



(12) Patentskrift

(10) SE 535 536 C2

(21) Patentansökningsnummer: 0900560-4
(45) Patent meddelat: 2012-09-11
(41) Ansökan allmänt tillgänglig: 2010-10-28
(22) Patentansökan inkom: 2009-04-27
(24) Löpdag: 2009-04-27
(83) Deposition av mikroorganism: ---
(30) Prioritetsuppgifter: ---

(51) Internationell klass:
A61L 27/32 (2006.01)

(73) Patenthavare: Biomacell AB, Erik Dahlbergsgatan 11B, 2vån, 411 26 Göteborg SE

(72) Uppfinnare: Håkan Engqvist, Östhammar SE
Jukka Lausmaa, Göteborg SE
Carl Lindahl, Uppsala SE
Peter Thomsen, Västra Frölunda SE
Wei Xia, Uppsala SE

(74) Ombud: BRANN AB, Box 12246, 102 26 Stockholm SE

(54) Benämning: Jonsubstituerade hydroxiapatitytbeläggningar

(56) Anförda
publikationer: US 6569489 B1 • US 6905723 B2 • US 5268167 A

(47) Sammandrag:

Uppfinningen avser en metod för att bilda en beläggningar innefattande två lager, ett första och ett andra lager där det första lagret är tätt eller poröst och det andra lagret innefattar täta eller porösa sfärer. Uppfinningen avser dessutom jonsubstituerad hydroxiapatitytbeläggning framställd genom metoden och biomedicinskt implantat innefattande ytbeläggningen.

Sammanfattning

~~Uppfinningen avser en metod för att bilda en kristallin ytbeläggning av en jonsubstituerad kalciumfosfat på ett substrat innefattande stegen:~~

- 5 a) ~~tillhandahålla ett substrat,~~
- b) ~~tillhandahålla en första vattenhaltig lösning innefattande kalciumjoner, magnesiumjoner, natriumjoner, kaliumjoner, kloridjoner, fosfatjoner, karbonatjoner, sulfatjoner som har ett initialt pH i intervallet 6,0 till 8,0 och en temperatur av 20°C till 100°C,~~
- 10 e) ~~sänka ner åtminstone en del av substratet i den första vattenhaltiga lösningen under en tidsperiod tillräcklig för att en första ytbeläggning ska bildas,~~
- d) ~~tillhandahålla en andra vattenhaltig lösning innefattande kalciumjoner, magnesiumjoner, natriumjoner, kaliumjoner, kloridjoner, fosfatjoner,~~
- 15 ~~karbonatjoner, sulfatjoner som har ett initialt pH i intervallet 6,0 till 8,0 och en temperatur av 20°C till 100°C, varvid lösningen vidare innefattar en eller flera av substitutionsjonerna Sr^{2+} , Si^{4+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{3+} , F^- ,~~
- e) ~~sänka ner åtminstone en del av substratet i den andra vattenhaltiga lösningen under en tidsperiod tillräcklig för att ett andra kristallint lager av~~
- 20 ~~ytbeläggning ska bildas.~~

~~Uppfinningen avser dessutom en kristallin jonsubstituerad hydroxiapatitytbeläggning framställd enligt metoden.~~

- Uppfinningen avser en metod för att bilda en beläggningar innefattande två lager, ett första och ett andra lager där det första lagret är tätt eller poröst och det andra lagret innefattar täta eller porösa sfärer. Uppfinningen avser dessutom jonsubstituerad hydroxiapatitytbeläggning framställd genom metoden och biomedicinskt implantat innefattande ytbeläggningen.

Jonsubstituerade hydroxiapatitytbeläggningar

BAKGRUND TILL UPPFINNINGEN

5 Föreliggande uppfinning avser en metod för att framställa en ytbeläggning, framför allt en kristallin ytbeläggning, av en jonsubstituerad kalciumfosfat på ett substrat. Uppfinningen avser dessutom en kristallin jonsubstituerad hydroxiapatit-ytbeläggning framställd enligt metoden.

10 Hydroxiapatit i ben är en multisubstituerad kalciumfosfat innefattande spår av CO_3^{2-} , F^- , Cl^- , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Si^{4+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{3+} , etc. [1-3]. Dessa joniska substitutioner spelar en viktig roll vid bildning av ben och i normala funktioner så som löslighet, ytkemi och morfologi hos materialet. Det har varit ett stort forskningsintresse kring den jonsubstituerad hydroxiapatiten.

15 Karbonat (CO_3^{2-}) är det mest rikliga (2-8 viktprocent) anjoniska substitutet, och delvis substituerar både på PO_4^{3-} -positionen och OH^- -positionen i hydroxiapatitstrukturen. Den höga reaktiviteten hos ungt ben kan relateras till den högre närvaron av karbonat jämfört med gammalt ben. Karbonerad hydroxiapatit
20 visade förbättrad löslighet, kollagendeponering in vitro och reabsorption in vivo, jämfört med stökiometrisk hydroxiapatit.

Fluor finns i ben och i tänder i kropparna hos vertebrater. Det har visats att substitutionen av fluor i OH^- -positioner och bildning av fluorsubstituerad
25 hydroxiapatit förhöjde syreressistansen och de mekaniska egenskaperna hos biokeramer av hydroxiapatit [4] och inducerade bättre biologisk respons [5]. På grund av den överlägsna syreressistansen och den mekaniska egenskapen, är den fluorsubstituerade hydroxiapatiten en fördelaktig ytbeläggning på dentala implantat.

30 Kisel har visats vara essentiell för normal ben- och brosktillväxt och utveckling. Syntetisk hydroxiapatit som innefattar spårmängder av Si i dess strukturer uppvisar avsevärt ökad biologisk funktion i jämförelse med stökiometrisk hydroxiapatit [6]. Den förbättrade biologiska funktionen kan tillskrivas de Si-

inducerade förändringarna i materialets egenskaper och också till den direkta effekten av Si i fysiologiska processer hos ben- och bindevävnadssystemen. Si-substitution främjar biologisk aktivitet genom omvandlingen av ytan hos materialet till en biologiskt ekvivalent hydroxiapatit, genom att öka lösligheten hos materialet, genom att skapa en mer elektronegativ yta och genom att skapa en finare mikrostruktur. Frisättning av Si-komplex till det extracellulära mediet och närvaron av Si vid ytan av materialet kan inducera ytterligare dosberoende stimulatoriska effekter på celler hos ben- och broskvävnadssystem [6].

- 10 Eftersom strontium är kemiskt och fysiskt nära släkt med kalcium är den lätt att föra in som en naturlig substitution för kalcium i hydroxiapatit. Strontium har visats ha effekterna att öka benbildning och att minska benresorption, vilket leder till en ökning i benmassa och förbättrade benmekaniska egenskaper i normala djur och människor. Sr-substituerade hydroxiapatitkeramer har uppvisat bättre mekaniska egenskaper än ren hydroxiapatit och ökade proliferationen och differentieringen av osteoblastceller i in vitro-studie [7].

- 20 Magnesium har påvisats i höga koncentrationer i ben- och broskvävnad under de initiala faserna av osteogenesis och för att orsaka accelerationen av kärnbildningskinetiken av hydroxiapatit och för att hämma dess kristallisationsprocess. Landi et al. har observerat att Mg-substituerad hydroxiapatit förbättrade beteendet hos celler när det gäller adhesion, proliferation och metabolisk aktivitet i jämförelse med stökiometrisk hydroxiapatit [8].

- 25 Zink är ett större spårämne och har visat sig spela en viktig roll i mänsklig vävnadsutveckling. In vitro-försök har visat att zink hämmar benresorption och har stimulatorisk effekt på benbildning. Zinksubstituerad hydroxiapatit är potentiellt ett material som kan ha samma effekter. När zink har varit substituerat in i HA och trikalciumfosfat-kristallgittret (TCP) har det visat sig hämma osteoklaster in vitro och att främja bentillväxt in vivo.

Trots de fördelaktiga resultaten, är den kliniska tillämpningen av jonsubstituerade keramer och cement begränsad på grund av den låga mekaniska styrkan. Genom ytbeläggning av implantat med jonsubstituerad HA kan den högre mekaniska

styrkan av en metall kombineras med de egenskaperna hos den jonsubstituerade HA. Därför är jonsubstituerad hydroxiapatit som ytbeläggning på implantat av intresse. Sådana ytbeläggningar framställda hittills har framställts genom plasmaspayning [9], sol-gel [10], magnetron-samsputtring [11], pulserad laserdeponering [12] och mikro-arc-oxidationstekniker (eng. microarc oxidation) [13]. Dessa ytbeläggningstekniker har några nackdelar även om de är relativt vanligt använda. Till exempel är ytbeläggningarna relativt tjocka och spröda och har dessutom kemiska defekter. De fäster inte alltid bra till substraten. Dessutom kan sådana ytbeläggningar inte appliceras jämnt och uniformt till ytor med komplexa geometrier såsom porösa och urkarvade ytor. Dessutom är högtemperaturbehandling essentiell för att skapa dessa ytbeläggningar, vilket begränsningar vilka substratmaterial som kan användas. För att överkomma några av dessa nackdelar har lågtemperaturförfaranden använts för att skapa hydroxiapatitkeramytbeläggningar genom lösningsbaserade metoder. Bunker et al. har upptäckt en teknik för framställning av en oktakalciumfosfat-ytbeläggning genom att indränka (eng. soaking) substratet i en lösning innehållande kalciumklorid [14]. De andra exemplen finns i US-patenten 6,905,723B2 [15] och 6,569,489B1 [16] i vilka hydroxiapatitytbeläggningar är framställda genom att använda lösningen innehållande Ca^{2+} , PO_4^{3-} , Sr, Na^+ , K^+ , HCO_3^- , Cl^- , Mg^{2+} och möjligtvis också Si- och F-joner så som nämns i den detaljerade beskrivningen.

Biomineralisering är ett naturligt själv-assemblerande förfarande för biomineralbildning i vattenbaserad lösning. I människokroppen består alla normala och de flesta patologiska kalcificeringar av kalciumfosfatföreningar. Men hydroxiapatitinnehållet i ben är inte stökiometrisk kalciumfosfat, utan istället en kalciumbristande och multisubstituerad hydroxiapatit som är bildad genom biomineralisering. Wu et al. har rapporterat att ett biomineraliserat HA-lager på vävnadsbärryten kunde öka cellproliferingshastigheten och differentieringsnivån [18].

US 6,569,481 och WO 9741273 beskriver förfaranden för att ytbelägga biomedicinska implantat med hydroxiapatitytbeläggningar via ett biomineraliseringsförfarande. De resulterande ytbeläggningarna kan valfritt dessutom innehålla silikat och sulfat. Beskrivningen av prekursormaterialen som

används för att bilda HA-ytbeläggningarna med fastlösningsjonerna är inte beskrivet i de citerade dokumenten.

BESKRIVNING AV UPPFINNINGEN

5

Föreliggande uppfinning är baserad på förståelsen att ett biomineraliserat lager kommer att ha fördelaktiga effekter på benbindning och benregenerering.

10 Biomineralisering kombinerad med jonsubstitution kommer att ha fördelar på grund av att jonsubstituerade hydroxiapatitytbeläggningar har en stor likhet med det naturliga mineralet i ben, vilket är baserat på ett biomineraliseringsförfarande. Dessutom, eftersom biomineraliseringsförfarandet sker i en vattenhaltig lösning, är den tillämpbar på vilken öppen yta som helst och är inte begränsad av den komplexa geometrin hos implantaten. Biomineraliseringsförfarandet är också en
15 substratmaterial. Föreliggande uppfinning avser framför allt kombinationen av ytbeläggningskemin och morfologin erhållen genom att applicera förfarandet och materialen så som beskrivet i uppfinningen.

20 Denna uppfinning tillhandahåller en ny framställningsteknik av jonsubstituerad hydroxiapatit eller brushit eller monoetit eller amorfa kalciumfosfatytbeläggningar eller kombinationer därav, innehållande substitutionsjoner så som F^- , Sr^{2+} , Si^{4+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{3+} på implantat. Framställningstekniken är baserad på ett biomineraliseringsförfarande.

25 Denna nya teknik är baserad på ett biomineraliseringsförfarande som använder en modifierad simulerad kroppsvätska och en fosfatbuffertlösning innehållande de katjoniska och anjoniska substituerade jonerna i kalciumfosfatytbeläggningen.

30 Katjoniska substitutioner är Sr^{2+} , Si^{4+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{3+} etc., anjoniska substitutioner är F^- etc. Källan till jonsubstitutionerna kan vara lösliga salter och delvis lösliga salter innehållande jonerna som ska substitueras så som $SrCl_2$, $SrCO_3$, $Sr(NO_3)_2$, $NaSiO_3$, kalciumsilikat ($CaOSiO_2$, $CaO(SiO_2)_2$, $CaO(SiO_2)_3$), $ZnCl_2$, $ZnSO_4$, $BaCl_2$, $FeCl_3$, $Fe(NO_3)_3$, $NaCO_3$, NaF , $NaFPO_4$.

~~Därmed tillhandahåller föreliggande uppfinning ett förfarande för framställning av en kristallin ytbeläggning av en jonsubstituerad kalciumfosfatförening på ett substrat innefattande stegen:~~

- ~~a) tillhandahålla ett substrat,~~
- 5 ~~b) tillhandahålla en vattenhaltig lösning innefattande kalciumjoner, magnesiumjoner, natriumjoner, kaliumjoner, kloridjoner, fosfatjoner, karbonatjoner, sulfatjoner som har ett initialt pH i intervallet 2,0 till 10,0 och en temperatur av 20°C till 100°C, företrädesvis ett pH mellan 6,0 till 8,0 och en temperatur mellan 37°C och 60°C, varvid lösningen vidare innefattar en~~
- 10 ~~eller flera av substitutionsjonerna Sr^{2+} , Si^{4+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{3+} , F^- , och~~
- ~~c) sänka ner åtminstone en del av substratet i den vattenhaltiga lösningen för en tidsperiod tillräcklig för att den kristallina ytbeläggningen ska bildas.~~

15 Därmed tillhandahåller föreliggande uppfinning ett förfarande för att bilda en ytbeläggning av en jonsubstituerad kalciumfosfat på ett substrat innefattande stegen:

- d) a) tillhandahålla ett substrat,
- e) b) tillhandahålla en lösning innefattande en fosfatbuffertlösning där Ca/P-kvoten är 1/10 och som har ett initialt pH i intervallet 2,0 till 10,0 och där
- 20 lösningen dessutom innefattar:
- f) i) strontiumjoner i en koncentration av 0,06-0,6 mM och där lösningen har en temperatur av eller värms till mellan 37°C och 60°C, eller
- g) ii) kiseljoner i en koncentration av ungefär 0,33 mM och där lösningen har en temperatur av eller värms till ungefär 60°C, eller
- 25 h) iii) strontiumjoner och kiseljoner i en koncentration av 0,06 till 0,6 mM respektive 0,075 till 0,15 mM och där lösningen har en temperatur av eller värms till mellan 37°C och 60°C, och
- i) c) sänka ner åtminstone en del av substratet i en av lösningarna i-iii under en tidsperiod tillräcklig för att ytbeläggningen ska bildas,

j) varigenom den erhållna ytbeläggningen är uppbyggd av ett första och ett andra lager där:

k) lösningen i) ger ett tätt första lager och ett andra lager innefattande täta eller porösa sfärer, och

5 l) lösningarna ii och iii) ger ett poröst första lager och ett andra lager innefattande porösa sfärer.

Föreliggande uppfinning avser dessutom jonsubstituerad hydroxiapatitytbeläggning framställd genom metoden enligt föreliggande uppfinning.

10 Föreliggande uppfinning avser dessutom biomedicinskt implantat innefattande ytbeläggningen enligt föreliggande uppfinning.

Koncentrationen av kalciumjoner kan vara i intervallet $0,01 - 25 \cdot 10^{-3}M$.

Koncentrationen av magnesiumjoner kan vara i intervallet $0,01 - 15 \cdot 10^{-3}M$.

15 Koncentrationen av natriumjoner kan vara i intervallet $0,01 - 1420 \cdot 10^{-3}M$.

Koncentrationen av kaliumjoner kan vara i intervallet $0,01 - 1420 \cdot 10^{-3}M$.

Koncentrationen av kloridjoner kan vara i intervallet $0,01 - 1030 \cdot 10^{-3}M$.

Koncentrationen av fosfatjoner kan vara i intervallet $0,01 - 10 \cdot 10^{-3}M$.

Koncentrationen av karbonatjoner kan vara i intervallet $0,01 - 270 \cdot 10^{-3}M$.

20 Koncentrationen av sulfatjoner kan vara i intervallet $0,01 - 5 \cdot 10^{-3}M$.

Företrädesvis kan koncentrationen av kalciumjoner vara i intervallet $0,5 - 2,5 \cdot 10^{-3}M$

Företrädesvis kan koncentrationen av magnesiumjoner vara i intervallet $0,2 - 1,5 \cdot 10^{-3}M$.

25 Företrädesvis kan koncentrationen av natriumjoner vara i intervallet $100 - 150 \cdot 10^{-3}M$.

Företrädesvis kan koncentrationen av kaliumjoner vara i intervallet $1,0 - 5,0 \cdot 10^{-3}M$.

Företrädesvis kan koncentrationen av kloridjoner vara i intervallet $100 - 150 \cdot 10^{-3}M$.

30 Företrädesvis kan koncentrationen av fosfatjoner vara i intervallet $1,0 - 10 \cdot 10^{-3}M$.

Företrädesvis kan koncentrationen av karbonatjoner vara i intervallet $1,0 - 50 \cdot 10^{-3}M$.

Företrädesvis kan koncentrationen av sulfatjoner vara i intervallet $0,1 - 1,0 \cdot 10^{-3}M$.

Koncentrationen av katjoner som ska substitueras, det vill säga Sr^{2+} , Si^{4+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{3+} , kan vara i intervallet $0,01 - 0,1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ och koncentrationen anjoner, det vill säga F^- , som ska substitueras kan vara i intervallet $1 - 100 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

5

Katjonerna och anjonerna som ska substitueras in i den biomineraliserade hydroxiapatitytbeläggningen kan tillsättas till lösningen med en kontrollerad katjon/anjon- eller anjon/fosfat-kvot (inklusive hydroxid).

- 10 Förfarandet enligt uppfinningen kan användas till olika substrat innefattande titan, titanlegeringar, andra metaller och legeringar, biokeramer, bioaktiva glas och polymerer.

- 15 Förbehandling av substratet, framför allt substrat bildad av metall och legeringar, för att bilda en funktionaliserad bioaktiv yta kan vara nödvändig. Förbehandling av ytor i vattenhaltig lösning så som $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$ -lösningar är det som eftersträvas så som beskrivet i känd teknik. Till exempel ren titan och titan är förbehandlad genom att använda alkalisk lösning, syralösning och UV-strålning [17] för att kunna aktivera ytorna för att erhålla en bioaktiv yta med förmåga att
20 främja hydroxiapatittillväxt.

- Förfarandet enligt uppfinningen kan företrädesvis användas till benförankrat implantat där ett förhöjt och ett permanent benläkande är önskvärt för att erhålla en god klinisk funktion. Exempel på sådana applikationer är dentala implantat,
25 kraniofaciala implantat eller ortopediska implantat.

- Halten av substituerat kalcium genom katjonisk substitution är up till 80% och halten av substituerad fosfat och hydroxid genom anjoniska substitutioner är upp till 30%.

30

Tjockleken hos de joniskt substituerade hydroxiapatitytbeläggningarna framställda genom biomineralisering kan kontrolleras till intervallet 10 nm till $100 \mu\text{m}$ genom nedsänkningstiden och temperaturen och jonkoncentrationerna hos lösningen i förfarandet.

Biomineraliseringsförfarandetemperaturen är från 20°C till ungefär 60°C 100°C
företrädesvis 37°C till 60°C.

- 5 Förfarandet enligt uppfinningen kan användas för att ytbelägga ytor med komplexa geometrier så som porösa material och utkarvade material.

Förfarandet enligt uppfinningen tillåter dessutom ytbeläggning av endast en del av
ett implantat likväl som att ytbelägga olika delar av implantatet med ytbeläggningar
10 med olika jonsubstitutioner och/eller tjocklek.

Förfarandet enligt uppfinningen kan användas för att tillverka inte bara
singeljonssubstituerade hydroxiapatitytbeläggningar utan också två-, tre- och fyr-
joniskt substituerade hydroxiapatitytbeläggningar.

15 Bildandet av joniskt substituerade hydroxiapatitytbeläggningar genom
biomineraliseringsförfarande innefattar indränkning av bioaktiva implantatprov i en
minerliserad lösning så som modifierad simulerad kroppsvätska (SBF) och
fosfatbuffertlösning (PBS) (Tabell 1), innehållande olika katjoner och anjoner. Den
20 mineraliseringsbara lösningen innefattar de stora oorganiska jonerna närvarande i
människokroppen nämligen Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , HCO_3^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} etc.

Tabell 1. Jonkoncentrationer i blodplasma, modifierad SBF och modifierad PBS (10^{-3}M)

Jon	Blodplasma (mmol/l)	SBF (mmol/l)	PBS* (mmol/l)
Na^+	142	142	145
K^+	5	5	4,2
Mg^{2+}	1,5	1,5	0,49
Ca^{2+}	2,5	2,5	0,91
Cl^-	103	148	143
HCO_3^-	27	4,2	
HPO_4^{2-}	1	1	9,6
SO_4^{2-}	0,5	0,5	

25 *:köpt från Sigma-Aldrich

Biomineraliseringsförfarandet kan delas upp i multipla steg för jonerna, så som F^- och Zn^{2+} , som kan bilda kalciumfosfatföreningar med låg

löslighetsproduktskonstant. Förfarandet är att indränkta substratet i den

- 5 mineraliserade lösningen i 1-3 dagar, och sen flytta den till den vattenhaltiga lösningen innehållande jonerna som ska substitueras i 1-3 dagar. Detta förfarande repeteras tills den tilltänkta tjockleken och/eller jonhalten har uppnåtts hos de nya ytbeläggningarna.

- 10 Därmed tillhandahåller föreliggande uppfinning också ett förfarande för bildningen av en kristallin ytbeläggning av en jonsubstituerad hydroxiapatit på ett substrat innefattande stegen:

- a) ~~tillhandahålla ett substrat,~~
- b) ~~tillhandahålla en första vattenhaltig lösning innefattande kalciumjoner,~~
- 15 ~~magnesiumjoner, natriumjoner, kaliumjoner, kloridjoner, fosfatjoner, karbonatjoner, sulfatjoner som har ett initialt pH i intervallet 6,0 till 8,0 och en temperatur av 20°C till 100°C,~~
- c) ~~sänka ner åtminstone en del av substratet i den första vattenhaltiga lösningen under en tidsperiod tillräcklig för att en första kristallin~~
- 20 ~~ytbeläggning ska bildas,~~
- d) ~~tillhandahålla en andra vattenhaltig lösning innefattande kalciumjoner, magnesiumjoner, natriumjoner, kaliumjoner, kloridjoner, fosfatjoner, karbonatjoner, sulfatjoner som har ett initialt pH i intervallet 6,0 till 8,0 och en temperatur av 20°C till 100°C, varvid lösningen vidare innefattar en eller~~
- 25 ~~flera av substitutionsjonerna Sr^{2+} , Si^{4+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{3+} , F^- , och~~
- e) ~~sänka ner åtminstone en del av substratet i den andra vattenhaltiga lösningen under en tidsperiod tillräcklig för att ett andra kristallint lager av ytbeläggning ska bildas.~~

Valfritt, steg b) till e) kan repeteras vilket antal gånger som helst.

30

Under biomineraliseringsytbeläggningsförfarandet indränkts de bioaktiva implantatproverna, efter rengöring, i den mineraliseringsbara lösningen med substituerade joner vid en bestämd temperatur under en tidsperiod tillräcklig för

att ett lager av kristallin ytbeläggning ska bildas, normalt 1-2 veckor. Proverna tas bort från lösningen och sköljs med avjonat vatten och torkas i luft.

Halten katjoniska substitutioner av kalcium i den jonsubstituerade

- 5 hydroxiapatitytbeläggningen enligt uppfinningen är upp till 80% och halten av anjoniska substitutioner av fosfat och hydroxid är upp till 30%.

Tjockleken av den joniskt substituerade hydroxiapatitytbeläggningen framställd genom biomineralisering kan kontrolleras till intervallet 10nm till 100µm genom
10 nedsänkningstiden och temperaturen och jonkoncentrationerna i lösningen i förfarandet.

Föreliggande uppfinning tillhandahåller dessutom en kristallin jonsubstituerad hydroxiapatitytbeläggning framställd genom förfarandet enligt uppfinningen.

15

Föreliggande uppfinningen tillhandahåller dessutom en kristallin jonsubstituerad hydroxiapatitytbeläggning med specifika kännetecken som bestäms genom

- a) Röntgendiffraktion (XRD)
- b) Svepelektronmikroskopi (SEM)
- 20 c) Röntgenfotoelektronspektroskopi (XPS) och/eller
- d) Time-of-flight secondary ion mass spectroscopy (ToF-SIMS)

Via ytbeläggningsförfarandet så som beskrivet här ovan kan morfologin hos kalciumfosfatytbeläggningen kontrolleras. Via jonisk substitution av Sr i

- 25 hydroxiapatit består den bildade HA-ytbeläggningen på Ti-substrat av sfäriska partiklar, t.ex. så som illustreras i Fig. 4 och via tillsättning av Si innehåller ytbeläggningsmorfologin små flakliknande partiklar, t.ex. så som illustrerat i Fig. 17. Förmågan att kontrollera ytbeläggningsmorfologi ger ytbeläggningen optimal porositet för att interagera med värdvävnaden.

30

TILLÄMPNINGAR

Baserat på den stora bredden av ytbeläggningar som kan framställas med uppfinningen kan olika tillämpningar betraktas.

Användningen av de bioaktiva ytbeläggningarna med dess fördelaktiga biologiska effekter gör dem lämpliga att tillämpas på biomedicinska implantat. Detta innefattar temporära och permanenta material där ytbeläggningen kan förbättra bindningen av implantatet till vävnader. En speciell omständighet är det kliniska behovet av ett snabbt och permanent läkande ben runt ett implantat, t.ex. dentala, karniofaciala och ortopediska implantat. Exempel på det senare innefattar tillämpningar med spinalimplantat, artroplastik, osteosyntes tillämpningar och fixeringsanordningar, brosk- och subkondrala bendifekter, fyllmedel för håligheter i ben och andra situationer där ett implantat bör fixera bendelar, förstärka ben och ersätta defekter och tillåta att funktionella belastningar tillämpas. Av särskilt intresse är implantat i benvävnader som är försvagade på något vis på grund av sjukdom (t.ex. osteoporos, diabetes), trauma, åldrande och som följd av behandling (t.ex. strålbehandling).

Ytterligare möjliga situationer är när prognosen för en lyckad implantatbehandling är lägre med mindre optimala implantatytor. Också i de situationer där anatomin hos patienten resulterar i en försämrad prognos för framgång, så som i områden med små mängder av ben som kan tillhandahålla initial implantatstabilitet, kommer användningen av uppfinningen att vara fördelaktig.

Möjligheten att endast täcka delar av ett implantat som uppfinningen erbjuder, eller att framställa olika typer av ytbeläggningar på olika delar av ett implantat, öppnar upp möjligheten för att skräddarsy ytegenskaperna hos implantaten för optimalt biologiskt utförande i förhållande till speciella typer av vävnader och för individuella patienter. För ett benförankrat implantat som penetrerar huden eller mukosa kan uppfinningen användas för att applicera en ytbeläggning enbart till de delar av implantatet som är i kontakt med ben. Användningen av olika ytbeläggningar på olika delar av implantatet kan också användas för att skapa ytbeläggningar som tillhandahåller den optimala responsen beroende på vilken typ av benvävnad olika delar av implantatet är i kontakt med. För ett benförankrat implantat som är i kontakt med både kortikalt ben och benmärg, kan olika delar av implantatet förses med olika ytbeläggningar designade för att optimera utförandet i dessa typer av vävnader.

BESKRIVNING AV FIGURER

Figur 1. XRD-mönster av värmebehandlade titanplattor indränkta i den 0,06 mmol/l och 0,6 mmol/l Sr-PBS-lösning vid 37°C (A) respektive 60°C (B) i 1 vecka. (*: specifika toppen för hydroxiapatit)

Figur 2. XRD-mönster av värmebehandlade titanplattor indränkta i den 0,06 mmol/l och 0,6 mmol/l Sr-PBS-lösning vid 37°C (A) respektive 60°C (B) i 2 veckor. (*: specifika toppen för hydroxiapatit)

Figur 3. SEM-bilder av värmebehandlad titanyta, förstoring (A) 3000 x, (B) 10000 x.

Figur 4. SEM-bilder av värmebehandlad titanyta efter indränkning i 0,06 mM strontium-PBS i 1 vecka vid 37°C, förstoring 10000 x.

Figur 5. SEM-bilder av värmebehandlad titanyta efter indränkning i 0,06 mM strontium-PBS i 2 veckor vid 37°C, förstoring 10000 x.

Figur 6. SEM-bilder av värmebehandlad titanyta efter indränkning i 0,06 mM strontium-PBS i 1 vecka vid 60°C, förstoring (A) 1000 x (B) 30000 x.

Figur 7. SEM-bilder av värmebehandlad titanyta efter indränkning i 0,06 mM strontium-PBS i 2 veckor vid 60°C, förstoring (A) 1000 x (B) 30000 x.

Figur 8. SEM-bilder av värmebehandlad titanyta efter indränkning i 0,06 mM strontium-PBS i 1 vecka vid 37°C, förstoring (A) 10000 x (B) 45000 x.

Figur 9. SEM-bilder av värmebehandlad titanyta efter indränkning i 0,6 mM strontium-PBS i 1 vecka vid 60°C, förstoring (A) 10000 x (B) 50000 x.

Figur 10. XRD-mönster av PVD-behandlade titanplattor indränkta i den 0,06 mmol/l och 0,6 mmol/l Sr-PBS-lösning vid 37°C (A) respektive 60°C (B) i 1 vecka. (*: specifika toppen för hydroxiapatit)

Figur 11. XRD-mönster av PVD-behandlade titanplattor genomdränkta i den 0,06 mmol/l och 0,6 mmol/l Sr-PBS-lösning vid 37°C (A) respektive 60°C (B) i 2 veckor. (*: specifika toppen för hydroxiapatit)

5

Figur 12. SEM-bilder av PVD-behandlad titanyta, förstoring (A) 1000 x (B) 30000 x.

Figur 13. SEM-bilder av PVD-behandlad titanyta efter indränkning i 0,06 mM strontium-PBS i 1 vecka vid 60°C, förstoring (A) 3000 x (B) 30000 x.

10

Figur 14. SEM-bilder av PVD-behandlad titanyta efter indränkning i 0,6 mM strontium-PBS i 1 vecka vid 60°C, förstoring (A) 3000 x (B) 30000 x.

Figur 15. SEM-bilder av PVD-behandlad titanyta efter indränkning i 0,06 mM strontium-PBS i 2 veckor vid 60°C, förstoring (A) 1000 x (B) 30000 x.

15

Figur 16. SEM-bilder av PVD-behandlad titanyta efter indränkning i 0,6 mM strontium-PBS i 2 veckor vid 60°C, förstoring (A) 1000 x (B) 30000 x.

Figur 17. SEM-bilder av PVD-behandlad titanyta efter indränkning i kisel-PBS i 1 vecka vid 37°C, förstoring (A) 1000 x (B) 5000 x.

20

Figur 18. SEM-bild av värmebehandlad titanyta efter indränkning i Si- och Sr-PBS i 1 vecka vid 37°C.

25

Figur 19. Illustrering av Si- och Sr-jonsignaler från den biomineraliserade ytan från TOF-SIMS.

EXEMPEL

30

Exempel 1. Avsättning av strontiumsubstituerad hydroxiapatitytbeläggning på värmebehandlade titanytor.

10mm x 10mm titanplattor behandlades med värme (vid 800°C i 2 timmar) för att ge en titandioxid yta. De behandlade plattorna rengjordes först med ultraljud i aceton följt av etanol och till sist sköljdes de med avjonat vatten och torkades i 37°C. Två typer av mineraliserbara lösningar erhöles från den modifierade

fosfatbuffertlösningen (PBS) (se Tabell 2). Den låga koncentrationen av Sr-PBS var 0,06 mmol/l. Den höga var 0,6 mmol/l. Det initiala pH i den låga var 7,20 och 7,21 vid 37°C respektive 60°C. Det initiala pH i den höga var 7,19 och 7,15 vid 37°C respektive 60°C. Varje två prov indränktes i 40ml förvärmad lösning i en förseglad plastflaska som sedan placerades i ugnen vid 37°C respektive 60°C. Plattorna inkuberades under olika tidsperioder från 1 vecka till 2 veckor. Alla prover sköljdes därefter med avjonat vatten och torkades i luft. Proven analyserades sen genom att använda tunnfilmröntgendiffraktion (TF-XRD), fältemissions-svepelektronmikroskopi (FESEM), röntgenfotoelektron-spektroskopispektra (XPS) och time-of-flight secondary ion mass spectroscopy (TOF-SIMS).

Tabell 2. Jonkoncentrationer i blodplasma, PBS och strontium-PBS (10⁻³M)

Jon (mmol/l)	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HPO ₄ ²⁻	Sr ²⁺
Blodplasma	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	1,0	
PBS	145,0	4,2	0,49	0,91	143	9,6	-
06Sr-PBS	145,0	4,2	0,49	0,91	143	9,6	0,6
006Sr-PBS	145,0	4,2	0,49	0,91	143	9,6	0,06

Resultaten visas i figur 1-9. Ytbeläggningen av biomineraliserad strontiumsubstituerad hydroxiapatit var uppbyggd av två lager efter indränkning i den mineraliserbara lösningen i 1 och 2 veckor. Det nedre lagret var en tunn och tät ytbeläggning och det övre lagret var en lucker och porös ytbeläggning (figur 8 och 9 visar dessa resultat tydligt).

Exempel 2. Avsättning av strontiumsubstituerad hydroxiapatitytbeläggning på PVD-behandlade titanytor.

Behandlingsförfarandet var liknande det i Exempel 1 men substraten var PVD-behandlade titanytor.

PVD-behandlingen var enligt följande:

Titanplattor placerades i en PVD-kammare (Baltzer 640R). Magnetroneffekten och det partiella syretrycket under ytbeläggningssteget var 1,5 kW respektive $1,5 \times 10^{-3}$ mbar. Inställningen av PVD-apparaturen var optimerad för maximal framställning av rutilstrukturen i TiO_2 -filmen.

5

Exempel 3. Avsättning av kiselsubstituerad hydroxiapatitytbeläggning på PVD-behandlade titanytor.

10mm x 10mm titanplattor behandlades genom att använda PVD-behandling för att ge titandioxyda. De behandlade ytorna var först rengjorda med ultraljud i aceton följt av etanol och till sist sköljda med avjonat vatten och torkade vid 37°C . Den mineraliseringsbara lösningen innefattande silikat erhållen från den modifierade fosfatbuffertlösningen (PBS). Den modifierade PBS-lösningen var framställd enligt följande:

- 15 (1) 3mg trikalciumsilikat tillsattes till 40ml PBS-lösning, omrörd över natten
- (2) Den grumliga lösningen centrifugerades sedan och supernatantlösningen agerade den mineraliseringsbara lösningen
- (3) pH-värdet och sammansättningen hos lösningen analyserades genom pH-meter respektive ICP-AES.

20

Varje två prover indränktes i 40ml förvärmad lösning i en förseglad plastflaska, som sedan placerades i ugnen i 60°C i 1 vecka. Alla prov sköljdes sen med avjonat vatten och torkades vid 37°C . Proven analyserades sen genom att använda tunnfilmröntgendifraktometer (TF-XRD), fältemissionssvepelektronmikroskopi (FESEM), röntgenfotoelektron-spektroskopiska (XPS) och time-of-flight secondary ion mass spectroscopy (TOF-SIMS). Resultaten är presenterade i Figur 17.

25

Exempel 4. Framställning av jonsubstituerade hydroxiapatitytbeläggningar

30

Andra refererade jonsubstituerade (CO_3^{2-} , F^- , Cl^- , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{3+} etc) hydroxiapatitytbeläggningar framställda enligt förfarandet kan erhållas genom liknande förfaranden som de i Exempel 1-3. Lösningen som innefattar olika joner kan framställas genom att lösa upp lösliga salter i modifierad SBF och PBS.

Dessa joniskt substituerade hydroxiapatitytbeläggningar framställda enligt metoden bildades på andra substrat så som bioaktiva keramer (hydroxiapatit, trikalciumpfosfat (TCP), kalciumsilikat, zirkoniumdioxid etc), bioaktiva glas (45S5 bioglas®, AW glas-keramer, bioaktiv 58S-glas etc) metaller (titan, titanlegeringar, rostfritt stål, CoCrMo-legering etc), kol och polymerer (collagen, glutin, PLGA, PGA etc.).

Exempel 5. Framställning av Si- och Sr-samsubstituerade kalciumfosfatytbeläggningar.

Substratbehandlingsförfarandet var så som beskrivet i Exempel 1.

Lösningen innefattande silikat och strontium erhöles från en modifierad fosfatbuffertlösning (PBS). Silikatkällan var natriumsilikatlösning och strontiumkällan var strontiumnitrat i detta exempel. Si-jonkoncentrationen kontrollerades till 0,075-0,15 mM och Sr-jonkoncentrationen kontrollerades till 0,06-0,6 mM.

Proven indränktes i 40ml förvärmad lösning i en förseglad plastflaska, som sedan placerades i ugnen vid 37°C i 1 vecka. Alla prov sköljdes sen med avjonat vatten och torkades vid 37°C efter indränkning. Proven analyserades sedan genom att använda tunnfilmröntgendiffraktometer (TF-XRD), fältemissionssvepelektronmikroskopi (FESEM), röntgenfotoelektron-spektroskopispektra (XPS) och time-of-flight secondary ion mass spectroscopy (TOF-SIMS).

Resultaten är presenterade i Figurerna 18-19. Analysen visar att den samsubstituerade apatitytbeläggningen bildades på substratet, se SEM-bilderna. TOF-SIMS-resultaten visade att det fanns Si- och Sr-jonsignaler från ytan. $\Sigma\text{Ca}/\Sigma\text{Sr}$ var omkring 0,83 och $\Sigma\text{SiO}_x/\Sigma\text{PO}_x$ var omkring 0,08. Dessa resultat visar att Si- och Sr-samsubstituerad apatitytbeläggning bildades på de värmebehandlade Ti-substraten.

Referenser

1. M. Vallet-Regi, J.M.G. Calbet, Calcium phosphate as substitution of bone tissues. *Progress in Solid State Chemistry* 2004;32:1-31.
- 5 2. S.V. Dorozhkin, M. Epple, Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed* 2002;41:3130-3146.
3. A.L. Oliveira, R.L. Reis, P. Li, Strontium-substituted apatite coating grown on Ti6Al4V substrate through biomimetic synthesis. *J Biomed Mater Res Part B* 2007;83:258-265.
- 10 4. K.A. Gross, L.M.R. Lorenzo, Sintered hydroxyfluorapatites. Part I: Sintering ability of precipitated solid solution powders. *Biomaterials* 2004;25:1375-1384.
5. C. Robinson, R.C. Shore, S.J. Brookes, S. Strafford, S.R. Wood, J. Kirkham, The Chemistry of Enamel Caries. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11:481-495.
- 15 6. A.M. Pietak, J.W. Reid, M.J. Stott, M. Sayer, Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials* 2007;28:4023-4032.
7. E. Landi, A. Tampieri, G. Celotti, S. Sprio, M. Sandri, G. Logroscino, Sr-substituted hydroxyapatites for osteoporotic bone replacement. *Acta Biomaterials* 2007;3:961-969.
- 20 8. E. Landi, A. Tampieri, M.M. Belmonte, G. Celotti, M. Sandri, A. Gigante, P. Fava, G. Biagini, Biomimetic Mg- and Mg₂(CO₃)₂-substituted hydroxyapatites: synthesis characterization and in vitro behaviour. *J Euro Ceram Soc* 2006;26:2593-2601.
- 25 9. W. Xue, H.L. Hosick, A. Bandyopadhyay, S. Bose, C. Ding, K.D.K. Luk, K.M.C. Cheung, W.W. Lue, Preparation and cell-materials interactions of plasma sprayed strontium-containing hydroxyapatite coating. *Surface & Coatings Technology* 2007;201:4685-4693.
10. G. Qi, S. Zhang, K.A. Khor a, W. Weng, X. Zeng, C. Liu, An interfacial study of sol-gel-derived magnesium apatite coatings on Ti6Al4V substrates. *Thin Solid Films* 2008;516:5172-5175.

11. E.S. Thian, J. Huang, S.M. Best, Z.H. Barber, W. Bonfield, Novel Silicon-Doped Hydroxyapatite (Si-hydroxyapatite) for Biomedical Coatings: An In Vitro Study Using Acellular Simulated Body Fluid. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2006;76:326-333.
- 5 12. E.L. Solla, P.Gonzalez, J. Serra, S. Chiussi, B. Leon, J. Garcia Lopez, Pulsed laser deposition of silicon substituted hydroxyapatite coatings from synthetical and biological sources. *Applied Surface Science* 2007;254:1189-1193.
13. Y. Han, D.H. Chen, L. Zhang, Nanocrystallized SrHA/SrHA-SrTiO₃/SrTiO₃-TiO₂ multilayer coatings formed by micro-arc oxidation for photocatalytic application. *Nanotechnology* 2008;19:335705.
- 10 14. B.C. Bunker, P.C. Rieke, B.J. Tarasevich, A.A. Campbell, G.E. Fryxell, G.L. Graff, L. Song, J. Liu, J.W. Virden, G.L. McVay, Ceramic Thin-Film Formation on Functionalized Interfaces Through Biomimetic Processing *Science* 1994;264:48-55.
- 15 15. Li P. Patent: Strontium substituted apatite coating. US 6,905,723 B2 2005.
16. Li P. Patent: Bioactive ceramic coating and method. US 6,569,489 B1 2003.
17. X. Zhao, X. Liu, C. Ding, Acid-induced bioactive titania surface. *J Biomed Mater Res A* 2005;75:888-894.
18. C. Wu, J. Chang, W. Zhai, S. Ni, A novel bioactive porous bredigite (Ca₇MgSi₄O₁₆) scaffold with biomimetic apatite layer for bone tissue engineering. *J Mater Sci-Mater in Med* 2007;18(5):857-864.
- 20

Patentkrav

1. Förfarande för att bilda en ytbeläggning av en jonsubstituerad kalciumfosfat på ett substrat innefattande stegen:

- a) tillhandahålla ett substrat,
 - b) tillhandahålla en lösning innefattande en fosfatbuffertlösning där Ca/P-kvoten är 1/10 och som har ett initialt pH i intervallet 2,0 till 10,0 och där lösningen dessutom innefattar:
 - i) strontiumjoner i en koncentration av 0,06-0,6 mM och där lösningen har en temperatur av eller värms till mellan 37°C och 60°C, eller
 - ii) kiseljoner i en koncentration av ungefär 0,33 mM och där lösningen har en temperatur av eller värms till ungefär 60°C, eller
 - iii) strontiumjoner och kiseljoner i en koncentration av 0,06 till 0,6 mM respektive 0,075 till 0,15 mM och där lösningen har en temperatur av eller värms till mellan 37°C och 60°C, och
 - c) sänka ner åtminstone en del av substratet i en av lösningarna i-iii under en tidsperiod tillräcklig för att ytbeläggningen ska bildas,
- varigenom den erhållna ytbeläggningen är uppbyggd av ett första och ett andra lager där:

lösningen i) ger ett tätt första lager och ett andra lager innefattande täta eller porösa sfärer, och

lösningarna ii och iii) ger ett poröst första lager och ett andra lager innefattande porösa sfärer.

2. Jonsubstituerad hydroxiapatitytbeläggning framställd genom metoden enligt krav 1.

3. Biomedicinskt implantat innefattande ytbeläggningen enligt krav 2.

Figure 1A

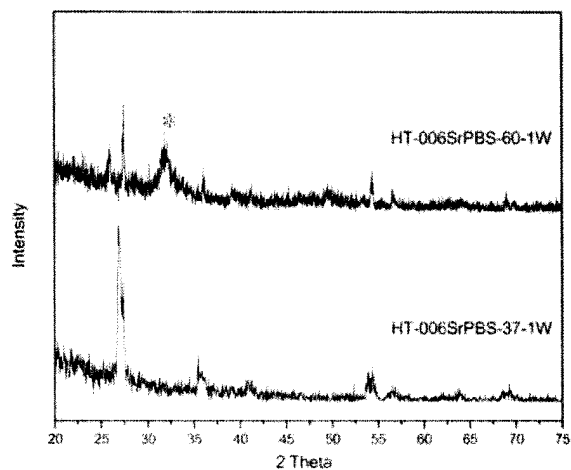


Figure 1B

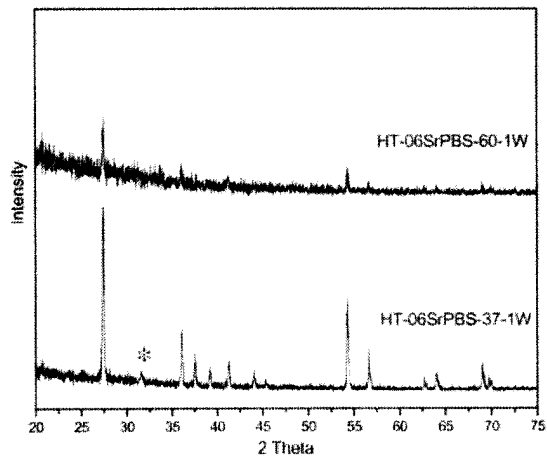


Figure 2A

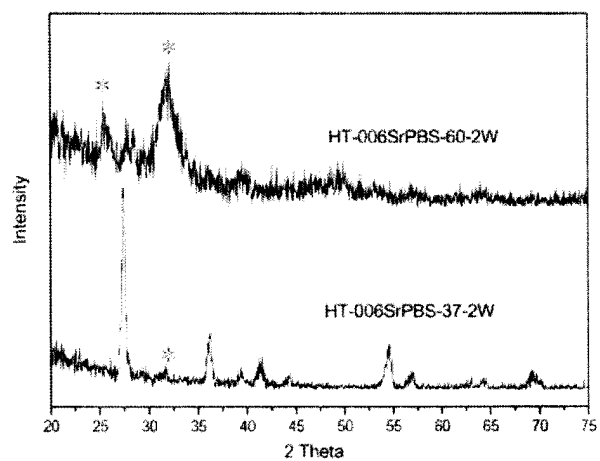


Figure 2B

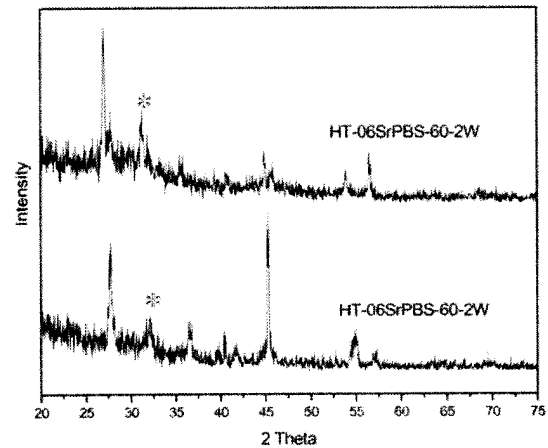


Figure 3A

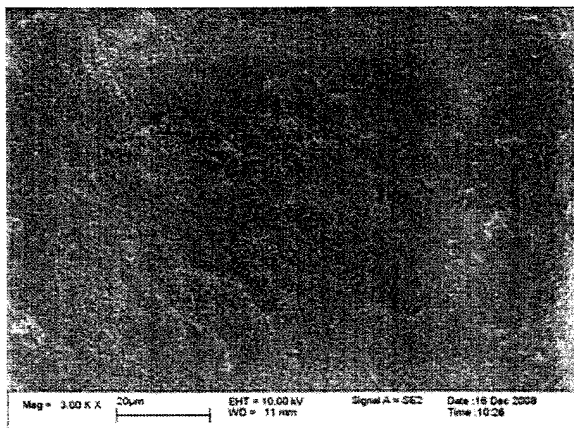


Figure 3B

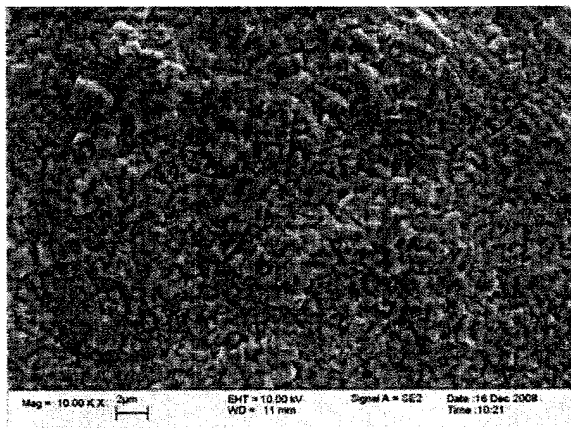


Figure 4A

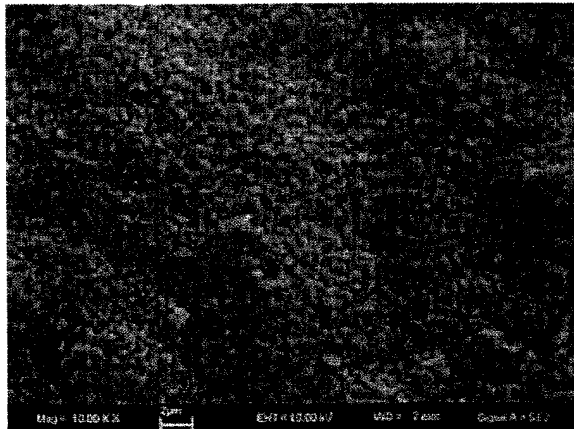


Figure 4B

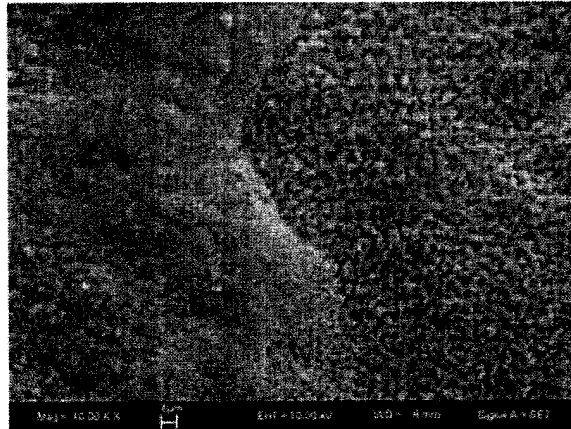


Figure 5A



Figure 5B



Figure 6A

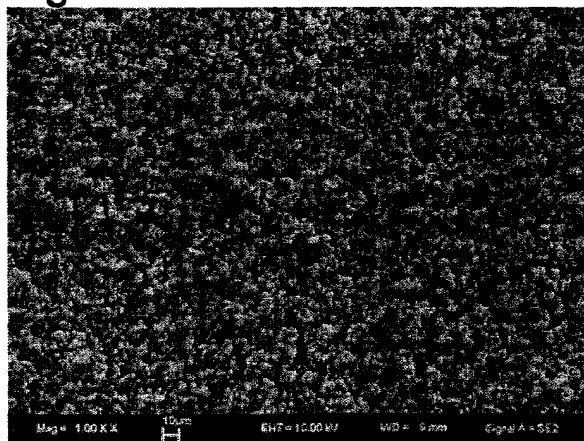


Figure 6B

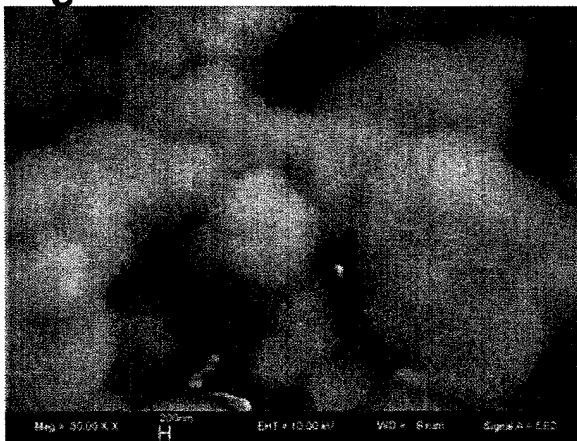


Figure 7A

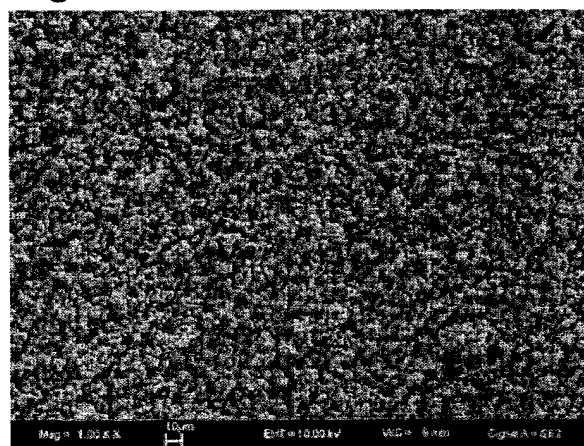


Figure 7B

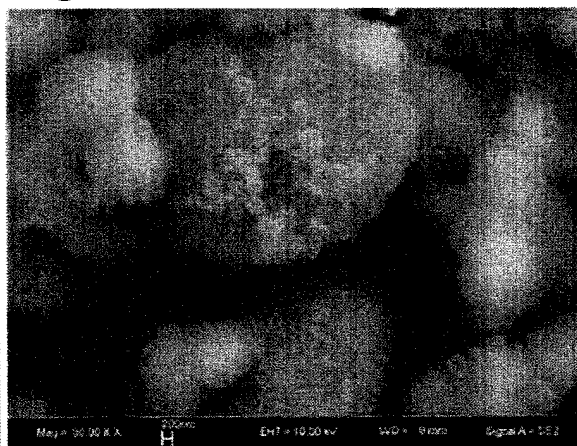


Figure 8A

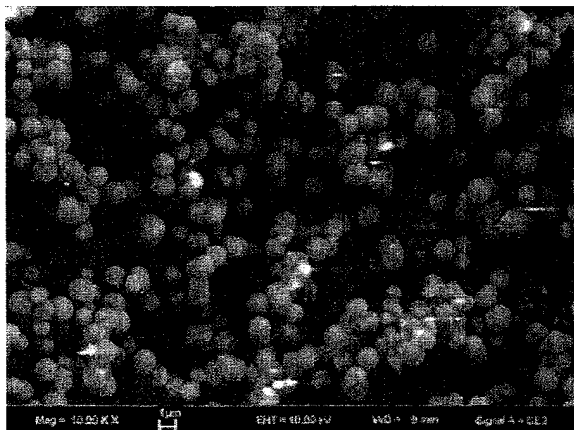


Figure 8B

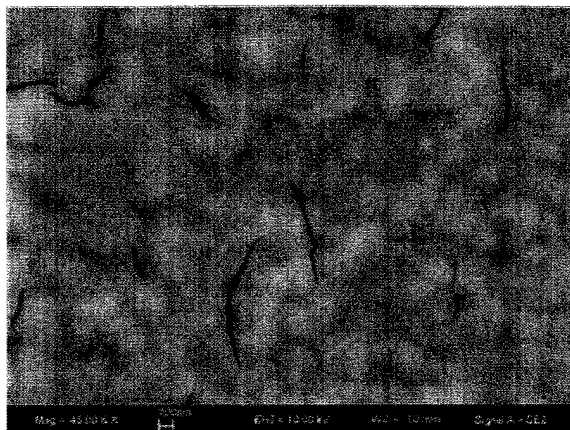


Figure 9A

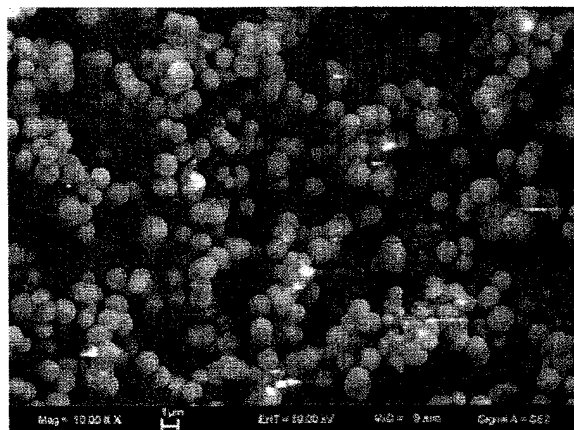


Figure 9B

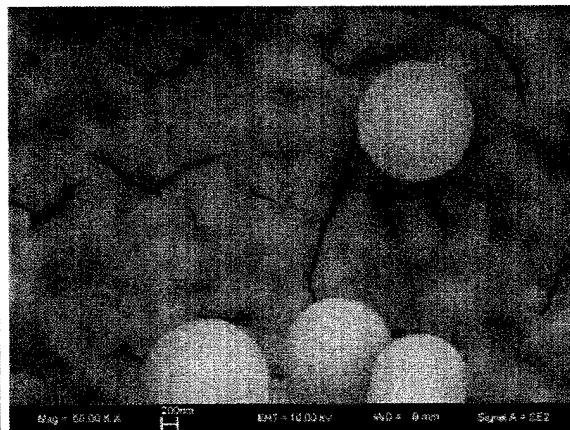


Figure 10A

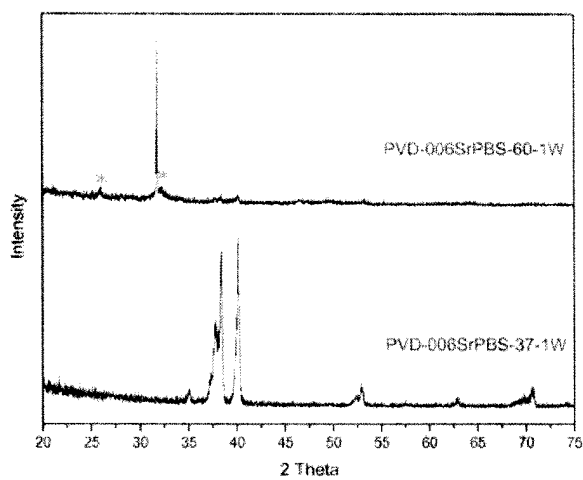


Figure 10B

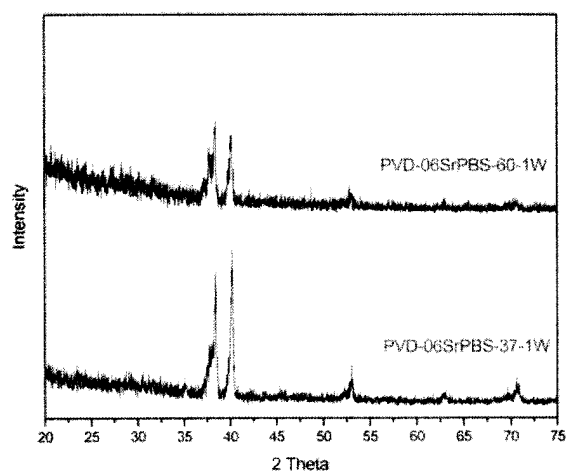


Figure 11A

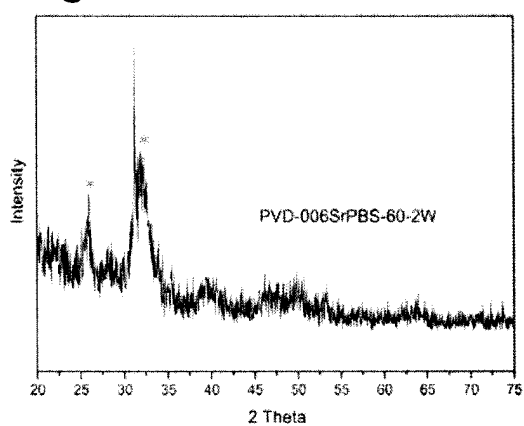


Figure 11B

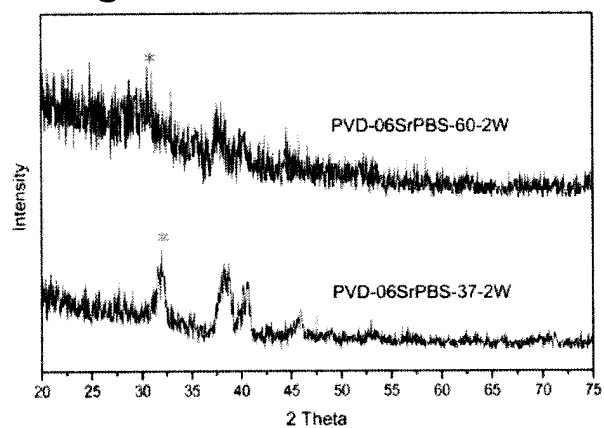


Figure 12A

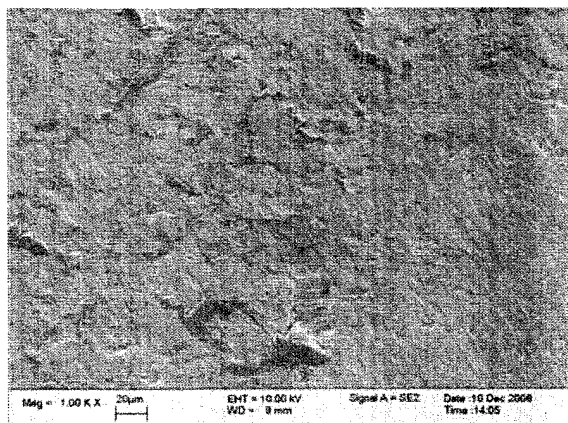


Figure 12B

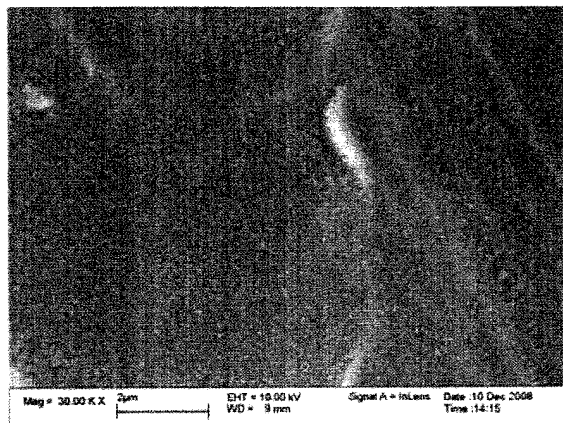


Figure 13A

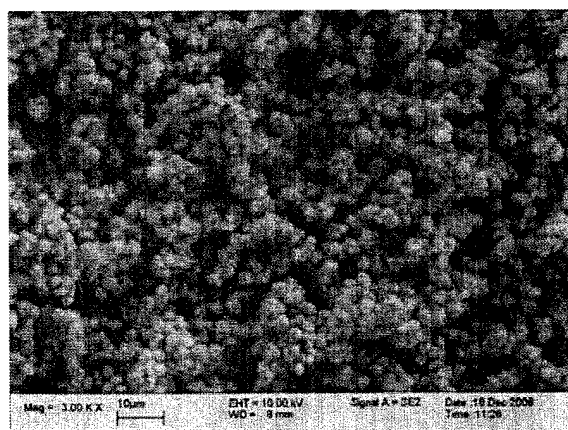


Figure 13B

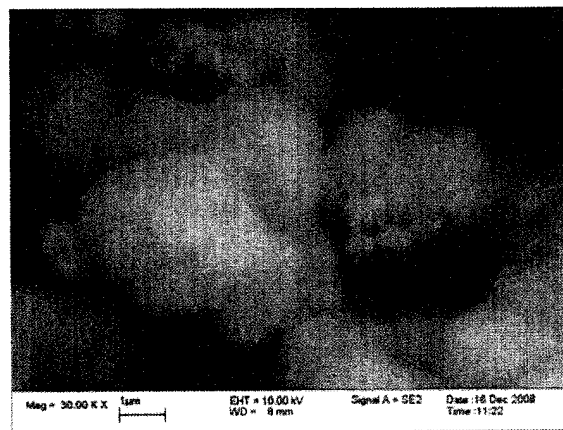


Figure 14A

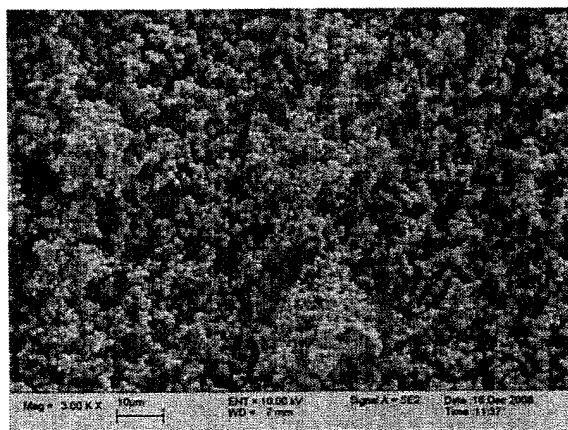


Figure 14B

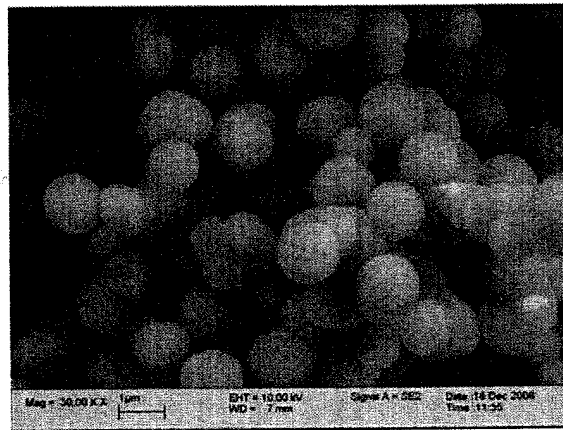


Figure 15A

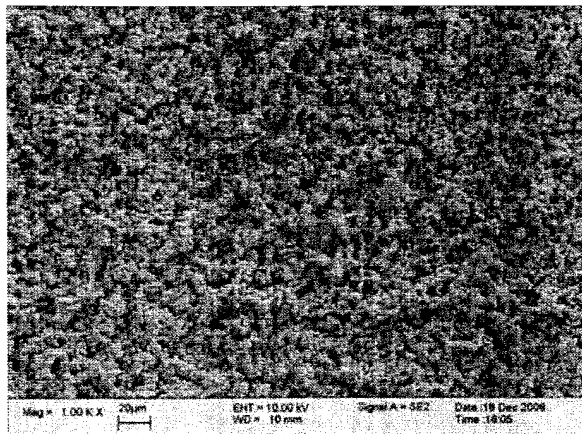


Figure 15B

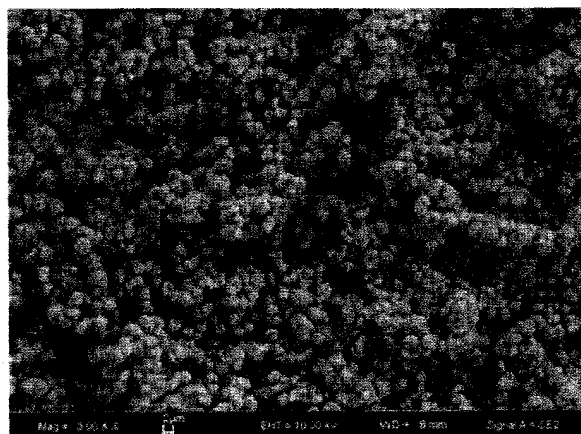


Figure 16A

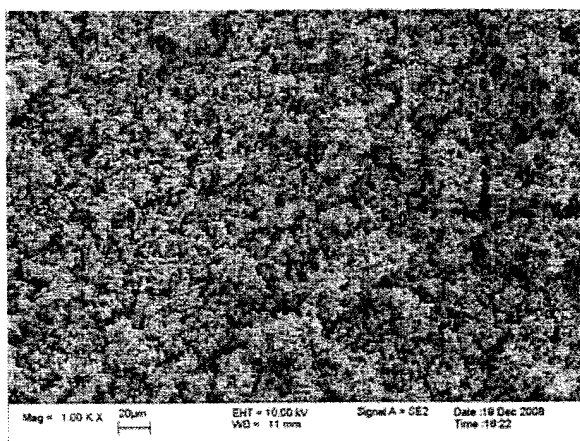


Figure 16B

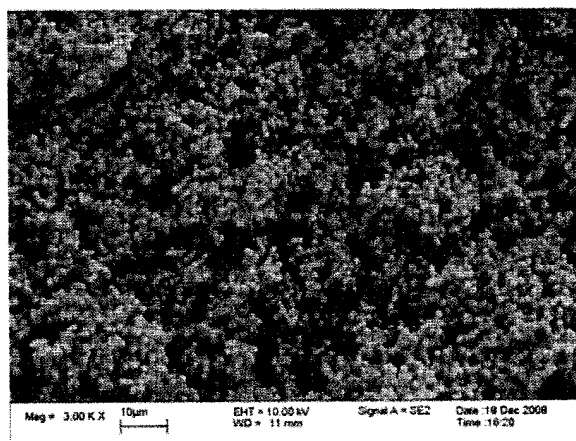


Figure 17A

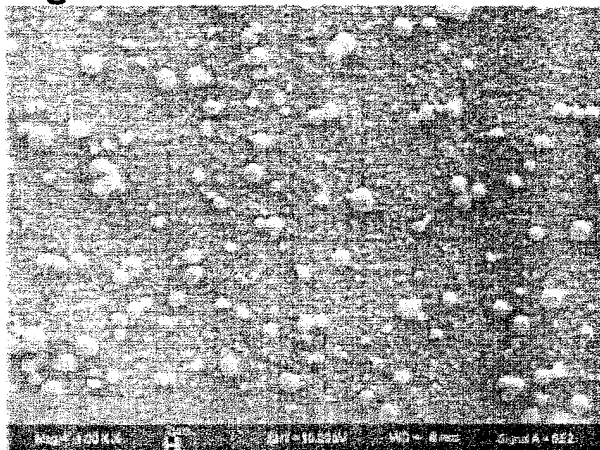


Figure 17B

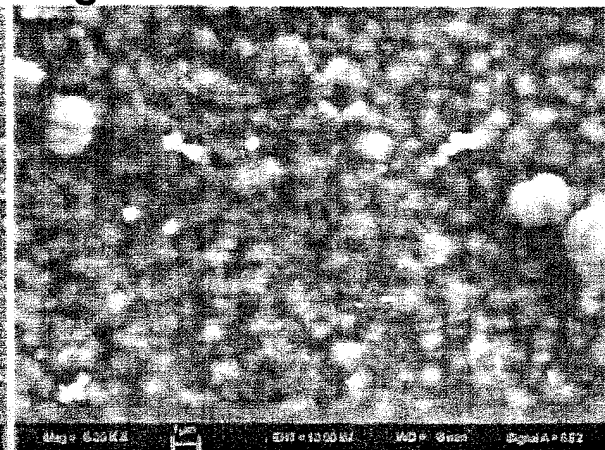


Figure 18



Figure 19

