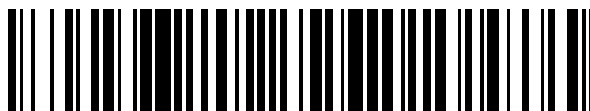


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 169**

51 Int. Cl.:

C01B 25/32 (2006.01)
C01B 25/45 (2006.01)
A61L 27/12 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 49/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.07.2011 PCT/IB2011/053362**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2012 WO12014172**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2011 E 11752344 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2598437**

54 Título: **Hidroxiapatita intrínsecamente magnética**

30 Prioridad:

29.07.2010 IT MI20101420

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.08.2017

73 Titular/es:

**CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
(50.0%)
Piazzale Aldo Moro, 7
00185 Roma, IT y
FIN-CERAMICA FAENZA S.P.A. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TAMPIERI, ANNA;
LANDI, ELENA;
SANDRI, MONICA;
PRESSATO, DANIELE;
RIVAS REY, JOSÉ;
BANOBRE LOPEZ, MANUEL y
MARCACCI, MAURILIO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 630 169 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Hidroxiapatita intrínsecamente magnética

- 5 La presente invención se relaciona con hidroxiapatita intrínsecamente magnética y usos de los mismos en la reconstrucción de huesos y osteocartilagos, como un vehículo para sustancias biológicas y/o fármacos y como un agente de contraste en el diagnóstico.
- 10 La hidroxiapatita (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, es el componente mineral principal del tejido óseo. Dada su alta biocompatibilidad y afinidad natural por las sustancias biológicas, la hidroxiapatita se usa comúnmente en aplicaciones de sustitución/regeneración de huesos y osteocartilagos y como vehículo de proteínas, genes, células madre, factores de crecimiento, sustancias activas, etc.
- 15 Es bien sabido que la hidroxiapatita tiene una red cristalina hexagonal que comprende iones de fosfato, iones de hidroxilo e iones de calcio, este último con coordinación hexavalente o tetravalente (posiciones 6h y 4f).
- También es bien conocido que la estructura de hidroxiapatita es capaz de acomodar diversos tipos de sustituciones iónicas en los sitios del ion de fosfato, ion de hidroxilo e ion de calcio, sin que ocurra ningún colapso en la estructura.
- 20 En otras palabras, la hidroxiapatita es un material que puede ser dopado con diferentes tipos de iones sin causar una degradación de fase de los mismos.
- Además del dopaje de la hidroxiapatita llevado a cabo con el objetivo de mejorar sus propiedades biomiméticas en relación con la fase mineral que constituye el tejido óseo, se han realizado numerosas sustituciones con iones capaces de impartir propiedades magnéticas, tales como Fe, Co, Mn y La.
- 25 En particular, Mayer et al. (Journal of Inorganic Biochemistry 1992, 45, 129 - 133) informaron la síntesis de hidroxiapatita dopada con iones férricos (Fe^{3+} HA) usando $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ como reactivo. De acuerdo con los autores, los iones férricos no se incorporaron a la red de apatita sino que estuvieron presentes en la propia apatita en la forma de FeOOH . Wu et al. (Nanotechnology 2007, 18, 165601-10) informó la síntesis de hidroxiapatita dopada con iones ferrosos (Fe^{2+} HA) que usan $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ como fuente de iones Fe^{2+} . Sin embargo, obtuvieron un producto con propiedades magnéticas sólo en el caso en que la hidroxiapatita fue acompañada por la formación de fases magnéticas secundarias, como la magnetita.
- 30 M.T.J. Jiang et al. (Phys. Rev. B 2002, 66, 224107 - 22115) hidroxiapatita dopada con iones Fe^{2+} y Fe^{3+} , a partir de soluciones de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$ añadidas gota a gota a una solución de fosfato de amonio. El artículo no proporciona ninguna indicación sobre una posible magnetización intrínseca de la hidroxiapatita.
- Una de las limitaciones más relevantes relacionadas con el uso de plataformas para la regeneración ósea u osteocartilada se refiere a la dificultad de controlar el desarrollo y la velocidad de los procedimientos de diferenciación celular y angiogénesis en el sitio de implantación de la plataforma. Estos procedimientos son favorecidos por la velocidad de migración de los factores de crecimiento del tejido óseo y los factores de vascularización para el sitio de implantación.
- 40 El control sobre la migración de factores específicos al sitio de implantación, de acuerdo con las necesidades del paciente y durante un período prolongado, es de enorme importancia para favorecer la osteointegración de la prótesis y la regeneración del tejido óseo, y por lo tanto para la curación del paciente.
- En este sector, por lo tanto, existe una necesidad fuertemente sentida de un sistema vehículo y de liberación de sustancias biológicas y fármacos que permiten controlar la migración de factores de crecimiento, factores de vascularización u otras sustancias biológicas capaces de favorecer y acelerar la osteointegración y la regeneración ósea. También se hace sentir la necesidad de un sistema vehículo de fármaco que pueda guiarse de una manera precisa y exacta para liberar el fármaco directamente, de manera selectiva y de acuerdo con los requisitos cuali-
 50 cuantitativos reales, sólo en el sitio afectado por la patología.
- 55 En el sector existe también una necesidad de una prótesis para regeneración ósea y osteocartilada que sea biocompatible al mismo tiempo y que pueda ser manipulada y constreñida en la posición de implantación específica in vivo por medio de un sistema de control fuera del cuerpo del paciente, eliminando así la actual necesidad de sistemas de fijación invasivos.
- 60 Dichas necesidades se resuelven mediante una hidroxiapatita intrínsecamente magnética y por un método para obtenerlo como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

Una descripción detallada de la invención se expone a continuación, también con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

- 5 - La Figura 1 muestra la morfología de una muestra de HA sustituida con iones de hierro
- La Figura 2 muestra el análisis de XRD de una muestra de HA sintetizada en presencia de iones de Fe^{3+} a 40°C (proporción $\text{Fe}/\text{Ca} = 0.20$);
- 10 - La Figura 3 muestra los difractogramas RX de HA y HA no dopados sintetizados mediante adición de iones de Fe^{2+} ($\text{Fe}/\text{Ca}=0.20$) a diferentes temperaturas [$D=25^\circ\text{C}$; $E=40^\circ\text{C}$; $F=60^\circ\text{C}$]; los picos marcados con el símbolo \bullet corresponden a la fase de magnetita (Fe_3O_4);
- 15 - La Figura 4 muestra el patrón de XRD de HA y HA no dopados producidos mediante la adición de iones de Fe^{3+} y Fe^{2+} ($\text{Fe}/\text{Ca}=0.20$) sintetizados a 40°C (H);
- Las Figuras 5A y 5B muestran imágenes TEM de baja resolución de la muestra E (las flechas negras indican las partículas de magnetita) y la muestra H, respectivamente; la caja en común contiene la imagen TEM ampliada, que muestra la presencia de nanovoides en las dos muestras;
- 20 - La Figura 6 presenta un detalle de alta resolución de una micrografía TEM que muestra una partícula representativa de la muestra E o H observada a lo largo de los ejes $[2,0,1]$ de HA; la flecha negra indica la orientación del eje c de la red HA obtenida de la transformada de Fourier de la imagen (caja) y la flecha blanca apunta hacia una región amorfa de la partícula;
- 25 - La Figura 7 presenta una imagen TEM que muestra una partícula de la muestra E después de un daño de radiación; las regiones más oscuras de la imagen corresponden a una nanofase rica en hierro;
- La Figura 8 muestra la relación entre los valores de magnetización y los patrones XRD obtenidos para las muestras E y H;
- 30 - Las Figuras 9A y 9B muestran imágenes TEM de baja resolución de materiales tratados a 700°C : A) muestra E; B) muestra H; (las flechas indican una fase rica en hierro);
- La Figura 10 muestra curvas magnéticas ZFC-FC para la muestra H en un campo magnético aplicado de $100 (10^3/4\pi)\text{A m}^{-1}$ (Oe); la flecha indica la temperatura de bloqueo (T_B);
- 35 - La Figura 11 muestra el magnetismo como una función del campo magnético aplicado a 300K para la muestra H.

40 La presente invención se relaciona con una hidroxiapatita intrínsecamente magnética caracterizada por un grado de magnetización que varía entre 0.05 a $8 \text{ A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ (emu/g), preferiblemente 0.1 a $5 \text{ A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ (emu/g), registrado mediante aplicación de un campo magnético de $34 (10^3/4\pi)\text{A m}^{-1}$ (Oe).

45 En particular, la hidroxiapatita de la invención está dopada con iones de Fe^{2+} y Fe^{3+} , que sustituyen parcialmente al calcio en la red cristalina.

50 La proporción $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ en la red de hidroxiapatita varía de 1 a 4 , preferiblemente de 2 a 3.5 . La hidroxiapatita de la invención es intrínsecamente magnética, es decir está dotada con propiedades magnéticas esencialmente atribuibles al dopaje de la red con iones de Fe^{3+} y Fe^{2+} , que sustituyen (parcialmente) el calcio en una cantidad, en posiciones recíprocas, en una relación de estado de oxidación/posición en la red y en estados de coordinación específicos tales como para generar magnetismo.

55 Sin estar vinculado a ninguna teoría, se cree que el magnetismo se debe a la existencia de dominios estructurales muy pequeños en la red HA dopada que se asemejan a la estructura de la magnetita y son capaces de activar los mecanismos responsables de la propiedad superparamagnética.

Los análisis de XRD y simulaciones por ordenador en modelos estructurales han demostrado una clara indicación de que ambas especies de Fe están en las posiciones de sustitución de calcio y no en los sitios intersticiales en la red HA.

60 La posición Ca(2), con un número de coordinación de 6 , y la posición Ca(1) con un número de coordinación de 4 , están ocupadas en una relación recíproca de tal manera que imparten susceptibilidad magnética a los polvos.

65 Las investigaciones TEM, así como las mediciones magnéticas, confirmaron la presencia de una nueva fase magnética de HA junto con nanoracimos similares a la magnetita. Esta nueva fase es una hidroxiapatita distorsionada/desordenada con Fe^{2+} , en su estado divalente nominal, y Fe^{3+} , que tiene una desviación de su estado trivalente nominal, organizado a nivel superficial y a granel y coordinado para generar magnetismo en la misma HA.

La hidroxiapatita de la invención puede comprender una cantidad de fases magnéticas secundarias (por ejemplo, fases secundarias del tipo de magnetita) por debajo de aproximadamente 3% en volumen. Preferiblemente, la cantidad de fases magnéticas secundarias es $\leq 2\%$ en volumen.

5 La baja cantidad de fases secundarias presentes junto a la hidroxiapatita de la invención indica que la mayoría de los iones de hierro usados para el dopaje sustituyen el calcio en la red de HA y sólo una pequeña parte de ellos contribuyen a la formación de óxidos de hierro (como la magnetita) que tienen propiedades magnéticas.

10 En virtud de la baja cantidad de fases magnéticas secundarias, por ejemplo magnetita, la hidroxiapatita dopada de la invención mantiene las buenas características de biocompatibilidad típicas de la hidroxiapatita no dopada. De hecho, cuanto mayor sea la cantidad de fases magnéticas secundarias, menor será la biocompatibilidad de la hidroxiapatita.

15 La hidroxiapatita de la invención tiene preferiblemente una proporción (Fe+Ca)/P que varía de 1.5 a 1.9. Tales valores se aproximan al valor de la proporción Ca/P en la HA no dopada.

Los valores de la proporción (Fe+Ca)/P que varían de 1.5 a 1.9 indican que el dopado con iones de hierro como sustitutos del calcio no ha provocado grandes alteraciones en la estructura química del material, lo que, incluso después del dopaje, retiene las características estructurales típicas de la hidroxiapatita no dopada.

20 La hidroxiapatita dopada de la invención está preferiblemente en la forma de partículas (o nanopartículas) que tienen dimensiones de 5-10 nm a 20-30 nm de ancho y hasta 80-150 nm de longitud. Las partículas pueden contener huecos esféricos de 2-5 nm.

25 La hidroxiapatita intrínsecamente magnética de la invención se sintetiza con un método que comprende los pasos de:

a) añadir una solución que comprende iones de Fe(II) y Fe(III) a una suspensión/solución que contiene iones de Ca(II);

30 b) calentar la suspensión del paso a) hasta una temperatura en el intervalo de 15°C a 80°C;

c) añadir una solución de iones fosfato a la suspensión/solución del paso a);

35 d) separar el precipitado de los licores madre.

Preferiblemente, dichos iones de Fe(II) y Fe(III) se derivan, respectivamente, de FeCl₂ y FeCl₃.

40 Preferiblemente, dichos iones de Ca(II) se derivan de hidróxido de calcio, nitrato de calcio, acetato de calcio, carbonato de calcio y/u otras sales de calcio.

La solución de iones de fosfato se añade a la suspensión/solución que contiene iones de calcio e iones de hierro en un periodo de 1-3 horas, preferiblemente calentando y agitando la suspensión. Preferiblemente, los iones de fosfato se derivan de ácido fosfórico y/o sales solubles de los mismos.

45 La cantidad de iones de hierro usados es tal que se obtiene un porcentaje de proporción molar Fe/Ca que varía de 5 a 30, preferiblemente de 10 a 20% en moles.

Al término de éste paso, la suspensión se puede mantener bajo agitación constante durante 1-2 horas y después se deja reposar, sin agitación o calentamiento, durante 12-36 horas.

50 De este modo se obtiene un precipitado que se separa de los licores madre, preferiblemente por centrifugación. El precipitado separado se dispersa posteriormente en agua destilada y se centrifuga al menos tres veces. Preferiblemente, el precipitado se lava al menos tres veces, se liofiliza y se tamiza.

55 El objeto de la invención también se relaciona con una hidroxiapatita intrínsecamente magnética, preferiblemente, en la forma de nanopartículas intrínsecamente magnéticas, obtenible con el método de síntesis descrito anteriormente. La hidroxiapatita intrínsecamente magnética de la invención es un material que retiene una biocompatibilidad totalmente comparable a la de la hidroxiapatita no dopada y por lo tanto puede usarse para diferentes propósitos en los sectores clínicos y/o de diagnóstico.

60 En particular, la hidroxiapatita intrínsecamente magnética se puede usar como agente vehículo y de liberación para factores biológicos o fármacos, como un agente de contraste en el diagnóstico o también como sustituto magnético bioactivo para la regeneración ósea y osteocartilada.

65 En cuanto a su uso en el sector de diagnóstico, la hidroxiapatita intrínsecamente magnética de la invención puede usarse como un agente de contraste, por ejemplo en formación de imagen de resonancia magnética (MRI). En este

caso, una vez que la hidroxiapatita magnética ha sido adecuadamente funcionalizada (por ejemplo con anticuerpos específicos capaces de situarse en regiones predeterminadas del cuerpo, por ejemplo en un tumor), se administra al paciente y, aplicando un campo magnético externo de intensidad adecuada, es posible localizar las partículas y así detectar si están presentes alteraciones patológicas o no.

Otro uso de la hidroxiapatita de la invención es como agente vehículo y de liberación de sustancias activas, por ejemplo fármacos antitumorales y/o antibióticos para tratamiento selectivo en el sitio patológico. En este caso, una vez administradas, las partículas de hidroxiapatita magnética se pueden guiar, aplicando un campo magnético adecuado, hacia el sitio patológico, donde liberarán el ingrediente activo que llevan.

De esta manera se crea un sistema para transportar y liberar fármacos de una manera controlada, en términos de velocidad y selectividad de liberación.

Para el tratamiento de tumores es posible usar las partículas de hidroxiapatita magnética de la invención con el fin de aumentar localmente la temperatura (magnetotermia o hipertermia). En términos prácticos, una vez administrados al paciente, las partículas de hidroxiapatita (desprovistas de cualquier sustancia activa) pueden guiarse, aplicando un campo magnético, hacia el sitio del tumor. Una vez que han llegado al sitio, la temperatura puede aumentarse aplicando campos magnéticos adecuados, de tal manera que provoque necrosis de células tumorales. Otro uso de las partículas de hidroxiapatita de la invención es como un sistema vehículo y de liberación para agentes biológicos, en particular proteínas, genes, células madre, factores de crecimiento y factores de vascularización; el sistema puede ser guiado, aplicando un campo magnético externo, hacia un sustituto óseo magnético implantado (por ejemplo, hecho de la misma hidroxiapatita magnética), o hacia una plataforma implantada no magnética.

De esta manera, se puede influir en la velocidad de osteointegración del hueso implantado y/o sustituto osteocartilado, y la regeneración de tejido, aumentando según sea necesario, de acuerdo con las necesidades individuales del paciente, la cantidad de factores de crecimiento y vascularización en el sitio donde se detectan las dificultades en el procedimiento de curación. El aumento de la cantidad de tales factores se puede conseguir aplicando un campo magnético externo que permite que las partículas de la invención sean guiadas hacia el sitio en el que la regeneración ósea u osteocartilada resulta particularmente difícil.

Por lo tanto, el objeto de la invención es una hidroxiapatita intrínsecamente magnética que tiene las características fisicoquímicas descritas anteriormente, cargadas con sustancias biológicas seleccionadas entre: proteínas, genes, células madre, factores de crecimiento, factores de vascularización y sustancias o fármacos activos. Dicha hidroxiapatita está preferiblemente en la forma de nanopartículas intrínsecamente magnéticas.

Todos los usos descritos anteriormente se basan en el principio de poder controlar la distribución interna de la plataforma y el sistema de liberación desde una ubicación remota, aplicando un campo magnético externo. Las partículas de hidroxiapatita intrínsecamente magnéticas se pueden definir así como nanodispositivos para transportar y liberar sustancias biológicas y farmacológicas.

La principal ventaja de la hidroxiapatita de la invención reside en su alta biocompatibilidad, que es comparable con la biocompatibilidad de hidroxiapatita no dopada y superior a la de sistemas que consisten en hidroxiapatita además de fases magnéticas secundarias. El sistema vehículo y de liberación de la invención no requieren, a diferencia de la plataforma magnética y sistemas de liberación conocidos en la técnica, ninguna otra modificación (por ejemplo, la aplicación de recubrimientos) dirigida a mejorar las propiedades biocompatibles de los mismos.

De hecho, las partículas magnéticas conocidas tienen un núcleo magnético protegido por varias monocapas de material inerte, por ejemplo sílice. Alternativamente, pueden usarse también sustancias orgánicas/biológicas; éstos pueden ser adsorbidos sobre la superficie de las partículas magnéticas de tal manera que formen un recubrimiento biocompatible.

Ejemplos de recubrimientos orgánicos/biológicos incluyen anticuerpos y biopolímeros (tales como colágeno), o monocapas de moléculas orgánicas que hacen que las partículas magnéticas sean biocompatibles. Además, las sustancias a suministrar deben estar unidas a las partículas magnéticas conocidas por medio de un vínculo con grupos reactivos en ambos extremos.

Un grupo funcional sirve para conectar el vínculo a la superficie de las partículas, mientras que el segundo grupo funcional se usa para unir las moléculas a transportar.

La ventaja de las partículas de hidroxiapatita de la invención es que son intrínsecamente magnéticas e intrínsecamente biocompatibles sin la necesidad de aplicar capas adicionales de material orgánico/inorgánico para mejorar dicha propiedad. Además, las sustancias a transportar pueden cargarse directamente sobre la hidroxiapatita sin necesidad de emplear una sustancia que une. Otro uso de la hidroxiapatita magnética de la invención es para la preparación de construcciones biomiméticas tridimensionales que se usan como sustitutos de hueso u osteocartilado en aplicaciones de regeneración de hueso u osteocartilaje.

Estas plataformas biomiméticas magnéticas pueden estar limitadas en una posición dada in vivo usando fuerzas magnéticas adecuadas aplicadas desde el exterior. Además, dichas plataformas pueden manipularse biológicamente in situ mediante la aplicación de un campo magnético externo adecuado que permita guiar otras partículas de hidroxiapatita magnética de acuerdo con la invención, cargadas con factores de crecimiento, factores de vascularización, células madre, fármacos o, en cualquier caso, agentes biológicos, hacia el dispositivo magnético, con el fin de liberar in situ las sustancias antes mencionadas de acuerdo con los requisitos cuali-cuantitativos y de tiempo del paciente.

Por lo tanto, el objeto de la invención se refiere además a un dispositivo biomimético en 3D, en particular para uso en la regeneración de hueso o osteocartilaje, que comprende partículas, preferiblemente nanopartículas, de hidroxiapatita intrínsecamente magnética de acuerdo con la invención.

Parte experimental

Los polvos de hidroxiapatita magnética y biomimética (HA) se prepararon usando FeCl_2 y FeCl_3 como fuentes de iones dopantes de Fe^{2+} y Fe^{3+} . Se compararon tres métodos diferentes de síntesis de las sales antes mencionadas; Se describen en detalle en los ejemplos 1-3.

La composición química, estructura y propiedades magnéticas de los polvos de Fe-HA sintetizados se determinaron con los siguientes métodos.

El análisis químico se realizó mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, Liberty 200, Varian, Clayton South, Australia): se disolvieron 20 mg de polvo en 2 ml de HNO_3 y el volumen de solución se elevó a 100 ml agregando agua desionizada. La cantidad de Fe^{2+} se confirmó por medio del análisis espectrofotométrico UV-Vis, aprovechando la capacidad de los iones Fe^{2+} para formar complejos con ortofenantrolina determinables a 510 nm.

La cantidad de Fe^{3+} se determinó calculando la diferencia entre la cantidad total de hierro (determinada con ICP) y la cantidad de Fe^{2+} (determinada con UV-VIS).

La evaluación morfológica de los polvos se realizó con un microscopio electrónico de barrido (SEM, Stereoscan 360, Leica, Cambridge, RU).

Se usó la determinación con electrones retrodispersados (BSE) para visualizar cualitativamente la distribución de Fe en los polvos. EDS (espectroscopia de dispersión de energía, Link Oxford) se usó para el análisis químico semi-cuantitativo.

Se empleó análisis de difracción de rayos X (radiación $\text{CuK}\alpha$, Rigaku Geigerflex, Tokio Japón) para determinar las fases cristalinas presentes y estimar el grado de cristalinidad del polvo.

Se usó un microscopio electrónico de transmisión (JEOL TEM 3010-UHR, Japón, 300 kV) para observar las características del material en una escala nanométrica.

El magnetismo de los polvos se midió en un campo bajo ($34 (10^3/4\pi) \text{ A m}^{-1} (\text{Oe})$) con un susceptómetro YSZ 01C/02C (Sartorius Mechatronics, Italia).

Las mediciones magnéticas también se realizaron usando un dispositivo magnetómetro de interferencia cuántica superconductor (SQUID) (Quantic Design) capaz de operar de 1.8K a 350K en un campo magnético máximo aplicado de $H=5\text{T} (50000 (10^3/4\pi) \text{ A m}^{-1} (\text{Oe}))$.

[0060] En este caso se midieron unos pocos miligramos de muestra en polvo (20 mg) de 5 K a 300 K en un campo magnético aplicado de $H = 100(103/4\pi)\text{Am}^{-1} (\text{Oe})$ para obtener el M (magnetismo) vs curvas de T (temperatura), mientras que las curvas M vs H (intensidad del campo magnético) se midieron en un solo ciclo de campo magnético de 2T a -2T (+/- 20000 $(103/4\pi)\text{A m}^{-1} (\text{Oe})$) a $T=300\text{K}$.

Ejemplo de síntesis 1 (para comparación)

Manteniendo el procedimiento de síntesis general descrito anteriormente, un método de síntesis consiste en añadir únicamente FeCl_3 como fuente de iones de Fe^{3+} , posteriormente parcialmente reducido a iones de Fe^{2+} de manera que se obtenga una proporción $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ igual a aproximadamente 3.

Los polvos sintetizados mediante la adición de iones de Fe^{3+} , que adoptan una proporción molar inicial de Fe/Ca de 0.20 y una temperatura de 40°C , muestran una distorsión considerable en la red de HA, tal como se revela mediante análisis difractométrico de XRD; sin embargo, no se detectaron fases secundarias (Figura 2).

El polvo sintetizado no sometido a un procedimiento de reducción no mostró ningún signo de magnetización, como se esperaba dado que el hierro está presente solamente en su estado de oxidación más alto.

- 5 El polvo se sometió luego a un procedimiento de reducción. El procedimiento de reducción se llevó a cabo en un autoclave cerrado (Parr, Aleación C276), que usa H₂ (4%) en Ar al 96% como gas reductor a diferentes presiones. La Tabla 1 resume las condiciones de reducción del autoclave experimental para el polvo de Fe³⁺HA.

Tabla 1

Muestra	T _{rojo} [°C]	Tiempo [min]	Agitación	P [psij]
A	300	60	NO	270
B	300	60	SI	270
C	300	60	SI	400

- 10 Las características de los polvos reducidos se dan en la Tabla 2, que muestran la relación entre el magnetismo y la proporción molar Fe³⁺/Fe²⁺ calculada para la muestra de Fe³⁺HA reducida.

Tabla 2

Muestra reducida	Fe ²⁺ (HA) [% en peso]	Fe ³⁺ (HA) [% en peso]	Fe ³⁺ /Fe ²⁺ (HA)	Magnetización [A*m ² *kg ⁻¹ (emu/g)]
A	5.5	4.9	0.89	0.00122
B	7.3	3.1	0.42	0.00108
C	9.6	0.8	0.08	0.00128

- 15 Se registraron valores de magnetización muy bajos para todos los polvos sintetizados. De hecho, se puede suponer una reducción preferencial de los iones Fe³⁺ presentes en la superficie, acompañada por una reducción no homogénea de la masa, que conduce a la formación de una cantidad excesiva de iones de Fe²⁺. El método de reducción aplicado parece estar caracterizado por condiciones de reacción que son demasiado extremas para obtener una distribución equilibrada de iones de Fe³⁺/Fe²⁺ en la red HA.

- 20 De hecho, la concentración de Fe²⁺ determinada por el análisis espectrofotométrico UV-Vis, que aprovecha la capacidad de iones de Fe²⁺ para formar un complejo con ortofenantrolina, mostró ser muy alta, disminuyendo así excesivamente la proporción de Fe³⁺/Fe²⁺ (Tabla 2).

25 **Ejemplo de síntesis 2 (para comparación)**

Mediante el mantenimiento del procedimiento de síntesis general descrito anteriormente, un método alternativo de síntesis prevé la adición únicamente de FeCl₂ como fuente de iones Fe²⁺. Estos últimos experimentan oxidación espontánea a iones de Fe³⁺ bajo las condiciones de reacción.

- 30 Los polvos se sintetizaron añadiendo iones de Fe²⁺, adoptando una proporción molar Fe/Ca inicial de 0.20, y diversificando la temperatura de síntesis (25°C, 40°C, 60°C).

- 35 Las condiciones de reacción experimentales y las propiedades de los polvos obtenidos como un resultado se dan en la Tabla 3.

Tabla 3

Muestra	Condiciones de síntesis	Fe ₃ O ₄ [% en volumen]	Fe _(tot) [% en peso]	Fe ²⁺ (HA) [% en peso]	Fe ³⁺ /Fe ²⁺ (HA)	(Fe+Ca)/P (HA)	M [A*m ² *kg ⁻¹ (emu/g)]
D	Fe ²⁺ T:25°C Fe/Ca=0.20	0	9.1	1.3	5.99	1.728	0.006
E	Fe ²⁺ T:40°C Fe/Ca=0.20	3	8.81	1.03	4.13	1.716	0.339
F	Fe ²⁺ T:60°C Fe/Ca=0.20	5.5	8.72	2.79	0	1.601	0.558

El diagrama XRD en la Figura 3 muestra el pico de magnetita a $2\theta \sim 36^\circ$ en las muestras E y F, mientras que el patrón de resolución en el espectro de la muestra D disminuye según se esperaba, ya que se preparó a una temperatura más baja. Las características de los polvos dependen estrechamente del procedimiento de síntesis, como se muestra en la tabla 3.

La formación de magnetita se favorece a una temperatura más alta (60° y 40°C) y bajo estas condiciones el valor magnético aumenta gracias principalmente a la contribución de la magnetita, que forma junto con la HA Fe-sustituido. A 25°C la formación de magnetita se minimiza y los iones de hierro entran en la red en mayor número, como lo demuestra la distorsión de la misma (Figura 3). La cantidad total de iones de hierro determinada por la ICP (Tabla 3) corresponde a la concentración nominal de FeCl_2 introducida en todas las muestras. La proporción de $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ se calcula usando la cantidad de Fe^{2+} determinada con UV y la cantidad de Fe^{3+} obtenida restando la cantidad de Fe^{2+} del contenido total de hierro determinado con ICP, en ambos casos después de restar la contribución de los iones de Fe^{2+} y Fe^{3+} que forman magnetita. Como se muestra en la tabla 3, la proporción de $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ es muy alta para las muestras D y E. A medida que aumenta la temperatura de reacción (muestra F), la cantidad de magnetita como fase secundaria también aumenta y la cantidad de Fe^{3+} disponible para entrar en la red de HA disminuye.

El valor de magnetización de la muestra D es muy bajo ya que: i) la magnetita, como fase secundaria, está ausente; ii) ambas especies de iones de hierro entran en la red, pero la proporción de $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ es muy alta y la distribución de los iones de Fe^{2+} y Fe^{3+} y sus estados de coordinación no son apropiados. En las muestras E y F el valor de magnetismo alto es esencialmente atribuible a la concentración de magnetita.

Ejemplo de síntesis 3 (de la invención)

Se añaden FeCl_2 y FeCl_3 simultáneamente a la suspensión de hidróxido de calcio en proporciones de $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$ de 1:1.

Se añade una solución de ácido fosfórico (Aldrich 85% en peso) a la suspensión que contiene hidróxido de calcio dispersado (Aldrich 95% en peso) e iones de hierro durante un periodo de aproximadamente 1-2 horas con calentamiento constante y agitación. La reacción de síntesis se lleva a cabo a 40°C . Las cantidades de cloruro de hierro son tales que producen proporciones molares Fe/Ca iniciales = 0.10 y 0.20.

El producto de reacción se mantiene en suspensión mediante agitación constante y calentamiento durante 1 hora y luego se deja durante 24 horas sin calentamiento o agitación.

El precipitado obtenido, de color marrón, se separa de los licores madre por centrifugación y luego se lava y centrifuga tres veces.

El precipitado se liofiliza posteriormente y se tamiza a $150\ \mu\text{m}$.

La adición de ambos reactivos (FeCl_2 y FeCl_3) hace que Fe^{2+} y Fe^{3+} estén disponibles simultáneamente durante la nucleación de HA: bajo estas condiciones la cantidad de magnetita que se forma es más pequeña comparada con los métodos comparativos descritos anteriormente. El espectro XRD en la Figura 4 muestra que la adición simultánea de Fe^{2+} y Fe^{3+} provoca una fuerte perturbación en la red HA, lo que hace muy difícil evaluar los parámetros de la red.

La Tabla 4 muestra la relación existente entre las condiciones de reacción y las características de $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}\text{HA}$.

Tabla 4

Muestra	Condiciones de síntesis	Fe_3O_4 [% en volumen]	$\text{Fe}_{(\text{tot})}$ [% en peso]	Fe^{2+} (HA) [% en peso]	$\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (HA)	$(\text{Fe}+\text{Ca})/\text{P}$ (HA)	M [$\text{A}^*\text{m}^2\text{kg}^{-1}$ (emu/g)]
G	$\text{Fe}^{3+} + \text{Fe}^{2+}$ T: 40°C $\text{Fe}/\text{Ca}=0.10$	1.5	4.92	0.71	3.41	1.75	0.476
H	$\text{Fe}^{3+} + \text{Fe}^{2+}$ T: 40°C $\text{Fe}/\text{Ca}=0.20$	2	9.93	1.82	3.15	1.678	0.679

El alto valor de magnetización de la muestra H (Tabla 4) no puede justificarse por la única contribución atribuible a la magnetita. Por lo tanto, la alta magnetización puede atribuirse a la proporción óptima entre los iones de hierro ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+} = 3.15$) y la posición relativa específica y la coordinación de los dos estados de oxidación del hierro.

Estos resultados sugieren la existencia de dominios estructurales muy pequeños en la red HA que simulan la estructura de la magnetita y son capaces de activar los mecanismos responsables de la propiedad superparamagnética.

- 5 El análisis mostró una fase de Ca-P amorfa que contiene partículas de óxido de hierro en una concentración muy baja. La fase bajo el haz es muy inestable, también debido al alto grado de amorfismo.

El contenido de hierro determinado con la sonda EDS es del 15-20%, probablemente presente en la red HA o en racimos muy pequeños de menos de 1-2 nm.

- 10 Las micrográficas típicas de las muestras E y H se muestran en la Figura 5. Las partículas exhiben principalmente una morfología alargada, de tamaño bastante homogéneo, de 5-10 nm a 20-30 nm de ancho y hasta 80-150 nm de longitud, y pueden contener huecos esféricos de 2-5 nm.

- 15 En el caso de la muestra E, la magnetita está en forma de nanopartículas que tienen dimensiones de 10-30 nm.

- El análisis de HRTEM (Figura 6) reveló que una parte del material está formada tanto de dominios amorfos como de dominios de cristal de HA, alargados en la dirección del eje C, que también pueden coexistir en la misma partícula (véase la Figura 6 y el detalle correspondiente). Se midió el contenido total de hierro, calcio y fósforo en la fase de fosfato de calcio tanto para los polvos E como H usando EDS/TEM (escogiendo cuidadosamente, en el caso de la muestra E, las regiones en las que no estaba presente magnetita). Los resultados en la forma de proporciones molares entre los elementos presentes (tabla 5) son consistentes con los obtenidos mediante ICP, XRD y UV-vis como se reportó previamente (Tabla 4).

- 25 La Tabla 5 muestra los resultados del análisis cuantitativo EDS/TEM de las muestras E y H y las mismas muestras tratadas a 700°C (Et y Ht).

Tabla 5

Muestra	Fe _(CaP) /Ca	(Ca+Fe)/P _(CaP)
E	9 ± 1.5	1.5 ± 0.1
Et	18 ± 3	1.5 ± 0.1
H	20 ± 0.5	1.6 ± 0.1
Ht	16 ± 1	1.4 ± 0.1

- 30 Dado que no se encontró evidencia de la presencia de una fase rica en hierro, ni siquiera en el polvo H (en el que la proporción molar inicial de Fe a calcio es Fe_{tot}/Ca (HA) = 0.20), se presume que los iones de hierro son distribuidos de forma homogénea y preponderante en sustitución de los iones de Ca²⁺ de la red HA o en la fase amorfa como grupos muy pequeños (<1 nm)

- 35 La evidencia indirecta de la distribución homogénea de los iones de hierro puede derivarse del comportamiento de las muestras expuestas a dosis relativamente grandes de electrones. Bajo estas condiciones, de hecho, los materiales son altamente inestables: los huecos se derrumban rápidamente y las partículas sufren cambios morfológicos acompañados de reordenamientos estructurales y parte del material se transforma en CaO.

- 40 Es interesante observar que, después de unos segundos, se forman nuevas partículas con un diámetro de 1-1.5 nm (véase la Figura 7). La nueva fase que se forma es un compuesto rico en hierro, probablemente originado por la coalescencia de iones de hierro o racimos durante el procedimiento de daño que ocurre como un resultado del bombardeo con electrones.

- 45 A continuación se aplica un tratamiento térmico a 700°C durante 1 hora en una atmósfera Ar a los polvos E y H. Los espectros XRD resultantes se muestran en la Figura 8.

La muestra E que contiene grandes cantidades de magnetita mostró ser bastante estable y después del tratamiento térmico (Et) la cantidad de HA permaneció aproximadamente en 72%.

- 50 Dado que la fase secundaria β-TCP Ca₃(PO₄)₂ se forma (26%), mientras que la magnetita casi desaparece, se supone que ambos iones de hierro entran en la red βTCP, que forman Ca₉Fe(PO₄)₇ y Ca₉FeH(PO₄)₇.

- 55 En el caso de la muestra H (que se supone se compone de HA cuya red está parcialmente ocupada por Fe²⁺ y Fe³⁺, que forman microdominios magnéticamente activos), la estabilidad térmica es mucho más baja. Esto demuestra la alta perturbación de la estructura cristalina debido a la ocupación simultánea por ambos iones de hierro (Ht).

Las micrográficas TEM de las muestras (Et) y (Ht) se muestran en la Figura 9. La muestra (Et) muestra partículas con formas esferoides muy irregulares con una anchura de aproximadamente 30-50 nm y longitud variable, obtenidas por sinterización de las partículas primarias de los polvos de partida.

5 La muestra se caracteriza por un contraste uniforme, indicativo de una dispersión homogénea del hierro. El análisis HRTEM confirmó que la fase de fosfato de calcio es principalmente del tipo HA, con algunas fracciones de volumen de β -TCP, y reveló que una fracción estrecha del material consiste en una fase pura que muestra un carácter amorfo, probablemente derivado de las partículas de magnetita que pierden su estructura como un resultado del tratamiento térmico.

10 En este caso también, aunque la muestra es más resistente al daño por el haz, después de que el fosfato de calcio se expone a grandes dosificaciones de electrones, aparecen nuevas partículas pequeñas, lo que indica la presencia de racimos muy pequeños de especies de hierro en la HA no dañada O en la red β -TCP. Es interesante observar que el contenido de hierro medido (Fetot / Ca (HA)) en el fosfato de calcio es de aproximadamente $18 \pm 3\%$ (ver tabla 5), más del doble que el de los polvos de partida. Esto indica que el tratamiento térmico promueve la difusión de las especies de hierro de la magnetita al fosfato de calcio. Esto, junto con la amorfización de la magnetita, explica la desaparición de los máximos de magnetita observados en el difractograma RX (Figura 8).

20 Por otra parte, las partículas de muestra (Ht) son más grandes y más esféricas (sin huecos en el interior) y presentan variaciones de contraste evidentes (Figura 9) asociadas con la presencia de una fase rica en hierro, que no se observa en la polvos de partida.

Los análisis HRTEM y EDS juntos confirman que el fosfato de calcio está presente en su mayor parte en forma de β -TCP sustituido con hierro, que encapsula óxido y partículas de hierro amorfo.

25 La proporción Fe/Ca medida (en regiones en las que no hay óxido de hierro puro) es aproximadamente $16 \pm 1\%$, más baja que en los polvos de partida.

30 Caracterización físico-química y magnética

Los polvos obtenidos eran de color pardo y se caracterizaban por aglomerados con dimensiones de aproximadamente 30-60 μm , como se muestra en la imagen SEM de la Figura 1.

35 Los patrones de difracción XRD parecen ser muy amplios; esto es indicativo de una distorsión considerable de la red HA; en cualquier caso, no se detectaron fases secundarias de fosfato junto con HA.

Con la ayuda de simulaciones por ordenador en modelos estructurales, se obtuvo una clara indicación de que los iones de Fe no están en un sitio intersticial en la red de hidroxiapatita, sino que son más bien sustitutos de los iones Ca (con pequeña diferencia entre las posiciones tetra- y hexacoordinadas de la red 4f y 6h).

40 El análisis ICP confirmó la presencia de hierro en el polvo, en una cantidad igual a la cantidad nominal introducida; La proporción Ca/P fue inferior a la teórica debido al agotamiento del calcio.

45 Se supone que las cantidades correspondientes de hierro como Fe^{3+} , Fe^{2+} y $(\text{Fe}^{3+} + \text{Fe}^{2+})$ sustituyen a Ca, ya que la proporción $(\text{Fe}+\text{Ca})/\text{P}$ se aproxima al valor teórico.

El análisis de la EEB confirmó una distribución homogénea de hierro en el polvo; el análisis por microsonda también fue capaz de detectar la misma cantidad nominal de hierro añadido durante la reacción.

50 Las propiedades magnéticas bajo un campo magnético alto se midieron usando un magnetómetro SQUID (Quantum Design). Se encontró evidencia de la presencia de una fase intrínsecamente magnética en la red de hidroxiapatita para la muestra H. La Figura 10 muestra la dependencia de la magnetización de la temperatura bajo condiciones refrigeradas por campo cero (ZFC) y refrigeradas por campo (FC) de 5K a 300K, en un campo magnético aplicado de 100 ($10^3/4\pi$)A m^{-1} (Oe). Ambas curvas muestran el comportamiento típico de un sistema de partículas magnéticas que interactúan con una temperatura de bloqueo promedio de $T_B=170\text{K}$. T_B es significativamente alta, probablemente debido a la presencia de agregados de nanopartículas de magnetita más pequeñas ($\sim 10\text{nm}$), que actúan como una fase secundaria (de acuerdo con otras técnicas de caracterización, que confirman la presencia de 2% en volumen de magnetita como una fase secundaria fuera de la red de hidroxiapatita) y separan el estado bloqueado por el estado superparamagnético. Debajo de T_B se bloquea el movimiento libre del momento magnético de las partículas; por encima de la T_B , la energía térmica induce fluctuaciones rápidas en el momento magnético de toda la partícula en relación con el tiempo de observación, como para hacer que el sistema aparezca superparamagnético. La T_B está estrechamente correlacionada con las interacciones dipolares interparticulares y aumenta con el aumento de las interacciones dipolares.

Como una consecuencia de la formación de agregados, aumenta la concentración local de nanopartículas y, por lo tanto, la fuerza de las interacciones dipolar interparticulares, que modifican la barrera de energía para la relajación magnética y que determinan el comportamiento magnético global de las muestras.

5 La Figura 11 muestra las curvas de magnetización como una función del campo magnético aplicado, de -2 a 2 Tesla, a 300K para la muestra H.

Se puede observar claramente el comportamiento superparamagnético típico (SPM) de nanopartículas magnéticas de un solo dominio, lo que indica que el tamaño de partícula está por debajo del intervalo magnético multidominio (25-30nm para magnetita). Esto es consistente con las micrográficas de TEM mostradas en la Figura 5B, donde pueden observarse agregados de magnetita de aproximadamente 5-10 nm. Por otra parte, la magnetización de saturación (M_s) de la muestra es significativamente baja (aproximadamente $4-5 \text{ A} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$ (emu/g)) y la fase secundaria identificada en la forma de nanopartículas de magnetita (que representa 2% en volumen) no es suficiente para justificar el valor de la magnetización observada. Por lo tanto, dos contribuciones magnéticas diferentes son responsables de la magnetización total en el material: uno obviamente proviene de las nanopartículas de magnetita y el otro de las partículas de hidroxiapatita sustituidas con los iones de Fe^{2+} y Fe^{3+} .

En el caso del formador, se conoce el origen del magnetismo, mientras que en el segundo el magnetismo se deriva de la sustitución parcial de sitios Ca^{2+} específicos en la red HA con los iones magnéticos de Fe^{2+} y Fe^{3+} .

Con el fin de encontrar la fase estructural y magnética responsable del magnetismo en la red de hidroxiapatita, la magnetización común de un sistema de nanopartículas de magnetita ($\phi \sim 10 \text{ nm}$, $M_s 60-80 \text{ A} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$ (emu/g)) se restó de la magnetización de saturación normalizada total ($M_s \sim \{4\} \cdot \text{A} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$ (emu/g)). De esta manera, fue posible determinar la magnetización asociada con HA con hierro sustituido solo. En cualquier caso, esta M_s calculada es mayor que la prevista, también donde la masa total de Fe en el material (6-7% en peso) está presente como magnetita.

Por lo tanto, los datos magnéticos encontrados apoyan el supuesto de que el valor M_s es causado por la presencia de dominios magnéticos estructurales (similares a la magnetita y/u otros óxidos de hierro) en la red de hidroxiapatita.

30 Pruebas in vitro

Se llevaron a cabo ensayos preliminares de adhesión celular y biocompatibilidad en granulados de HA y polvos de HA magnéticos que usan células madre mesenquimatosas (MSC), que después de la caracterización se cultivaron en atmósfera controlada (5% de CO_2 ; $T = 37^\circ\text{C}$) en DMEM (Sigma, Milán, Italia) suplementados con suero bovino fetal (FBS) al 10%, 1% de aminoácidos no esenciales y antibióticos. Las células se dividieron 1:2 en intervalos de una semana y se usaron entre el tercer y cuarto pasaje. Las células de cultivos confluentes de MSC se separaron usando tripsina al 0.25% en 1 ml de MEDTA y se ubicaron en plaquetas en triplicado a una densidad de 5×10^4 y 1×10^4 células/ cm^2 , respectivamente, sobre los polvos granulados a ensayar y placas de poliestireno de 24 pozos como control.

Los cultivos de placas se incubaron a 37°C durante 7 días. Después de la incubación, se retiró el medio de cultivo; se añadieron 200 μl de MTT (ensayo colorimétrico 3-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolio Aldrich 135038) y 1.8 ml del medio de cultivo a las monocapas de células individuales; las placas multicapa se incubaron a 37°C durante otras 3 horas.

Después de la separación del sobrenadante, los cristales de formazán azul se disolvieron mediante adición de 2 ml de solvente (HCl 1N al 4% en isopropanol absoluto) y se cuantificaron espectrofotométricamente a 570 nm.

50 Con respecto a HA estequiométrica, los polvos magnéticos de HA representan un sustrato adecuado en términos de adhesión celular y proliferación para precursores de osteoblastos (MSC).

El valor de MTT es de 80% para HA magnético, mientras que para HA es de 82%. Los análisis morfológicos de SEM realizados en células cultivadas mostraron una buena biocompatibilidad del MSC con todos los polvos ensayados. De forma similar a su comportamiento en HA, en HA magnético las células mostraron una difusa "estirada" morfológica, con un número de extensiones citoplasmáticas en contacto con el polvo.

En conclusión, la adición simultánea de FeCl_2 y FeCl_3 como fuentes de iones para sustituir parcialmente el calcio en la red de HA y el uso de parámetros de síntesis optimizados permitió obtener HA sustituida con $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ que tiene una proporción de $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ igual a aproximadamente 3 y una proporción (Fe+Ca)/P muy próxima a la teórica.

Mediante el uso de XRD y simulaciones por computadora en modelos estructurales, se obtiene una clara indicación de que ambas especies de Fe están en posiciones de sustitución de calcio y no en sitios intersticiales en la red HA.

La posición Ca(2), con un número de coordinación de 6, y la posición Ca(1), con un número de coordinación de 4, están ocupadas en una relación recíproca de tal manera que transmitan susceptibilidad magnética a los polvos, gracias a parámetros de síntesis estrictamente definidos.

- 5 Las investigaciones TEM, así como las mediciones magnéticas, confirman la presencia de una nueva fase magnética de HA junto con nanoracimos similares a la magnetita.

10 Esta nueva fase es una hidroxiapatita distorsionada/desordenada con Fe^{2+} , en su estado divalente nominal, y Fe^{3+} , que tiene una desviación de su estado trivalente nominal, organizado a nivel superficial y a granel y coordinado para generar magnetismo en la misma HA.

15 Estos resultados, junto con la biocompatibilidad del HA magnético, proporcionan una medicina regenerativa con una nueva familia de materiales biomiméticos biocompatibles que se pueden controlar y manipular a través de campos magnéticos externos adecuados; estos materiales pueden de hecho emplearse con el fin de producir 1) nanopartículas para transportar y liberar factores y/o fármacos bioactivos, 2) nanopartículas que se pueden usar para propósitos de diagnóstico (imagenología) y tratamiento (hipertermia), 3) sustitutos óseos o osteocartilados que pueden ser manipulados biológicamente in situ (es decir, 'recargados' o en cualquier caso estimulados después de la implantación in vivo, con factores específicos de acuerdo con los requisitos cuali-cuantitativos y temporales del paciente) e incluso fijados en una posición dada in vivo (eliminando la dependencia de los sistemas tradicionales de fijación).

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una hidroxiapatita que comprende iones de calcio e iones de fosfato en una red cristalina, caracterizada porque está dopada con iones de Fe^{2+} e iones de Fe^{3+} , que sustituyen parcialmente dichos iones calcio en dicha red cristalina en una proporción cuantitativa $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ de 1 a 4, tiene magnetismo de 0.05 a $5 \text{ A} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$ (emu/g), medido mediante aplicación de un campo magnético de $34 (10^3/4\pi) \text{ A} \cdot \text{m}^{-1}$ (Oe), debido a la presencia de nano-dominios magnéticos en la red de hidroxiapatita, y comprende una cantidad de fases magnéticas secundarias por debajo de 3% en volumen.
- 10 2. La hidroxiapatita de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha proporción $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ es de 2 a 3.5.
3. La hidroxiapatita de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende una cantidad de fases magnéticas secundarias $\leq 2\%$ en volumen.
- 15 4. La hidroxiapatita de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene una proporción (Fe+Ca)/P de 1.5 a 1.9.
- 20 5. La hidroxiapatita de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la forma de nanopartículas que tienen una anchura de 5-10 nm a 20-30 nm y una longitud de hasta 80-150 nm, o en forma de agregados/gránulos de dichas nanopartículas.
6. La hidroxiapatita de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dichas nanopartículas comprenden huecos esféricos de 2-5 nm.
- 25 7. La hidroxiapatita de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, cargada con sustancias biológicas seleccionadas en el grupo que consiste en proteínas, genes, células madre, factores de crecimiento y factores de vascularización; o cargado con sustancias activas o fármacos.
- 30 8. Un sustituto óseo u osteocartilato biomimético que comprende una hidroxiapatita de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 35 9. La hidroxiapatita de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o el hueso biomimético o sustituto de osteocartilato de acuerdo con la reivindicación 8 para uso médico o de diagnóstico, preferiblemente para la regeneración ósea u osteocartilada.
- 40 10. La hidroxiapatita de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso como agente vehículo y de liberación para sustancias biológicas o fármacos.
- 45 11. La hidroxiapatita de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso como un agente de contraste en el diagnóstico.
- 50 12. Un procedimiento para preparar la hidroxiapatita de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende los siguientes pasos:
- a) añadir una solución que comprende iones de $\text{Fe}(\text{II})$ y $\text{Fe}(\text{III})$ a una suspensión/solución que contiene iones de $\text{Ca}(\text{II})$;
- b) añadir una solución de iones fosfato a la suspensión/solución del paso a);
- c) calentar la suspensión/solución del paso b) a una temperatura de 15° a 80°C , preferiblemente de 25°C a 60°C ;
- d) separar el precipitado de los licores madre.
- 55 13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicha solución de iones de fosfato se añade a la suspensión/solución que contiene iones de $\text{Ca}(\text{II})$ e iones de hierro en un periodo de 1-3 horas, preferiblemente calentando y agitando la suspensión.
- 60 14. Un método de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en el que después de añadir iones de fosfato la cantidad de iones de hierro con respecto a iones de calcio se ajusta añadiendo adicionalmente solución de iones de hierro para obtener una proporción molar de Fe/Ca de 5 a 30, preferiblemente de 10 a 20% en moles.
15. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que dichos iones de $\text{Fe}(\text{II})$ y $\text{Fe}(\text{III})$ se derivan de FeCl_2 y FeCl_3 , respectivamente.

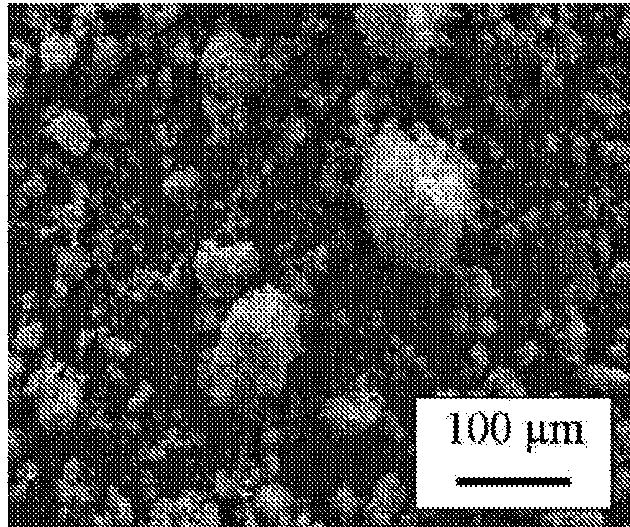


Fig. 1

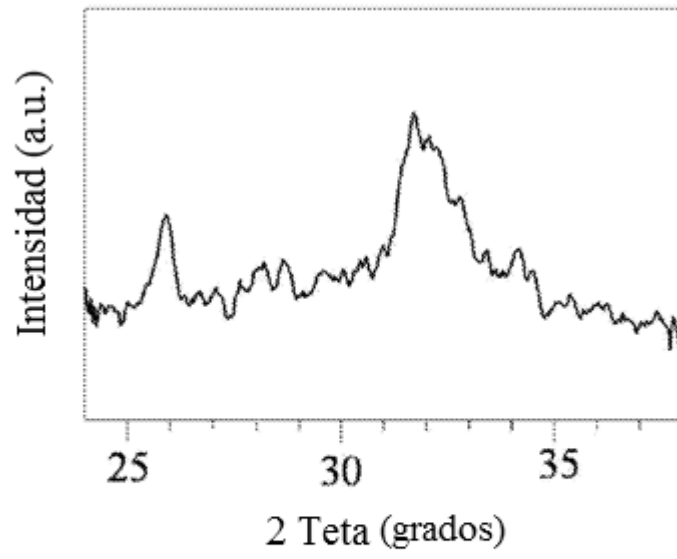


Fig. 2

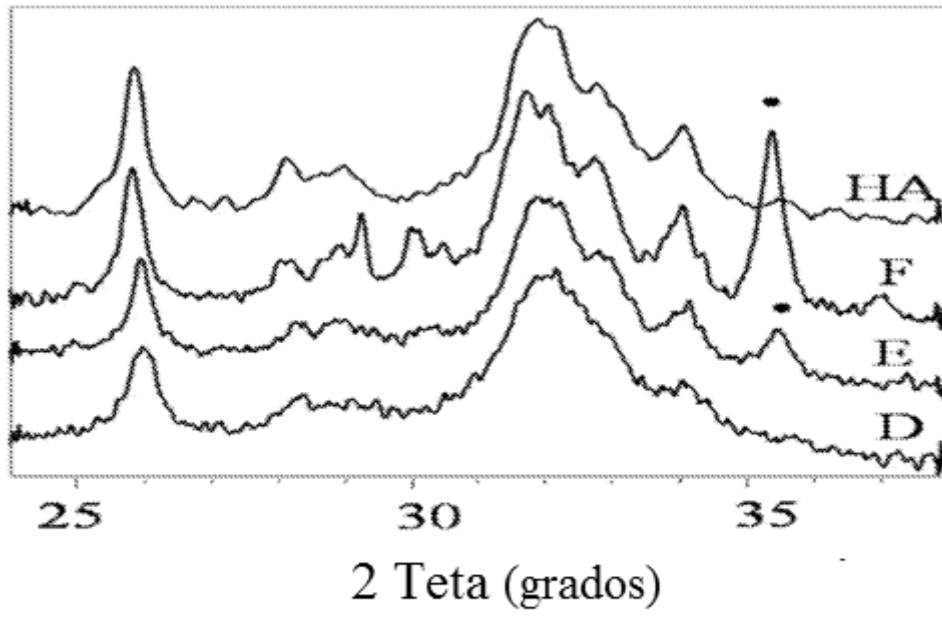


Fig. 3

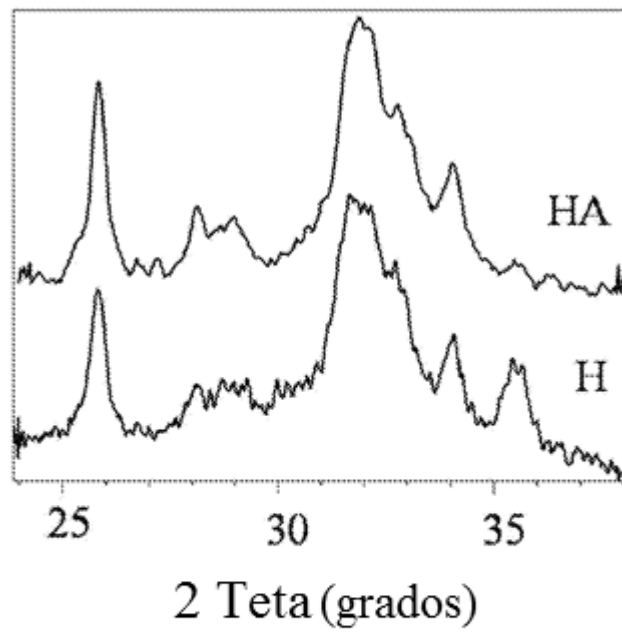


Fig. 4

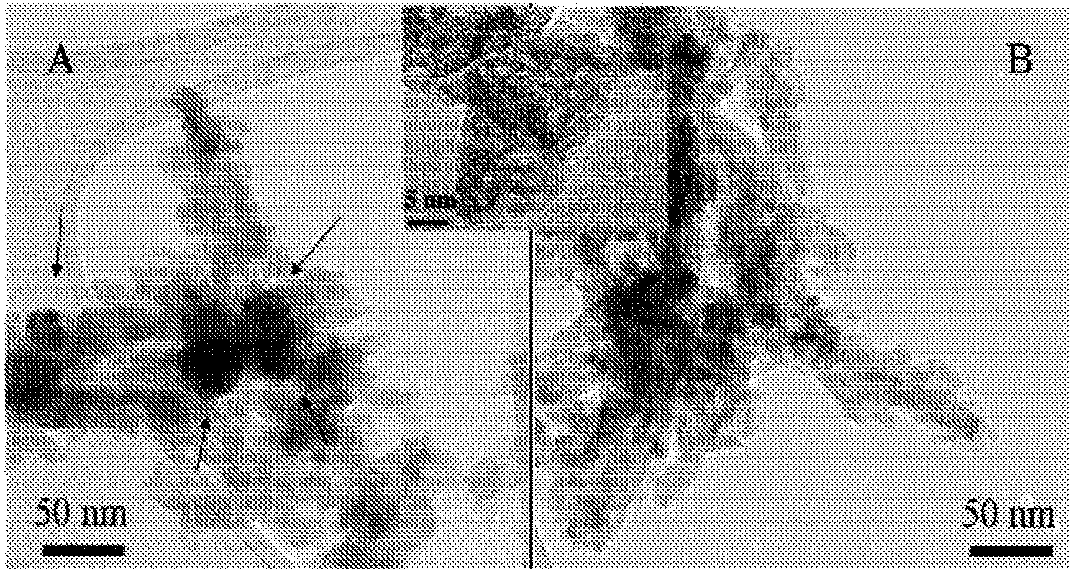


Fig. 5

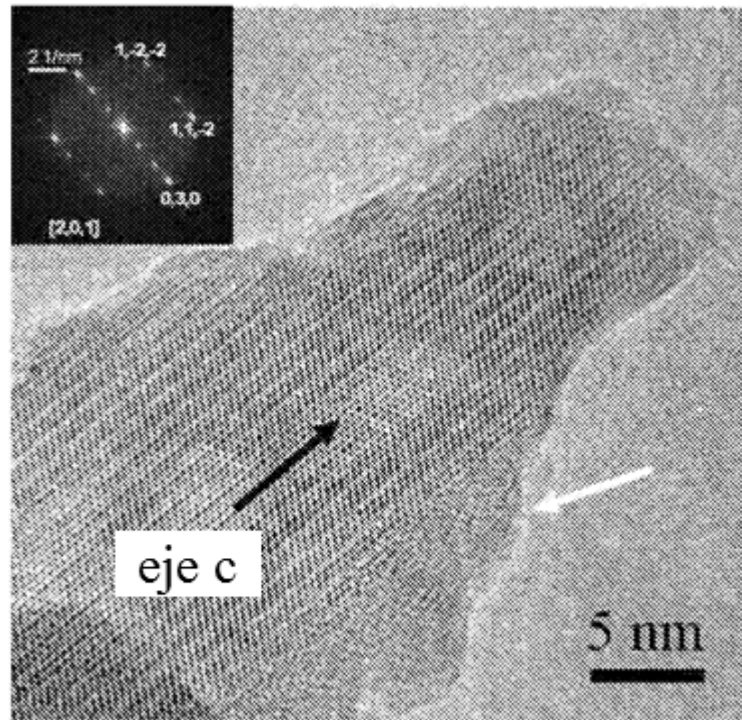


Fig. 6

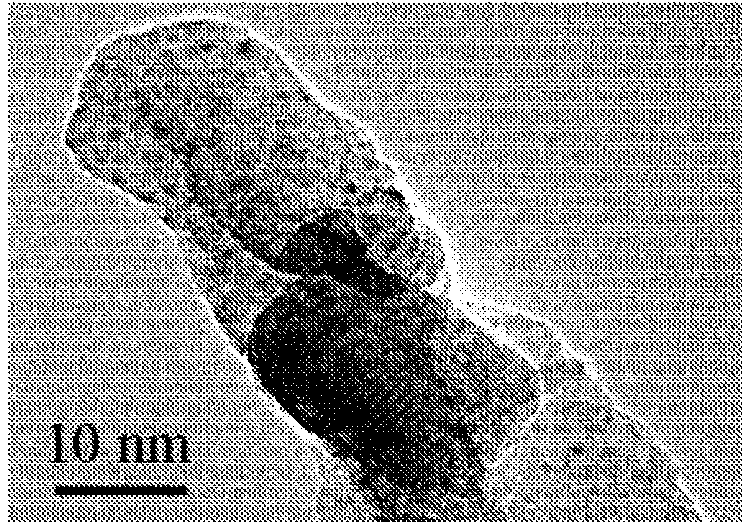


Fig. 7

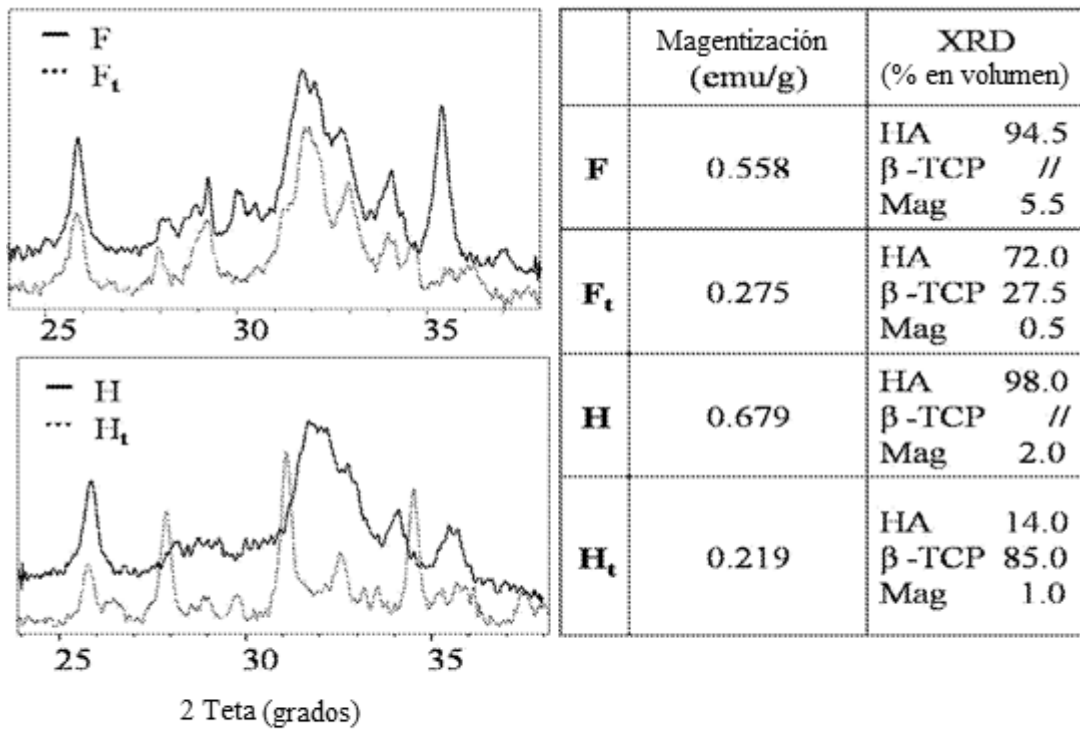


Fig. 8

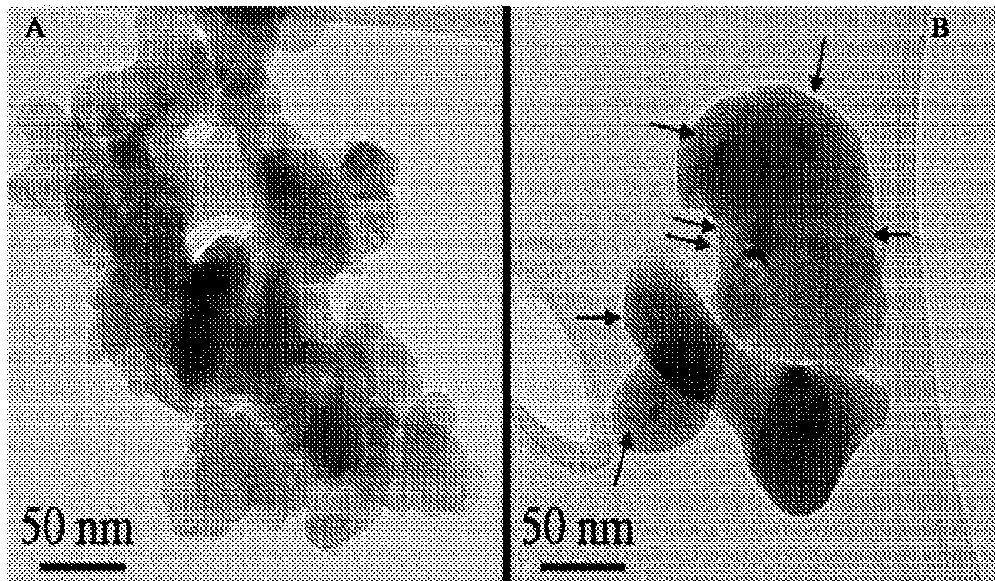


Fig. 9

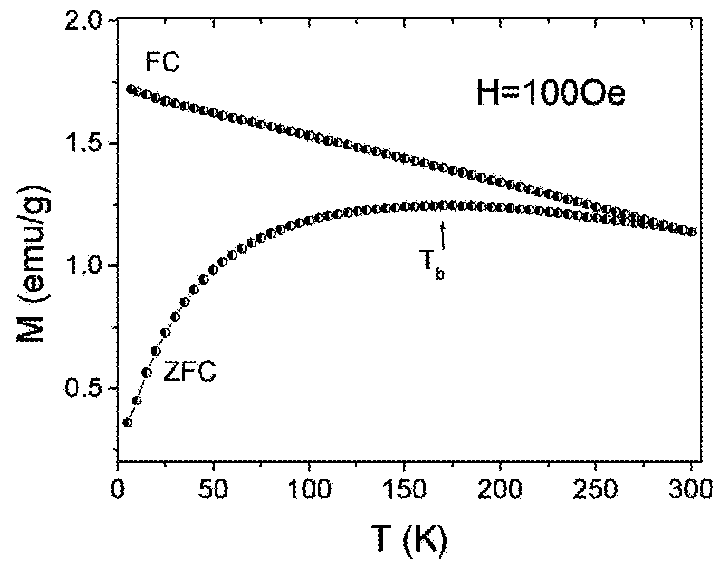


Fig. 10

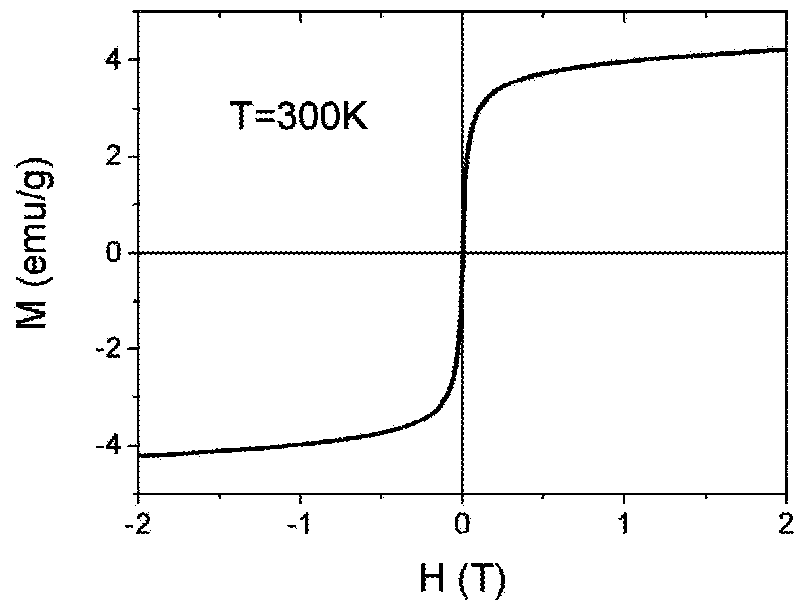


Fig. 11