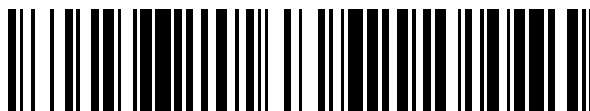


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 736**

51 Int. Cl.:

A61L 27/50 (2006.01)

A61L 27/12 (2006.01)

A61L 27/32 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2014** **PCT/NL2014/050491**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2015** **WO15009154**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2014** **E 14750018 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018** **EP 3021878**

54 Título: **Método para producir un fosfato de calcio osteoinductivo y productos que se obtienen de este modo**

30 Prioridad:

18.07.2013 NL 2011195

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

23.04.2018

73 Titular/es:

KUROS BIOSCIENCES B.V. (100.0%)
Prof. Bronkhorstlaan 10 G 48
3723 MB Bilthoven, NL

72 Inventor/es:

DE GROOT-BARRERE, FLORENCE;
VAN MIEGEM, VINCENT;
YUAN, HUIPIN y
DE BRUIJN, JOOST

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 664 736 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

Método para producir un fosfato de calcio osteoinductivo y productos que se obtienen de este modo

Campo de la invención

La invención se refiere a un tratamiento superficial para fosfatos de calcio que se usan como un material de injerto óseo en medicina regenerativa, y a fosfatos de calcio osteoinductores que se obtienen mediante tales tratamientos, según se define en las reivindicaciones adjuntas.

Antecedentes de la invención

Los sustitutos óseos sintéticos deben ser biocompatibles, osteoconductivos, y compatibles mecánicamente con hueso nativo para que se usen con éxito en configuraciones clínicas. Se alcanzaron mejoras adicionales del material mediante crecimiento más rápido del hueso e incluso estimulación de la capacidad de formación de hueso del cuerpo, o inducción ósea. Esta propiedad del material de implante se refiere a su capacidad de inducir osteogénesis, o el mecanismo que activa a las células madre para que se diferencien en osteoblastos formadores de hueso.

La osteoinducción se informa a partir de un grupo de cerámicas de fosfato de calcio, que incluye hidroxiapatita (HA), β -fosfato tricálcico (β -TCP), fosfato de calcio bifásico (BCP), que determina la mezcla de HA y TCP, fosfato dicálcico anhidro (DCPA), fosfato dicálcico dihidratado (DCPD), apatita carbonatada, pirofosfato cálcico (CPP) y mezclas (CC) de HA/carbonato de calcio. A pesar de que hasta la fecha un análisis exhaustivo describe a los materiales como osteoinductivos, aún no resulta posible describir como debería designarse y producirse con exactitud un material osteoinductivo. Lo que es claro es que la capacidad osteoinductiva puede determinarse de la mejor manera mediante implante heterotópico, a saber, implante en los tejidos u órganos en los que el hueso no crece en forma natural, tales como mediante implante ectópico (a saber, implante intramuscular o implante subcutáneo).

En general, se han encontrado ciertos fosfatos de calcio porosos que exhiben osteoinductividad. Por ejemplo, Yamasaki *et al.*, en *Biomaterials* 13:308-312 (1992), describe la ocurrencia de osificación heterotópica (formación de hueso nuevo en el tejido que normalmente no se osifica) alrededor de gránulos de cerámica de hidroxiapatita porosa, pero no alrededor de gránulos densos. Los gránulos porosos varían en tamaño desde 200 a 600 μm , y tienen una microporosidad continua e interconectada a partir de la que los poros varían en diámetro desde 2 a 10 μm .

El documento US nro. 6,511,510 describe un fosfato de calcio biocompatible y biodegradable que exhibe osteoinductividad mejorada con respecto a los gránulos de hidroxiapatita porosa de Yamasaki *et al.* El fosfato de calcio biodegradable tiene una porosidad total del 20 al 90%, y abarca tanto macroporos que varían en tamaño desde 0,05 a 1,5 mm como microporos que varían en tamaño desde 0,05 a 20 μm . El material de fosfato de calcio biodegradable se produce mediante fundición en molde y los bloques pueden granularse posteriormente o cortarse en partículas más pequeñas. El material, una vez que se implanta, resulta adecuado para funcionar como un sustituto (temporal) para el hueso.

El documento WO 2010/149296 describe un material sustituto del hueso que comprende un núcleo de fosfato tricálcico sinterizado y una capa de hidroxiapatita nanocristalina en la parte superior del núcleo sinterizado. Los nanocristales tienen el mismo tamaño y morfología que el mineral de hueso humano, a saber, una longitud de 30 a 46 nm y un ancho de 14 a 22 nm. La capa de hidroxiapatita se forma mediante la inmersión del material del núcleo de fosfato tricálcico sinterizado en una solución acuosa a una temperatura que oscila entre 10 y 50°C. A pesar de la disponibilidad de los materiales anteriores, resultaría ventajoso que los biomateriales para usarse en relación con los tejidos vivos pudieran ser provistos con aun mejores propiedades osteoinductivas y osteoconductivas, a saber, que resultara en una formación de hueso aún más veloz y de mayor profundidad. Resultaría ventajoso, además, si tales materiales osteoinductivos se pudieran introducir de manera más sencilla en el cuerpo del animal, más preferiblemente, de manera tal que proporcione un material de andamio que se implante de manera más sencilla y efectiva para la producción de hueso nuevo en ambos tejidos óseo y no óseo. Tal material se usaría mucho más para la producción de hueso autólogo *de novo*, que podría usarse posteriormente como hueso sustituto para la reparación de defectos óseos grandes.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un material de fosfato de calcio que tiene excelentes propiedades osteoinductivas.

En especial, la presente invención proporciona un método para tratar fosfatos de calcio, en particular, fosfatos de calcio sinterizados, cuyo método de tratamiento reproduce el material, y en especial, su superficie, con mayor osteoinductividad con respecto al material que no se trata.

La presente invención proporciona ahora un método para la producción de un material de fosfato de calcio osteoinductivo, comprendiendo el método las etapas de provisión de un material de fosfato de calcio bifásico sinterizado (BCP), de partida de β -fosfato tricálcico e hidroxiapatita, en el que el BCP comprende el 4-20% en peso de

- 5 hidroxapatita, teniendo el material de partida de BCP sinterizado una topografía superficial que consiste de granos de fosfato de calcio, sometándose el material de partida de fosfato de calcio bifásico sinterizado a un tratamiento hidrotérmico a una temperatura equivalente a o mayor que 125°C de duración suficiente para cambiar los granos de fosfato de calcio en la superficie del material de partida en agujas de fosfato de calcio. En una realización preferida de un método de la invención, el material de partida de fosfato de calcio previo al tratamiento hidrotérmico tiene un tamaño de grano promedio que varía de 0,1-3,0 μm , más preferiblemente de 0,2-2,5 μm , más preferiblemente, el tamaño de grano medio es de aproximadamente 0,5-2,2 μm , 0,75-1,5 μm .
- 10 Una característica preferida del material antes y después del tratamiento es su porosidad.
- Otra característica preferida del material antes y después del tratamiento es que exhibe macroporosidad (poros que varían en tamaño desde 0,1 a 1,5 mm).
- 15 El tratamiento hidrotérmico cambia los granos de fosfato de calcio en la superficie del material de partida en agujas de fosfato de calcio. El cambio en la topografía superficial de la forma de grano a la forma de aguja se asocia con un aumento en el área superficial específica y en el área porosa total; por consiguiente, la capacidad superficial de adsorción de proteína aumenta de manera considerable debido al tratamiento hidrotérmico, según se describe en el presente documento.
- 20 En una realización preferida de un método de la invención, el área porosa total del material de partida de fosfato de calcio aumentará en al menos el 10-65% luego del tratamiento hidrotérmico en comparación con un material de control que no se trata. El área porosa total puede medirse mediante intrusión de mercurio y expresarse en m^2/g .
- 25 En incluso otra realización preferida de un método de la invención, el área porosa total del material de partida de fosfato de calcio aumentará en al menos el 100% luego del tratamiento hidrotérmico en comparación con un material de control que no se trata.
- 30 En incluso otra realización preferida de un método de la invención, la capacidad de adsorción de proteína del material de partida de fosfato de calcio aumenta en al menos el 10-50% luego del tratamiento hidrotérmico en comparación con un material de control que no se trata. La capacidad de adsorción de proteína puede determinarse mediante la determinación de la cantidad de proteínas de suero o albúminas que se adsorben luego de la incubación a 37°C y la medición de la cantidad de proteína que permanece en la solución luego de la incubación con una cantidad predeterminada del material de fosfato de calcio durante un período de tiempo predeterminado. Las proteínas pueden medirse espectrofotométricamente mediante el uso, por ejemplo, de un ensayo con ácido bicinónico (BCA).
- 35 En incluso otra realización preferida de un método de la invención, la capacidad de adsorción de proteína del material de partida de fosfato de calcio aumenta en al menos el 50% luego del tratamiento hidrotérmico en comparación con un material de control que no se trata.
- 40 La presente invención proporciona en otro aspecto un material de fosfato de calcio osteoinductivo que puede obtenerse mediante un método de acuerdo con la invención según se describe anteriormente. Tal fosfato de calcio osteoinductivo tiene preferiblemente una capacidad de adsorción de proteína superior en al menos un 40% con respecto al material de partida que no se trata. Se cree que esta capacidad de adsorción de proteína aumentada se asocia con el aumento
- 45 del área superficial específica que tiene lugar a partir del tratamiento. De hecho, el tratamiento puede duplicar el área superficial específica del material de fosfato de calcio.
- Un material de fosfato de calcio osteoinductivo de la presente invención que tiene topografía superficial de tipo aguja tal como la que puede obtenerse, por ejemplo, mediante un método como el que se describe anteriormente, tiene tanto
- 50 un área superficial específica como un área porosa total que son mayores con respecto a las de un material de referencia de composición similar pero que comprende una topografía superficial de tipo grano. En especial, un material osteoinductivo mejorado de la invención tiene un área porosa total de preferiblemente al menos 1,8 m^2/g . Más preferiblemente, el material osteoinductivo mejorado de la invención tiene un área porosa total de al menos 1,85 m^2/g , más preferiblemente, al menos 1,9 m^2/g , incluso más preferiblemente, al menos 2,0 m^2/g , más preferiblemente mayor que 2,5, 2,8, 3,0, 3,5, 4,0 o 4,5 m^2/g , según se determina mediante intrusión de mercurio. En especial, un
- 55 material osteoinductivo mejorado de la invención tiene un área superficial específica de preferiblemente al menos 0,7 m^2/g . Más preferiblemente, el material osteoinductivo mejorado de la invención tiene un área superficial específica mayor que 0,9 m^2/g , más preferiblemente mayor que 1,0, 1,5, 2,0 o 3,0 m^2/g según se determina mediante BET.
- 60 Un material de fosfato de calcio osteoinductivo de la presente invención que tiene topografía superficial de tipo aguja tal como la que puede obtenerse, por ejemplo, mediante un método como el que se describe anteriormente, tiene una capacidad de adsorción de proteína mayor con respecto a la de un material de referencia de composición similar pero que comprende una topografía superficial de tipo grano. En especial, un material osteoinductivo mejorado de la invención tiene una capacidad de adsorción de proteína de preferiblemente al menos 1,0-3,0 mg de proteínas en suero por cc de material (a partir de 2 ml de FBS al 1%), o al menos 1000-3500 μg de BSA por cc de material (a partir de 2
- 65 ml de 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BSA).

El material de fosfato de calcio osteoinductivo que se obtiene mediante métodos de esta invención puede tener una cantidad más elevada o más baja de hidroxiapatita con respecto al material de partida de fosfato de calcio, preferiblemente mayor. Un material de partida de fosfato de calcio bifásico que comprende el 10% de hidroxiapatita puede exhibir una cantidad mayor al 30% de hidroxiapatita luego del tratamiento hidrotérmico.

Un material de fosfato de calcio osteoinductivo que se obtiene mediante un método de la presente invención es, en una realización preferida, una cerámica de fosfato de calcio bifásico (BCP), que comprende preferiblemente del 5 al 65%, tal como el 50%, de hidroxiapatita (HA), y del 35 al 95%, tal como el 50% de fosfato β -tricálcico (β -TCP).

El material de fosfato de calcio osteoinductivo que se obtiene mediante un método de la presente invención tiene una topografía superficial de tipo aguja. El tamaño de estas agujas consiste normalmente de un diámetro de 10-1500 nm. El material es, además, preferiblemente poroso.

El material producido mediante métodos de la invención muestra excelente comportamiento osteoinductivo en tejido vivo, debido principalmente a su sobresaliente capacidad de adsorción de proteína. La formación de tejido óseo en la superficie del material de la invención contribuye a una aceptación favorable de un implante que se constituye a partir de dicho material. Además, la formación de tejido óseo acelera la recuperación de cualquier daño en la estructura ósea, que constituye la razón por la que se aplica el implante.

La cerámica de fosfato de calcio osteoinductivo de la presente invención tiene normalmente un área porosa total que resulta ser 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 o incluso 3 veces mayor con respecto al material de partida de la cerámica de fosfato de calcio correspondiente con anterioridad al tratamiento hidrotérmico. El área porosa total, según se mide mediante intrusión de Hg, de una cerámica de fosfato de calcio de la presente invención que tiene topografía superficial de tipo aguja puede alcanzar un tamaño de 1,8, 1,9, 2, 2,5, 2,7, 3,0, 3,5, 3,8 o incluso 4,0 m²/g, o más grande.

La cerámica de fosfato de calcio osteoinductivo de la presente invención tiene normalmente un área superficial específica (BET) que resulta ser 0,5, 1, 1,5 o incluso 2 veces mayor con respecto al material de partida de la cerámica de fosfato de calcio correspondiente con anterioridad al tratamiento hidrotérmico. El Área Superficial Específica, según se mide mediante BET, de una cerámica de fosfato de calcio de la presente invención que tiene topografía superficial de tipo aguja puede alcanzar un tamaño de 1,25, 1,4, 1,5, 2, 2,4, o incluso 2,5 m²/g, o más grande.

En incluso otra realización preferida del material de la invención, la densidad de las agujas de apatita es menor que 0,45/ μ m².

En otro aspecto, la presente invención se refiere al fosfato de calcio osteoinductivo de la invención para uso como un material de implante médico o andamio tisular.

Un fosfato de calcio osteoinductivo de la invención puede usarse de manera adecuada para inducir la formación de tejido óseo en un organismo vivo, como un material de implante por separado o en combinación con factores de crecimiento y/o células para la producción de hueso autólogo en un sitio no óseo o para la producción de un implante o dispositivo médico por separado o en combinación con factores de crecimiento y/o células.

Un fosfato de calcio osteoinductivo de la invención puede usarse de manera adecuada en la reconstrucción ósea tal como, por ejemplo, en cirugía maxilofacial, o cirugía ortopédica.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un revestimiento de fosfato de calcio osteoinductivo que comprende una capa externa que comprende agujas de hidroxiapatita y, de manera opcional, una capa interna que se encuentra en contacto con la capa externa.

En otra realización preferida del revestimiento de la invención, las agujas de hidroxiapatita tienen un diámetro promedio de entre 10-1500 nm.

En incluso otra realización preferida del revestimiento de la invención, la densidad de las agujas de hidroxiapatita de la capa externa es menor que 0,45 agujas/ μ m².

En todavía otra realización preferida del revestimiento de la invención, el espesor de la capa externa varía de entre 1 y 1000 μ m. En este aspecto de la invención, la capa interna comprende un BCP sinterizado de β -fosfato tricálcico e hidroxiapatita, en la que el fosfato de calcio bifásico comprende entre el 4-20% en peso de hidroxiapatita. En otra realización preferida del revestimiento de la invención, el revestimiento tiene un área superficial específica BET por encima de 0,9 m²/g.

En incluso otra realización preferida del revestimiento de la invención, la capa externa es un precipitado de hidroxiapatita a partir del BCP de la capa interna luego del tratamiento hidrotérmico de este último a una temperatura equivalente a o mayor que 125°C.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un objeto que puede implantarse que comprende el revestimiento de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores del revestimiento de la invención.

5 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra imágenes SEM de (a) T1050, (b) T1125, (c) T1150, (d) T1050a, (e) T1125a, and (f) T1150a. Las imágenes (d) – (f) son cerámicas que se trataron con configuraciones “calientes/largas”. En el presente documento no se informan imágenes de cerámicas tratadas con tratamiento “frío/corto” ya que no ocurrió ningún cambio en la topografía superficial.

La Figura 2 (izquierda) muestra adsorción de proteína de suero (en μg por cc) y (derecha) adsorción de proteína de albúmina (en μg por cc).

La Figura 3 muestra información histológica de (a) T1050, (b) TCP de control negativo, (c) T1050a y (d) T1125a. El material es de color negro, el hueso se tiñe de rosa y los tejidos/músculo blando se tiñen de violeta.

La Figura 4 muestra el solapamiento de imágenes fluorescentes y luminosas en el mismo punto de (a) T1050 (material del arte previo), (b) T1050a (de acuerdo con la invención) y (c) T1125a (de acuerdo con la invención). El verde brillante representa calceína que tiñe tejido óseo (que se indica mediante estrellas). El TCP de control negativo no se muestra en el presente documento ya que no ocurrió formación ósea.

La Figura 5 muestra la topografía superficial de tipo aguja de un material o revestimiento de la invención.

La Figura 6 muestra una sección transversal de un material o revestimiento de la invención. El lado izquierdo de la imagen muestra de manera clara una topografía superficial de tipo aguja (la capa externa), mientras que el lado derecho de la imagen muestra el BCP (capa interna).

Descripción detallada de la invención

Los términos “partícula” y “gránulo” se usan de manera indistinta en el presente documento, y se usan en el presente documento para indicar formas en polvo o granulares del material de fosfato de calcio. Las partículas pueden tener un tamaño promedio que varía de 0,1 a 5 mm. Una micropartícula es una partícula que tiene un tamaño menor que 1 mm (a saber, de varios a varios cientos de micrómetros).

El término “cristal” se usa para indicar los elementos de fosfato de calcio que se reconocen individualmente y se interconectan en las micrografías SEM y cuyos elementos forman la matriz continua del fosfato de calcio. El término “cristal” se refiere, de manera general, a la estructura espacial básica de las moléculas de fosfato de calcio luego del procedimiento de cristalización, tal como precipitación. El término “cristal” incluye tanto los granos como las agujas según se define en el presente documento.

Los términos “grano” y “de tipo grano” se usan para indicar que los cristales de fosfato de calcio tienen una naturaleza o morfología globular definiendo así la topografía superficial del material de fosfato de calcio. Las Figuras 1a-c proporcionan ejemplos de topografías superficiales de tipo grano del fosfato de calcio, a saber, en los que los cristales consisten esencialmente de granos. Los granos tienen, de manera general, un tamaño promedio que varía de 0,1-5,0 μm .

Los términos “aguja” y “de tipo aguja” se usan para indicar que los cristales de fosfato de calcio tienen una naturaleza o morfología espinal definiendo así la topografía superficial del material de fosfato de calcio. Las Figuras 1d-f proporcionan ejemplos de una topografía superficial de tipo aguja del fosfato de calcio, a saber, en los que los cristales consisten esencialmente de agujas. Las estructuras de tipo pétalo u hoja no se incluyen en el término de tipo aguja, ya que dicho término se limita preferiblemente a una estructura prismática poligonal o cilíndrica que tiene una longitud de más de 1,5, 3, 4, 5, 6, 10, 20, 50 o 100 veces su diámetro (10-1500 nm).

El término “partículas que tienen formas irregulares” se refiere a que las partículas de un polvo de fosfato de calcio (que puede tener una estructura granulada por su cuenta) no son esféricas.

El término “BCP”, según se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto de β -TCP e hidroxiapatita (proporción Ca/P de 1,5 – 1,67). En otras palabras, el término “BCP” se refiere a un compuesto de β -TCP e hidroxiapatita, que comprende del 1-99% en peso de hidroxiapatita, y, de manera correspondiente, del 99-1% en peso de β -TCP, en base al peso del fosfato de calcio. De este modo, el término “BCP”, según se usa en el presente documento, incluye todas las combinaciones posibles de hidroxiapatita y β -TCP dentro de la variación del porcentaje en peso según se indica anteriormente.

El término “apatita”, según se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera de un grupo de minerales de fosfato de calcio que se indica mediante la fórmula química estequiométrica repetitiva $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, y cualquier otra apatita no estequiométrica y/o deficiente debido a sustituciones parciales del grupo OH mediante, por ejemplo, F^- , Cl^-

, CO_3^{2-} , HCO_3^- , o cualquier otro anión y/o la sustitución parcial del grupo PO_4 mediante, por ejemplo, HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , HCO_3^- , o cualquier otro anión y/o la sustitución parcial de Ca^{2+} mediante, por ejemplo, Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Na^+ , o cualquier otro catión (Elliot, J.C., 1994. Structure and Chemistry of the Apatites and other Calcium Orthophosphates, Amsterdam: Elsevier). Estas sustituciones parciales conducen a una variación en la proporción Ca/P.

El término “área superficial específica” indica el área superficial de las partículas de CaP según se determina por el análisis BET. Con el método Brunauer, Emmett y Teller (BET) (J. Am. Chem. Soc., 1938, 60, 309), se estima el área superficial de un polvo a partir de la cantidad de gas que se adsorbe en relación con su presión, a la temperatura de ebullición de gas líquido bajo presión atmosférica normal y se expresa en m^2/gramo .

El término “área porosa total” indica el volumen accesible de líquidos (por ejemplo, fluidos biológicos, células) que pueden fluir a través del implante (a saber, a través de las partículas de CaP). Este área porosa total disponible se determina mediante intrusión de mercurio, usando el modelo de poro cilíndrico (que se divulga en "An Introduction to the Physical Characterization of Materials by Mercury Intrusion Porosimetry with Emphasis on Reduction and Presentation of Experimental Data," Paul A. Webb, pp 1-22, Micromeritics Instrument Corporation, Norcross, GA, Enero 2001) y se expresa en m^2/gramo .

El término “adsorción de proteína” indica la cantidad de proteína que se adsorbe por un volumen de 1cc del fosfato de calcio cuando se sumerge en 2 ml de una solución acuosa que contiene suero fetal bovino (FBS) al 1% y 25 ppm de NaN_3 , o 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de albúmina fetal bovina (BSA) y 25 ppm de NaN_3 , luego de la incubación a 37°C durante 24 horas, en el que la cantidad que se absorbe es 100% menos el porcentaje que permanece en la solución y a partir del cual se determina el contenido de proteína antes y después del contacto con el fosfato de calcio, usando, por ejemplo, un BCA™ Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA).

El término “sinterización” y “sinterizado” se refiere a un proceso de tratamiento térmico del CaP esencialmente a temperaturas que exceden los 1000°C , tales como entre 1000°C y 1300°C , preferiblemente, entre 1050°C y 1275°C . El procedimiento de sinterización da como resultado la densificación del material de fosfato de calcio. Dependiendo del aumento en la densidad que se requiere, el procedimiento de sinterización puede realizarse con una duración de 1-10 horas.

El término “capa externa”, según se usa en el presente documento, se refiere a una capa de un revestimiento osteoinductivo que comprende agujas de apatita, en la que las agujas de apatita se fijan a o se depositan en una base de material del núcleo y una superficie de fijación o depósito, y en el que entre la base de material del núcleo y la capa externa, se posiciona una capa interna, y en el que la parte de la capa externa opuesta con respecto a la base de material del núcleo forma la superficie del revestimiento que se expone al tejido cuando se implanta en un cuerpo humano o animal.

El término “capa interna”, según se usa en el presente documento, se refiere a una capa de un revestimiento osteoinductivo que comprende, o, preferiblemente, consiste de BCP y en el que la capa interna se contacta con la capa externa. La capa interna se ubica más hacia el núcleo de la cerámica en comparación con la capa externa. En algunos ejemplos menores, la capa interna puede exponerse al medio ambiente como un resultado de una fragmentación granular o como un resultado de un obstáculo físico durante el tratamiento hidrotérmico (por ejemplo, algunas partes de los gránulos en contacto con la placa de vidrio no conducirán a la formación de agujas de apatita).

El pretratamiento del material de fosfato de calcio

Un material de partida útil para aspectos de la presente invención y susceptible a un aumento de la capacidad osteoinductiva mediante un método de la presente invención se caracteriza por ser un fosfato de calcio sinterizado que tiene una topografía superficial que consiste esencialmente de granos de fosfato de calcio. De este modo, bajo observación microscópica, la estructura de la matriz de fosfato de calcio no es en sí misma lisa sino granulosa, en la que el material estructural se organiza de manera estructural en la forma de granos empaquetados.

El material de partida comprende preferiblemente macroporos. El material de partida tiene preferiblemente una estructura esencialmente porosa, abierta, en la que los poros individuales se interconectan mediante aberturas o espacios. El material o revestimiento de la presente invención es preferiblemente poroso, tanto antes como después del tratamiento hidrotérmico. Se prefiere limpiar el material (por ejemplo, por ultrasonido) antes del tratamiento hidrotérmico. El material de partida de fosfato de calcio sinterizado es preferiblemente poroso. El material de partida de fosfato de calcio sinterizado puede comprender microporos en realizaciones, pero en realizaciones preferidas, este no comprende microporos (poros $<5 \mu\text{m}$).

La apatita es una hidroxiapatita.

La persona capacitada en la técnica conoce que una apatita puede ser imperfecta, por ejemplo, al ser baja, o incluso deficiente, en calcio e iones hidróxido, pero rica en impurezas sustitutivas. En el presente contexto, cuando se usa el término “hidroxiapatita”, se hace referencia a una apatita que es esencialmente una hidroxiapatita, pero que permite impurezas. Un ejemplo de una impureza como tal lo constituye la presencia de uno o más grupos químicos de flúor

y/o cloro en la hidroxiapatita. De este modo, el término "hidroxiapatita" según se usa en el presente documento, incluye una apatita que es esencialmente una hidroxiapatita, pero que comprende además una o más fluorapatitas, cloroapatitas, apatitas carbonatadas, apatitas deficientes en calcio y/o no estequiométricas.

Los materiales de partida según se usan en el presente documento son fosfatos de calcio que comprenden esencialmente al menos el 60% en peso, más preferiblemente, al menos el 70% en peso, e incluso más preferiblemente al menos el 80% en peso de β -TCP. El material de partida de fosfato de calcio comprende además aproximadamente del 4-20% en peso de hidroxiapatita, en base al peso del fosfato de calcio. Un BCP que resulta útil como un material de partida puede resultar adecuado como un BCP que se obtiene mediante precipitación a partir de una solución acuosa a baja temperatura o mediante un procedimiento a temperatura elevada (térmico).

Los métodos para producir materiales de partida de CaP pueden comprender las etapas de provisión de una suspensión acuosa de un polvo de fosfato de calcio, un agente formador de espuma y, de manera opcional, un agente porogénico en agua; sometiendo la suspensión a condiciones de formación de espuma a partir de dicha suspensión; secado de la suspensión espumosa resultante y, de manera opcional, retiro del agente porogénico, y sinterización de la suspensión espumosa y seca para obtener, de manera opcional, una cerámica de fosfato de calcio sinterizado, poroso. El método puede continuar, de manera opcional, con las etapas de fresado de la cerámica de fosfato de calcio sinterizado a partículas y recolección de las partículas que tienen un tamaño de partícula deseado.

Los materiales de partida de CaP para uso en métodos de la presente invención son materiales sinterizados, lo que significa que pueden estar sometidos, preferiblemente, a temperaturas que exceden los 1000°C.

Los materiales de partida de CaP adecuados pueden producirse, por ejemplo, mediante mezclas acuosas maduras de nitrato de calcio tetrahidratado y hidrógenofosfato de diamonio a pH elevado, seguidas de cubrimiento de polvo del depósito resultante, lo que crea porosidad en la presencia de un agente formador de poros tal como peróxido de hidrógeno, y sinterización de los cuerpos verdes resultantes. Tales métodos se describen, por ejemplo, en US 6,511,510. Preferiblemente, los fosfatos de calcio de la presente invención se forman mediante un procedimiento que involucra la sinterización de un fosfato de calcio sin sinterizar (cuerpo verde) a una temperatura que oscila entre 800°C y 1300°C, preferiblemente entre 1000°C y 1275°C, más preferiblemente entre 1050°C y 1200°C, de manera opcional bajo presión. Preferiblemente, la sinterización se lleva a cabo a una temperatura entre 1075°C y 1175°C, 1100°C y 1150°C. La duración de la etapa de sinterización puede elegirse y optimizarse de manera adecuada para dar como resultado la mejor topografía superficial de tipo aguja luego del tratamiento hidrotérmico, preferiblemente de entre, por ejemplo, 4 y 10 horas, preferiblemente de entre 6 y 9 horas.

Las propiedades del producto de partida de CaP pueden ajustarse mediante la selección específica de combinaciones de temperatura, presión y materiales de partida de fosfato de calcio. Por ejemplo, la HA pura se forma mediante el uso de una apatita con una proporción de CaP de 1,67, mientras que el TCP se forma mediante el uso de una apatita con una proporción de CaP de 1,5. La presente invención se refiere, sin embargo, a proporciones de CaP que varían de entre 1,51 y 1,66 (valores límites incluidos), lo que da como resultado una hidroxiapatita-TCP combinada, cerámica que se denomina BCP y puede, por ejemplo, sinterizarse para proporcionar cerámica de CaP con diferentes cantidades de hidroxiapatita, y TCP.

Los parámetros de sinterización pueden elegirse para ajustar la macroporosidad del material de partida. La macroporosidad de las cerámicas pueden deberse, en algunas realizaciones de un método para su producción, a espacios generados entre las partículas sinterizadas, que, a su vez, se influencia mediante la cristalización del CaP o el agente porogénico que se usa. Los parámetros de sinterización pueden elegirse, además, para ajustar el tamaño de grano del material de partida. El tamaño de grano de las cerámicas puede deberse, en algunas realizaciones de un método para su producción, a una transformación de fase del cuerpo verde debida a la sinterización, que, a su vez se influencia mediante el tiempo de sinterización y la temperatura de sinterización.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, el material de partida de CaP se constituye a partir de cristales o granos interconectados. En una realización preferida, el tamaño de los granos varía preferiblemente entre 50 y 3000 nm o 0,05 y 3 μm , más preferiblemente, entre 0,1 y 2 μm , incluso más preferiblemente, entre 0,1 y 1,5 μm , y todavía más preferiblemente entre 0,5 y 2,5 μm . El material de partida es preferiblemente BCP. El material de partida de BCP se encuentra preferiblemente en la forma de un polvo que tiene un tamaño de gránulo o partícula en el rango de 50 a aproximadamente 5500 μm , preferiblemente, 500-1500 μm , o 1000-4000 μm .

El procedimiento de tratamiento hidrotérmico

En resumen, un método para producir una cerámica de fosfato de calcio sinterizado con rendimiento osteoinductivo mejorado y que se basa en topografía superficial de tipo aguja puede llevarse a cabo de la siguiente manera:

En una realización altamente preferida de un fosfato de calcio sinterizado, la primera etapa consiste en proporcionar una cerámica de fosfato de calcio sinterizado como un material de partida. En una realización preferida como tal, se pueden proporcionar una suspensión acuosa de un polvo de fosfato de calcio, un agente formador de espuma, y un agente porogénico en un solvente. La suspensión puede ser luego sometida a condiciones a partir de las cuales se

forma espuma de dicha suspensión. Posteriormente, la suspensión espumosa resultante puede ser presecada y se puede retirar el agente porogénico mediante sinterización previa. Luego, los cuerpos verdes presecados y espumosos se sinterizan para obtener una cerámica de fosfato de calcio sinterizado, luego de que los cuerpos verdes se hayan fresado o triturado en partículas más pequeñas, de manera opcional. Finalmente, el material de partida de cerámica de fosfato de calcio sinterizado (que puede fresarse o triturarse en partículas más pequeñas, de manera opcional) se somete luego al tratamiento hidrotérmico para impulsar el desarrollo de las agujas de CaP en la superficie de la cerámica, obteniendo así una cerámica de fosfato de calcio sinterizado con superficie de tipo aguja. Según se indica, si los cuerpos verdes sin fresar se someten a sinterización y tratamiento hidrotérmico, el método puede continuar con las etapas de fresado de dicha cerámica de fosfato de calcio en gránulos y recolección de gránulos en diversas fracciones de tamaño de gránulo, de manera opcional. Se comprenderá que debido a que el tratamiento hidrotérmico constituye esencialmente un tratamiento superficial del fosfato de calcio sinterizado, a fin de obtener partículas con osteoinductividad mejorada, se prefiere la provisión de partículas de un tamaño de partícula deseado antes de la etapa de tratamiento hidrotérmico para modificar la superficie de dichas partículas, para proporcionar así las partículas de la invención.

Como se mencionó, la preparación de un cuerpo verde puede comprender de manera adecuada la formación de una suspensión de fosfato de calcio (CaP), en la que dicho CaP se prefiere en la forma de un polvo, suspendido en una solución que contiene un agente formador de espuma. La concentración del agente formador de espuma (por ejemplo, H_2O_2) en la solución de agente formador de espuma resulta adecuada en el rango del 0,1% al 10,0% y el solvente es preferiblemente agua. La proporción en la que la solución de agente formador de espuma (por ejemplo, H_2O_2 , 0,1-10,0% en agua) y fosfato de calcio se mezclan para formar la suspensión resulta adecuada entre 1 y 300 mL de solución de agente formador de espuma por 100 g de CaP. La cantidad de agente porogénico (por ejemplo, naftaleno o gránulos de cera, $<2000 \mu m$) que se usa cada 100 g de CaP resulta adecuada entre 0-150 g. El agente porogénico puede suspenderse en un solvente. La proporción en la que dicho solvente y el fosfato de calcio se mezclan resulta adecuada entre 0 y 100 mL de solvente por 100 g de CaP, o la proporción de contenido de dicho solvente en agua resulta adecuada entre 0 y el 50% en volumen. La suspensión puede espumarse luego y secarse a, por ejemplo, 50-120°C y luego presinterizarse a, por ejemplo, 800-1100°C durante 1-6 horas para formar los cuerpos verdes, que se sinterizan luego a, por ejemplo, 1000-1300°C durante 3-12 horas. La composición de esta cerámica es: HA 4-18% y beta-TCP: 96-82%. Las cerámicas de fosfato de calcio sinterizado se tratan luego hidrotérmicamente en agua a 135°C, 99 min y 2-4 bars, se secan a 40-100°C y se fresan para formar gránulos que pueden recolectarse (y proporcionarse) en tamaños diferentes.

El material de partida de CaP según se define anteriormente se somete a tratamiento hidrotérmico que da como resultado la modificación de la topografía superficial del CaP.

El método comprende someter el fosfato de calcio a un tratamiento hidrotérmico a una temperatura mayor que o igual a 125°C, preferiblemente, entre 125-300°C, más preferiblemente, entre 125-200°C, y de mayor preferencia, entre 125-150°C por una duración suficiente para cambiar los granos de fosfato de calcio en la superficie del material en agujas de fosfato de calcio. Particularmente, se prefiere una temperatura del tratamiento hidrotérmico que se encuentra entre 130-140°C, siendo incluso más preferible, alrededor de 135 (+/-2)°C.

El tratamiento hidrotérmico involucra colocar el material de partida de fosfato de calcio en contacto con agua, preferiblemente mediante la inmersión en agua, y someter el material de partida de cerámica de fosfato de calcio a una temperatura entre 125-150°C, preferiblemente, entre 130-140°C, más preferiblemente, alrededor de 135 (+/-2)°C, por una duración de al menos 30 min a, preferiblemente, 2-4 bars durante períodos equivalentes a otras presiones, mientras que el fosfato de calcio permanece en contacto con agua. Preferiblemente, empaparlo con agua no caliente no constituye un tratamiento hidrotérmico según se define en el presente documento. Además, contactar el fosfato de calcio con vapor de agua no constituye preferiblemente un tratamiento hidrotérmico según se define en el presente documento. El tratamiento hidrotérmico abarca preferiblemente la esterilización por autoclave del fosfato de calcio mientras se encuentra en contacto con agua, preferiblemente sumergido en agua. Preferiblemente, la duración del tratamiento hidrotérmico es de al menos 40, 50, 60, 75, 100, 200, 300 o 400 min o de mayor duración a 2-4 bars, o durante períodos equivalentes a otras presiones. Más preferiblemente, el tratamiento comprende someter el material a la temperatura indicada por una duración de aproximadamente 100 min a 2-4 bars.

A continuación del tratamiento hidrotérmico anterior, la característica superficial granular del material de partida de CaP ha cambiado a una característica superficial de tipo aguja que consiste de nanoagujas unidas que cubren la superficie total de los gránulos. El diámetro de estas nanoagujas puede variar en el rango de 10-1500 nm. Con las dimensiones más pequeñas de aproximadamente 10 y 600 nm que derivan a partir de los CaPs de tamaño de grano más pequeño, mientras que el tamaño de las agujas más grandes que varía de entre aproximadamente 400 a 1500 nm se obtiene a partir de los CaPs de tamaño de partícula más grande. Preferiblemente, el diámetro del tamaño de aguja es menor a 800 nm, más preferiblemente, se encuentra entre 100 y 750 nm y, de mayor preferencia, se encuentra entre 200 y 700 nm. El diámetro de aguja promedio de 600-680 nm puede observarse, de manera regular, en el ejemplo de un material que se indica en el presente documento como T1125a.

A partir de la Figura 2 y la Tabla 3 se concluye que el tamaño de grano depende de la temperatura de sinterización. Además, la Figura 2 y la Tabla 3 muestran que el diámetro del tamaño de aguja es mayor cuando la temperatura de

sinterización es mayor, si los parámetros del tratamiento hidrotérmico son constantes. Se encontró que, al ajustar la configuración del tratamiento hidrotérmico, resultar posible obtener un diámetro del tamaño de aguja en el orden de magnitud de una cerámica T1125a (ver Tabla 3) cuando una cerámica T1125a se trata hidrotérmicamente (ver Tabla 3) durante un período de tiempo mayor a una temperatura más elevada. En otras palabras, el tamaño de grano del material de partida sinterizado no determina por sí mismo la cuestión sobre si se obtiene un material o revestimiento osteoinductivo luego de un tratamiento hidrotérmico. Se prevé en el presente documento que los materiales de partida de los materiales y revestimientos de la invención se sinterizan a una temperatura mayor que 1125°C y se someten después a un tratamiento hidrotérmico durante un período de tiempo y a una temperatura que resultan suficientes para obtener un material o revestimiento de la invención que tiene un diámetro de tamaño de aguja según se indica en el párrafo anterior.

En realizaciones preferidas de la presente invención, el material de partida se sumerge por completo en solución acuosa (preferiblemente agua) durante el tratamiento hidrotérmico. De manera alternativa, el método puede realizarse bajo niveles de humedad relativa de aproximadamente el 100%.

Preferiblemente, el tratamiento hidrotérmico comprende someter el material de cerámica de fosfato de calcio a una temperatura entre 130-140°C, más preferiblemente alrededor de 135 (+/- 2)°C.

Preferiblemente, el tratamiento hidrotérmico comprende someter el material de cerámica de fosfato de calcio a la temperatura elevada por una duración de al menos 10 min, preferiblemente, por una duración de al menos 40, 50, 60, 75, 100, 200, 300, 400 min o durante más tiempo. La duración del tratamiento hidrotérmico resulta esencialmente suficiente para cambiar los granos de fosfato de calcio en la superficie del material en agujas de fosfato de calcio. Este cambio puede determinarse mediante SEM.

Preferiblemente, el tratamiento hidrotérmico comprende someter el material de cerámica de fosfato de calcio a la temperatura elevada mientras se encuentra sumergido en agua.

Preferiblemente, el tratamiento hidrotérmico comprende someter el material de cerámica de fosfato de calcio a temperatura elevada por la duración indicada, mientras que el material se encuentra preferiblemente a 2-4 bars. Se pueden usar otras presiones, pero las duraciones deben adaptarse para optimizar la modificación de la superficie de la cerámica de fosfato de calcio. Preferiblemente, para la duración del tratamiento hidrotérmico, el material ocurre a 2-4 bars. En una realización de mayor preferencia, el tratamiento hidrotérmico comprende someter el material a la temperatura indicada por una duración de aproximadamente 100 min a 2-4 bars.

El método de la presente invención se dirige a cambiar la topografía superficial y cambiar así la capacidad osteoinductiva de una superficie de fosfato de calcio. En realizaciones preferidas, el término "superficie" como se denomina en el presente documento, se refiere a la parte superior de 0-1,0 mm según se mide a partir de la parte externa del material de CaP.

El material de fosfato de calcio con osteoinductividad mejorada

A continuación del tratamiento hidrotérmico anterior, la característica superficial granular del material de partida de CaP se ha cambiado a una característica superficial de tipo aguja que consiste de nanoagujas unidas que cubren la superficie de los gránulos. El diámetro de estas nanoagujas puede variar en el rango de 10-1500 nm. Con las dimensiones más pequeñas de aproximadamente 50 a 400 nm que derivan a partir de los CaPs de tamaño de grano más pequeño, mientras que el tamaño de las agujas más grandes que varía de entre aproximadamente 350 a 1100 nm se obtiene a partir de los CaPs de tamaño de grano más grande.

En un material de fosfato de calcio que se obtiene mediante un método de la presente invención, la superficie del material ha cambiado significativamente, mientras que el material subyacente (de mayor profundidad) puede presentarse esencialmente sin cambios. Por lo tanto, en una cerámica de fosfato de calcio mejorado, objeto de la presente invención, el 80% de los granos dentro del material pueden no cambiar, mientras que esto ocurre principalmente en la subsuperficie de los granos (>en profundidad que 1,0mm-1 cm a partir de la superficie).

Las cerámicas de fosfato de calcio mejorado de la invención tienen una topografía superficial de cristales de tipo aguja con diámetros en un rango de 0,01-1,50 μm , más preferiblemente 50-1250 nanómetros.

Los materiales de fosfato de calcio y revestimientos de la presente invención tienen preferiblemente una densidad de aguja más baja que 0,45/ μm^2 , más preferiblemente, de entre 0,10/ μm^2 y 0,40/ μm^2 , incluso más preferiblemente, entre 0,25/ μm^2 y 0,39/ μm^2 y todavía más preferiblemente, 0,28/ μm^2 , 0,29/ μm^2 , 0,30/ μm^2 , 0,31/ μm^2 , 0,32/ μm^2 , 0,33/ μm^2 , 0,34/ μm^2 , 0,35/ μm^2 , 0,36/ μm^2 , 0,37/ μm^2 o 0,38/ μm^2 .

El área superficial específica y el área porosa total del material de la invención son considerablemente superiores con respecto a las del fosfato de calcio sinterizado previo al tratamiento hidrotérmico. De manera general, un aumento del área superficial específica y del área porosa total debido a la formación de agujas resulta evidente al exceder en un

50, 80 o incluso el 100%, a saber, la duplicación del área superficial específica y el área porosa total iniciales resulta evidente a partir del análisis mediante BET o mediante intrusión de mercurio, respectivamente.

5 El área porosa total del material de la presente invención representa normalmente 1,8 m²/g cuando se mide mediante intrusión de Hg.

El área superficial específica del material de la presente invención se encuentra normalmente por encima de 1,25 o incluso 1,4 m²/g cuando se mide mediante BET.

10 El diámetro de aguja de los cristales, tamaño de macroporos, área superficial específica y área porosa total que se prefieren dan como resultado una elevada concentración de adsorción de proteína en las cerámicas y una elevada formación de hueso (formación ósea inductiva en sitios no óseos).

15 El fosfato de calcio sinterizado mejorado de la invención exhibe preferiblemente una adsorción superficial de proteína de más del 40%, más preferiblemente, más del 60%, incluso más preferiblemente, más del 75% (40-80%) que se determina según se describe en el presente documento en 24 hrs. En especial, el fosfato de calcio sinterizado mejorado de la invención exhibe preferiblemente una adsorción superficial de proteína en el que más de 250 µg, preferiblemente, más de 300 µg, preferiblemente, más de 500 µg, preferiblemente, más de 1000 µg, preferiblemente
20 más de 1500 µg o una mayor cantidad de BSA se adsorbe hacia la superficie de 1 ml de material de fosfato de calcio a partir de 2 ml de una solución de BSA a 400 µg BSA/ml.

En aspectos de la presente invención, el fosfato de calcio con capacidad osteoinductiva mejorada puede tomar la forma de un revestimiento de fosfato de calcio, a saber, un revestimiento de fosfato de calcio osteoinductivo. Un
25 revestimiento como tal puede obtenerse mediante un método según se describe en el presente documento y comprende una capa externa y una capa interna. El revestimiento puede tener un espesor de varios micrómetros a varios milímetros o incluso centímetros. Preferiblemente, el espesor de la capa externa del revestimiento se encuentra entre 1 y 1000 µm, preferiblemente, entre 1 y 500 µm, más preferiblemente, entre 1 y 200 µm y, de mayor preferencia, entre 1 y 100 µm. El espesor de la capa externa se mide por medios conocidos por aquellos expertos en la técnica e
30 incluye la medición de la capa externa luego de la provisión de una sección transversal de un material de la invención. El espesor de la capa que comprende agujas de apatita e un material de la invención se encuentra de manera correspondiente entre 1 y 1000 µm, preferiblemente, entre 1 y 500 µm, más preferiblemente entre 1 y 200 µm y, de mayor preferencia, entre 1 y 100 µm. El revestimiento de fosfato de calcio puede usarse como una superficie mejorada sobre otros materiales (por ejemplo, no osteoinductivos) que requieren mejorar su capacidad osteoinductiva,
35 incluyendo, pero sin limitación, otros fosfatos de calcio, metales, cerámicas, cristales, polímeros o materiales compuestos. El revestimiento osteoinductivo mejorado puede producirse mediante el revestimiento de la superficie de un material del cual se debe mejorar la osteoinductividad con un material de partida de fosfato de calcio según se describe en el presente documento, y sometiendo el material revestido a un método para mejorar la capacidad osteoinductiva según se describe en el presente documento. El producto revestido resultante ha mejorado sus
40 propiedades osteoinductivas. De manera alternativa, los fosfatos de calcio osteoinductivos mejorados que tienen la topografía superficial de tipo aguja mejorada, objeto de la presente invención, puede fijarse o unirse de manera adecuada a la superficie de un material del cual se debe mejorar la osteoinductividad, a saber, base de material del núcleo, por ejemplo, mediante la adhesión, moldeo o presión. Se prevé en el presente documento que la capa externa del revestimiento de la invención puede ser de manera adecuada un precipitado de la capa interna del revestimiento
45 de la invención luego del tratamiento hidrotérmico de dicha capa interna mediante el uso de un método de la presente invención. De manera alternativa, los fosfatos de calcio osteoinductivos mejorados que tienen la topografía superficial de tipo aguja mejorada, objeto de la presente invención, pueden proporcionarse de manera adecuada en la forma de un inyectable, ya sea por separado en la forma de un "polvo" o en combinación con un portador líquido en la forma de una pasta, o un cemento y puede aplicarse luego a la superficie de un material del cual se debe mejorar la
50 osteoinductividad.

Una cerámica de fosfato de calcio mejorado de la invención se prepara preferiblemente mediante un proceso en el que se usa polvos de fosfato de calcio fresados y secados por horno que tienen formas irregulares. Tales materiales se prefieren antes que usar polvos de fosfato de calcio secados por aspersión que tienen partículas esféricas de forma
55 regular. Adicionalmente, se prefieren temperaturas de sinterización de entre 800 y 1200°C. Para fosfatos de calcio individuales, las temperaturas de sinterización pueden optimizarse.

El material de la presente invención puede usarse, por ejemplo, para inducir la formación de tejido óseo en un organismo vivo.

60 El material de la presente invención puede usarse de manera adecuada como un material de implante, a saber, una matriz, para la producción de hueso autólogo en un sitio no óseo. Esta capacidad se debe a las altas propiedades osteoinductivas del material.

65 El material de la invención puede usarse, de este modo, como un implante médico o dispositivo médico que se constituye a partir de fosfato de calcio. Resulta posible, además, que el material se use en combinación con un implante

médico de un material diferente, tal como un metal o un material polimérico, en el que el material osteoinductivo de acuerdo con la invención se presenta en la forma de un revestimiento.

- 5 Se debería notar que los diversos usos del material de la presente invención incluyen aplicaciones quirúrgicas musculoesqueléticas en la reparación de hueso, así como también, aplicaciones en cirugía dental u ortopédica.

La invención se ilustrará ahora a partir de los siguientes ejemplos no limitantes. Estos Ejemplos describen métodos para mejorar la capacidad de formación de hueso de las cerámicas de fosfato de calcio (a saber, fosfatos de calcio sinterizados), en los que el fosfato de calcio es un BCP.

Ejemplos

Ejemplo 1: Influencia de la configuración de autoclave en la formación de aguja

1.1 Preparación de cerámicas de fosfato de calcio bifásico

El polvo de fosfato de calcio bifásico (BCP) (92-96% β -TCP y 8-4% HA) se preparó mediante la mezcla de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y H_3PO_4 en una solución acuosa para permitir la precipitación de CaP. La proporción Ca/P se ajustó para obtener las cerámicas CaP finales con contenido diferente de TCP y HA. Se produjeron las siguientes proporciones Ca/P: 1,500 (para ~100% TCP), 1,509 (para ~5%HA/95% TCP), 1,518 (~10%HA/90% TCP), 1,534 (~20%HA/80%TCP), 1,568 (~40%HA/60%TCP), o 1,636 (~80%HA/20%TCP). El precipitado de CaP se filtró y secó para formar polvo de CaP. Este polvo de CaP se usó para preparar una suspensión en agua desmineralizada que contenía H_2O_2 (1-2%), 0-500 μm de partículas de cera (40-60-g / 100 g de polvo) y etanol (8-10%). Después, la suspensión se espumó a 40-80°C y presinterizó a 1000°C. Cuando la cera se quemó por completo, la torta porosa se trituró en partículas (0-5 mm) y se sinterizó a diferentes temperaturas, a saber, 1050°C, 1125°C y 1150°C, para obtener una cerámica de fosfato de calcio poroso con una topografía superficial diferente pero con la misma composición química.

1.2 Caracterización de cerámicas de fosfato de calcio bifásico

Las cerámicas se caracterizaron en cuanto a su proporción de contenido HA/TCP mediante difractómetro de rayos X (XRD, *Tabla 1*). Los resultados muestran que las cerámicas son fosfatos de calcio bifásico con proporción de contenido HA/TCP comparable independientemente de la temperatura de sinterización. Las imágenes obtenidas a partir del microscopio electrónico de barrido (SEM) demuestran que la temperatura de sinterización afecta la estructura de la superficie, a saber, cuanto más elevada es la temperatura de sinterización, mayor es el tamaño del grano con una reducción de porosidad (*Figura 1a-c*).

1.3 Tratamiento hidrotérmico de las cerámicas

Los gránulos se depositaron en una placa de vidrio. La capa se sumergió en agua desmineralizada, en la que el nivel del agua fue de al menos 2 cm por encima de la superficie de la capa de gránulos. La placa que contenía gránulos se colocó en una autoclave (Astell, AVX 040). Se aplicaron dos configuraciones diferentes como se indica en la Tabla 2. Cuando finalizó el tratamiento, los materiales se retiraron para enfriado y secado a $80 \pm 10^\circ\text{C}$.

1.4 Caracterización de las cerámicas que se trataron hidrotérmicamente

Se usó el microscopio electrónico de barrido en el modo de electrón secundario (SEM; JEOL) para evaluar la topografía superficial de los gránulos de partida, y se midieron los tamaños de ~500 cristales para cada material. Se midió el tamaño de grano del material de partida y se calcularon los valores medios. Luego del tratamiento hidrotérmico, se midió el diámetro de las nuevas agujas que se formaron y se calcularon los valores medios. Todas las medidas se realizaron con la herramienta "medida de longitud" en ImageJ (v1.43u, NIH, USA), usando la barra de escala SEM como referencia. En esta fase, las especificaciones de los materiales de partida y las configuraciones del tratamiento hidrotérmico se establecieron para una modificación exitosa de la superficie.

Las imágenes SEM demostraron que solo el tratamiento hidrotérmico con la configuración "caliente/largo" origina la desaparición de la estructura superficial granular de la cerámica normal y conduce al crecimiento de estructuras de tipo aguja (*Figura 1d-f*), mientras que la configuración "frío/corto" no condujo a la formación de agujas en ninguna de las cerámicas que se consideraron. Las mediciones revelaron que dichos componentes de tipo aguja habían aumentado su diámetro con el aumento del tamaño de grano de la cerámica de partida (*Tabla 3*).

El área superficial específica (SSA) de las muestras se determinó mediante el cambio en la concentración de gas N_2/He (30/70) a medida que tuvo lugar los procedimientos de adsorción y desorción usando el analizador MonosorbTM (Quantachrom Instruments, USA), para determinaciones de área superficial B.E.T por punto simple. Se coloca un peso de 1.0000 ± 0.0001 gramos de muestra seca en un volumen celular de $4,8 \text{ cm}^3$. Se aplicó gas N_2/He (30/70) con una presión de 140 kPa, y se desorbió por ~ 30 min. Esta operación se repitió 3 veces.

El área porosa total de la muestra se determinó mediante intrusión de mercurio usando un porosímetro de mercurio Micromeritics (AutoPore). Se colocó un peso de 0,4 – 0,7 gramos de muestra en un penetrómetro de volumen de bombilla de 3 cm³ con volumen celular de alrededor de 1,1 – 1,2 ml para alcanzar aproximadamente el 50-90% de uso de volumen celular. El penetrómetro cargado se insertó en el instrumento para intrusión de mercurio (ángulo de contacto de Hg de 130,000 grados, densidad de Hg de 13,5310 g/mL). La evacuación se realizó usando 50 µm de Hg durante 5 minutos, seguido de la recarga de mercurio a 0,22 psia que se equilibró durante 10 segundos.

Las mediciones BET y por intrusión de mercurio revelaron que la formación de aguja en cualquiera de las cerámicas consideradas conduce a un aumento del área superficial específica y del área porosa total, respectivamente (*Tabla 3*).

La adsorción de proteína en los gránulos se realizó en dos soluciones:

- solución acuosa que contenía suero fetal bovino (FBS) al 1% vol y 25 ppm de NaN₃.
- solución acuosa que contenía 400 µg/mL de albúmina de suero bovino (BSA) y 25 ppm de NaN₃.

La densidad de la aguja en los gránulos se determinó mediante el conteo del número de agujas visible en las imágenes SEM x5000 (tamaño de ventana 424,6528 µm²). La densidad se calculó por µm².

Los gránulos estériles (0,2 cc) de las cerámicas se colocaron en 2 mL de las soluciones de proteína (en quintuplo). Se incubaron a 37± 0,5°C y CO₂ al 5% durante una semana. Las proteínas que se adsorbieron (a saber, proteínas de suero y albúmina) se midieron luego de 12 horas, 1 día, 4 días y 7 días usando un kit de ensayo micro BCA y espectrofotómetro con filtro de absorbancia de 595 nm. La proteína adsorbida mediante las muestras (expresadas en µg por cc para FBS, y en µg por cc para BSA) se estimó a través de las curvas de calibración interna de proteínas para FBS y BSA. Se han realizado análisis de los materiales antes y después del tratamiento.

La Figura 2 muestra que, independientemente del tipo de material de partida (a saber, TCP1050 o TCP1125), el tratamiento hidrotérmico aumentó significativamente el potencial de adsorción de proteínas gracias al aumento del área superficial.

1.5 Conclusión

El tratamiento hidrotérmico (por ejemplo, 135°C, 99 min, 2.4 bar) de cerámicas de BCP que se evaluaron en el presente documento generó superficies de tipo aguja en tales cerámicas independientemente de la temperatura de sinterización, en las que el diámetro de la aguja se incrementa con el tamaño del grano de la cerámica que se trata. La formación de agujas condujo a un aumento del área superficial específica, del área porosa total y, posteriormente, de la adsorción total de proteína.

Tabla 1. Proporción de contenido de HA/TCP de las cerámicas preparadas en el Ejemplo 1

	T1050	T1125	T1150
HA [%]	8	6	9
TCP [%]	92	94	93

Tabla 2. Configuraciones del tratamiento hidrotérmico (autoclave Astell, AVX040)

Configuración	“frío/corto”	“caliente/largo”
T [°C]	121	135
Tiempo [min]	30	99
Presión [bar]	2-4	2-4

Tabla 3. Caracterización superficial de materiales antes y después del tratamiento hidrotérmico¹

	T1050	T1125	T1150	T1050a	T1125a	T1150a
--	-------	-------	-------	--------	--------	--------

Tamaño de grano promedio	0,73 ± 0,21	1,85 ± 0,45	2,29 ± 0,69	n/a	n/a	n/a
Rango medio	0,60-0,67	1,53-1,60	2,20-2,27			
Diámetro de aguja promedio [nm]	n/a	n/a	n/a	341 ± 171	579 ± 198	801 ± 201
Rango de diámetro medio [nm]				300-312	540-562	828-840
Densidad de aguja/ μm^2	n/a	n/a	n/a	0,36 ± 0,08	0,32	0,46 ± 0,07
Valores min-max/ μm^2				0,26-0,51		0,39-0,62
Área superficial específica mediante BET [m^2/g]	1,2	0,6 0,5	0,6 0,5	2,5	1,0 1,4	0,9 0,7
Área porosa total mediante intrusión de Hg [m^2/g]	1,8 1,5	1,3	NM ²	4,4	2,7	NM ²
¹ dos valores indican dos mediciones por separado; ² NM: no se midió						

Ejemplo 2: Influencia de proporción HA/TCP en la formación de cristales

2.1 Preparación de cerámicas de fosfato de calcio bifásico

Los polvos de BCP, con diversas proporciones de contenido de HA/TCP se usaron para preparar cerámicas conforme al procedimiento que se describe en §1.1 según se describe anteriormente. XRD de las cerámicas finales muestra que su proporción de contenido HA/TCP no cambió en comparación con el polvo de partida que se usó para su preparación.

2.2 Tratamiento hidrotérmico

Todas las cerámicas se han tratado luego térmicamente de acuerdo con el protocolo que se describe en §1.3, con configuración “caliente/largo”.

2.3 Caracterización de las cerámicas que se trataron hidrotérmicamente

El análisis SEM mostró que la proporción de contenido HA/TCP de las cerámicas de fosfato de calcio de partida tiene un rol clave en la determinación del crecimiento de las agujas (*Tabla 4*). La dimensión y forma de la aguja se pueden comparar con aquellas que se observan en el Ejemplo 1. Se requiere, por lo tanto, de un rango más angosto de contenido de HA para la formación de aguja exitosa. La conclusión general de que la formación de aguja ocurre solamente en la superficie de las cerámicas de BCP, se justifica por la observación de que no ocurre formación de aguja en la superficie de las cerámicas de fosfato de calcio con el 100% en peso de β -TCP luego del tratamiento hidrotérmico. Se observó, además, que la formación de aguja no ocurrió en las cerámicas de 100% en peso de HA luego de un tratamiento hidrotérmico.

2.4 Conclusión

Tomando los resultados de este Ejemplo y del Ejemplo 1, el tratamiento hidrotérmico de cerámicas de fosfato de calcio bifásico de estructura granular genera superficies de tipo aguja en tales cerámicas, cuando el contenido de HA de las cerámicas de partida es del 5 y 20%.

Tabla 4. Proporción de contenido de HA/TCP de las cerámicas preparadas en el Ejemplo 2 y resultados luego del tratamiento hidrotérmico

HA [%]	1	2	7	18	35	79
TCP [%]	99	98	93	82	65	21
Formación de aguja	no	no	si	si	no	no

Ejemplo 3: Potenciales osteoinductivos

3.1 Montaje experimental

Un cc de gránulos (1-2 mm) de T1050, T1050a y T1125a (según se preparó en el Ejemplo 1) se implantaron en los músculos paraespinales de ocho perros mestizo de esqueleto maduro (machos, 1-4 años de edad, peso de 10-15 kg) durante 12 semanas para evaluar la reacción tisular y la propiedad osteoinductiva de las nuevas cerámicas de CaP. Se usó una cerámica de TCP de control negativo sin aguja para validar los resultados de estos experimentos (TCP de control negativo).

3.2 Protocolo de implantación

El procedimiento quirúrgico se realizó bajo anestesia general (pentobarbital sódico, Organon, Países Bajos; 30 mg kg⁻¹ de peso corporal) y condiciones estériles. La espalda de los perros se afeitó y se limpió la piel con yodo. Se realizó una incisión longitudinal y se expuso el músculo paraespinal mediante separación roma. Posteriormente, se realizaron incisiones musculares longitudinales con un escalpelo y se crearon compartimentos musculares mediante separación roma. Los gránulos compuestos se colocaron luego en los compartimentos y la herida se cerró en capas mediante suturas de seda. Luego de la cirugía, los animales recibieron una inyección intramuscular de penicilina durante tres días consecutivos para impedir la infección. Luego de 6 semanas, todos los animales recibieron una inyección de calceína de tinte fluorescente (2mg kg⁻¹ del peso corporal) para estudiar el tiempo de inicio de la formación de hueso mediante el etiquetado de calceína.

3.3 Cosecha y procedimiento histológico

Doce semanas después del implante, los animales se sacrificaron y las muestras se cosecharon con tejidos circundantes y se fijaron en solución de formaldehído regulada al 4% (pH=7,4) a 4°C durante una semana. Luego de enjuagar con regulador fosfato salino (PBS, Invitrogen), las muestras se recortaron de los tejidos blandos circundantes, deshidrataron en una serie de soluciones de etanol (70%, 80%, 90%, 95% y 100% X2) y se incorporaron en metacrilato de metilo (MMA, LTI Nederland, Países Bajos). Se realizaron secciones histológicas no decalcificadas (10-20 mm de espesor) usando un micrótopo de cuchillas de diamante (Leica SP1600, Leica Microsystems, Alemania). Las secciones se tiñeron con soluciones de azul de metileno al 1% (Sigma-Aldrich) y fucsina básica al 0,3% (Sigma-Aldrich).

3.4 Análisis histológico

Las secciones se observaron con un microscopio óptico (Nikon Eclipse E200, Japón) para analizar la reacción tisular y la formación de hueso en detalle. Las secciones teñidas se escanearon usando un escáner de deslizamiento (Dimage Scan Elite 5400II, Konica Minolta Photo Imaging Inc, Tokyo, Japón) para obtener imágenes generales para análisis histomorfométrico. La histomorfometría se realizó en las imágenes escaneadas usando Photoshop CS5 (v12, Adobe Systems Benelux BV). En primer lugar, todas las muestras se seleccionaron en base a una región de interés y el número de píxeles que se leyeron como ROI. Luego, tanto el material como el hueso mineralizado se pseudo-colorearon y sus píxeles se leyeron como M y B respectivamente. El porcentaje de hueso en el espacio disponible de los explantes (B_p) se determinó como

$$B_p = 100 \times B / (ROI - M)$$

Las secciones histológicas no teñidas se observaron en microscopía fluorescente (Nikon Eclipse E600, Japón; cámara Nikon FDX-35) para estudiar el tiempo de inicio de la formación de hueso mediante etiquetado por calceína. Se tomaron imágenes con un tiempo de exposición de 40-80 ms. Se registró la incidencia del teñido fluorescente en las áreas óseas, y se contó el número de manchas fluorescentes en las muestras. Un índice (C_{flúor}) cuantitativo que indica apenas la posibilidad de formación temprana de hueso, se calculó como

$$C_{flúor} = \sum (teñido)_m / (incidencia)_m$$

donde el subíndice "m" indica el material considerado, a saber, m=(T1050, T1050a, T1125a, TCP de control negativo de TCP)

3.5 Resultados

Un total de ocho muestras por material se implantaron intramuscularmente en ocho perros. Luego de 12 semanas, las ocho muestras por material se recuperaron con su tejido circundante. No se observó inflamación en ninguno de los explantes. Se formó hueso en los implantes T1050, T1050a, T1125a y T1150a, pero en ninguno de los TCP de control

negativo (*Tabla 5, Figura 3*). La cantidad de hueso que se formó en las 12 semanas resultó equivalente para T1050, T1050a, T1125a, y fue significativamente mayor para T1150. Las observaciones fluorescentes en T1050, T1050a y T1125a demostraron que T1125a podía disparar la formación de hueso antes de seis semanas en la mayoría de los explantes, mientras que T1050 y T1050a indujeron la formación de hueso principalmente luego de las seis semanas (*Figura 4, Tabla 5*). De manera simultánea, se formó más hueso en la semana 6 en los grupos esterilizados por autoclave (a saber, T1050a y T1125a) en comparación con el control (a saber, T1050) (*Tabla 5*). En especial, T1125a mostró mayor incidencia ósea en la semana 6 en comparación con T1050a (*Tabla 5*). Los resultados de la histomorfometría se resumen también en la *Tabla 5*, e indican que en la semana 12 no hubo diferencias significativas entre los materiales que se trataron hidrotérmicamente y los controles.

3.6 Conclusión

La estructura de aguja (y gran área superficial) conduce a una aceleración en la formación de hueso en comparación con las cerámicas de fosfato de calcio de estructura granular clásicas.

Tabla 5. Resumen general de los materiales elegidos para caracterización adicional. C_{flúor} no se ha calculado para TCP de control negativo.

Material	Incidencia ósea	Hueso [%por.]	Incidencia de calceína	Σ (manchas)m	C _{flúor}
T1050	8/8	23 ± 10	2/8	2	1
T1050a	8/8	23,7 ± 10,1	4/8	12	3 15
T1125a	8/8	22,8 ± 13,3	5/8	21	4,2
T1150a	4/4	2,0 ± 2,0%	NM	NM	NM
TCP de control negativo	0/8	n/a	0/8	0	n/a

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un material de calcio osteoinductivo, comprendiendo el método las etapas de:
 - proporcionar un material de partida de fosfato de calcio bifásico sinterizado (BCP) de β -fosfato tricálcico e hidroxiapatita, en el que el BCP comprende el 4-20% en peso de hidroxiapatita, teniendo el material de partida de BCP sinterizado una topografía superficial que consiste de granos de fosfato de calcio, y
 - someter el material de partida de fosfato de calcio bifásico sinterizado a un tratamiento hidrotérmico a una temperatura equivalente a o mayor que 125°C por una duración suficiente para cambiar los granos de fosfato de calcio en la superficie del material de partida en agujas de fosfato de calcio.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el material de partida de fosfato de calcio sinterizado tiene un tamaño de grano promedio que varía en un rango de 0,1-3,0 μm .
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el material de partida de fosfato de calcio sinterizado es poroso.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el material de partida de fosfato de calcio sinterizado comprende macroporos en un rango de tamaño de 50-1500 μm .
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el área superficial específica del material de fosfato de calcio osteoinductivo es al menos 10-50% mayor, más preferiblemente, 80-100% mayor con respecto a la del material de partida de fosfato de calcio sinterizado.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la capacidad de adsorción de proteínas del material de fosfato de calcio osteoinductivo es al menos 10-50% mayor, más preferiblemente, 80-100% mayor con respecto a la del material de partida de fosfato de calcio sinterizado.
7. Un material de fosfato de calcio osteoinductivo, que se obtiene mediante un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
8. El material de fosfato de calcio de la reivindicación 7, que tiene una topografía superficial de tipo aguja, teniendo, preferiblemente, agujas con un diámetro de 10-1500 nm,
9. El fosfato de calcio de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que el fosfato de calcio es fosfato de calcio bifásico reabsorbible (BCP).
10. El fosfato de calcio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en el que el fosfato de calcio tiene un área de superficie específica BET por encima de 0,9 m^2/g .
11. El fosfato de calcio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en el que la densidad de las agujas de apatita es más baja que 0,45/ μm^2 .
12. El fosfato de calcio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-11, para uso como un material de implante médico o matriz tisular.
13. El fosfato de calcio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-12 para uso en medicina.
14. El fosfato de calcio para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el fosfato de calcio es
 - para uso en la inducción de la formación de tejido óseo en un organismo vivo, o para uso en cirugía dental, y/o
 - para uso como un material de implante por separado o en combinación con factores de crecimiento o/y células para la producción de hueso autólogo en un sitio no óseo.
15. Uso del fosfato de calcio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-12 en la producción de un implante o dispositivo médico por separado o combinado con factores de crecimiento o/y células.
16. Un revestimiento de fosfato de calcio osteoinductivo que comprende una capa externa que comprende agujas de hidroxiapatita, teniendo, preferiblemente, las agujas de hidroxiapatita un diámetro promedio de entre 10-1500 nm y una capa interna que se encuentra en contacto con la capa externa, en el que la capa interna comprende un fosfato de calcio bifásico sinterizado de β -fosfato tricálcico e hidroxiapatita, en la que el fosfato de calcio bifásico comprende entre el 4-20% en peso de hidroxiapatita; por lo tanto, la capa externa es un precipitado de hidroxiapatitas a partir del BCP de la capa interna luego del tratamiento hidrotérmico de este último a una temperatura equivalente a o mayor que 125°C.

- 5 17. El revestimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la densidad de las agujas de hidroxiapatita de la capa externa es menor que $0,45/\mu\text{m}^2$.
18. El revestimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16-17, en el que el espesor de la capa externa se encuentra entre 1 y $1000\ \mu\text{m}$.
- 10 19. El revestimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16-18, en el que el revestimiento tiene un área superficial específica BET por encima de $0,9\ \text{m}^2/\text{g}$.
20. Un objeto que puede implantarse que comprende el revestimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16-19.

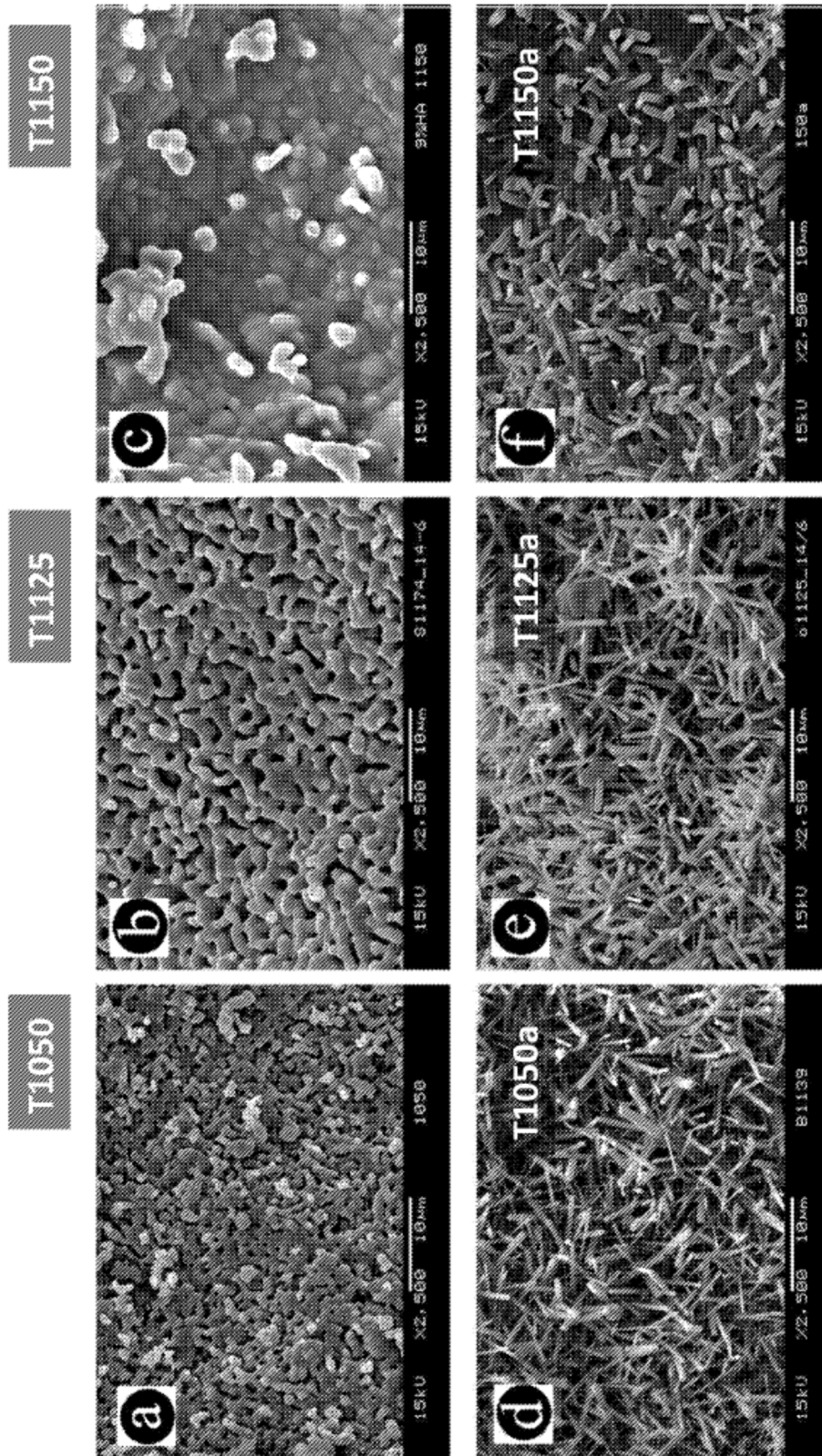


Fig. 1

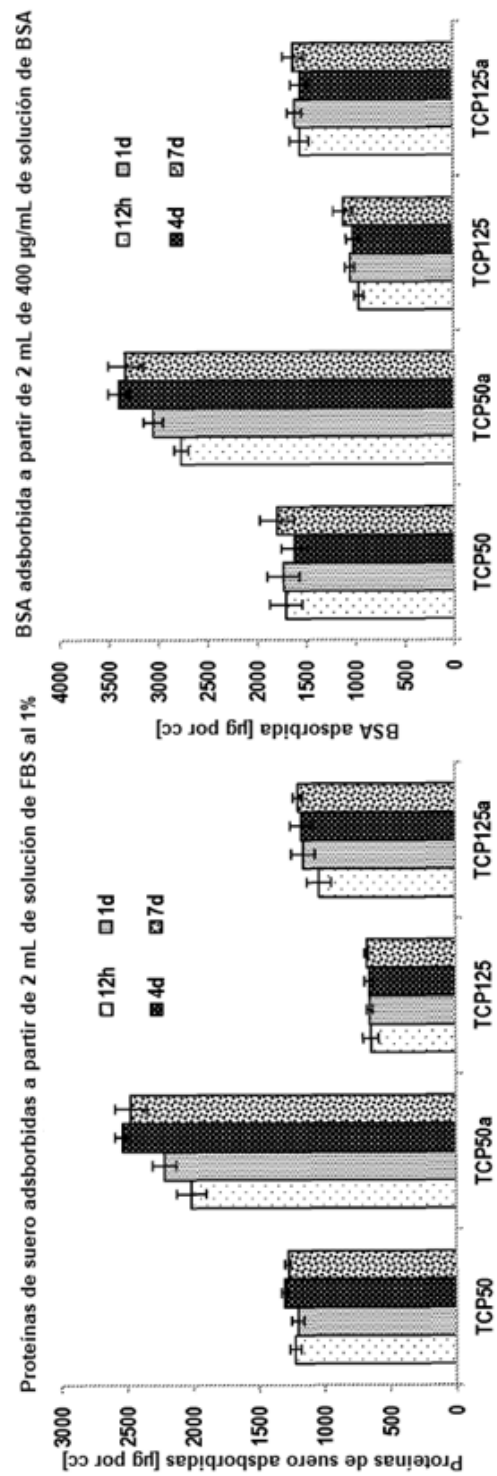


Fig. 2

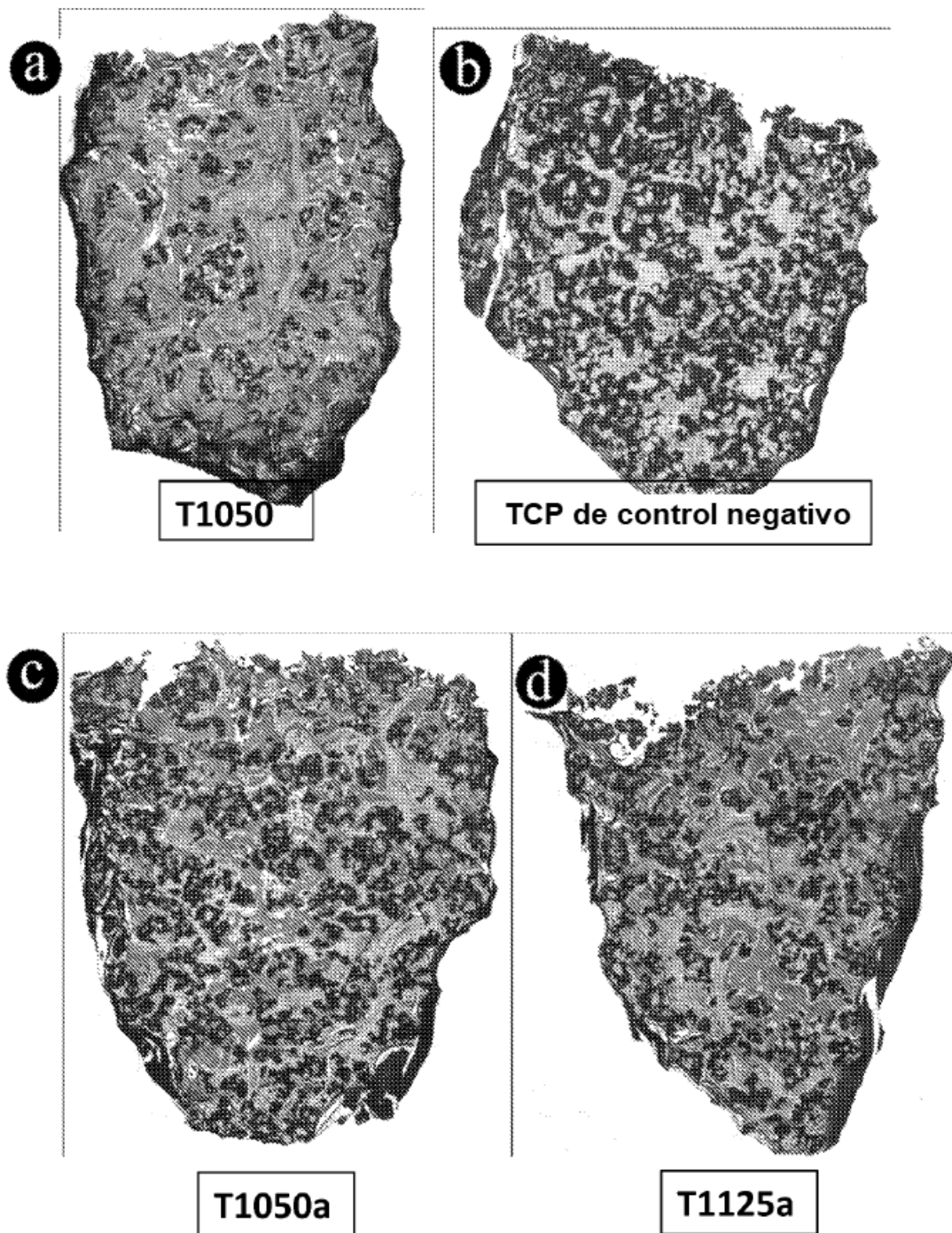


Fig. 3

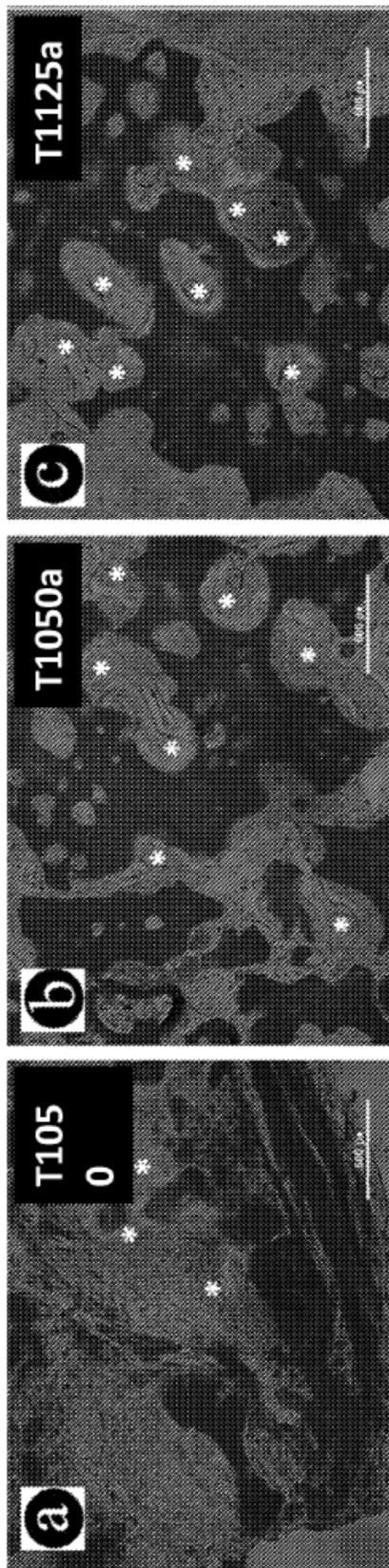


Fig. 4

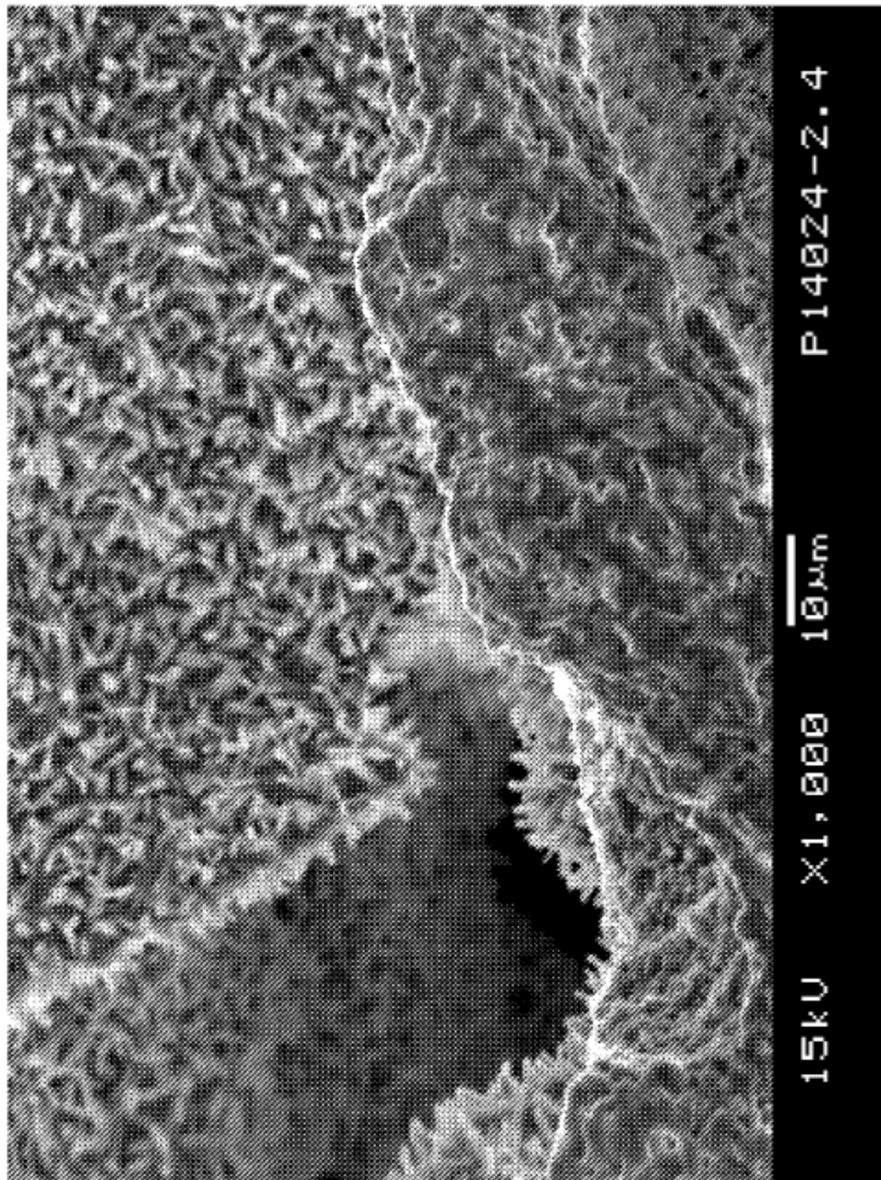


Fig. 5

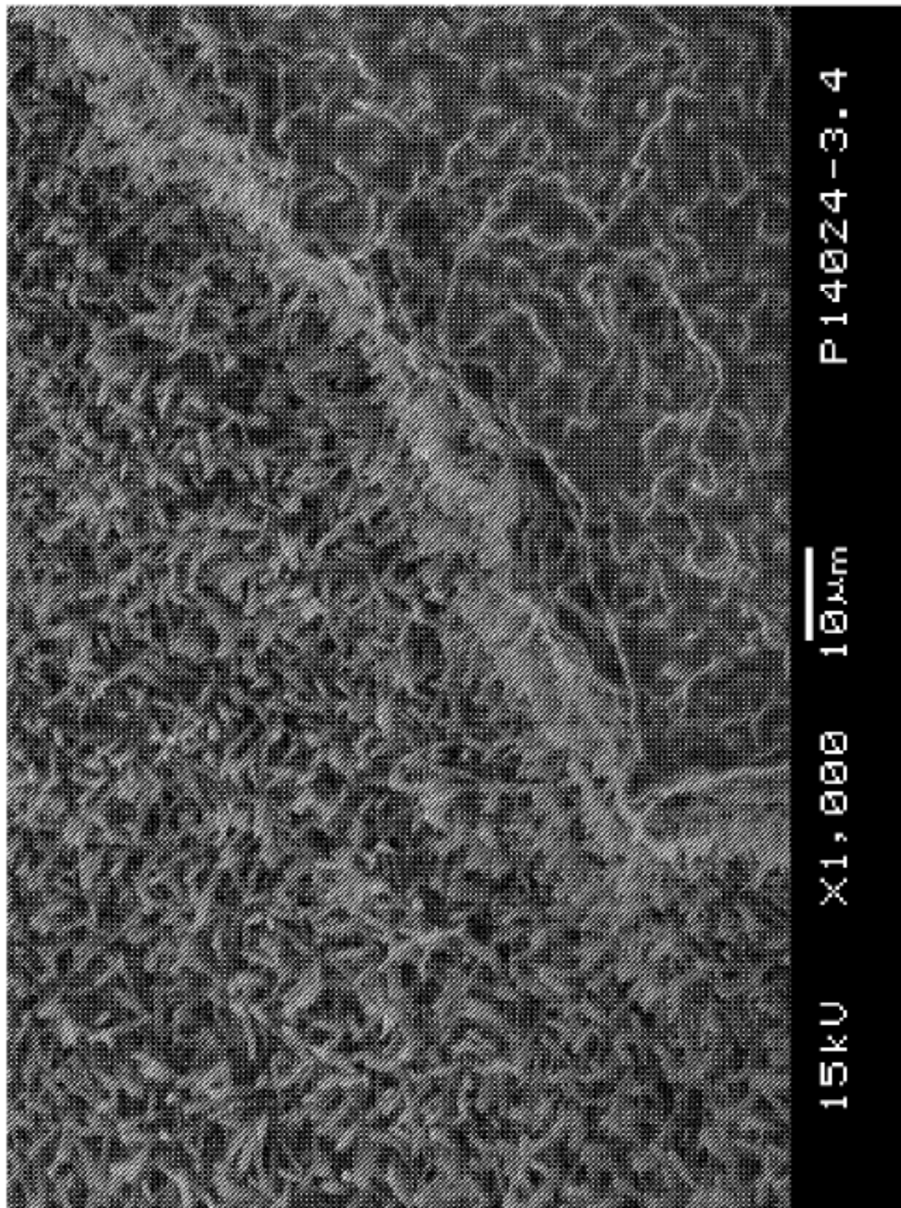


Fig. 6