

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6880330号
(P6880330)

(45) 発行日 令和3年6月2日(2021.6.2)

(24) 登録日 令和3年5月7日(2021.5.7)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 L 27/12	(2006.01)	A 6 1 L 27/12
A 6 1 L 27/46	(2006.01)	A 6 1 L 27/46
A 6 1 L 27/50	(2006.01)	A 6 1 L 27/50

請求項の数 14 (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2020-532744 (P2020-532744)
 (86) (22) 出願日 平成30年12月13日 (2018.12.13)
 (65) 公表番号 特表2021-506401 (P2021-506401A)
 (43) 公表日 令和3年2月22日 (2021.2.22)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2018/084783
 (87) 國際公開番号 WO2019/115704
 (87) 國際公開日 令和1年6月20日 (2019.6.20)
 審査請求日 令和2年8月12日 (2020.8.12)
 (31) 優先権主張番号 17207235.7
 (32) 優先日 平成29年12月14日 (2017.12.14)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
歐州特許庁 (EP)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 508326459
ガイストリッヒ ファーマ アーゲー
スイス連邦 ヴォルフーゼン パーンホーフストラーセ 40
 (74) 代理人 110001508
特許業務法人 津国
 (72) 発明者 ツィールマン, クラウディオ
スイス国、6003 ルツエルン、ブンデスプラツツ 2
 (72) 発明者 バフラー, ミヒャエル
スイス国、4153 ライナッハ、ヒンターリンデンヴェーク 73

審査官 鶴見 秀紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】骨代替材料

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

二相性リン酸カルシウム/ヒドロキシアパタイト(CAP/HAP)骨代替材料であつて、焼結CAPコアと、焼結CAPコアの外表面上に堆積したナノ結晶HAPの閉じたエピタキシャル成長層(ここで、エピタキシャル成長ナノ結晶は、ヒト骨塩と同じサイズと形態を有する)とを含み、焼結CAPコアの外表面上に堆積したナノ結晶HAPの閉じたエピタキシャル成長層が、平らな結晶小板を含む均質な粗い外表面を有し、粗い表面が、走査型電子顕微鏡法(SEM)で測定されるとき、0.2~20μmのサイズを持つ小板の連結ネットワークを形成するエピタキシャル成長ナノ結晶のヒドロキシアパタイト小板を含む、骨代替材料。

10

【請求項 2】

粗い表面が、走査型電子顕微鏡法(SEM)で測定されるとき、0.5~5μmのサイズを持つ小板の連結ネットワークを形成するエピタキシャル成長ナノ結晶のヒドロキシアパタイト小板を含む、請求項1記載の二相性リン酸カルシウム/ヒドロキシアパタイト(CAP/HAP)骨代替材料。

【請求項 3】

均質な粗い外表面が、水銀圧入ポロシメトリー(MIP)で測定されるとき、0.03~2μmの細孔を含有する連結ネットワークを形成するエピタキシャル成長ヒドロキシアパタイト小板を含む、請求項1又は2のいずれか一項記載の二相性リン酸カルシウム/ヒドロキシアパタイト(CAP/HAP)骨代替材料。

20

【請求項 4】

均質な粗い外表面が、A F M (原子間力顕微鏡法 (Atomic Force Microscopy))で得た 5 0 ~ 4 0 0 nm の範囲の二乗平均平方根粗度 R_q 及び 5 0 0 ~ 2 0 0 0 nm の範囲の輪郭の平均最大高さ R_z を用い、A F M により特徴付けられる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の二相性リン酸カルシウム / ヒドロキシアパタイト (C A P / H A P) 骨代替材料。

【請求項 5】

均質な粗い外表面が、A F M (原子間力顕微鏡法) で得た 1 1 0 ~ 1 5 0 nm の範囲の二乗平均平方根粗度 (R_q) 及び 5 5 0 ~ 7 5 0 nm の範囲の輪郭の平均最大高さ (R_z) を用い、A F M により特徴付けられる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の二相性リン酸カルシウム / ヒドロキシアパタイト (C A P / H A P) 骨代替材料。 10

【請求項 6】

焼結 C A P コアが、本質的に - T C P からなる、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の二相性リン酸カルシウム / ヒドロキシアパタイト (C A P / H A P) 骨代替材料。

【請求項 7】

H A P の割合が、X R D により測定されるとき、1 . 5 ~ 3 0 % である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項記載の二相性リン酸カルシウム / ヒドロキシアパタイト (C A P / H A P) 骨代替材料。

【請求項 8】

粒子状又は顆粒状である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の二相性リン酸カルシウム / ヒドロキシアパタイト (C A P / H A P) 骨代替材料。 20

【請求項 9】

成形体である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の二相性リン酸カルシウム / ヒドロキシアパタイト (C A P / H A P) 骨代替材料。

【請求項 10】

適切なマトリックス中に請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載の二相性リン酸カルシウム / ヒドロキシアパタイト (C A P / H A P) 骨代替材料の顆粒を含有するパテ。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項記載の C A P / H A P 骨代替材料の調製方法であって、以下の工程 :

- a) 焼結 C A P コア材料を調製すること、
- b) 焼結 C A P コア材料を 1 0 と 5 0 の間の温度で 1 0 ~ 9 0 % の短鎖脂肪族アルコールを含有する緩衝液に浸漬して、C A P から H A P への変換プロセスを開始し、それによって焼結 C A P コア材料表面上にナノ結晶ヒドロキシアパタイトの閉じたエピタキシャル成長層 (ここで、エピタキシャル成長ナノ結晶は、ヒト骨塩と同じサイズと形態を有する) であって、平らな結晶小板を含む均質な粗い外表面を有する、焼結 C A P コア材料表面上に形成されるナノ結晶 H A P の閉じたエピタキシャル成長層が形成されること、
- c) H A P の少なくとも 1 つのナノ結晶層の閉じたコーティングが存在するが、変換プロセスが完全に終わる前の時点で、水溶液から固体材料を分離することによって変換を停止させること、及び
- d) 場合により、工程 c) からの分離された材料を滅菌することを含む方法。 40

【請求項 12】

短鎖脂肪族アルコールが、エタノールである、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

工程 b) の緩衝液が、3 0 ~ 5 0 % の短鎖脂肪族アルコールを含有する、請求項 11 又は 12 記載の方法。

【請求項 14】

工程 b) が、3 5 ~ 4 0 の温度で、2 0 ~ 6 0 % の短鎖脂肪族アルコールを含有する pH 7 . 0 ~ 8 . 0 のリン酸緩衝液中で行われる、請求項 11 ~ 13 のいずれか一項記載の方法。 50

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、均質な粗い外表面を有するリン酸カルシウム／ヒドロキシアパタイト（C A P / H A P）に基づく二層構造を持つ新しい二相性骨代替材料、その材料の製造方法、並びにヒト又は動物の欠損部位における骨形成、骨再生、骨修復及び／又は骨置換を支持するためのインプラント又はプロテーゼとしてのこれらの使用に関する。

【背景技術】**【0002】**

骨構造の欠損は、外傷、疾患、及び手術のような様々な状況で発生するが、種々の外科分野における骨欠損を効果的に修復する必要が依然として存在する。 10

【0003】

骨欠損部位の治癒を刺激するために、数多くの天然及び合成の材料及び組成物が使用されてきた。歯周及び顎顔面骨欠損で骨成長を促進する、周知の天然の骨伝導性の骨代替材料は、Geistlich Pharma AGから市販されているGeistlich Bio-Oss（登録商標）である。その材料は、米国特許第5,167,961号に記載されている方法によって自然骨から製造され、自然骨の小柱構造及びナノ結晶構造の保存を可能にして、吸収されないか又は非常にゆっくりと吸収される優れた骨伝導性マトリックスが得られる。

【0004】

リン酸三カルシウム／ヒドロキシアパタイト（T C P / H A P）システム及び骨代替材料としてこれらの使用は、例えば、US-6,338,752に記載されており、リン酸アンモニウムとH A Pとの粉末混合物を1200～1500で加熱して、-T C P / H A Pの二相セメントの調製方法を開示している。 20

【0005】

欧州特許EP-285826は、インプラント用の金属及び非金属体上のH A Pの層を製造する方法であって、-T C Pの層を適用し、80～100でp H 2～7の水との反応により-T C P層をH A Pに完全に変換することによる方法を記載している。得られた生成物は、H A Pの層で覆われた金属又は非金属体である。

【0006】

WO 97/41273は、特にヒドロキシアパタイト（H A P）又は他のリン酸カルシウム（C A P）などの基材を炭酸ヒドロキシアパタイト、即ち、リン酸及び／又はヒドロキシリイオンが重炭酸イオンによって部分的に置換されているヒドロキシアパタイトのコーティングでコーティングする方法であって、（a）50未満の温度でカルシウムイオン、リン酸イオン及び重炭酸イオンを含有するp H 6.8～8.0の溶液に基材を浸漬し、（b）基材と接触している溶液の部分をp H が8を超えるまで50～80の温度まで加熱して、（c）基材と工程（b）で得られたアルカリ溶液との接触を維持して、炭酸ヒドロキシアパタイトコーティングを形成し、そして（d）基材を溶液から取り出し、コーティングを乾燥させることを含む方法を記載している。重炭酸イオンは、ヒドロキシアパタイト結晶成長の阻害剤として作用するため、欠損を含み、かつ寸法がかなり小さい、即ち、長さが10～40nm、幅が3～10nmの非化学量論的結晶が得られることが開示されている（7ページ、1～7行目を参照のこと）。 30

【0007】

リン酸カルシウム／ヒドロキシアパタイト（C A P / H A P）システム、特にT C P / H A Pシステムの成分は、その熱力学的安定性が異なる。この違いにより、C A P / H A Pシステムが哺乳動物、特にヒト患者に埋め込まれると、体液中のT C P及びその他のリン酸カルシウムの溶解度は、H A Pの溶解度よりも高い。リン酸カルシウムとH A Pの間の溶解度の違いにより、C A P / H A Pシステムの不規則な焼結構造が崩壊するが、これは、溶解性の高い方の化合物C A P（例えば、T C P）がH A Pよりも速く除去されるためである。高温で生成したC A PとH A Pの間の焼結相互接合は、生理環境でのデバイスのより高い溶解度にも大きく貢献しよう。2つの異なるタイプの反応が、このようなセラ 40

ミックの加速したインビボ分解を支配する：化学溶解及び細胞による生物学的吸收。どちらのプロセスもセラミック材料の溶解を引き起こし、更にはカルシウムイオンの局所的な過飽和を引き起こして、吸着されるカルシウムイオンよりも多くのカルシウムイオンが放出される。カルシウムイオンの自然の平衡は、細胞外マトリックスにも、インプラント周囲の組織にも最早存在しない。カルシウムイオンの過飽和に関する自然のカルシウム平衡の局所的な搅乱は、破骨細胞の活性を上昇させ、ひいてはセラミック材料の制御されない吸収を加速し、特に大量の合成骨代替材料を使用する場合に有害な炎症反応のリスクにつながる。

【 0 0 0 8 】

骨代替材料のGeistlich Bio-Ossをヒト患者に埋め込むと、自然のカルシウム平衡は実質的に影響を受けず、材料の表面上及びその局所環境内のカルシウムイオンの濃度はほぼ一定のままである。よって材料の生物学的吸収は起こらないか、又は有害な炎症反応のリスクを伴わない非常に遅い速度で進行する。

【 0 0 0 9 】

EP-B1-2445543は、非常に有利なリン酸カルシウム／ヒドロキシアパタイト（C A P / H A P）骨代替材料を開示しているが、これは、骨代替材料のGeistlich Bio-Ossと同様に、体内に設置後、材料の表面上及びその局所環境内のカルシウムイオンの濃度をほぼ一定に維持することができ、よって破骨細胞活性の上昇につながらない。

【 0 0 1 0 】

実際、最適な骨再生に必要な自然のカルシウム平衡は乱されたり破壊されたりしない。更に、自然のカルシウム濃度の平衡は、再生プロセスが完了するまで、骨代替材料によって永続的に支持される。これらの条件が満たされると、破骨細胞活性が上昇しないため、有害な炎症反応のリスクがない。

【 0 0 1 1 】

EP-B1-2445543の発明は、焼結C A Pコアと、焼結C A Pコアの上に堆積したナノ結晶H A Pの少なくとも1つの均質で閉じたエピタキシャル成長層（ここで、エピタキシャル成長ナノ結晶は、ヒト骨塩と同じサイズと形態、即ち、長さ30～46nm及び幅14～22nmを有する）とを含む、二相性リン酸カルシウム／ヒドロキシアパタイト（C A P / H A P）骨代替材料に関する。

【 0 0 1 2 】

焼結C A Pコアは、リン酸三カルシウム（T C P）、特に $-T C P(-Ca_3(PO_4)_2)$ 又は $-T C P(-Ca_3(PO_4)_2)$ 、及び／又はリン酸四カルシウム（T T C P） $Ca_4(PO_4)_2O$ を含んでもよい。

【 0 0 1 3 】

頻繁に使用される実施態様では、焼結C A Pコアは、本質的にT C Pからなり、 $-T C P$ が好ましい。

【 0 0 1 4 】

ナノ結晶H A Pのエピタキシャル成長層は、構造的及び化学的に天然のヒト骨塩とほぼ同一である。

【 0 0 1 5 】

ナノ結晶H A Pのエピタキシャル成長層は一般に、少なくとも15～50nm、好ましくは少なくとも20～40nm、更に好ましくは少なくとも25～35nmの厚さを有する。その最小厚さは、エピタキシャル配向のH A Pナノ結晶の1つの層に対応する。

【 0 0 1 6 】

ナノ結晶H A Pのエピタキシャル成長層は、エピタキシャル配向のH A Pナノ結晶の単層又は多層を含むことができる。エピタキシャル配向のH A Pナノ結晶のそのような層の数に関連する、ナノ結晶H A Pのエピタキシャル成長層の厚さは、身体の負荷が異なる部位におけるインプラント又はプロテーゼとしての骨代替材料の意図される用途により選択されよう。その発明の骨代替材料は確かに、焼結C A Pコアをサイズと形態がヒト骨塩に類似したヒドロキシアパタイトへと徐々に変換する生体様システムとしてインビボで機能

10

20

30

40

50

するように設計されており、その変換速度は、焼結 C A P コアによるカルシウム放出の速度に依存し、そして大部分はナノ結晶 H A P のエピタキシャル成長層の厚さによって制御される。

【 0 0 1 7 】

C A P / H A P 骨代替材料の特性は、大部分は結晶 H A P のエピタキシャル成長層の厚さによって制御される。「特性」という用語は、C A P / H A P 骨代替品が一定濃度のカルシウムイオンをインビトロ及びインビボで局所環境に放出する能力を含む。

【 0 0 1 8 】

ナノ結晶 H A P のエピタキシャル成長層の厚さは、焼結 C A P コア材料対 H A P の比に関連し、前記比は、一般に 5 : 9 5 ~ 9 5 : 5 の間、好ましくは 1 0 : 9 0 ~ 9 0 : 1 0 10 である。

【 0 0 1 9 】

C A P / H A P 骨代替材料は、粒子状又は顆粒状であってよく、この粒子又は顆粒は所望のサイズと形状を有する。一般に、粒子又は顆粒は、ほぼ球形であり、そして直径 2 5 0 ~ 5 0 0 0 μm である。

【 0 0 2 0 】

C A P / H A P 骨代替材料はまた、成形体、例えば、ネジ、釘、ピン、又は特に、股関節、鎖骨、肋骨、下顎骨若しくは頭蓋骨のような、骨性身体部分の輪郭を有する構造であつてもよい。そのようなネジ、釘、又はピンは、例えば、膝又は肘の骨に靭帯を固定するための整形外科再建手術において使用されてもよい。骨性身体部分の輪郭を有するそのような構造は、消失又は欠損の骨又は骨部分を置換するためのプロテーゼとして整形外科手術において使用されてもよい。 20

【 0 0 2 1 】

EP-B1-2445543のその C A P / H A P 骨代替材料は、以下の工程：

a) 焼結 C A P コア材料を調製すること、

b) 焼結 C A P コア材料を 1 0 と 5 0 の間の温度で水溶液に浸漬して、C A P から H A P への変換プロセスを開始し、それによって焼結 C A P コア材料表面上にナノ結晶ヒドロキシアパタイトの均質で閉じたエピタキシャル成長層（ここで、エピタキシャル成長ナノ結晶は、ヒト骨塩と同じサイズと形態を有する）が形成されること、

c) H A P の少なくとも 1 つのナノ結晶層の均質で閉じたコーティングが存在するが、変換プロセスが完全に終わる前の時点で、水溶液から固体材料を分離することによって変換を停止させること、 30

d) 場合により、工程 c) からの分離された材料を滅菌することを含むプロセスによって得られることが教示されている。

【 0 0 2 2 】

焼結 C A P コア材料の調製は、最初にリン酸水素カルシウム（C a H P O₄）、炭酸カルシウム及び／又は水酸化カルシウムの粉末を混合し、次に適切な温度範囲内で混合物をか焼及び焼結し、これによってバルク焼結 C A P コア材料が与えられることを含む、当技術分野において公知の方法によって実施され得る（例えば、Mathew M. et al., 1977, Acta. Cryst. B33: 1325; Dickens B. et al., 1974, J. Solid State Chemistry 10, 232; and Durucan C. et al., 2002, J. Mat. Sci., 37:963を参照のこと）。 40

【 0 0 2 3 】

よってバルク焼結 T C P コア材料を、リン酸水素カルシウム（C a H P O₄）、炭酸カルシウム及び／又は水酸化カルシウムの粉末を化学量論比で混合し、混合物を 1 2 0 0 ~ 1 4 5 0 の範囲の温度、好ましくは 1 4 0 0 でか焼及び焼結することによって得てもよい。

【 0 0 2 4 】

バルク焼結 T T C P コア材料もまた、上記プロセスによって得てもよい。

【 0 0 2 5 】

そのような方法によって調製されたバルク焼結 C A P 材料は、2 ~ 8 0 体積%の空隙率 50

及び細孔の幅広い分布を有する多孔質であつてよい。空隙率パラメーターは、C A P / H A P 骨代替材料の意図される用途に応じて選択されよう。

【0026】

工程 b) に使用される焼結 C A P コア材料は、

- 上記のとおり調製されたバルク焼結 C A P コア材料であるか、
- 上記のとおり調製されたバルク焼結 C A P コア材料から、破碎、磨碎及び / 又は粉碎、並びに篩い分けのような従来の方法を使用して得られた、焼結 C A P コア材料の粒子又は顆粒であるか、あるいは
- 所望の形状とサイズ、例えば、ネジ、釘、ピン、又は骨性身体部分の輪郭を有する構造を有する焼結 C A P コア材料のプリフォームであつてもよい。

【0027】

このような任意の所望の形状とサイズのプリフォームを、C N C フライス加工又は3 D 印刷のような周知のプロトタイピング技術を使用して、上記のとおり調製されたバルク焼結コア材料から得てもよい（例えば、Bartolo P. et al., 2008, Bio-Materials and Prototyping Applications in Medicine, Springer Science New York, ISBN 978-0-387-47682-7; Landers R. et al., 2002, Biomaterials 23(23), 4437; Yeong W.-Y. et al., 2004, Trends in Biotechnology, 22 (12), 643; and Seitz H. et al., 2005, Biomed. Mater. Res. 74B (2), 782を参照のこと）。

【0028】

工程 b) の水溶液は、純水、人工体液又は緩衝液であると教示されている。重要なのは、工程 b) の浸漬溶液のp H 値がほぼ中性であり、変換プロセス全体を通じて、好ましくは5.5 ~ 9.0 のp H 範囲内で安定を保つことである。

【0029】

「人工体液」という用語は、体液を模倣する任意の溶液のことをいう。好ましくは、人工体液は、血漿のそれと同様のイオン濃度を有する。

【0030】

緩衝液は、上記のp H 範囲の任意の緩衝液であり得るが、好ましくは、カルシウム、マグネシウム及び / 又はナトリウムを含むか含まないリン酸緩衝液である。

【0031】

実施例で使用される緩衝液（実施例4及び5を参照のこと）は、水性リン酸緩衝液である。

【0032】

工程 b) の温度範囲は、一般に10 ~ 50 、好ましくは25 ~ 45 、更に好ましくは35 ~ 40 である。

【0033】

浸漬工程 b) は、第1段階で C A P コア材料の一次相転移を誘導し、したがって H A P ナノ結晶前駆体の核形成を誘導する。第2段階中に、第1段階から得られた H A P 前駆体は成長して、閉じた（即ち、完全にコーティングしている）エピタキシャルナノ結晶複合層を確立する。最初の H A P ナノ結晶層は、均質で閉じており、かつ焼結 C A P コア材料にエピタキシャルに接合されている必要がある。

【0034】

第3段階中に、新しく形成された二重複合層内で一次相転移が進行して、焼結 C A P コア材料（T C P 又はT T C P ）をナノ結晶 H A P に更に変換し得る。相転移のこの第3工程中に、焼結 C A P コア材料の一部がナノ結晶 H A P に変換されるまで、遅延拡散制御プロセスによって制御可能な時間、カルシウムイオンが放出されよう。 H A P 層の厚さ、したがってカルシウム放出の速度は、変換時間の変動によって制御され得る。

【0035】

適切な厚さのエピタキシャル成長ナノ結晶 H A P 層は、インピトロで調製されるが、ここで H A P への C A P の変換は、完了する前に停止させる。

【0036】

10

20

30

40

50

C A P / H A P 骨代替材料がインビボに設置されると直ぐに、H A PへのC A Pの変換プロセスは、体液との接触により再活性化され、骨代替材料は、ヒト骨塩にサイズと形態が類似する新しいヒドロキシアパタイトを形成する生体様システムとして機能しよう。インビボ相変態プロセス中に、輸送されたカルシウムイオンは、骨再生プロセスにとって重要かつ有益である局所カルシウム平衡を支持する局所環境へと放出されよう。

【 0 0 3 7 】

身体の負荷が異なる部位では骨欠損の再生時間が異なるため、カルシウム放出の速度を制御できることが重要である。これは、ヒドロキシアパタイトのエピタキシャル成長層の厚さを変えることによって達成され得る。

【 0 0 3 8 】

したがって工程 c) は非常に重要な工程である。工程 b) の水溶液における曝露時間は、所望のH A P層の厚さに基づく。エピタキシャル配向のナノ結晶H A Pの少なくとも1つの層が必要である。C A PからH A Pへの変換が完了していないことは不可欠である。

【 0 0 3 9 】

所望の厚さによる適切な曝露時間は、リン酸カルシウム、セメント及びコンクリート化学の分野の当業者に周知の幾つかの熱力学的微分方程式を使用することによって計算され得る。

【 0 0 4 0 】

例えは : Pommersheim, J.C.; Clifton, J.R. (1979) Cem. Conc. Res.; 9:765; Pommersheim, J.C.; Clifton, J.R. (1982) Cem. Conc. Res.; 12:765; and Schlussler, K.H. Mchedlov-Petrosjan, O.P.; (1990): Der Baustoff Beton, VEB Verlag Bauwesen, Berlin を参照のこと。

【 0 0 4 1 】

上記の微分方程式の解をC A P / H A Pシステムに代入すると、C A PのH A Pへの相転移及び層の厚さを予測できるため、H A Pのエピタキシャル層を安定で再現性あるやり方で調製することができる。

【 0 0 4 2 】

工程 c) の最後の水溶液からの固体材料の分離は、当技術分野で周知の技術を使用して、濾過、洗浄及び乾燥によって通常実施される。

【 0 0 4 3 】

EP-B1-2445543の実施例 (即ち、実施例4 [0 0 5 7] 及び実施例5 [0 0 5 8]) において、洗浄は、分離した顆粒を精製水で3回洗浄することによって実施され、緩衝液から残留物を取り出す。

【 0 0 4 4 】

オプションの滅菌工程 d) は、ガンマ線照射又はX線照射のような当技術分野で周知の手法によって実施され得る。

【 0 0 4 5 】

EP-B1-2445543の実施例4及び5に教示されているとおり、工程 b) の水溶液用の水性リン酸緩衝剤と精製水とを使用して、工程 c) の最後に分離した顆粒を3回洗浄すると、焼結C A Pコアと、焼結C A Pコアの外表面上に堆積したナノ結晶H A Pの閉じたエピタキシャル成長層 (ここで、エピタキシャル成長ナノ結晶は、ヒト骨塩と同じサイズと形態、即ち、長さ30 ~ 46 nm及び幅14 ~ 22 nmを有する) とを含む、二相性リン酸カルシウム / ヒドロキシアパタイト (C A P / H A P) 骨代替材料が得られるが、ここで、焼結C A Pコアの外表面上に堆積したナノ結晶H A Pの閉じたエピタキシャル成長層は、エピタキシャル成長H A Pナノ結晶からなる平らな結晶小板の個々の (分離した) クラスターと、平らな結晶小板の個々のクラスターの間の滑らかな領域とを含む、不均質な外表面を有しており、平らな結晶小板の個々のクラスターの間の滑らかな領域が占める外表面の%は、所与の変換条件での変換時間に依存する。

【 0 0 4 6 】

図1a [滑らかな領域が、S E Mで測定されるとき外表面全体の約70%に相当する、

10

20

30

40

50

30分の変換時間有する、プロトタイプ1(1~2mm顆粒)のSEM(走査型電子顕微鏡)写真を表す]；及び図1b[滑らかな領域が、SEMで測定されるとき外表面全体の約50%に相当する、40分の変換時間有する、プロトタイプ2(1~2mm顆粒)のSEM写真を表す]を参照のこと。

【0047】

WO 2015/009154は、骨誘導能が改善された骨伝導性材料を製造する方法を開示しているが、この方法は、粒子からなる表面トポグラフィーを有する焼結二相性リン酸カルシウム/ヒドロキシアパタイト(CAP/HAP)材料を、2~4barの圧力下で125以上的温度でpHを制御することなく、出発物質の表面上のリン酸カルシウム粒子を直径10~1500nmのリン酸カルシウム針状物に変えるのに十分な時間、水熱処理に付すことを含む。少なくとも125の温度及び少なくとも2barの圧力は、HAPナノ結晶のエピタキシャル成長を可能にする、EP-B1-2445543で使用されている(人体生理学に近い)条件(温度35~40、pH5.5~9.0、常圧)からは遠い。これらの針状物はエピタキシャルに成長していないが、コア材料ベースに付着又は堆積し、そして部分的に(通常は40~90%)後者をコーティングするだけであるが、それによってその比表面積とタンパク質保持力を増加させ、その骨誘導能を高める。

【0048】

EP-B1-2445543の二相性リン酸カルシウム/ヒドロキシアパタイト(CAP/HAP)骨代替材料の調製において、10~90%、好ましくは20~60%のメタノール、エタノール、プロパノール又はブタノールを含むがこれらに限定されない短鎖脂肪族アルコールを、工程b)の水性リン酸緩衝液に加えることにより、焼結CAPコアの外表面上に堆積したナノ結晶HAPの閉じたエピタキシャル成長層の不均質な外表面である、二相性リン酸カルシウム/ヒドロキシアパタイト(CAP/HAP)骨代替材料(平らな結晶小板の個々のクラスターとその間の滑らかな領域とを含む)は、平らな結晶小板の個々の結晶クラスターを伴わない、平らな結晶小板を含む均質な粗い外表面で置き換えられることが今や見い出された。その均質な粗い外表面は一般に、使用される脂肪族アルコールの量に応じて、SEMで測定されるとき、0.2~20μm、好ましくは0.5~5μmの個々の小板サイズを持つ小板の連結ネットワークを形成するエピタキシャル成長ナノ結晶のヒドロキシアパタイト小板を含む。

【0049】

ヒト胎児間葉系幹細胞(hMSC)の骨形形成分化のインビトロ試験で示されているとおり、インビボ骨形成反応は、平らな結晶小板を含むその均質な粗い外表面を有する二相性リン酸カルシウム/ヒドロキシアパタイト(CAP/HAP)骨代替材料の方が、EP-B1-2445543により教示された、平らな結晶小板の個々のクラスターとその間の滑らかな領域とを含む不均質な外表面を有する、二相性リン酸カルシウム/ヒドロキシアパタイト(CAP/HAP)骨代替材料よりも強い可能性が高い。

【0050】

発明の要約

よって本発明は、焼結CAPコアと、焼結CAPコアの外表面上に堆積したナノ結晶HAPの閉じたエピタキシャル成長層(ここで、エピタキシャル成長ナノ結晶は、ヒト骨塙と同じサイズと形態を有する)とを含む、二相性リン酸カルシウム/ヒドロキシアパタイト(CAP/HAP)骨代替材料に関するが、ここで、焼結CAPコアの外表面上に堆積したナノ結晶HAPの閉じたエピタキシャル成長層は、平らな結晶小板を含む均質な粗い外表面を有する。

【0051】

その二相性リン酸カルシウム/ヒドロキシアパタイト(CAP/HAP)骨代替材料は、ヒト胎児間葉系幹細胞(hMSC)の骨形形成分化の増加を示しており、そしてこれは、インビボ骨形成反応の増強のはっきりした兆候である。

【0052】

「焼結CAPコアの外表面上に堆積したナノ結晶HAPの閉じたエピタキシャル成長層

10

20

30

40

50

」という用語は、ナノ結晶HAPのエピタキシャル成長層が、焼結CAPコアの外表面全体を被覆していることを意味する。

【0053】

「平らな結晶小板を含む均質な粗い外表面」という用語は、巨視的には、平らな結晶小板に起因する外表面の粗さが、平らな結晶小板の個々の結晶クラスターを伴わずにCAPコアの表面上に統計的に均等に分布していることを意味する。種々の程度の粗さの均質な粗い外表面を持つ、本発明の二相性リン酸カルシウム/ヒドロキシアパタイト(CAP/HAP)骨代替材料のプロトタイプ3~7のSEM写真を表す、図2を参照のこと。

【0054】

「平らな結晶小板」という用語は、3つの垂直方向に関して高さ(厚さ)が幅及び長さよりもかなり小さい結晶集合を意味する。このような平らな結晶小板は、図3bにおいてはっきりと見える。

【0055】

一般に、均質な粗い外表面は、SEMで測定されるとき0.2~20μmのサイズ(幅と長さ)を持つ小板の連結ネットワークを形成する、エピタキシャル成長ナノ結晶ヒドロキシアパタイト小板を含む。小板のサイズが大きいほど、外表面の粗さが高まる。

【0056】

好ましくは、均質な粗い外表面は、SEMで測定されるとき0.5~5μmのサイズを持つ小板の連結ネットワークを形成する、エピタキシャル成長ナノ結晶ヒドロキシアパタイト小板を含む。

【0057】

通常は、その均質な粗い外表面は、水銀圧入ポロシメトリー(MIP)で測定されるとき0.03~2μmの細孔を含む連結ネットワークを形成する、エピタキシャル成長ヒドロキシアパタイト小板を含む。0.03~2μmの細孔容積が大きいほど、外表面の粗さが高まる。

【0058】

一般に、その均質な粗い外表面は、AFM(原子間力顕微鏡法(Atomic Force Microscopy))で得た50~400nmの範囲の二乗平均平方根粗度(R_q)及び500~2000nmの範囲の輪郭の平均最大高さ(R_z)を用い、AFMにより特徴付けられ得る。

【0059】

好ましくは、均質な粗い外表面は、AFMで得た110~150nmの範囲の二乗平均平方根粗度(R_q)及び550~750nmの範囲の輪郭の平均最大高さ(R_z)により特徴付けられ得る。

【0060】

一般に、二相性リン酸カルシウム/ヒドロキシアパタイト(CAP/HAP)骨代替材料中のHAPの割合は、XRDにより測定されるとき1~90%である。

【0061】

好ましくは、その割合は、XRDにより測定されるとき1.5~30%、更に好ましくは2~15%である。

【0062】

焼結CAPコアは、リン酸三カルシウム(TCP)、特に-TCP(-Ca₃(PO₄)₂)又は-TCP(-Ca₃(PO₄)₂)、及び/又はリン酸四カルシウム(TTCP)Ca₄(PO₄)₂Oを含む。

【0063】

頻繁に使用される実施態様では、焼結CAPコアは、本質的にTCPからなり、-TCPが好ましい。

【0064】

ナノ結晶HAPのエピタキシャル成長層は、構造的に天然のヒト骨塩とほぼ同一である。

【0065】

10

20

30

40

50

C A P / H A P 骨代替材料は、粒子状又は顆粒状であってよく、この粒子又は顆粒は所望のサイズ及び形状を有する。一般に、粒子又は顆粒は、250～5000 μm 、好ましくは1000～2000 μm のサイズを有する。

【0066】

C A P / H A P 骨代替材料はまた、成形体、例えば、ネジ、釘、ピン、又は特に、股関節、鎖骨、肋骨、下顎骨若しくは頭蓋骨のような、骨性身体部分の輪郭を有する構造であってもよい。そのようなネジ、釘又はピンは、例えば、膝又は肘の骨に韌帯を固定するための整形外科再建手術において使用されてもよい。骨性身体部分の輪郭を有するそのような構造は、消失又は欠損の骨又は骨部分を置換するためのプロテーゼとして整形外科手術において使用されてもよい。

10

【0067】

本発明はまた、一般に天然又は合成ポリマーを含む、適切なマトリックス中に上記のC A P / H A P 骨代替品の粒子又は顆粒を含むパテに関する。一般に、粒子又は顆粒は、250～5000 μm 、好ましくは1000～2000 μm のサイズを有する。

【0068】

本発明は更に、上記のC A P / H A P 骨代替材料の調製方法であって、以下の工程：

a) 焼結C A Pコア材料を調製すること、

b) 焼結C A Pコア材料を10～50の間の温度で10～90%の短鎖脂肪族アルコールを含有する緩衝液に浸漬して、C A PからH A Pへの変換プロセスを開始し、それによって焼結C A Pコア材料表面上にナノ結晶ヒドロキシアパタイトの閉じたエピタキシャル成長層（ここで、エピタキシャル成長ナノ結晶は、ヒト骨塩と同じサイズと形態を有する）であって、平らな結晶小板を含む均質な外表面を有する、焼結C A Pコア材料表面上に形成されるナノ結晶H A Pの閉じたエピタキシャル成長層が形成されること、

20

c) H A Pの少なくとも1つのナノ結晶層の閉じたコーティングが存在するが、変換プロセスが完全に終わる前の時点で、水溶液から固体材料を分離することによって変換を停止させること、及び

d) 場合により、工程c)からの分離された材料を滅菌することを含む方法に関する。

【0069】

適切な短鎖脂肪族アルコールは、メタノール、エタノール、プロパノール及びブタノールからなる群より選択され得る。

30

【0070】

好ましくは短鎖脂肪族アルコールは、エタノールである。

【0071】

好ましくは、工程b)の緩衝液は、20～60%、更に好ましくは30～50%の短鎖脂肪族アルコールを含有する。

【0072】

焼結C A Pコアの外表面上に堆積したナノ結晶H A Pの閉じたエピタキシャル成長層の均質な粗い外表面の粗さのパラメーター、特に

- A F Mパラメーター：A F Mで得た二乗平均平方根粗度（ R_q ）及び輪郭の平均最大高さ（ R_z ）、

40

- S E Mで測定されるエピタキシャル成長ナノ結晶ヒドロキシアパタイト小板のサイズ、並びに

- M I Pで測定される0.03～2 μm の細孔容積

は、便利には変換溶液の緩衝液中の短鎖脂肪族アルコールの割合を変えることにより調整され得る。

【0073】

その割合が高いほど、A F Mで得た二乗平均平方根粗度（ R_q ）及び輪郭の平均最大高さ（ R_z ）が低く、S E Mで測定されるエピタキシャル成長ナノ結晶ヒドロキシアパタイト小板のサイズが小さく、そしてM I Pで測定される0.03～2 μm の細孔容積が小さ

50

い。

【0074】

10 ~ 90 %の短鎖脂肪族アルコールを含有する工程b)の緩衝液は、水性緩衝液を種々の量の短鎖脂肪族アルコールと混合することによって得られる。水性緩衝液は、10 ~ 90 %の短鎖脂肪族アルコールを更に含有する工程b)の浸漬溶液のpH値が、ほぼ中性であり、そして変換プロセス全体を通じて、好ましくは5.5 ~ 9.0、更に好ましくは7.0 ~ 8.0のpH範囲内で安定を保つように、選択される。

【0075】

緩衝剤は、上記pH範囲内の任意の緩衝剤であってよいが、好ましくはカルシウム、マグネシウム及び/又はナトリウムを含むか又は含まないリン酸緩衝剤である。

10

【0076】

適切な緩衝液は、例えば、7.3 ~ 7.6のpH値を持つリン酸二水素ナトリウム(NaH₂PO₄)の0.05 ~ 0.3M水溶液である。

【0077】

工程b)の温度範囲は一般に、10と50の間、好ましくは25と45の間、更に好ましくは35と40の間である。

【0078】

好ましくは工程b)は、35 ~ 40の温度で、20 ~ 60 %の短鎖脂肪族アルコールを含有するpH7.0 ~ 8.0のリン酸緩衝液中で行われる。

【0079】

焼結CAPコア材料の調製は、最初にリン酸水素カルシウム(CaHPO₄)、炭酸カルシウム及び/又は水酸化カルシウムの粉末を混合し、次に適切な温度範囲内で混合物をか焼及び焼結し、これによってバルク焼結CAPコア材料が与えられることを含む、当技術分野において公知の方法によって実施され得る(例えば、Mathew M. et al., 1977, Acta. Cryst. B33: 1325; Dickens B. et al., 1974, J. Solid State Chemistry 10, 232; and Durucan C. et al., 2002, J. Mat. Sci., 37:963を参照のこと)。

20

【0080】

よってバルク焼結TCPコア材料を、リン酸水素カルシウム(CaHPO₄)、炭酸カルシウム及び/又は水酸化カルシウムの粉末を化学量論比で混合し、混合物を1200 ~ 1450の範囲の温度、好ましくは約1400でか焼及び焼結することによって得てもよい。

30

【0081】

バルク焼結TTCAPコア材料もまた、上記プロセスによって得てもよい。

【0082】

そのような方法によって調製されたバルク焼結CAP材料は、2 ~ 80体積%の空隙率及び細孔の幅広い分布を有する多孔質であってよい。空隙率パラメーターは、CAP/HAP骨代替材料の意図される用途に応じて選択されよう。

【0083】

工程b)に使用される焼結CAPコア材料は、

- 上記のとおり調製されたバルク焼結CAPコア材料であるか、

40

- 上記のとおり調製されたバルク焼結CAPコア材料から、破碎、磨碎及び/又は粉碎、並びに篩い分けのような従来の方法を使用して得られた、焼結CAPコア材料の粒子又は顆粒であるか、あるいは

- 所望の形状とサイズ、例えば、ネジ、釘、ピン、又は骨性身体部分の輪郭を有する構造を有する焼結CAPコア材料のプリフォームであってもよい。

【0084】

このような任意の所望の形状とサイズのプリフォームを、CNCライス加工又は3D印刷のような周知のプロトタイピング技術を使用して、上記のとおり調製されたバルク焼結コア材料から得てもよい(例えば、Bartolo P. et al., 2008, Bio-Materials and Prototyping Applications in Medicine, Springer Science New York, ISBN 978-0-387-476

50

82-7; Landers R. et al., 2002, *Biomaterials* 23(23), 4437; Yeong W.-Y. et al., 2004, *Trends in Biotechnology*, 22 (12), 643; and Seitz H. et al., 2005, *Biomed. Mater. Res.* 74B (2), 782を参照のこと)。

【0085】

浸漬工程b)は、第1段階でCAPコア材料の一次相転移を誘導し、したがってHAPナノ結晶前駆体の核形成を誘導する。第2段階中に、第1段階から得られたHAP前駆体は成長して、閉じた(即ち、完全にコーティングしている)エピタキシャルナノ結晶複合層を確立する。最初のHAPナノ結晶層は、均質で閉じており、かつ焼結CAPコア材料にエピタキシャルに接合されている必要がある。

【0086】

第3段階中に、新しく形成された二重複合層内で一次相転移が進行して、焼結CAPコア材料(TCP又はTTCP)をナノ結晶HAPに更に変換することができる。相転移のこの第3工程中に、焼結CAPコア材料の一部がナノ結晶HAPに変換されるまで、遅延拡散制御プロセスによって制御可能な時間、カルシウムイオンが放出されよう。HAP層の厚さ、ひいてはカルシウム放出の速度は、変換時間の変動によって制御され得る。

【0087】

適切な厚さのエピタキシャル成長ナノ結晶HAP層は、インビトロで調製されるが、ここでHAPへのCAPの変換は、完了する前に停止させる。

【0088】

CAP/HAP骨代替材料がインビボに設置されると直ぐに、HAPへのCAPの変換プロセスは、体液との接触により再活性化され、骨代替材料は、ヒト骨塩にサイズと形態が類似する新しいヒドロキシアパタイトを形成する生体様システムとして機能しよう。インビボ相変態プロセス中に、輸送されたカルシウムイオンは、骨再生プロセスにとって重要かつ有益である局所カルシウム平衡を支持する局所環境へと放出されよう。

【0089】

身体の負荷が異なる部位では骨欠損の再生時間が異なるため、カルシウム放出の速度を制御することが重要である。これは、ヒドロキシアパタイトのエピタキシャル成長層の厚さを変えることによって達成され得る。

【0090】

したがって工程c)は非常に重要な工程である。工程b)の水溶液中の曝露時間は、所望のHAP層の厚さに基づく。エピタキシャル配向のナノ結晶HAPの少なくとも1つの層が必要である。CAPからHAPへの変換が完了していないことは不可欠である。

【0091】

所望の厚さによる適切な曝露時間は、リン酸カルシウム並びにセメント及びコンクリート化学の分野の当業者に周知の幾つかの熱力学的微分方程式を使用することによって計算され得る。

【0092】

例えば、Pommersheim, J.C.; Clifton, J.R. (1979) *Cem. Conc. Res.*; 9:765; Pommersheim, J.C.; Clifton, J.R. (1982) *Cem. Conc. Res.*; 12:765; and Schlüssler, K.H. Medlov-Petrosjan, O.P.; (1990): *Der Baustoff Beton*, VEB Verlag Bauwesen, Berlinを参照のこと。

【0093】

上記の微分方程式の解をCAP/HAPシステムに代入すると、CAPのHAPへの相転移及び層の厚さを予測できるため、HAPのエピタキシャル層を安定で再現性あるやり方で調製することができる。

【0094】

水溶液からの固体材料の分離は、当技術分野で周知の技術を使用して、濾過及び乾燥によって通常実施される。

【0095】

オプションの滅菌工程d)は、ガンマ線照射又はX線照射のような当技術分野で周知の

10

20

30

40

50

手法によって実施され得る。

【0096】

本発明はまた、一般に粒子、パテ又は成形体の形の、ヒト又は動物の欠損部位における骨形成、骨再生、骨修復及び／又は骨置換を支持するためのインプラント又はプロテーゼとしての上記C A P / H A P 骨代替材料の使用に関する。

【0097】

本発明はまた、一般に粒子、パテ又は成形体の形の、上記C A P / H A P 骨代替材料を移植することによる、ヒト又は動物の欠損部位における骨形成、骨再生及び／又は骨修復を促進する方法に関する。

【0098】

本発明のC A P / H A P 骨代替材料及びその調製方法の利点

10

平らな結晶小板を含む均質な粗い外表面を有する、本発明の二相性リン酸カルシウム／ヒドロキシアパタイト（C A P / H A P ）骨代替材料は、平らな結晶小板の個々のクラスターとその間の滑らかな領域とを含む不均質な外表面を有するEP-B1-2445543により教示された二相性リン酸カルシウム／ヒドロキシアパタイト（C A P / H A P ）骨代替材料と比較して、ヒト胎児間葉系幹細胞（h M S C ）の骨形成分化の増加、特に分化マーカーであるオステオポンチン（O P N ）及びオステオカルシン（O C N ）のより高い発現を示す。これは、インビボ骨形成反応の増強のはっきりした兆候である。

【0099】

これは、R.A. GittensらがBiomaterials 2011 May, 32(13): 3395-3403に発表した結果と一致しているが、この文献は、マイクロ - サブマイクロスケールの粗度と組合せたナノスケール構造の導入により骨芽細胞の分化と局所因子の産生が改善されることを示しており、これにより、インビボでのインプラントのオッセオインテグレーション（osseointegration）の改善の可能性が示唆される。

20

【0100】

本発明の二相性リン酸カルシウム／ヒドロキシアパタイト（C A P / H A P ）骨代替材料の調製方法によって、焼結C A P コアの外表面上に堆積したナノ結晶H A P の閉じたエピタキシャル成長層の均質な粗い外表面の粗さパラメーターを、特に

- A F M パラメーター：A F Mで得た二乗平均平方根粗度（R_q）及び輪郭の平均最大高さ（R_z）を、

30

- S E M で測定されるエピタキシャル成長ナノ結晶ヒドロキシアパタイト小板のサイズを、並びに

- M I P で測定される0.03 ~ 2 μmの細孔容積を

変換溶液の緩衝液中の短鎖脂肪族アルコールの割合を調整することにより、便利に調整することができる。

【0101】

その割合が高いほど、A F Mで得た二乗平均平方根粗度（R_q）及び輪郭の平均最大高さ（R_z）が低く、S E Mで測定されるエピタキシャル成長ナノ結晶ヒドロキシアパタイト小板のサイズが小さく、そしてM I Pで測定される0.03 ~ 2 μmの細孔容積が小さい。

40

【図面の簡単な説明】

【0102】

本発明は、本発明の好ましい実施態様の説明例及び添付の図面を参照して、本明細書の以下に更に詳細に記載されよう。

【図1a】図1aは、EP-B1-2445543により開示され、30分の変換時間有する実施例1で調製された、滑らかな領域が、S E Mで測定されるとき外表面全体の約70%に相当する、骨代替材料のプロトタイプ1（1 ~ 2 mm顆粒）のS E M写真を表す。

【図1b】図1bは、EP-B1-2445543により開示され、40分の変換時間有する実施例1で調製された、滑らかな領域が、S E Mで測定されるとき外表面全体の約50%に相当する、骨代替材料のプロトタイプ2（1 ~ 2 mm顆粒）のS E M写真を表す。

50

【図2】図2a～2eは、本発明の骨代替材料のプロトタイプ3(図2a)：20%エタノール、1～2mm顆粒、プロトタイプ4(図2b)：30%エタノール、1～2mm顆粒、プロトタイプ5(図2c)：40%エタノール、1～2mm顆粒、プロトタイプ6(図2d)：50%エタノール、1～2mm顆粒、及びプロトタイプ7(図2e)：60%エタノール、1～2mm顆粒のSEM写真を表す。図1及び図2a～2eの全てのSEM写真は、倍率3500倍を有する。

【図3a】図3aは、低倍率(1000×)でのプロトタイプ5(40%エタノール、1～2mm顆粒)の断面のSEM写真を表す。右下隅は顆粒の外面を示し、顆粒の中心は左上隅寄りに位置する。

【図3b】図3bは、高倍率(14,000×)でのプロトタイプ5(40%エタノール、1～2mm顆粒)の断面のSEM写真を表す。

【図4】図4は、実施例2で調製された本発明の骨代替材料の無孔質ディスクのプロトタイプ3a(左：20%エタノール)及び6a(右：50%エタノール)のSEM写真(上の2つの写真)及びAFM写真(他の4つの写真)を表す。

【図5】図5a～5bは、インビトロ試験において先行技術の骨代替材料と比較しての、本発明の骨代替材料と接触したヒト胎児間葉系幹細胞(hMSC)のオステオカルシン(OCN、図5a)及びオステオポンチン(OPN、図5b)反応を表す。

【図6】図6は、実施例2で調製された本発明の骨代替材料のプロトタイプ3(20%エタノール)、5(40%エタノール)及び7(60%エタノール)並びに実施例1に記載されたとおり製造された純粋な-TCPの1～2mm顆粒のMIP図を表す。

【0103】

詳細な説明

以下の実施例により、本発明の範囲を限定することなく本発明を説明する。

【実施例1】

【0104】

EP-B1-2445543の二相性リン酸カルシウム/ヒドロキシアパタイト(CAP/HAP)骨代替材料の調製。

EP-B1-2445543の実施例1、2及び4と同様に、-TCPのバルク焼結材料、1.0～2.0mmの粒径のその多孔質顆粒、及びエピタキシャル成長HAPコーティングを有する変換顆粒を調製した。

実験室用攪拌機を用いて、364g リン酸二カルシウム無水物粉末、136g 炭酸カルシウム粉末、及び220ml 脱イオン水を700rpmで5分間混合した。混合プロセスからのスラリーを、直ちに高温安定なプラチナカップに移した。充填プラチナカップを低温炉に入れた。1時間当たり100 の加熱速度を使用して、炉を1400 に加熱した。この温度を12時間保持し、そして炉を1時間当たり500 の冷却速度で800 まで冷却し、次に1時間当たり125 の冷却速度で300 まで冷却し、最後に炉の切り替えにより室温まで冷却した。バルク焼結材料(相純粋な-Ca₃(PO₄)₂)を炉及びプラチナカップから取り出した。相純度の制御は、粉末X線回折分析法を用いて実施された。

ジョークラッシャーを使用してバルク生成物を粉碎した(ジョー距離は10～1mmで変動した)。生成した顆粒を、2mm及び1mmのメッシュ開口を有する篩い機及び篩いインサートを使用して篩い分けした。篩い分け後、顆粒をエタノールで濯いで、顆粒に吸着した微粉末残留物を分離した。多孔質顆粒をキャビネット乾燥機で80 で1時間乾燥させた。濯ぎ後の粒子表面の清浄度は、走査型電子顕微鏡法を用いる表面観察によって制御された。

0.4mol/l リン酸二水素ナトリウム(NaH₂PO₄)を蒸留水に溶解して、コーティング及び相変態プロセスに適した緩衝液を調製した。水酸化ナトリウム(NaOH)を使用して、溶液のpHを室温で7.45に調整した。前の段落で生成した顆粒を調製溶液中に浸漬し、温かい水浴(40)内でそれぞれ30分間(プロトタイプ1)及び40分間(プロトタイプ2)保存した。浸漬後、顆粒を蒸留水で3回濯ぎ、相変態プロセスを停

10

20

20

30

40

50

止させ、緩衝液から残留物を取り出した。多孔質顆粒を、キャビネット乾燥機内で100で2時間乾燥させた。

プロトタイプ1及びプロトタイプ2の顆粒に対して、倍率3500×のSEMを実施した。

プロトタイプ1及び2のSEM写真を表す図1a及び1bから明らかなように、顆粒の外表面は、エピタキシャル成長HAPナノ結晶からなる平らな結晶小板の個々の（分離した）クラスターと結晶間の滑らかな領域を含む不均質なものである。

プロトタイプ1及びプロトタイプ2の各々についてSEM写真上で個々のクラスターと滑らかな領域とが占める表面を測定することにより、滑らかな領域がプロトタイプ1では外表面の約70%、プロトタイプ2では外表面の約50%に相当することが判定された。

【実施例2】

【0105】

本発明の二相性リン酸カルシウム/ヒドロキシアパタイト(CAP/HAP)骨代替材料の調製。

1) 骨代替材料の顆粒の調製

上記の実施例1に記載されるとおり、相純粋な-TCPの1~2mmサイズの多孔質顆粒を製造した。

相変態及びコーティング工程は、40に設定された水浴に入れたガラスフラスコ中で実施された。変換緩衝液は、様々な割合のエタノールと混合したリン酸二水素ナトリウム(NaH₂PO₄)の水溶液とした。リン酸二水素ナトリウムの水溶液のモル濃度は0.05M~0.3Mの間で変動し、エタノールの含量は20~60w/w%の間で変動した。変換溶液のpHは7.3~7.6の間であった。

ガラスフラスコに変換緩衝液を充填し、-TCP顆粒を1:40~1:80(顆粒対変換溶液)の比で加えた。顆粒を変換溶液に40で24~72時間の期間、浸漬した。浸漬後、顆粒を脱イオン水(顆粒対水の比は重量で1:10)で5回濯ぎ、エタノール(99.9%、顆粒対エタノールの比は重量で1:10)で2回濯いで、相変態プロセスを停止させ、緩衝液から残留物を取り出した。多孔質顆粒を、キャビネット乾燥機内で100で2時間乾燥させた。

コーティング及び相変態プロセス後の表面形態を、SEMを使用して観察した。

図2は、本発明の骨代替材料のプロトタイプ3(20%エタノール)、プロトタイプ4(30%エタノール)、プロトタイプ5(40%エタノール)、プロトタイプ6(50%エタノール)及びプロトタイプ7(60%エタノール)の倍率3500×のSEM写真を表す。図1a及び1bを図2に対して比較することにより、平らな結晶小板の個々のクラスターとその間の滑らかな領域を有するプロトタイプ1及び2の不均質な外表面が、個々の結晶クラスターのない均質な粗い外表面によって置き換えられることが分かる。均質な粗い外表面は、エピタキシャル成長ヒドロキシアパタイト小板の連結ネットワークでできている。SEM分析で観察されるとおり、個々の小板のサイズは、変換溶液のエタノール含量を増加させると減少し、そして外表面の粗さ又は粗度を減少させる。

図3aは、低倍率(1000×)でのプロトタイプ5(40%エタノール、1~2mm顆粒)の断面のSEM写真を表す。右下隅は顆粒の外面を示し、顆粒の中心は左上隅寄りに位置する。

図3bは、高倍率(14,000×)でのプロトタイプ5(40%エタノール、1~2mm顆粒)の断面のSEM写真を表しており、粗い表面の構成単位である個々の平らな結晶小板をはっきりと見ることができる。顆粒の中心の粗い外表面と顆粒の外面の粗い外表面との間に違いはない。

【0106】

水銀圧入ポロシメトリー(MIP)による細孔径分布の測定

顆粒の細孔径分布は、水銀圧入ポロシメトリー(MIP)を使用して測定された。MIPは、多孔質材料の細孔径分布を測定するために使用される標準的な特性評価手法である。この手法は当技術分野において周知であり、例えば、Gregg, S. J. and Sing, K.S.W.,

10

20

30

40

50

Adsorption, Surface Area and Porosity, 2nd ed., Academic Press Inc. (1982), 173-190に記載されている。

図6は、純粋な-TCP(実施例1により製造され、そしてプロトタイプ3、5及び7のコア材料)と比較した本発明の骨代替材料のプロトタイプ3、5及び7のMIP図を表す。全ての測定は、1~2mm顆粒を用いて実施された。

純粋な-TCP試料は、その表面が滑らかであるため0.03~2μmの範囲の細孔を持たないことが分かる。本発明の全ての骨代替材料は、エピタキシャル成長ヒドロキシアバタイト小板の連結ネットワークでできている均質な粗い外表面の多孔性のため、0.03~2μmの範囲の細孔を含有する。0.03~2μmの範囲のMIP曲線下の面積に対応する粗い外表面の細孔容積は、連結ネットワークの個々の小板サイズに依存する。個々の小板が大きいほど、連結ネットワークに含まれる細孔容積が高値になる。よって、連結ネットワークに含まれる細孔容積は、表面の粗さに直接相関させることができる。MIP図で0.03~2μmの範囲の細孔容積が高値であるほど、表面の粗さが高くなる。プロトタイプ3は、示されたプロトタイプの0.03~2μmの範囲で最大の細孔容積(曲線下の面積)を持ち、プロトタイプ5及び7がそれに続く。図2a~2eでのSEM分析によって、プロトタイプの粗さがプロトタイプ3からプロトタイプ5及び7へと減少していることが確認される。

【0107】

2) 骨代替材料の無孔質ディスクの調製

上記実施例1に記載されたとおり製造された相純粋な-TCPの1~2mmサイズ顆粒を150rpmで20時間遊星ミルで粉碎して、微粉末を得た。微粉末をプレス型に充填し、ハンドプレスで1トンの荷重で圧縮した。グリーン成形体を型から取り出し、高温炉に移した。1時間当たり250の加熱速度を用いて、炉を1450まで加熱した。この温度を24時間保持し、次に炉を1時間当たり500の冷却速度で800まで冷却し、次いで1時間当たり150の冷却速度で室温まで冷却した。バルク焼結無孔質材料(相純粋な-Ca₃(PO₄)₂)を炉から取り出した。相純度の制御は粉末X線回折分析法を用いて実施され、表面特性はSEMを用いて分析された。

調製ディスクの相変態及びコーティングは、1)の下に上記されたとおり実施されたが、唯一の違いは、-TCP対変換溶液の重量比が1~3.5であったことである。

本発明の骨代替材料のプロトタイプ3a(20%エタノール)及び6a(50%エタノール)は、このように調製された。

コーティング及び相変態プロセス後の表面形態を、SEMを使用して観察した。対応する粗度パラメーターは、原子間力顕微鏡法AFMを使用して測定された。

図4のSEM画像によって、無孔質ディスクの均質な粗い外表面の形態が、実施例2の段落1からの対応するエタノール含量で製造された顆粒の粗い外表面と同一であることが確認される(プロトタイプ3と3a及びプロトタイプ6と6a)。

【0108】

原子間力顕微鏡法(AFM)

ナノスケールでの表面測定は、タッピングモードで原子間力顕微鏡法(TT-AFM、AFM Workshop)を使用して評価された。AFM分析は、直径11mm、高さ1mmの無孔質円筒ディスクを使用して、周囲雰囲気下で行われた。190kHzの共振周波数及び最大10nmの先端半径を使用した。各AFM分析は50μm×50μmの面積で実施され、各群3試料が走査された。数値補正を適用することにより、元のデータを水平にして傾きを除去し、二乗平均平方根粗度(R_q)及び輪郭の平均最大高さ(R_z)の平均値をGwyddionソフトウェアを使用して決定した。

表面の同様の表面特性評価法は、例えば、US-2013-0045360-A1に記載されている。

図4は、本発明により調製された無孔質ディスクのプロトタイプ3a(20%エタノール、左側)及び6a(50%エタノール、右側)のAFM写真を表す。プロトタイプ3a及び6aのAFMで得た粗度値を、以下の表1に見い出すことができる。

【0109】

【表1】

表1

プロトタイプ3a及び6aのAFMで得た粗度値

	R _q [nm]	R _z [nm]
プロトタイプ3a(20%エタノール)	237 ± 31	1391 ± 194
プロトタイプ6a(50%エタノール)	130 ± 13	630 ± 82

10

【0110】

表1に見られるとおり、エタノール含量を20%から50%へと増加させると、二乗平均平方根粗度(R_q)の平均値は237nmから130nmに減少し、そして輪郭の平均最大高さ(R_z)は1391nmから630nmに減少した。

【実施例3】

【0111】

ヒト胎児間葉系幹細胞(hMSC)の骨形成分化のインビトロ試験。

実施例1及び2で調製された骨代替材料プロトタイプが骨形成分化を支持するかどうかを評価するために、妊娠22週後にヒト胎児大腿骨から分離された約200,000個のhMSC(ScienCellから市販:Cat # 7500、Lot # 6890)をその骨代替材料プロトタイプの顆粒320mgに播種して、3週間培養した。培養の最初の7日間は、市販のhMSC増殖培地(MSCM培地、Cat # 7501、ScienCell)を使用して、細胞増殖を最適に支持した。次の14日間、培地を10%FBS及びペニシリン/ストレプトマイシンを補足したDMEMに交換した。細胞培養培地に追加の骨形成剤を添加しなかった。3週間のhMSC培養の後、全mRNAを単離して、cDNAに転写し、そしてリアルタイム定量PCR(Real Time Quantitative PCR)を実施した。遺伝子発現は、GAPDHをハウスキーピング遺伝子として使用するCT法(Livak K.J. and Schmittgen T.D., Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2-⁻CT method, 2001, Methods 25, pp. 402-408を参照のこと)を経て計算された。骨形成分化マーカーであるオステオポンチン(OPN)及びオステオカルシン(OCN)の発現は、実施例1及び2で調製された顆粒形(1~2mm)の全ての骨代替材料プロトタイプについて測定された。

20

これらの測定は、実施例1の先行技術の骨代替材料プロトタイプよりも、実施例2の本発明の骨代替材料プロトタイプでは、骨形成分化マーカーのOPN及びOCNの有意に高い発現を示した(図5a~5bを参照のこと)。

30

このインビトロ結果に基づいて、本発明の骨代替材料プロトタイプに対する骨形成反応の増強がインビボで予想される。

【実施例4】

【0112】

本発明の二相性CAP/HAP骨代替材料のHAPナノ結晶とヒト骨塩との結晶サイズ及び形態の比較。

40

結晶サイズ分析は、プロトタイプ3の試料及び天然のヒト骨塩にプラッギ法を適用することにより、EP-B1-2445543の場合と同様にX線回折データの精密化を使用して実施された。

よって、本発明の二相性CAP/HAP骨代替材料及びヒト骨塩が同じ形態及び同じ結晶サイズを有することが示された。

以下の表2を参照のこと。

【0113】

【表2】

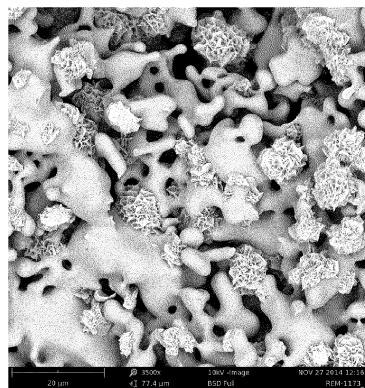
表2

本発明のCAP/HAP骨代替物とヒト骨塩とのHAP結晶サイズ及び形態の比較

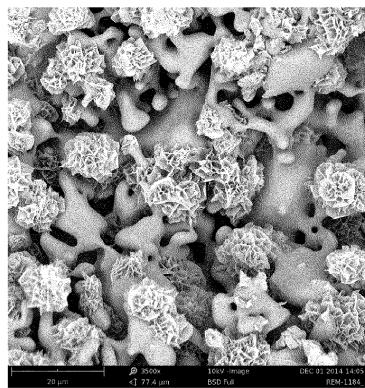
結晶軸 (六方晶系空間群 P6 ₃ /m)	生理的温度で調製された本発明 の CAP/HAP 結晶サイズ ⁺ [nm]	天然ヒト骨塩 結晶サイズ ⁺ [nm]
a (1,0,0)	18 (± 4)	15-21
b (0,1,0)	18 (± 4)	15-21
c (0,0,1)	38 (± 8)	34-45

10

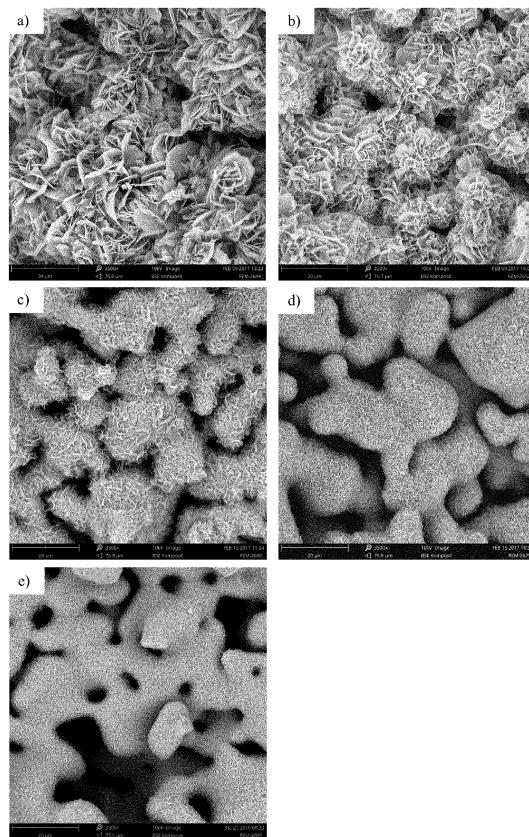
【図1 a】



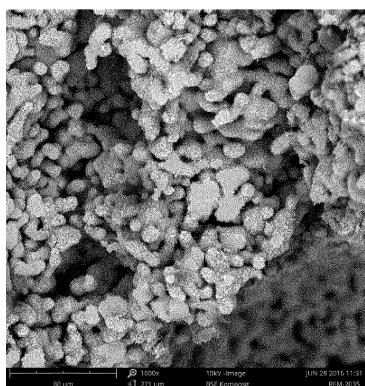
【図1 b】



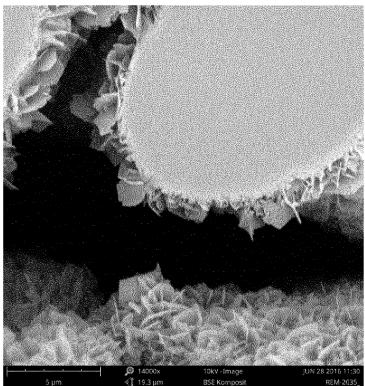
【図2】



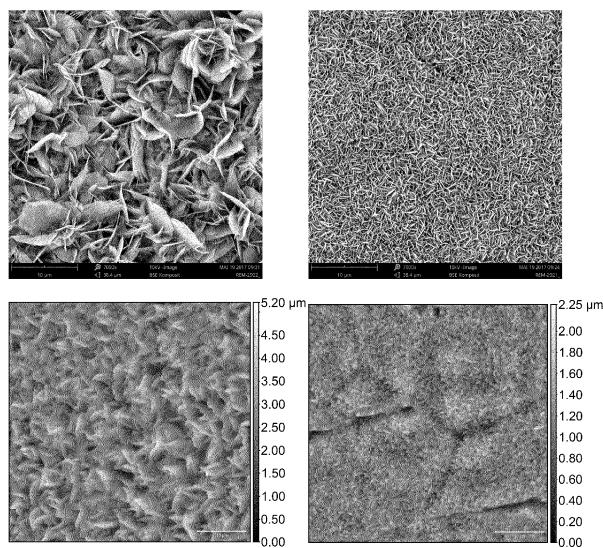
【図3a】



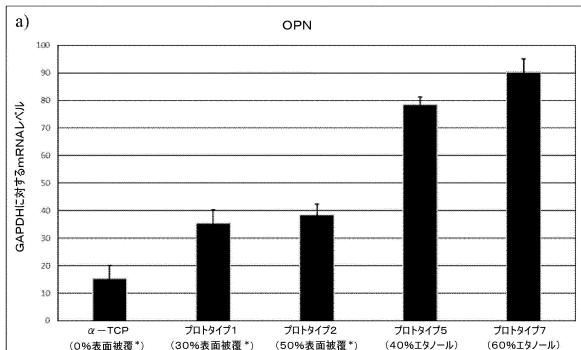
【図3b】



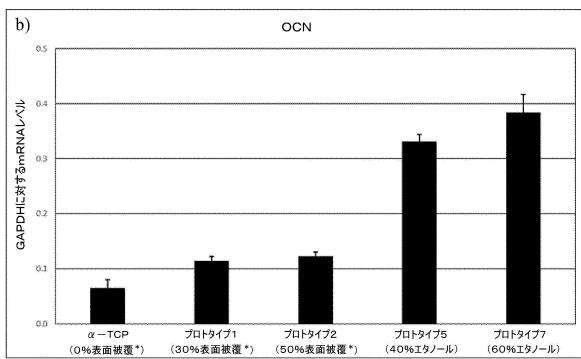
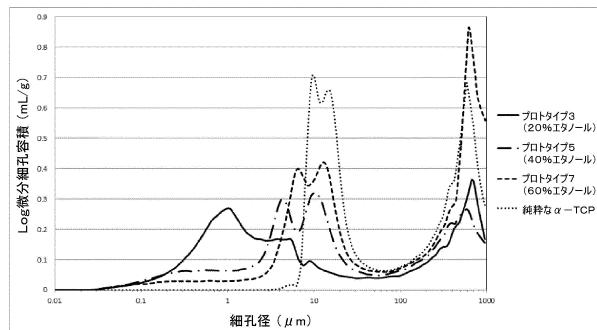
【図4】



【図5】



【図6】



* SEMで測定された平らな結晶小板の個々のクラスターによる表面被覆

フロントページの続き

(56)参考文献 特表2012-530568 (JP, A)
特開昭60-220056 (JP, A)
Acta Biomaterialia, 2014年, Vol.10, pp.3363-3371

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61L 27/00 - 27/60
JST Plus / MEDLINE / ST7580 (JDreamIII)
Caplus / EMBASE / BIOSIS (STN)