composición del FFS usado en los ejemplos 1 y 2 es la siguiente:

Reactivos	Moles/litro de FFS
NaCl	0,112
$NaHCO_3$	0,027
KCl	0,005
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	0,0010
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,0015
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,0025
Na_2SO_4	0,0005
$(CH_2OH)_3CNH_2$	0,0501
HCl	0,0400

De manera similar, se prepararon los materiales compuestos SiMgHA/Coll 70/30 y SrSiMgHA/Coll 70/30 siguiendo el mismo procedimiento experimental, eliminando la adición deliberada de iones carbonato y el uso del FFS.

Se obtuvieron las siguientes proporciones molares, respectivamente:

- SiMgHA/Coll 70/30: Mg/Ca molar = 0,066; CO_3/PO_4 molar = 0,05; SiO_4/PO_4 molar = 0,011.
- SrSiMgHA/Coll 70/30: Mg/Ca molar = 0,069; Sr/Ca molar = 0,177; CO_3/PO_4 molar = 0,06; SiO_4/PO_4 molar = 0,011.

Además, se cambiaron las condiciones iniciales de los reactivos (sustituyentes en proporciones molares de iones) para obtener materiales compuestos que tuvieran diferentes características de biomimética y capacidad de reabsorción, que se iban a usar para diferentes propósitos en diferentes campos de regeneración.

La tabla IV contiene, a modo de ejemplo, los datos de los análisis químicos sobre algunos de los materiales compuestos sintetizados.

Tabla IV

	Mg/Ca molar	**Sr/Ca molar**	**SiO_4/PO_4 molar**	**% en peso de CO_3 en hidroxiapatita sustituida**
SiMgCHA/Coll 70/30 **(no forma parte de la invención)**	**0,044 -0,052**	**-**	**0-0,015**	**> 4 de introd. deliberada**
SrSiMgCHA/Coll 70/30	**0,052 -0,067**	**0,149-0,187**	**0-0,015**	**> 4 de introd. deliberada**
SiMgHA/Coll 70/30 **(no forma parte de la invención)**	**0,054 -0,066**	**-**	**0,011-0,05**	**2-3 espontánea**
SrSiMgHA/Coll 70/30	**0,064 -0,069**	**0,128-0,144**	**0,011-0,05**	**2-3 espontánea**

Se analizaron los materiales compuestos sintetizados desde los puntos de vista composicional, químico, físico, morfológico, estructural usando las diversas técnicas de análisis conocidas en el campo (por ejemplo: ESEM (microscopia electrónica de barrido ambiental), TEM (microscopia electrónica de transmisión), DRX (difracción de rayos X), FTIR (espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier), STA (análisis térmico simultáneo); EDS (espectroscopia de energía dispersiva, como se muestra a modo de ejemplo en las figuras adjuntas 1-6).

En términos generales, se pueden hacer las siguientes observaciones.

- La introducción de iones carbonato en la síntesis limita la introducción de iones silicato en la HA sustituida.

En la preparación del material compuesto HA multisustituida/colágeno, fue posible sintetizar una apatita sustituida con iones silicato (en la posición de fosfato, sitio B) limitando el contenido de iones carbonato que se pueden convertir en competidores.

De hecho, al considerar los materiales compuestos SiMgHA/Coll 70/30 y SrSiMgHA/Coll 70/30 preparados sin la adición deliberada de iones carbonato, como se divulga previamente, se observó que, a pesar de que se produce espontáneamente una carbonación parcial de la fase inorgánica que constituye el material compuesto biohíbrido en el sitio B (como se señala por los picos específicos en FTIR) con valores en porcentaje en el intervalo de carbonación biológica, se puede obtener la introducción de iones silicato en estas condiciones (tabla IV). Por lo tanto, es preferente usar cantidades iniciales bajas de carbonato (como ya se ha señalado anteriormente, para la preparación de HA sustituidas no nucleadas en colágeno).

- Se confirma la capacidad del ion Sr^{2+} para promover una introducción más alta de iones Mg^{2+} en la estructura, es decir, para incrementar el rendimiento de incorporación de Mg^{2+}.

La presencia de iones Sr^{2+} junto con el ion Mg^{2+} durante la síntesis posibilita incrementar la estabilidad de la fase de apatita, es decir, contrarrestar el efecto desestabilizante inducido de por sí por Mg^{2+}, y al mismo tiempo, incrementar el contenido de Mg^{2+}, que se puede introducir en la fase inorgánica, como ya se ha señalado en la síntesis de la fase inorgánica únicamente.

El desarrollo de apatitas multisustituidas sintéticas de acuerdo con la presente invención, con un nivel controlado y completo de sustituciones iónicas en la estructura de la HA, ha demostrado ser altamente importante, puesto que, como se señala anteriormente, el comportamiento del material sintético obtenido de esta manera fue óptimamente similar al del hueso natural.

Dicho comportamiento, en particular, desde el punto de vista de reactividad, solubilidad, integración del implante de apatita, no solo se debía a la presencia de sustituyentes iónicos/elemento de dopaje específico en el material (y a su cantidad mutua), sino también al mayor número de defectos en la celda cristalina de la HA multisustituida, induciéndose estos defectos exactamente por la propia presencia de los iones sustituyentes.

El solicitante ha descubierto ventajosamente que la velocidad de disolución más alta de la hidroxiapatita multisustituida de acuerdo con la presente invención está relacionada con una remodelación ósea más rápida alrededor del implante, con respecto a la hidroxiapatita estequiométrica. La reactividad incrementada con el hueso preexistente ha dado como resultado una estabilidad más alta en el sitio del implante gracias a la formación de un fuerte vínculo mecánico entre el implante y el área circundante. De esta manera, se reduce el tiempo de rehabilitación para el paciente.

Además, al llevar a cabo la nucleación de HA multisustituidas de acuerdo con la presente invención sobre materiales de molde orgánicos, naturales o sintéticos, de autoensamblaje (tales como, por ejemplo, fibrillas de colágeno de autoensamblaje), fue posible obtener tejidos óseos sintéticos, es decir, materiales compuestos biohíbridos que tienen las mismas propiedades de los tejidos óseos naturales. Dicha biomimética fue garantizada mediante la profunda interacción que se produce entre la fase orgánica e inorgánica durante la síntesis de la fase inorgánica gracias a un procedimiento que simula el proceso de osteogénesis *in vivo*.

La hidroxiapatita multisustituida y el material compuesto biohíbrido correspondiente de la misma con colágeno de polímeros naturales o sintéticos adecuados, de acuerdo con la presente invención, por lo tanto, han demostrado ser particularmente ventajosos en la preparación de un sustituto óseo completamente reabsorbible, biocompatible y biomimético.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención también es el uso de los mismos para preparar dicho sustituto óseo, así como el sustituto óseo que los incluye.

REIVINDICACIONES

1. Una hidroxiapatita multisustituida con especies iónicas, en la que dicha hidroxiapatita comprende:

iones Sr^{2+} en una proporción molar de Sr/Ca de desde 0,002 a 0,35, correspondiente a una proporción molar en porcentaje de Sr/Ca de un 0,2 % a un 35 %, e

iones Mg^{2+} en una proporción molar de Mg/Ca de desde 0,01 a 0,30, correspondiente a una proporción molar en porcentaje de Mg/Ca de un 1 % a un 30 %.

2. La hidroxiapatita de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha proporción de Sr/Ca es de desde 0,02 a 0,30, correspondiente a una proporción molar en porcentaje de Sr/Ca de un 2 % a un 30 %; preferentemente dicha proporción de Sr/Ca es de desde 0,03 a 0,25, correspondiente a una proporción molar en porcentaje de Sr/Ca de un 3 % a un 25 %.

3. La hidroxiapatita de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que dicha proporción de Mg/Ca es desde 0,03 a 0,20, correspondiente a una proporción molar en porcentaje de Mg/Ca de un 3 % a un 20 %.

4. La hidroxiapatita de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, que comprende adicionalmente iones silicato en una proporción molar de iones silicato con respecto a iones fosfato de desde 0,001 a 0,25, correspondiente a una proporción molar en porcentaje de SiO_4/PO_4 de un 0,1 % a un 25 %.

5. La hidroxiapatita de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicha proporción de silicato con respecto a fosfato es de desde 0,005 a 0,20, correspondiente a una proporción molar en porcentaje de SiO_4/PO_4 de desde un 0,5 % a un 20 %; preferentemente dicha proporción de silicato con respecto a fosfato es de desde 0,01 a 0,10, correspondiente a proporción molar en porcentaje de SiO_4/PO_4 de desde un 1 % a un 10 %.

6. La hidroxiapatita de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende adicionalmente iones carbonato en una proporción molar de carbonato con respecto a fosfato de desde 0,01 a 0,80, correspondiente a una proporción molar en porcentaje de $CaCO_3/PO_4$ de desde un 1 % a un 80 %; preferentemente de desde 0,05 a 0,30, correspondiente a una proporción molar en porcentaje de desde un 5 % a un 30 %.

7. La hidroxiapatita de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo adicionalmente dicha hidroxiapatita una cantidad eficaz de un polímero natural o sintético seleccionado de: gelatinas, albúminas, alginatos, goma gellan, almidones, quitosanos, celulosas, colágeno, poli(ácido láctico); preferentemente dicho polímero es colágeno.

8. Un procedimiento para preparar una hidroxiapatita multisustituida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que incluye neutralizar una suspensión acuosa básica a) de $Ca(OH)_2$, que comprende una cantidad de iones Sr^{2+}, mediante adición de una solución acuosa b) de H_3PO_4, en el que, en dicha reacción de neutralización, dicha suspensión acuosa a) comprende adicionalmente una cantidad de iones Mg^{2+}.

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la suspensión acuosa básica a) de $Ca(OH)_2$ comprende adicionalmente una cantidad de silicato.

10. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, en el que la adición de dicha solución b) se lleva a cabo simultáneamente a la adición de una solución acuosa de iones bicarbonato.

11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dicha solución b) comprende adicionalmente una cantidad eficaz de un polímero natural o sintético seleccionado de: gelatinas, albúminas, alginatos, goma gellan, almidones, quitosanos, celulosas, colágeno, poli(ácido láctico).

12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicha suspensión a) comprende adicionalmente una cantidad eficaz de fluido fisiológico sintético, FFS.

13. Uso de una hidroxiapatita de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para preparar un sustituto óseo.

14. Un sustituto óseo que comprende una hidroxiapatita de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 7.

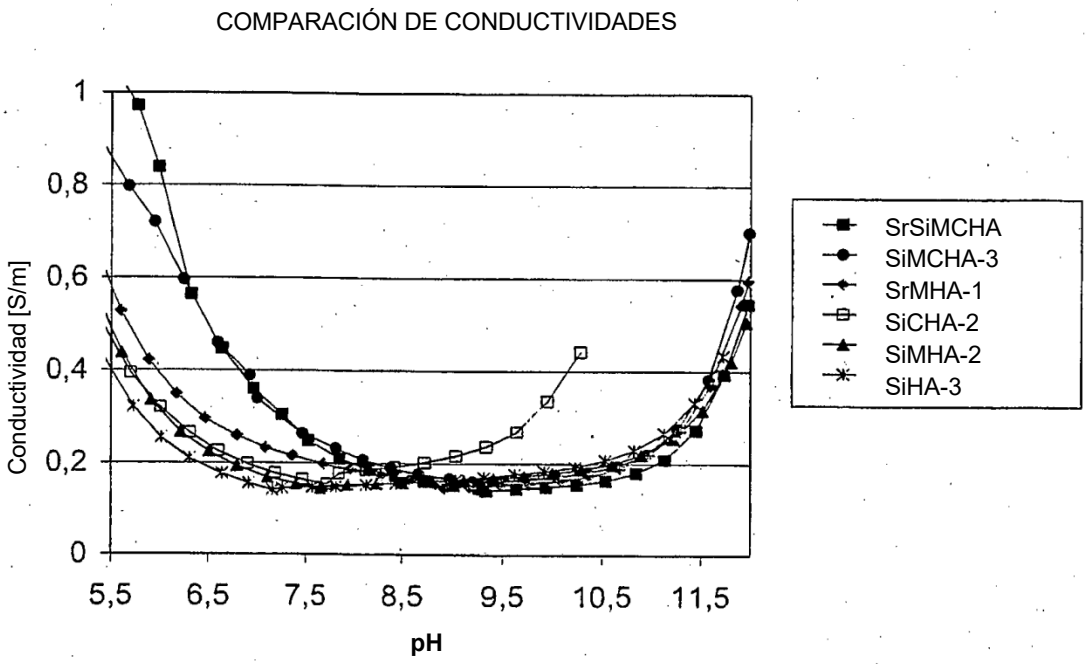
COMPARACIÓN DE CONDUCTIVIDADES
Conductividad [S/m]
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
5,5
6,5
7,5
8,5
9,5
10,5
11,5
pH
SrSiMCHA
SiMCHA-3
SrMHA-1
SiCHA-2
SiMHA-2
SiHA-3

Fig. 1/6

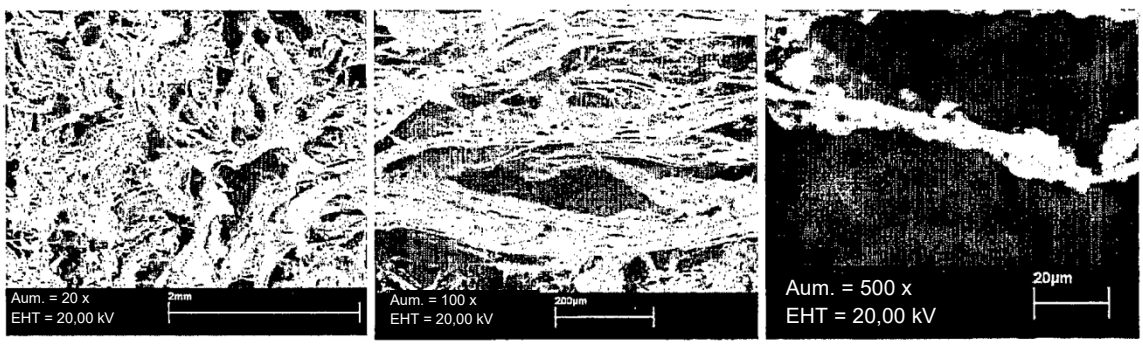
Aum. = 20 x
EHT = 20,00 kV
2mm
Aum. = 100 x
EHT = 20,00 kV
200µm
Aum. = 500 x
EHT = 20,00 kV
20µm

Fig. 2/6

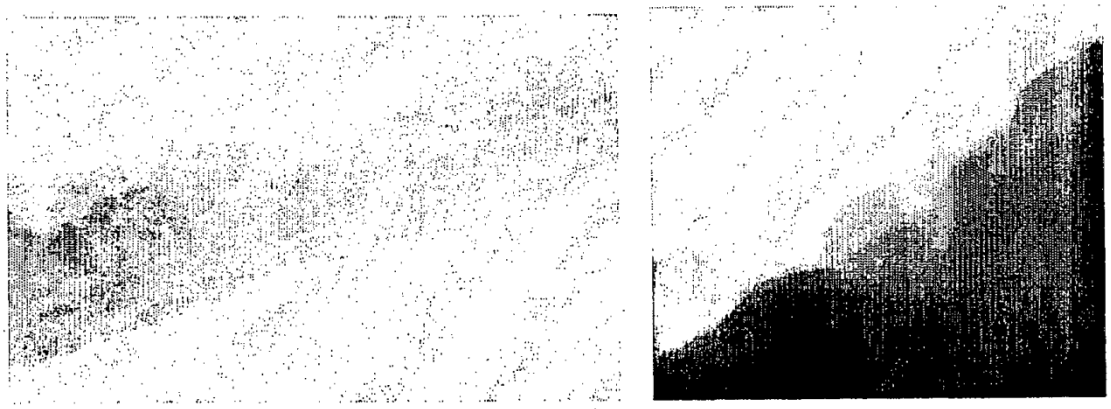

Fig. 3/6

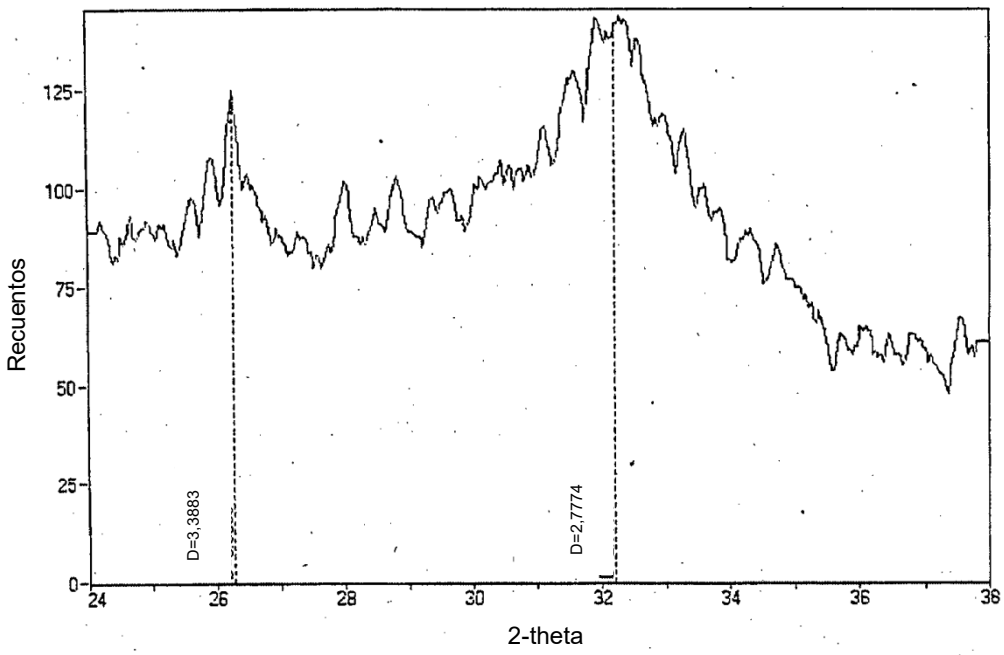
Recuentos
125
100
75
50
25
0
24
26
28
30
32
34
36
38
2-theta
D=3,3883
D=2,7774

Fig. 4/6

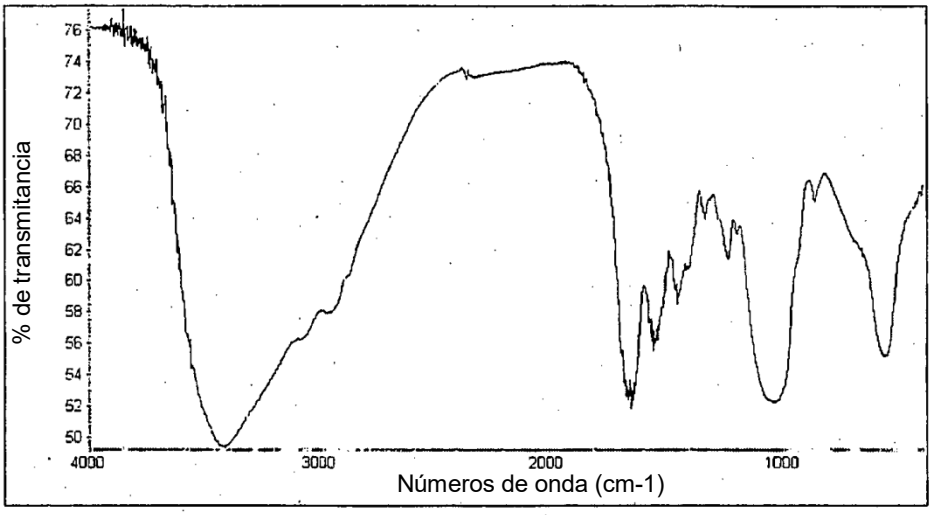
% de transmitancia
76
74
72
70
68
66
64
62
60
58
56
54
52
50
4000
3000
2000
1000
Números de onda (cm-1)

Fig. 5/6

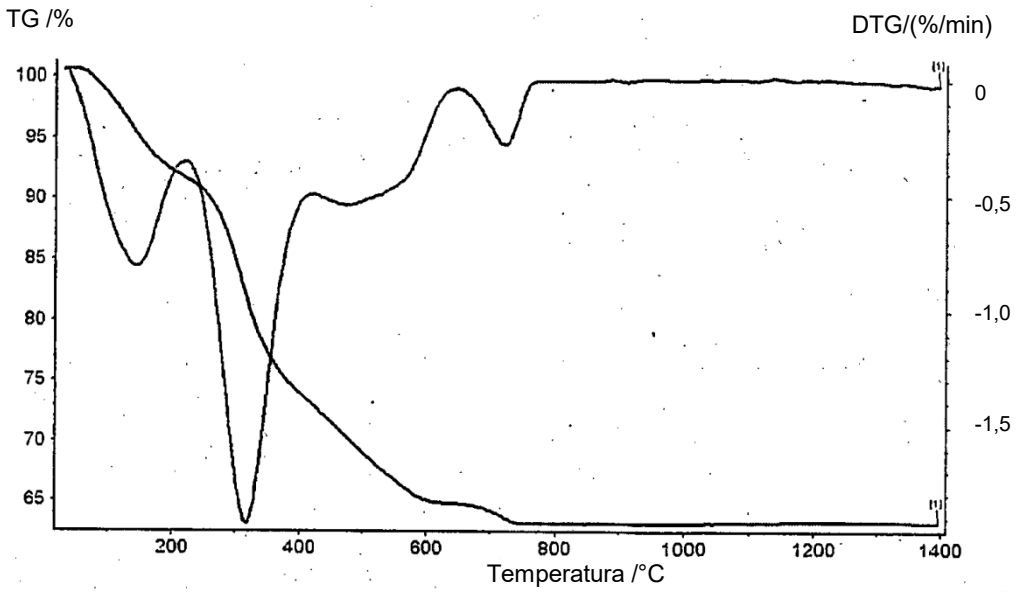
TG /%
DTG/(%/min)
100
95
90
85
80
75
70
65
0
-0,5
-1,0
-1,5
200
400
600
800
1000
1200
1400
Temperatura /°C

Fig. 6/6