

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 475**

51 Int. Cl.:

A61C 8/00 (2006.01)

A61L 27/06 (2006.01)

A61L 27/32 (2006.01)

A61K 6/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.05.2010 PCT/KR2010/003132**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2010 WO10147308**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2010 E 10789635 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 2444027**

54 Título: **Implante recubierto con hidroxiapatita de baja cristalización en forma de red o en forma de isla y método para recubrir el mismo**

30 Prioridad:

18.06.2009 KR 20090054315

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

31.07.2019

73 Titular/es:

**OSSTEMIMPLANT CO., LTD. (100.0%)
426-5 Gasan-dong Geumcheon-gu
Seoul 153-023, KR**

72 Inventor/es:

**HA, KYUNG WON y
CHOI, GYU OK**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 721 475 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

Implante recubierto con hidroxiapatita de baja cristalización en forma de red o en forma de isla y método para recubrir el mismo

5

[Campo técnico]

La presente invención se refiere a un método para recubrir una superficie de un implante de titanio, que se ha usado ampliamente como material de injertos, con hidroxiapatita de baja cristalización que tiene bioabsorbabilidad y un implante recubierto mediante el mismo método.

10

[Técnica anterior]

En los últimos años, la hidroxiapatita se ha usado ampliamente como un biomaterial artificial capaz de reemplazar tejidos duros tales como huesos o dientes. La hidroxiapatita es un material que es química y cristalográficamente idéntico a los componentes minerales que constituyen los huesos y los dientes en el cuerpo humano. Cuando se trasplanta en el cuerpo humano, la hidroxiapatita muestra una alta biocompatibilidad con las células circundantes y forma rápidamente un enlace química directamente con los huesos en la zona de unión. Un cristal de hidroxiapatita puro compuesto de iones de calcio, iones de fosfato e iones de hidroxilo es un cristal estequiométrico que tiene una estructura en forma de hilo y tiene una alta cristalinidad. Por otro lado, un biocristal aislado de huesos o cartílago calcificado es una hidroxiapatita no estequiométrica que tiene una baja cristalinidad [véase, Elliott J. C., In Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates, Studies in Inorganic Chemistry 18, Amsterdam: Elsevier, págs. 111-190 (1994)].

15

20

25

30

35

40

El titanio se ha usado ampliamente como material de implante debido a que tiene propiedades físicas similares a las de los huesos humanos y una resistencia mecánica excelente. Además, el titanio se ha usado en gran medida como metal biológico puesto que no provoca ninguna respuesta inflamatoria u otra respuesta inmune *in vivo*. Para impartir bioactividad al titanio para aplicaciones industriales, el titanio se somete a una variedad de modificaciones de superficie tales como decapado, ataque químico ácido y similares (véase los numerosos documentos de patente incluida la solicitud de patente coreana n.º 98-23075). Sin embargo, el titanio muestra de forma desventajosa una pobre biocompatibilidad en comparación con materiales de cerámica tales como la hidroxiapatita y se somete a la disolución de los iones de metal cuando se mantiene durante un largo plazo en el cuerpo humano, lo que da como resultado, por consiguiente, en la formación de sustancias inorgánicas *in vivo*.

Por estas razones, se ha desarrollado recientemente una variedad de métodos para obtener un biomaterial que tenga tanto una resistencia mecánica como una biocompatibilidad excelentes para su uso en el reemplazo de tejidos duros biológicos, recubriendo el titanio con una fina película de hidroxiapatita. Los métodos representativos convencionales de recubrimiento de una cerámica, impartiendo, de este modo, bioactividad a una superficie de titanio, pueden incluir pulverización de plasma, metalizado por bombardeo, implantación de iones, deposición de haz de iones y similares. Con el fin de formar una película cristalina en la que las propiedades cristalográficas de la hidroxiapatita sean similares a la de los biocristales, se han realizado diversos enfoques que usan una solución de fosfato de calcio o un fluido corporal simulado.

45

50

55

60

La pulverización de plasma que se ha usado más comúnmente entre los métodos anteriormente mencionados tiene inconvenientes tales como no uniformidad de la capa de recubrimiento debido a la exposición instantánea de una alta temperatura de 10.000 °C o superior y una dificultad en conseguir un recubrimiento que tenga un grosor inferior a aproximadamente 10 µm. Además, este método tiene un problema de muy baja reactividad biológica en que la hidroxiapatita recubierta sobre la superficie de titanio se somete a descomposición *in vivo* debido a una muy elevada cristalinidad o su refractariedad de retirada por osteoclastos. Además, este método se conoce por implicar la formación simultánea de fosfato de calcio o hidróxidos de calcio que tiene distintas fases como subproductos [véase, H.-G. Pfaff y col., Properties of HA-Coatings in 'Bioceramics', vol. 6., eds. P. Ducheyne and D. Christiansen, págs. 419-424, Butterworth-Heinemann Ltd. (1993)]. En general, los huesos en el cuerpo humano se someten a una serie de procesos conocidos como remodelación ósea en la que un hueso viejo se retira del esqueleto y se añade un nuevo hueso. Una película de recubrimiento de hidroxiapatita que tiene una alta cristalinidad no forma parte del proceso de remodelación de huesos. Por consiguiente, la hidroxiapatita permanece como una película de recubrimiento durante un largo período de tiempo en el cuerpo humano. Incluso después de haber generado un hueso funcional, la película de recubrimiento existe y se descompone en subproductos que tienen distintas fases, lo que contribuye al pelado de la película de recubrimiento desde la superficie, dando como resultando, finalmente, la separación de un implante. Con este fin, existe la necesidad de desarrollar hidroxiapatita de baja cristalización que sea capaz de formar parte en un proceso de remodelación de huesos mediante la absorción de *in vivo* por los osteoclastos, superando, de este modo, los problemas de las capas de recubrimiento de hidroxiapatita convencionales que tienen una alta cristalinidad.

65

Además, el metalización por bombardeo o implantación de iones, aparte de necesitar un equipamiento costoso para este fin, ha sufrido diversos problemas tales como formas complejas, pobre uniformidad de la capa de recubrimiento formada sobre partes irregulares y desprendimiento de implantes debido al fenómeno de descascarillamiento en el

cuerpo humano.

Por otro lado, como un método de recubrimiento en húmedo, existe un método que usa una solución de fosfato de calcio o un fluido corporal simulado. La preparación o el recubrimiento de diversos tipos de fosfatos de calcio se inicia a partir de una solución de iones de fosfato de calcio. Estos compuestos de fosfato de calcio pueden prepararse mediante la mezcla de iones de calcio e iones de fosfato en una solución acuosa bajo una variedad de condiciones. A este respecto, se conoce que el tipo y forma de compuestos se ven en gran medida afectados por la concentración de iones, relaciones de Ca/p y las condiciones de pH [véase, Ayako Oyane, Kazuo Onuma, Tadashi Kokubo, and Atsuo Ito J. Phys. Chem. B 1999, 103, 8230-8235, Elliott J. C. In Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates, Studies in Inorganic Chemistry 18, Amsterdam: Elsevier, págs. 111-190 (1994)]. Los procesos de recubrimiento anteriormente ejemplificados implican etapas complicadas o requieren un largo tiempo de recubrimiento. En general, es complicado para una solución sobresaturada de fosfato de calcio mantener una concentración constante, debido a la precipitación espontánea [véase, H. B. Wen et al., J. Biomed. Mater. Res. 41,227-236 (1998)]. Además, un proceso que se realiza bajo una condición limitada de mantenimiento a aproximadamente 37 °C puede llevar un largo periodo de tiempo, sobre un mes o más, dependiendo de las condiciones de la superficie. Para resolver estos problemas, se han desarrollado métodos de recubrimiento de un implante con fosfato de calcio disminuyendo la temperatura de procesamiento y aplicando un sistema de tampón de iones de fosfato para inhibir, de este modo, la precipitación de cristales de fosfato de calcio en una solución sobresaturada. Sin embargo, estos métodos también requieren el uso de ácidos para la fabricación de una solución de iones de calcio y una solución de iones de fosfato y el ajuste de pH (concentraciones de iones de hidrógeno) mediante su mezcla con una solución base a una baja temperatura para la inhibición de la precipitación de fosfato de calcio. Además, estos métodos tampoco superan las limitaciones de un tiempo de procesamiento largo y complejo (solicitud de patente coreana n.º 1999-38528 a Kim Hyun-Man, y col., y solicitud de patente coreana n.º 2000-51923 a Kim Se-Won y col., ambas asignadas a Oscotec Inc.), puesto que necesita, por ejemplo, su purificación (mediante filtración porosa o centrifugación) para retirar fosfato de calcio amorfo que se genera al inicio de la mezcla de la solución de iones de calcio y la solución de iones de fosfato.

Los compuestos de fosfato de calcio que usan un método en húmedo tienen distintas fases de equilibrio, dependiendo de las temperaturas y valores pH. En particular, a una temperatura de 40 °C o inferior, el fosfato de calcio tiene una fase de equilibrio de amorfo ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$; $n=3$ a 4,5) o hidroxiapatita no estequiométrica ($\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x} \cdot n\text{H}_2\text{O}$; $x=0$ a 1, $n=0$ a 2) a un pH de 7 o superior, una fase de equilibrio de fosfato de octacalcio (OCP, $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a un pH de 6 a 7, y una fase de equilibrio de fosfato de dicalcio (DCP, CaHPO_4), fosfato de dicalcio dihidrico (DCPD, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) o similar a un pH de 6 o inferior. El recubrimiento de fosfato de dicalcio de acuerdo con un método en húmedo convencional se basa en el cambio de la solubilidad del fosfato de dicalcio, aprovechando el hecho de que la solubilidad del fosfato de calcio disminuye según aumente la temperatura de reacción. Por lo tanto, debe proceder un proceso inicial a una baja temperatura de 2 °C a 5 °C y es muy complicado obtener una película de recubrimiento de fosfato de calcio así como una solución coloidal de fosfato de calcio sin la elevación de temperatura. Además, durante el proceso en el que se obtiene la solución coloidal y la película de recubrimiento de fosfato de calcio elevando la temperatura de reacción, un pH de la solución se termina generalmente en el intervalo de 6,0 a 6,5. Aunque no se ha comprendido completamente una fase de equilibrio precisa de la película de recubrimiento de fosfato de calcio de acuerdo con el método en húmedo convencional, parece ser OPC basándose en la correlación entre la temperatura y el pH de la solución de fosfato de calcio.

Como se ha comentado anteriormente, el método en húmedo convencional utiliza una diferencia en la solubilidad del fosfato de calcio en respuesta a cambios en temperatura y tiene limitaciones que requieren el control de la temperatura y/o pH, temperatura de reacción en aumento y un procedimiento complejo para la formación de una película de recubrimiento de fosfato de calcio.

Makoto Tamura y col., Hydroxyapatite film coating by thermally induced liquid-phase deposition method for titanium implants, págs.32-38, Dental Materials Journal, vol.25, n. 1, 1 de marzo de 2006, desvela un método de deposición de fase líquida térmicamente inducido para producir una fina película de hidroxiapatita sobre un sustrato de titanio en una solución de fosfato de calcio metaestable. Por consiguiente, la presente invención se ha concebido para solucionar la complejidad del procedimiento que se muestra por el método en húmedo convencional. Como consecuencia, la presente invención proporciona un método de recubrimiento de hidroxiapatita, que es capaz de conseguir una productividad superior mediante un proceso relativamente sencillo a bajo coste, incluso sin el control de la temperatura y el pH o el proceso de elevación de temperatura.

[Divulgación]

60 [Problema técnico]

El objetivo principal de la presente invención es superar los problemas tal como se han descrito anteriormente. La presente invención ha descubierto un implante recubierto con hidroxiapatita de baja cristalización que puede usarse durante un largo período de tiempo mientras que no se aísla de los nuevos huesos de modo que el implante se absorbe por los osteoclastos *in vivo*, formando parte, de este modo, en un proceso de remodelación de huesos. Por lo tanto, la presente invención supera las limitaciones de una capa de recubrimiento de hidroxiapatita convencional

que tiene una alta cristalinidad.

Además, un método de recubrimiento de hidroxiapatita de baja cristalización de acuerdo con la presente invención proporcionado es relativamente simple en comparación con un método en húmedo convencional. El método de recubrimiento también es económicamente favorable debido a que no se necesita un control estricto de las condiciones de reacción tales como temperatura y/o pH, y elevación de la temperatura de reacción mientras que imparte una excelente bioactividad.

[Solución técnica]

La presente invención proporciona un procedimiento para recubrir un implante, en donde el método comprende: pretratar una superficie de implante de titanio o de aleación de titanio, mezclar una solución de iones de fosfato con una solución de iones de calcio para preparar una solución de fosfato de calcio, sumergir y almacenar el implante de titanio o aleación de titanio en la solución de fosfato de calcio durante 1 hora a 3 horas a la temperatura de 15 °C a 30 °C, en donde la fina película resultante de hidroxiapatita de baja cristalización tiene una morfología tipo red o tipo isla y es bioabsorbente.

[Efectos ventajosos]

El método de recubrimiento de implante de acuerdo con la presente invención tiene una ventaja de ser útil durante un largo período de tiempo mediante que no queda aislado de los nuevos huesos, de modo que el implante se absorbe por los osteoclastos *in vivo*, formando parte, de este modo, en un proceso de remodelación de huesos.

Además, el método de recubrimiento de implante de acuerdo con la presente invención es capaz de potenciar una tasa de éxito del implante de modo que la bioactividad impartida a una superficie del implante de titanio resulta en una fuerte enlace interfacial entre los tejidos óseos del implante y tejidos dentales y la promoción de la osteoconductividad u osteogénesis. Adicionalmente, la separación del implante que surge del descascarillamiento de la capa de recubrimiento de la superficie se evita debido a la bioabsorbabilidad de la hidroxiapatita de baja cristalización que forma una capa de recubrimiento.

El método de recubrimiento de implante de acuerdo con la presente invención permite la producción de un excelente implante dental mediante un proceso muy sencillo a bajo costes y el control del grosor y morfología de la capa de recubrimiento según sea necesario, tal como una capa de recubrimiento fina, una capa de recubrimiento gruesa y superficie coexpuesta de titanio y capa de recubrimiento. Por lo tanto, la presente invención puede aplicarse a una variedad de campo de biomateriales de acuerdo con los usos deseados, por ejemplo, el área ortopédica así como el área dental.

[Descripción de los dibujos]

Se comprenderán más claramente los objetos, características y otras ventajas de la presente invención a partir de la siguiente descripción detallada junto con los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 es una micrografía por barrido electrónico de una superficie de implante de titanio no recubierta;

La Figura 2 es una micrografía por barrido electrónico que ilustra un recubrimiento grueso de hidroxiapatita de baja cristalización que tiene una morfología de tipo red sobre una superficie de implante de titanio;

La Figura 3 es una micrografía por barrido electrónico de un recubrimiento fino de una hidroxiapatita de baja cristalización que tiene una morfología tipo red y tipo isla sobre una superficie de implante de titanio;

La Figura 4 es una micrografía por barrido electrónico que ilustra un recubrimiento de una hidroxiapatita de baja cristalización que tiene una morfología tipo isla sobre una superficie de implante de titanio;

La Figura 5 es una micrografía electrónica de transmisión que ilustra una película de recubrimiento fina de hidroxiapatita de baja cristalización que tiene una morfología de tipo red y tipo isla sobre una superficie de implante de titanio;

La Figura 6 es una micrografía por barrido electrónico que compara la capacidad de recubrimiento de hidroxiapatita de baja cristalización dependiendo de la presencia y ausencia de pretratamiento;

La Figura 7 es un diagrama de flujo del proceso esquemático de la presente invención;

La Figura 8 es una foto gráfica de comparación de estructuras de red cristalina observadas a través de un microscopio de transmisión electrónico de alta resolución, entre hidroxiapatita de Sigma Aldrich y una superficie de recubrimiento de hidroxiapatita de baja cristalización de acuerdo con la presente invención;

La Figura 9 muestra los resultados de medición de una distancia desde un centro a átomos individuales y un ángulo entre átomos individuales, obtenible a partir de la fotografía de comparación de la estructura de red cristalina de la Figura 8;

La Figura 10 muestra los resultados de los cuales se midió la hidroxiapatita de baja cristalización recubierta sobre un implante de titanio mediante un analizador elemental bajo un microscopio de transmisión electrónico de alta resolución;

La Figura 11 es un gráfico que compara un grado de diferenciación de células madre mesenquimatosas en osteoblastos entre un sustrato de titanio tratado con RBM y un sustrato de implante recubierto con hidroxiapatita

de baja cristalización, durante 14 días;

La Figura 12 es un gráfico que compara un grado de calcificación de células madre mesenquimatosas entre un sustrato de titanio tratado con RBM y un sustrato de implante recubierto con hidroxiapatita de baja cristalización, durante 14 y 28 días, respectivamente; y

5 La Figura 13 es una micrografía por barrido electrónico que ilustra la bioabsorbabilidad de una película de recubrimiento 2 y 6 semanas después del trasplante de una hidroxiapatita de baja cristalización.

[Mejor forma de realización]

10 La presente invención se refiere a un implante y método en el que la hidroxiapatita que tiene un excelente crecimiento óseo y osteoconductividad se recubre sobre una superficie de titanio que tiene propiedades mecánicas excelentes para el uso del implante. Con este fin, la presente invención proporciona una técnica que induce un crecimiento de hidroxiapatita de baja cristalización de tipo red o tipo isla sobre una superficie de un implante de titanio en una solución acuosa de fosfato de calcio de baja concentración a temperatura ambiente de 15 °C a 30 °C.

15 El método de recubrimiento de acuerdo con la presente invención también es aplicable a implantes que usan una aleación de titanio distinta al titanio puro, como materia prima, o implantes que usan titanio como materia prima y, a continuación, se tratan por superficie mediante una variedad de métodos. Aunque el tiempo de proceso puede ser ligeramente distinto al de la realización de la presente invención, dependiendo del tipo de tratamientos de superficie, el tiempo de reacción puede controlarse fácilmente por los expertos en la técnica a la que pertenece una técnica de recubrimiento de una superficie de implante con hidroxiapatita.

Específicamente, el método de recubrimiento de implante de la presente invención incluye:

25 pretratar una superficie de implante de titanio o de aleación de titanio, mezclar una solución de iones de fosfato con una solución de iones de calcio para preparar una solución de fosfato de calcio, y sumergir y almacenar el implante de titanio o aleación de titanio en la solución de fosfato de calcio durante 1 hora a 3 horas a la temperatura de 15 °C a 30 °C.

30 La etapa de pretratamiento puede llevarse a cabo mediante una variedad de métodos comúnmente usados en la técnica, tales como método de medio de decapado reabsorbible (RBM) en el que se lleva a cabo tratamiento de superficie usando medio de decapado reabsorbible, grava grande con tratamiento por chorro de arena y método de tratamiento de superficie con ataque químico de ácido (SLA) en el que el decapado de aluminio es seguido por ataque químico de ácido, tratamiento térmico a una temperatura de 300 °C o superior, anodización y tratamiento térmico de superficie después de tratamiento de ácido o de base. Cuando se usa un material de titanio o aleación de titanio que se trató por superficie mediante cualquiera de los métodos anteriormente mencionados, la etapa de pretratamiento puede omitirse. Además, la etapa de pretratamiento incluye preferentemente tratamiento ultrasónico de implante de titanio o aleación de titanio en agua destilada, una solución de iones de calcio, una solución de iones de fosfato o una solución de fosfato de calcio durante 1 minutos o más. El tratamiento ultrasónico también puede llevarse a cabo después de llevarse a cabo el anteriormente mencionado RBM, SLA o tratamiento térmico y similar.

45 En la etapa de pretratamiento, con respecto a un implante compuesto del titanio o aleación de titanio anteriormente mencionado como materia prima, cualquier hidrocarburo que permanece sobre la superficie del implante puede retirarse opcionalmente usando una solución de ácido nítrico. La concentración de la solución de ácido nítrico es preferentemente de 4 % v/v a 60 % v/v. Dependiendo de las propiedades hidrófilas y morfología de la superficie, se puede omitir el proceso de limpieza con ácido nítrico. Después de la limpieza con ácido nítrico, la superficie puede limpiarse con agua destilada para retirar ácido nítrico residual sobre la superficie. El lavado con agua destilada también se puede omitir para la superficie que no se ha sometido al proceso de limpieza con ácido nítrico.

50 Una solución de iones de calcio de baja concentración (aproximadamente de 1,0 mM a aproximadamente 10 mM) propuesta en la presente invención se puede preparar mediante un método simple de disolución de nitrato de calcio (por ejemplo, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ o $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, etc.) o cloruros de sodio (por ejemplo, CaCl_2 or $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, etc.) en agua destilada. Una solución de iones de fosfato de baja concentración (aproximadamente de 1,0 mM a aproximadamente 10 mM) de la presente solicitud puede prepararse mediante un simple método simple de disolución de fosfatos de amonio (por ejemplo, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, etc.) o fosfatos de sodio (por ejemplo, Na_2HPO_4 o $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, etc.) o fosfatos de potasio (por ejemplo, K_2HPO_4 or $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, etc.) en agua destilada.

60 Antes de la aplicación del mismo al sustrato de implante, la solución de iones de fosfato y la solución de iones de calcio se mezclan para preparar una solución de fosfato de calcio que se aplica, a continuación, al sustrato de implante.

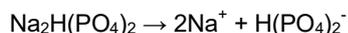
65 Una concentración de la solución de fosfato de calcio se encuentra en el intervalo de 1,0 mM a 10 mM. El tiempo de sumersión del implante en la solución de fosfato de calcio de baja concentración es de 1 hora a 3 horas, el tiempo de sumersión puede variar dependiendo del estado previsto y morfología de la superficie y el grosor de recubrimiento. Además, la temperatura de sumersión se encuentra en el intervalo de 15 °C a 30 °C. 15 °C a 30 °C. La temperatura

de sumersión puede mantenerse constante o elevada. Dependiendo de los usos y fines previstos, el tiempo de sumersión y temperatura de sumersión puede seleccionarse fácilmente por los expertos en la técnica.

5 La solución de iones de calcio y la solución de iones de fosfato, que se prepararon a una baja concentración, se mezclan para preparar una solución de fosfato de calcio que se añade al implante de titanio, seguido por sumersión durante 1 hora a 3 horas a la temperatura de 15 °C a 30 °C y el implante de titanio se retira y se lava rápidamente con agua destilada, mediante lo cual la hidroxiapatita de baja cristalización que tiene una morfología tipo red o tipo isla puede cubrirse sobre una superficie de implante de titanio o de aleación de titanio.

10 El método de recubrimiento de acuerdo con la presente invención tiene ventajas como que no necesita controlar un pH de la solución de fosfato de calcio. No es necesario agitar para mezclar la solución de iones de fosfato y la solución de iones de calcio.

15 El método de recubrimiento de hidroxiapatita de baja cristalización propuesto en la presente invención se basa en una suficiente utilización de un fenómeno en el que una solubilidad de la solución de fosfato de calcio se reduce a temperatura ambiente y un mecanismo químico que mezcla iones de calcio con la solución de iones de fosfato provoca cambios en una constante de disociación de fosfato de hidrógeno (HPO_4^{2-}) en la solución de iones de fosfato y, por lo tanto, se puede producir continuamente fosfato de calcio amorfo o cristalino durante la sumersión de un implante de titanio en la solución de fosfato de calcio. Lo que sigue es un esquema de reacción de la solución de 20 iones de fosfato.



25 Una constante de disociación de iones de fosfato de hidrógeno en la solución de iones de fosfato es muy baja. Por lo tanto, hay una muy pequeña cantidad de una forma disociada de iones de fosfato de hidrógeno en la solución. A diferencia del método convencional que aprovecha una solubilidad dependiente de tampón o de temperatura del fosfato de calcio, la presente invención hace uso de cambios en la constante de disociación de los iones de fosfato de hidrógeno que se producen durante un proceso de mezcla de la solución de iones de calcio y la solución de iones de fosfato. Además de la solución de iones de calcio a la solución de iones de fosfato acelera la disociación de los 30 iones de fosfato de hidrógeno. Aunque la disociación de los iones de fosfato de hidrógeno tiene lugar continuamente y puede variar hasta cierto punto dependiendo de la concentraciones de las soluciones de iones o la temperatura de reacción, la disociación de los iones de fosfato de hidrógeno tiene lugar rápidamente alrededor de una hora después de proceder la reacción y, a continuación, tiene lugar la disociación de los iones de fosfato de hidrógeno lentamente y continuamente según pasa el tiempo. Por consiguiente, es posible obtener una película de recubrimiento que tiene una morfología tipo red en un punto en el que tiene lugar una rápida disociación de los iones de fosfato de hidrógeno. Cuando se deja proceder el proceso durante un período más largo de tiempo (3 horas o más), es posible 35 obtener una gruesa película de recubrimiento de hidroxiapatita de baja cristalización debido a la continua disociación de los iones de fosfato de hidrógeno. La fina película de hidroxiapatita de baja cristalización tiene un grosor de aproximadamente 10 nm o menos. Según aumenta el tiempo de sumersión, se puede obtener una película más gruesa.

45 El pretratamiento en la presente invención es un proceso que imparte actividad a la superficie del implante para asegurar el recubrimiento uniforme y la alta adhesión de los cristales de fosfato de calcio a una superficie del implante de titanio en la solución de fosfato de calcio. En general, una tasa de producción de cristales de fosfato de calcio es muy alta en la solución de fosfato de calcio a temperatura ambiente. Por lo tanto, si no se imparte una actividad adecuada a la superficie de implante de titanio, no se forma un recubrimiento sobre el implante y/o la resistencia adhesiva de un recubrimiento al implante se ve reducida. En conclusión, el pretratamiento de la superficie 50 de implante de titanio es necesario para aumentar una generación y crecimiento de fosfatos de calcio cristalinos sobre la superficie del implante. Además, el pretratamiento da como resultado una uniformidad de recubrimiento mejorada de hidroxiapatita de baja cristalización sobre la superficie del implante y repetibilidad y reproducibilidad significativamente mejoradas.

55 El método de pretratamiento en la presente solicitud se lleva a cabo tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, preferentemente, sometiendo el implante de titanio o de aleación de titanio a tratamiento ultrasónico en agua destilada, una solución de iones de calcio, una solución de iones de fosfato o una solución de fosfato de calcio durante un minuto o más.

60 La hidroxiapatita de baja cristalización preparada por el método de recubrimiento de acuerdo con la presente invención es característicamente no estequiométrica y también bioabsorbente.

Además, el implante recubierto con hidroxiapatita de baja cristalización de la presente invención tiene una doble 65 superficie con coexposición de una capa de recubrimiento tipo red o tipo isla y una superficie de titanio del implante, mediante el cual la capacidad osteogénica se mejora debido a los efectos sinérgicos entre la adhesión del titanio a las células y los efectos osteoconductivos de la hidroxiapatita.

Como se describe en el presente documento, el recubrimiento de hidroxiapatita de baja cristalización que tiene una morfología tipo red o tipo isla en la solución de fosfato de calcio puede determinar un grosor deseado dependiendo de la concentración de hidroxiapatitas, temperatura y tiempo de procesamiento. Un estado del recubrimiento se puede confirmar con un microscopio de barrido electrónico. Debido a la sencillez del proceso, se puede controlar de forma adecuada un grado de recubrimiento de hidroxiapatita de baja cristalización que se corresponde con las aplicaciones deseadas en diversas áreas de implantes así como en dientes.

[Modo de invención]

Ahora, la presente invención se describirá en mayor detalle con referencia a los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1

Pretratamiento de implante de titanio

Se sumergió un implante tratado con SLA (método de tratamiento de superficie que incluye decapado de aluminio seguido por ataque químico de ácido) en una solución de ácido nítrico (HNO₃) al 12 % durante 5 minutos, seguido por tratamiento ultrasónico y el ácido que permanece sobre una superficie del implante se retiró usando agua destilada (H₂O). La solución de ácido nítrico al 12 % se preparó mezclando una solución de ácido nítrico al 60 % y agua destilada (H₂O) en una relación de 1:4. El implante, del cual se retiraron las impurezas de la superficie lavándolo en la solución de ácido nítrico, se sumergió en agua destilada, seguido por tratamiento ultrasónico durante 15 minutos.

Ejemplo 2

Preparación de solución de iones de calcio de baja concentración y solución de iones de fosfato

Se inició la preparación de una solución de fosfato de calcio a partir de una etapa de preparación de una solución de iones de calcio (Ca) y una solución de iones de fosfato (PO₄) de alta concentración 200 mM. La solución de iones de calcio de alta concentración se preparó disolviendo cloruro de calcio (CaCl₂) en agua destilada (H₂O) y la solución de iones de fosfato de alta concentración se preparó disolviendo hidrógeno de sodio (Na₂HPO₄) en agua destilada (H₂O). La solución de iones de calcio y la solución de iones de fosfato de alta concentración de 200 mM se diluyeron respectivamente a 5 mM mediante la adición de agua destilada. Se almacenaron 5 mM de solución de iones de calcio y 5 mM de solución de iones de fosfato a la misma temperatura en la que se llevó a cabo el proceso de recubrimiento. Preferentemente, la solución de iones de calcio y la solución de iones de fosfato se almacenaron en una incubadora en la que se debió llevar a cabo el proceso de recubrimiento.

Ejemplo 3

Recubrimiento de hidroxiapatita de baja cristalización

Se preparó el recubrimiento de hidroxiapatita de baja cristalización de un modo en que un implante finalmente pretratado en agua destilada se colocó en un recipiente de reacción, al cual se añadió secuencialmente a cada uno 5 mM de solución de iones de fosfato de baja concentración y 5 mM de solución de iones de calcio en un volumen igual y se mezclaron para preparar una solución de fosfato de calcio de 2,5 mM. El recipiente de reacción que contenía el implante de titanio y la solución de fosfato de calcio de 2,5 mM se almacenó en una incubadora a 20 °C durante 60 minutos. Posteriormente, el implante de titanio se retiró del recipiente de reacción, se lavó rápidamente con agua destilada y se secó para formar una superficie de recubrimiento tipo red.

Una micrografía por barrido electrónico de la Figura 3 muestra una superficie de recubrimiento tipo red y una superficie dual de hidroxiapatita de baja cristalización y titanio. A partir de una micrografía de transmisión electrónico de la Figura 5, se puede confirmar que el recubrimiento de la hidroxiapatita de baja cristalización con morfología tipo red tiene un grosor de 10 nm o menos.

Para justar un grosor del recubrimiento, el implante puede almacenarse en una incubadora durante 180 minutos o más para formar un recubrimiento grueso de hidroxiapatita de baja cristalización. Cuando se prepara en primer lugar la solución de fosfato de calcio y de 1 a 3 minutos después, se coloca el implante pretratado y se almacena en un recipiente de reacción durante 60 minutos, también puede obtener una superficie de recubrimiento de tipo isla que existe externamente tanto de titanio como de hidroxiapatita de baja cristalización.

Tabla 1

	Morfología tipo red y tipo isla fina	Morfología tipo red fina	Morfología tipo isla
Implante	Producto	Producto	Producto

(continuación)

	Morfología tipo red y tipo isla fina	Morfología tipo red fina	Morfología tipo isla
Pretratamiento	Sí	Sí	Sí
Tiempo de espera después de mezclar las soluciones	0 min	0 min	3 min
Concentración	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM
Temperatura	20 °C	20 °C	20 °C
Tiempo	60 min	180 min	60 min
Resultados (dibujos)	Véase la Figura 3	Véase la Figura 2	Véase la Figura 4

Ejemplo comparativo 1

5 Capacidad de recubrimiento de implante de titanio de acuerdo con pretratamiento

Para un grupo experimental que se pretrató mediante ultrasonificación en agua destilada como en el Ejemplo 1 y un grupo de control no pretratado, se trataron implantes de titanio como en el procedimiento del Ejemplo 2 y el Ejemplo 3.

10

Tabla 2

	Grupo experimental	Grupo de control
Implante	Producto	Producto
Pretratamiento	Sí	No
Concentración	2,5 mM	2,5 mM
Temperatura	20 °C	20 °C
Tiempo	60 min	60 min
Resultados	Morfología tipo red	Recubrimiento fallido

La Figura 6 es una micrografía por barrido electrónico del grupo experimental y el grupo de control, que confirma que el grupo de control no muestra formación de un recubrimiento, mientras que el grupo experimental muestra la formación de una fina película de recubrimiento que tiene una morfología tipo red. Por lo tanto, el pretratamiento es un factor que tiene una influencia sobre la capacidad de recubrimiento en el implante de titanio y también es capaz de mejorar la uniformidad de una película de recubrimiento.

15

Ejemplo experimental 1

20

Ensayo de actividad de fosfatasa alcalina de células madre mesenquimatosas

Para medir un grado de diferenciación de células madre mesenquimatosas, que se cultivaron en una placa de cultivo celular, en osteoblastos, se evaluó la actividad de fosfatasa alcalina (ALP) de las células para los implantes recubiertos con hidroxiapatita de baja cristalización preparada en el Ejemplo anterior.

25

Se cultivaron células madre mesenquimatosas procedentes de médula ósea humana en un disco de titanio tratado con RBM (método de tratamiento de superficie que usa medio de decapado reabsorbible) que se recubrió con hidroxiapatita de baja cristalización. Se usó un disco de titanio tratado con RBM como grupo de control. Para inducir la diferenciación de las células madre mesenquimatosas en osteoblastos, las células se trataron con un medio de cultivo complementado con 0,1 µM de dexametasona, 10 mM de fosfato de β-glicerol y 50 µg/ml de ácido ascórbico, seguido por cultivo durante 14 días y se evaluaron las actividades de fosfatasa alcalina y se compararon entre sí. Las células cultivadas se lavaron con PBS, sometieron a lisis en un tampón de lisis y se evaluaron usando un kit de ensayo de actividad de ALP.

35

Tal como se muestra en un gráfico de la Figura 11, se puede confirmar que la actividad de fosfatasa alcalina de las células madre mesenquimatosas se aumentó en el disco de titanio recubierto con hidroxiapatita de baja cristalización que tiene un tipo mezclado de morfología tipo red y morfología tipo isla preparado en el Ejemplo anteriormente mencionado. A partir de estos resultados, se puede observar que el implante recubrimiento de hidroxiapatita de baja cristalización promueve en gran medida la diferenciación de las células madre mesenquimatosas en osteoblastos, en comparación con el implante tratado solo con RBM (método de tratamiento de superficie que usa medio de decapado reabsorbible) usado como grupo de control.

40

Ejemplo experimental 2

45

Ensayo de formación de nódulos calcificados en células madre mesenquimatosas

Para medir un grado de formación de nódulos calcificados de células madre mesenquimatosas que se cultivaron sobre una placa de cultivo celular, se llevó a cabo el siguiente experimento para los implantes recubiertos con hidroxiapatita de baja cristalización preparada en el Ejemplo.

- 5 Se cultivaron células madre mesenquimatosas procedentes de médula ósea humana en un disco de titanio tratado con RBM (método de tratamiento de superficie que usa medio de decapado reabsorbible) que se recubrió con hidroxiapatita de baja cristalización de forma análoga al procedimiento en el Ejemplo experimental 1. Se usó un disco de titanio tratado con RBM como grupo de control. Para inducir la diferenciación de las células madre mesenquimatosas en osteoblastos, las células se trataron con un medio de cultivo inductor de diferenciación, seguido por cultivo durante 2 o 4 semanas. Las células cultivadas se lavaron con PBS, se fijaron con un 4 % de paraformaldehído durante 15 minutos y, a continuación se lavaron con agua destilada. Una solución de Alizarín rojo (pH 4,2) que se había preparado previamente, se añadió a las células para llevar a cabo un proceso de tinción durante 20 minutos. A continuación, se lavaron las células con agua destilada para retirar la solución no teñida. Para la evaluación cuantitativa de los nódulos calcificados teñidos, se añadió un 10 % p/v de cetilpiridinio a la solución de fosfato de sodio (pH 7) para eluir el tinte teñido que se sometió, a continuación, a medición de absorbancia.

20 Tal como se muestra en un gráfico de la Figura 12, se puede observar que la calcificación de células madre mesenquimatosas aumentó sobre una superficie del disco de titanio recubierto con hidroxiapatita de baja cristalización que tiene un tipo mezclado de morfología tipo red y morfología tipo isla preparado en el Ejemplo anteriormente mencionado. A partir de estos resultados, se puede observar que el implante recubrimiento de hidroxiapatita de baja cristalización promueve en gran medida la formación de nódulos calcificados sobre la superficie del implante, en comparación con el implante tratado con RBM (método de tratamiento de superficie que usa medio de decapado reabsorbible) usado como grupo de control.

25 **Ejemplo experimental 3**

Evaluación de bioabsorbabilidad en animales

30 El implante recubierto con hidroxiapatita de baja cristalización preparado en el Ejemplo se trasplantó en iliones de conejo y se investigó la supervivencia de una película de recubrimiento antes y después de la remodelación ósea.

35 Un implante de titanio, que se recubrió con hidroxiapatita de baja cristalización de forma análoga con el procedimiento en el Ejemplo experimental 1, que usaba un implante de titanio tratado con RBM (método de tratamiento de superficie que usa medio de decapado reabsorbible) y una muestra del mismo como material de base, se trasplantó en el ilion de un conejo blanco de Nueva Zelanda. El implante tiene un diámetro de 3,5 mm y una longitud de 8,5 mm. Para el injerto del implante, el ilion del conejo se perforó para que tuviera un diámetro de 3,6 mm y el implante se empujó manualmente en el ilion. Después de 2 y 6 semanas, el conejo se sacrificó y se retiró el implante del conejo y se examinó con microscopía por barrido electrónico.

40 La micrografía por barrido electrónico proporcionada para fines comparativos en la Figura 13 muestra que la película de recubrimiento de hidroxiapatita de baja cristalización no estequiométrica tiene bioabsorbabilidad. En un experimento a la 2ª semana después del trasplante del implante en el ilion de conejo, se confirmó que la película de recubrimiento aún estaba presente. En un experimento a la 6ª semana, se confirmó que ya se había completado la remodelación ósea y, por lo tanto, la película de recubrimiento había desaparecido debido a los osteoclastos. Por consiguiente, se puede observar que la película de recubrimiento de hidroxiapatita de baja cristalización no estequiométrica de la presente invención tiene bioabsorbabilidad de modo que la película de recubrimiento de hidroxiapatita se retira mediante precipitación en el proceso de remodelación de los huesos.

50 Como puede observarse a partir de los Ejemplos experimentales tal como se ha descrito anteriormente, el implante recubierto con hidroxiapatita de baja cristalización que tiene una morfología de tipo mezclado tipo red y tipo isla promueve la diferenciación celular y la formación de nódulos calcificados. Tomado en conjunto, se puede confirmar que el implante recubrimiento de hidroxiapatita de baja cristalización de la presente invención muestra una excelente biocompatibilidad. Además, se puede observar que el implante de la presente invención se puede usar como un biomaterial superior que tiene bioabsorbabilidad mediante la participación del mismo en un proceso de remodelación ósea y mejora el descascarillamiento de la película de recubrimiento y la consiguiente separación del implante.

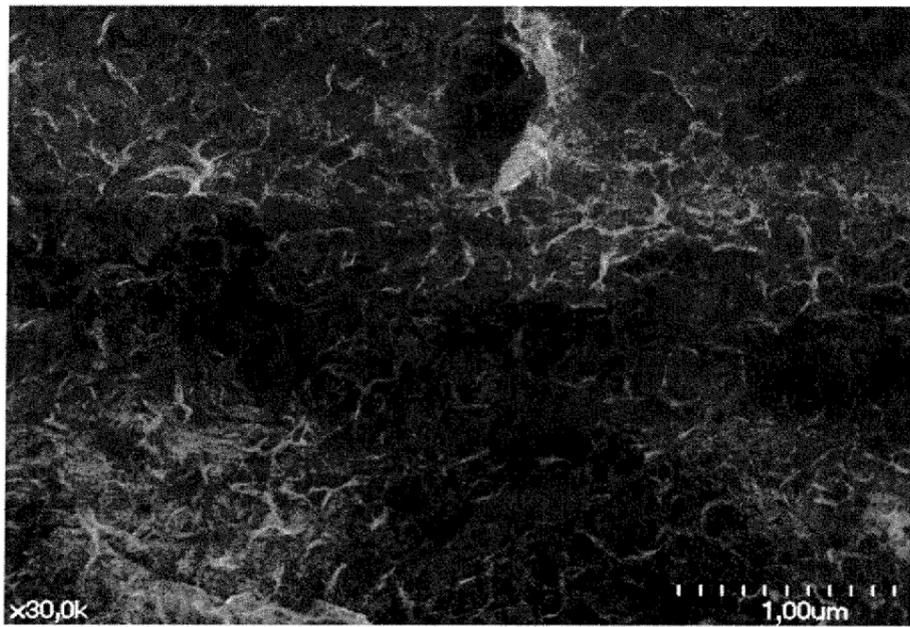
REIVINDICACIONES

1. Un método para recubrir un implante de titanio o de aleación de titanio con hidroxiapatita de baja cristalización, en donde el implante de titanio o de aleación de titanio tiene una doble superficie con coexposición de una capa de recubrimiento tipo red o tipo isla y la superficie de implante, en donde el método comprende:
- 5
- pretratar una superficie de implante de titanio o de aleación de titanio,
mezclar una solución de iones de fosfato con una solución de iones de calcio para preparar una solución de fosfato de calcio y sumergir y almacenar el implante de titanio o aleación de titanio en la solución de fosfato de calcio durante 1 hora a 3 horas a la temperatura de 15 °C a 30 °C.
- 10
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la etapa de pretratamiento incluye tratamiento ultrasónico de implante de titanio o aleación de titanio en agua destilada, una solución de iones de calcio, una solución de iones de fosfato o una solución de fosfato de calcio durante 1 minutos o más.
- 15
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la solución de iones de fosfato se prepara disolviendo fosfatos de amonio, fosfatos de sodio y fosfatos de potasio en agua destilada.
- 20
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la solución de iones de calcio se prepara disolviendo nitrato de calcio o cloro de calcio en agua destilada.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la etapa de pretratamiento se selecciona entre el grupo que consiste en tratamiento de RBM (medio de decapado reabsorbible), un tratamiento SLA (grava grande con tratamiento de chorro de arena y ataque químico de ácido), un tratamiento térmico a 300 °C o superior, una anodización y un tratamiento térmico después de un tratamiento de ácido o de base.
- 25
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la solución de fosfato de calcio tiene una concentración de 1,0 mM a 10 mM.
- 30
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la etapa de pretratamiento incluye tratamiento ultrasónico de implante de titanio o aleación de titanio en agua destilada, una solución de iones de calcio, una solución de iones de fosfato o una solución de fosfato de calcio durante 1 minuto, después del tratamiento de RBM (medio de decapado reabsorbible), un tratamiento SLA (grava grande con tratamiento de chorro de arena y ataque químico de ácido), un tratamiento térmico a 300 °C o superior, una anodización o un tratamiento térmico después de un tratamiento de ácido o de base.
- 35
8. Un implante de titanio o de aleación de titanio recubierto con hidroxiapatita de baja cristalización que tiene una doble superficie con coexposición de una capa de recubrimiento tipo red o tipo isla y una superficie de implante.
- 40
9. El implante de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la hidroxiapatita de baja cristalización tiene bioabsorbibilidad.
10. El implante de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en donde la fina película de hidroxiapatita de baja cristalización tiene un grosor de 10 nm o menos.
- 45

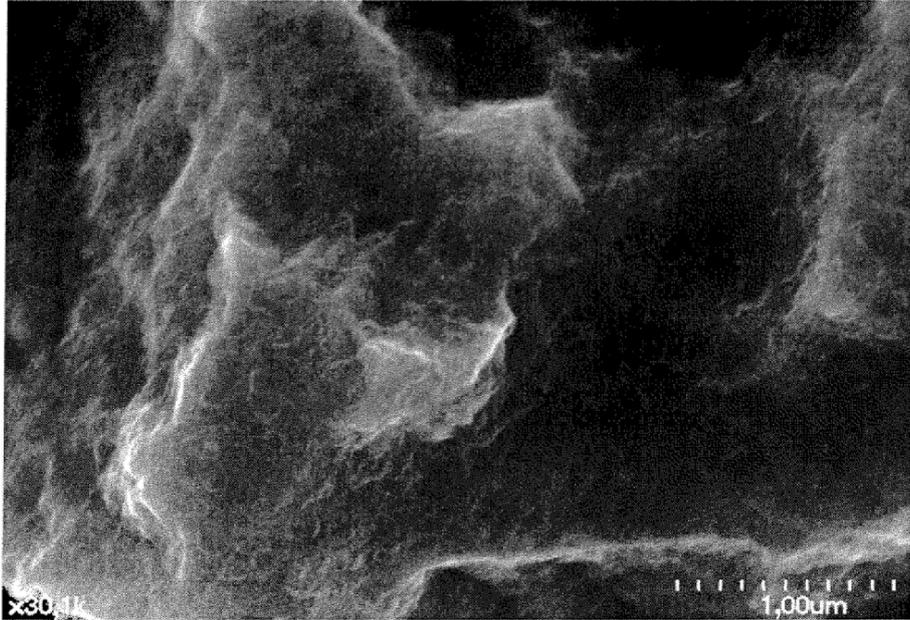
【Fig. 1】



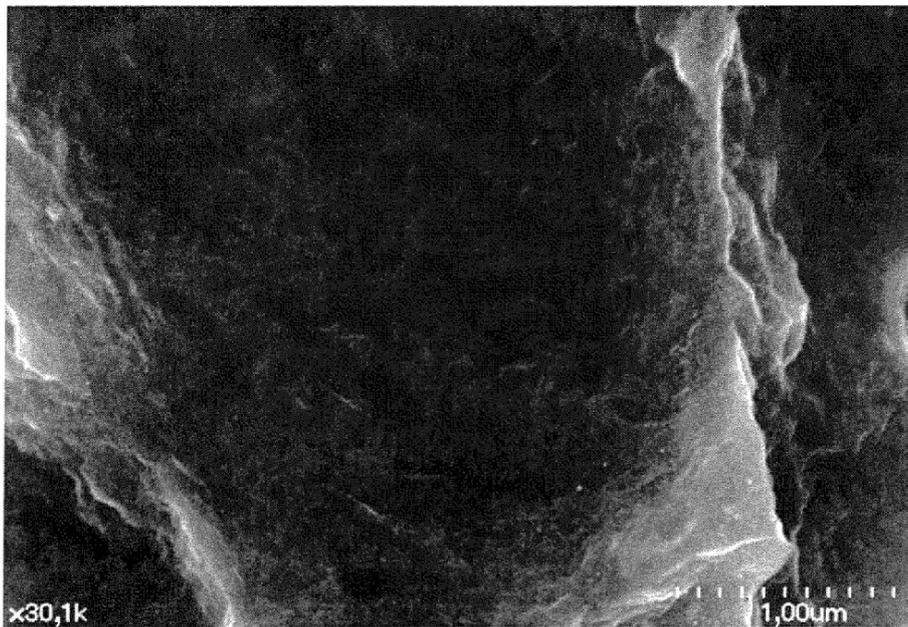
【Fig. 2】



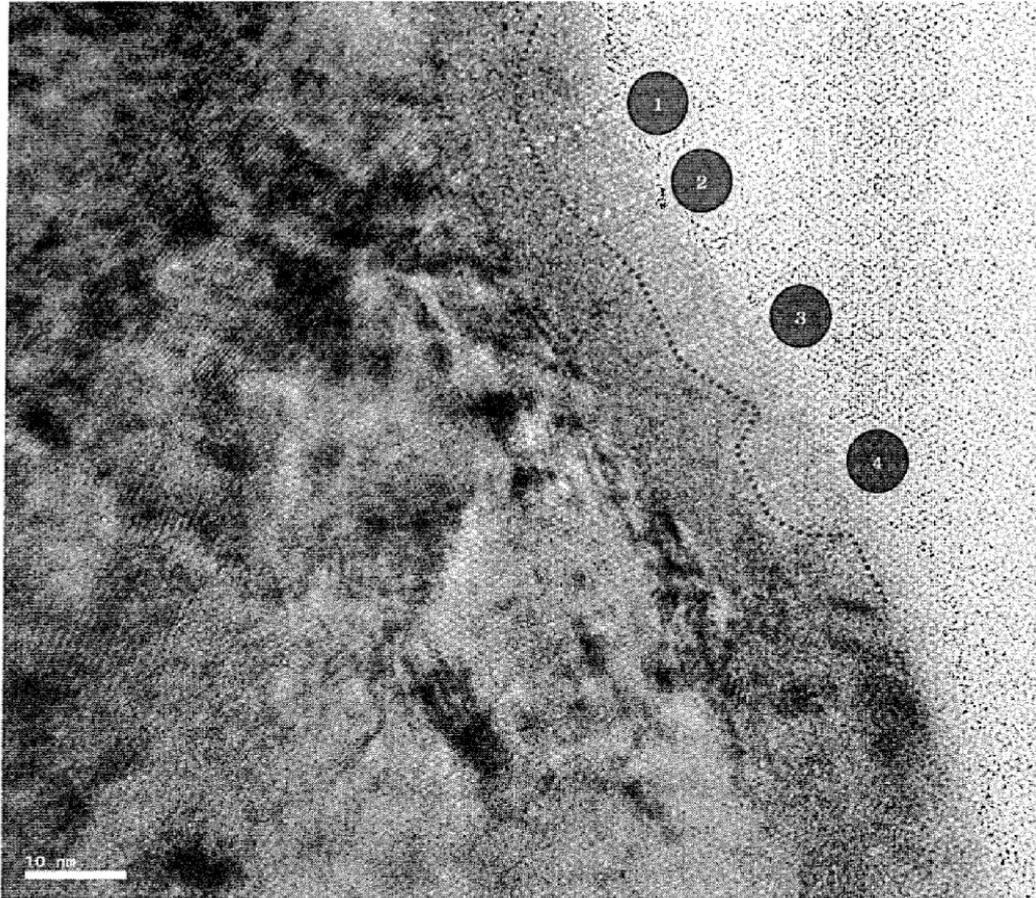
【Fig. 3】



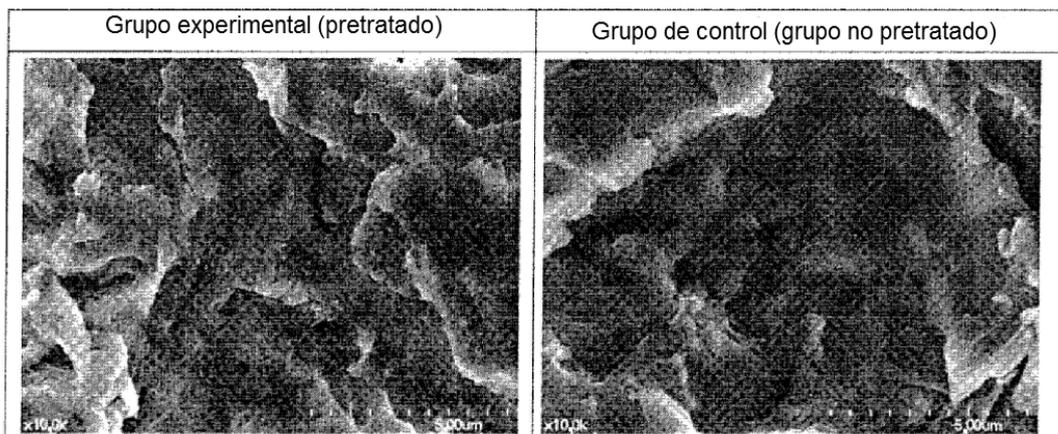
【Fig. 4】



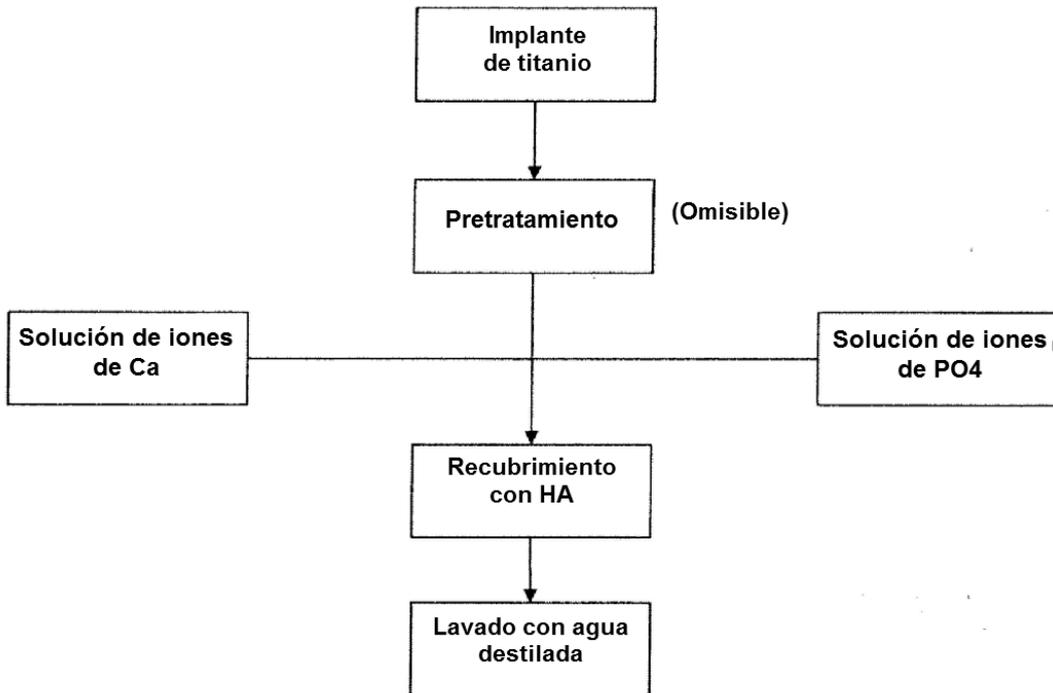
【Fig. 5】



【Fig. 6】



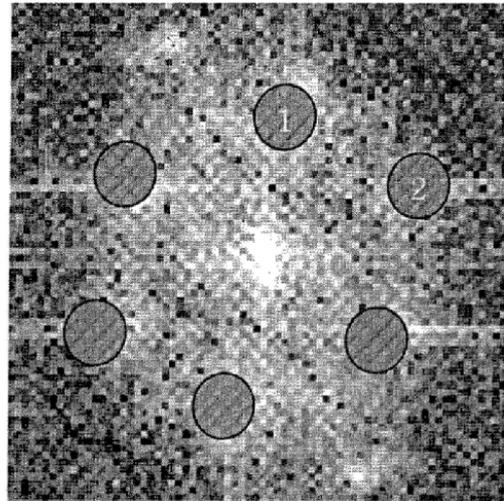
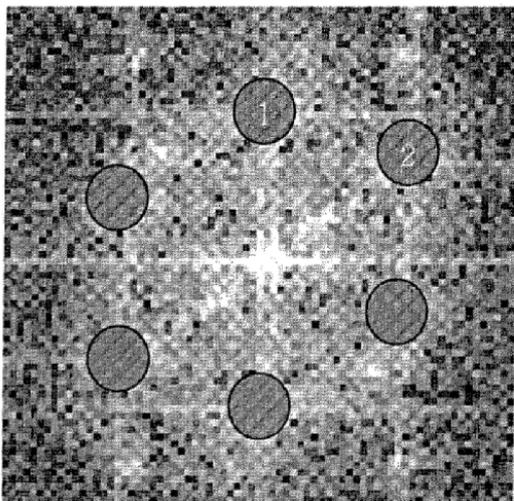
【Fig. 7】



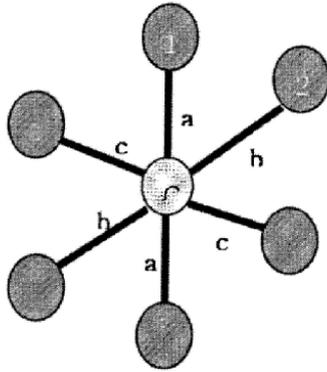
【Fig. 8】

HA (Sigma-Aldrich CAS 12167-74-7)

Hidroxiapatita de baja cristalización

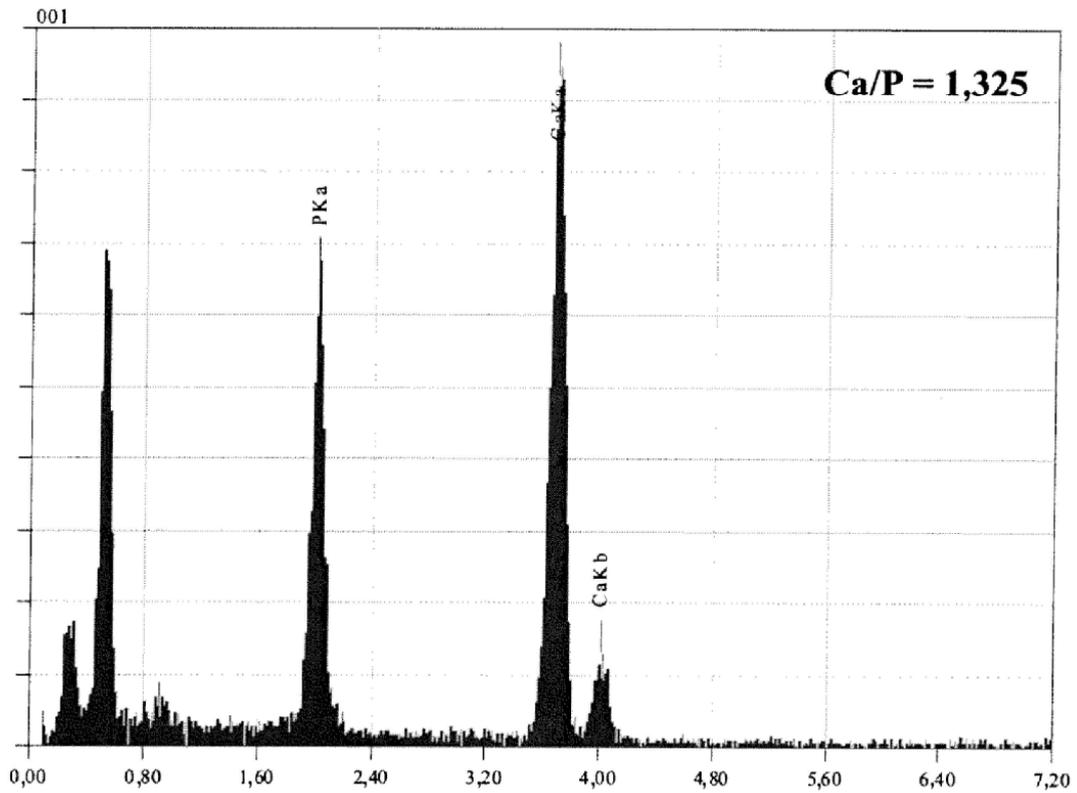


【Fig. 9】

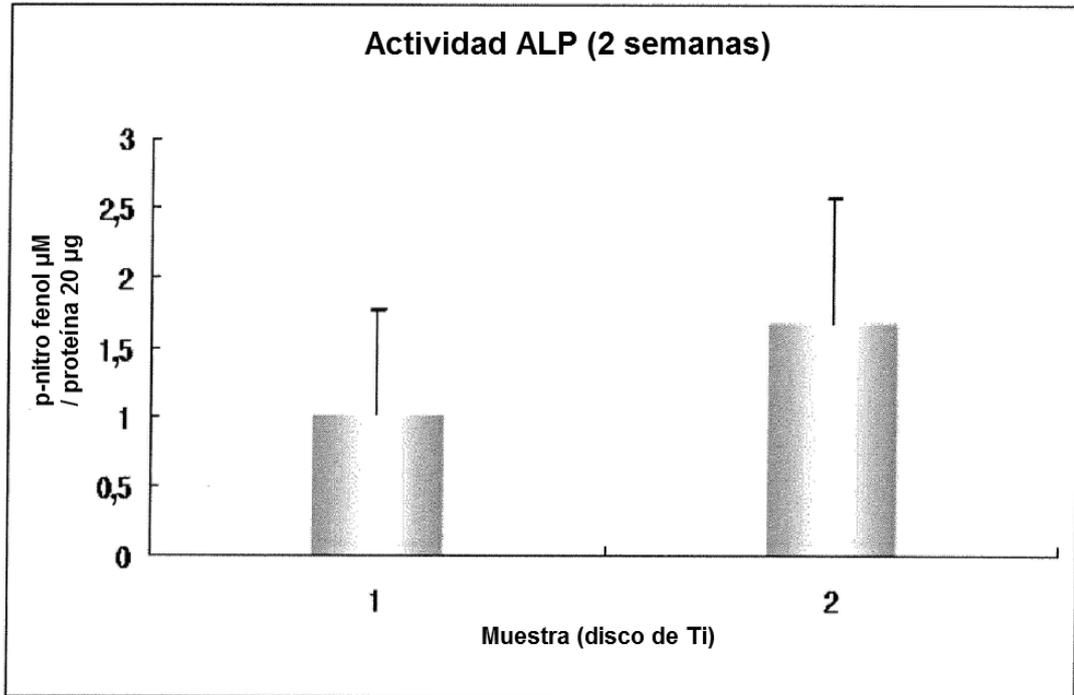


	Longitud (pixel)		Ángulo (grad)	
	HA	Recubrimiento	HA	Recubrimiento
a	187,00	185.44	53,89	53,30
b	223,66	226.99	57,57	58,36
c	184,40	180.62	68,75	67,56
a'	187,02	185,37	54,18	54,38
b'	222,18	226,36	57,16	57,81
c'	202,62	196,46	66,19	67,24

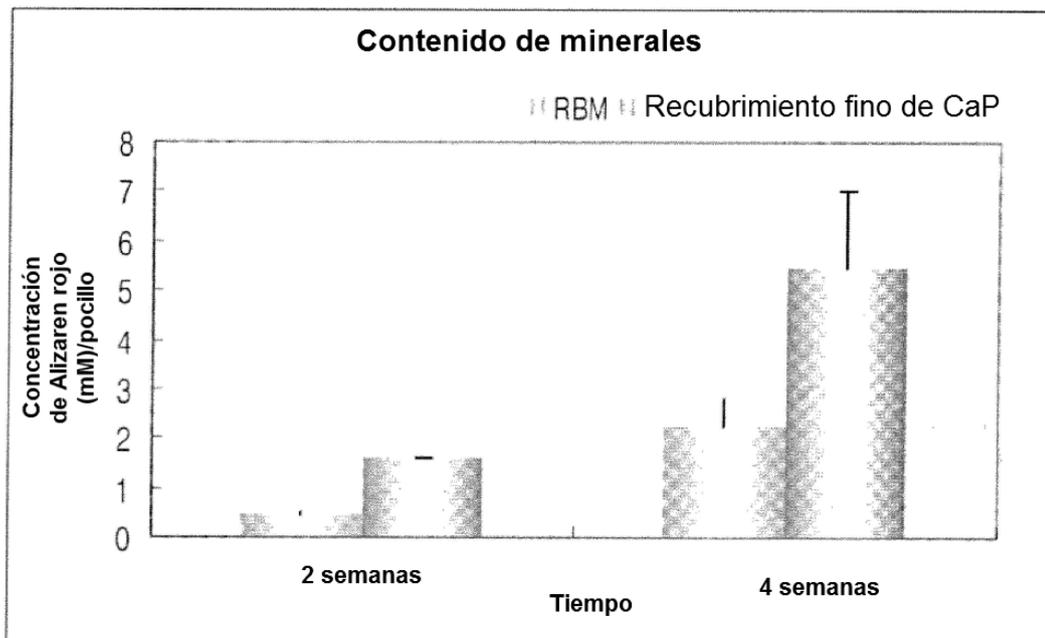
【Fig. 10】



【Fig. 11】



【Fig. 12】



【Fig. 13】

