

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

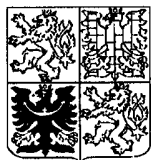
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3626-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20. 05. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **19.05.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/446182**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13. 05. 98**
(Věstník č. 5/98)

(86) PCT číslo: **PCT/US96/07273**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/36562**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 01 B 25/32
A 61 L 27/00

(71) Přihlášovatel:

ETEX CORPORATION, Cambridge, MA, US;

(72) Původce:

Lee Dosuk D., Brookline, MA, US;

Rey Christian, Castanet, FR;

Aiolova Maria, Brookline, MA, US;

(74) Zástupce:

Guttmann Michal JUDr. Ing., Nad Štolou
12, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Materiál pro náhradu kosti a způsob jeho výroby

(57) Anotace:

Reaktivní amorfni pevná látka, získaná konverzí precipitátu standardního inertního amorfniho fosforečnanu vápenatého poskytuje reakci s promotorem syntetický hydroxyapatit s nízkou krystalinitou, který vykazuje jak bioaktivitu, tak strukturní integritu. Tento materiál pak reaguje s fosforečnanem vápenatým při teplotě 37 °C nebo nižší za vzniku kosti podobného materiálu sestávajícího z hydroxyapatitu s nízkou krystalinitou.

CZ 3626-97 A3

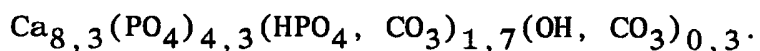
Materiál pro náhradu kosti a způsob jeho přípravy

Oblast techniky

Tento vynález se týká syntetického hydroxyapatitu s nízkou krystalinitou, vhodného jako materiál pro náhradu lidské nebo zvířecí kosti a jiné účely. Vynález se dále vztahuje na syntézu amorfních fosfátových sloučenin uplatňujících se při tvorbě hydroxyapatitu s nízkou krystalinitou při nízkých teplotách.

Dosavadní stav techniky

Fosforečnany vápenaté jsou hlavními konstituenty tvrdých tkání (kost, chrupavka, zubní sklovina, zubní dřev). Přirozeně se vyskytující kostní minerál je tvořen fosforečnanem vápenatým o nízké krystalinitě, o nanometrové velikosti krystalů a se strukturou hydroxyapatitu. Avšak na rozdíl od ideálního stechiometrického krystalického hydroxyapatitu $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ s atomovým poměrem Ca/P 1,67, je složení minerálu kostí výrazně rozdílné a může být vyjádřeno následujícím vzorcem:



Nestechiometrické složení minerálu kostí je třeba přičítat přítomnosti dvojmocných iontů jako CO_3^{2-} a HPO_4^{2-} , které zastupují trojmocné PO_4^{3-} ionty. Záměna ionty HPO_4^{2-} a CO_3^{2-} způsobuje změnu poměru Ca/P tak, že se v závislosti na věku a umístění kosti, pohybuje mezi 1,50 až 1,70. Obecně se poměr Ca/P zvyšuje během stárnutí kosti, což naznačuje, že pro starší kosti je typický vzrůst množství karbonátových species.

Je to poměr Ca/P, ve spojení s nanometrovou velikostí a málo krystalickou povahou, co dává kostním minerálům

vlastnost specifické rozpustnosti. A protože kostní tkáň podléhá konstantní obnově tkáň regulované buňkami resorbujícími minerály (osteoklasty) a buňkami produkujícími minerály (osteoblasty), chování minerálů při rozpouštění je významné pro udržování citlivé metabolické rovnováhy mezi aktivitami těchto buněk.

Syntetický materiál pro kostní štěpy vytvořený tak, aby se co nejvíce podobal přírodnímu materiálu kosti, může být její platnou náhradou. Přijatelná syntetická kost pomáhá vyhnout se problémům s dostupností a sbíráním autogenního kostního štěpu (vlastní pacientova kost) a rizikům a komplikacím, souvisejícími s alogenním kostním štěpem (kost mrtvého jedince), právě tak jako rizikům souvisejícím s virovým přenosem. Proto se tedy objevil značný počet pokusů o syntézu keramického materiálu, který by co nejvíce odpovídal přirozené kosti pro použití jako implantáty. Preferovaným je hydroxyapatit, protože je chemicky nejpříbuznější přirozeně se vyskytujícímu materiálu kostí, přestože má stechiometrickou, krystalickou formu zpravidla o větší velikosti krystalů.

Ideální syntetický kostní štěp by měl mít minimálně následující čtyři vlastnosti: (1) měl by být chemicky biokompatibilní jako hydroxyapatit; (2) měl by poskytovat stejný stupeň strukturní integrity, aby se štěp udržel na místě a zůstal intaktní, dokud se pacientova vlastní kost kolem něj nezahojí; (3) měl by mít rozpustnou formu, která by dovoľovala resorpci tak, aby pacientova vlastní kost nahradila cizí hydroxyapatit a (4) protože je nezbytné, aby se do syntetického kostního materiálu mohly inkorporovat biomolekuly, jako jsou proteiny kostního růstu, které mohou stimulovat kost vytvářející buňky osteoblastů, je žádoucí, aby postup použitý k vytvoření materiálu byl uskutečněn za nízkých teplot. Nejvíce růstových proteinů (jako kostní

morfogenetické proteiny) je citlivých na teplo a ztrácí svoji bioaktivitu při teplotách nad teplotou tělesnou.

Splnění těchto požadavků může být dosaženo u materiálu, u něhož se kontrolují parametry jako poměry Ca/P, velikost krystalů, krystalinita, porosita, hustota, tepelná stabilita a čistota.

Dřívější poznatky (LeGeros R. Z. v Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine, Karger Pub. Co., New York, 1991) popisují, že vysoce krystalinická forma hydroxyapatitu se tvoří srážením z roztoku a následným sintrováním při vysokých teplotách (800 až 1200 °C). Postup s použitím vysokých teplot poskytuje vysoce stechiometrický hydroxyapatit s velikostí krystalů v řádu několika mikronů a s poměrem Ca/P 1,67. Takový vysoce krystalinický hydroxyapatit má extrémně nízkou rozpustnost, takže se v hostitelské tkáni stává v podstatě nerozpustný. Není proto nahrazován živou kostní tkání a zůstává v pacientovi nedotčen po nežádoucí dlouhou dobu.

V dřívějších poznatcích se dále konstatuje, že se hydroxyapatit tvoří z původně krystalických reaktantů fosforečnanu vápenatého acido-bazickou reakcí probíhající v pevné fázi. Takovýto postup poskytuje materiály, které jsou někdy špatně proreagovány, jsou nehomogenní a obsahují podstatné množství krystalinického hydroxyapatitu.

Constantz v U.S. patentu č. 4,880,610 referuje o přípravě kalcium fosfátových minerálů reakcí vysoce koncentrované kyseliny fosforečné se zdrojem vápníku za přítomnosti base a krystalů hydroxyapatitu. Výsledný produkt je polykrystalinický materiál obsahující krystalickou formu hydroxyapatitových minerálů. Podobně U.S. patent č. 5,053,212 pro Constantze a spol. popisuje použití zdroje práškové kyseliny ke zlepšení zpracovatelnosti a mísitelnosti směsi kyselina/baze; popisuje však smíšené fáze fosforečnanu vápenatého, materiálu podobného tomu, o němž se referuje

v U.S. patentu 4,880610. Nověji popisuje Constantz *a spol.* v *Science* (sv. 267, str. 1796-9, z 24.března 1995) přípravu karbonátovaného apatitu reakcí monohydrátu monokalcium fosfátu, beta-trikalcium fosfátu, alfa-trikalcium fosfátu a uhličitanu vápenatého v roztoku fosforečnanu sodného, při níž vzniká materiál z fosforečnanu vápenatého, který je stále ještě ve svém charakteru podstatně více krystalinický než přirozeně se vyskytující kostní minerály.

Podobně Brown *a spol.* v U.S. Reissue č. 33,221 popisují reakci krystalického tetrakalcium fosfátu ($\text{Ca/P} = 2,0$) s kyselými kalcium fosfáty. Liu *a spol.* v U.S. patentu č. 5,149.368 publikují reakci solí krystalinického fosforečnanu vápenatého s kyselým citrátem.

Všechny tyto odkazy na dřívější poznatky popisují chemickou reakci poskytující krystalinickou formu pevných hydroxyapatitů, které byly získány reakcí pevného krystalinického fosforečnanu vápenatého. O použití amorfního fosforečnanu vápenatého (s Ca/P přibližně 1,5) jako jednoho z reaktantů bylo publikováno málo, protože amorfní fosforečnany vápenaté jsou mezi fosforečnany vápenatými nejméně prozkoumané pevné látky a běžný amorfní fosforečnan vápenatý je většinou považován za inertní a nereaktivní pevnou látku.

Jediná zmínka o amorfním fosforečnanu vápenatém jako materiálu v dřívějších pracích, se soustředila na použití amorfního fosforečnanu vápenatého jako prekursoru pro tvorbu vysoce krystalinických hydroxyapatitových sloučenin obvykle pomocí postupů za vysokých teplot. Takový vysoce krystalinický materiál je vzhledem ke své vysoké nerozpustnosti za fyziologických podmínek nevhodný pro syntetickou kost.

Palmer *a spol.* v U.S. patentu č. 4,849,193 referují například o tvorbě krystalinického práškovitého

hydroxyapatitu reakcí kyselého fosforečnanu vápenatého s roztokem hydroxidu vápenatého, přičemž oba roztoky jsou téměř nasycené, tak, aby se vytvořil precipitát práškovitého amorfního hydroxyapatitu. Amorfni prášek se pak bezprostředně vysuší a sintruje při vysoké teplotě 700 až 1100 °C za vzniku hydroxyapatitu s velmi vysokou krystalinitou. Brown a spol. v U.S. Reissue č. 33,221 popisují vznik krystalinického hydroxyapatitu pro zubní cement reakcí amorfni fáze specificky omezené na tetrakalcium fosfát ($\text{Ca/P} = 2,0$) nejméně s jedním z více kyselých fosforečnanů vápenatých. Brown a spol. dále přípravu nebo vlastnosti takového tetrakalcium fosfátu v amorfni stavu nepopisují. Tung v U.S. patentu č. 5,037,639 popisuje užití a aplikaci standardního amorfni fosforečnanu vápenatého pro remineralisaci zubu. Tung navrhuje užití standardního, inertního a amorfni fosforečnanu ve směsi a podávaného jako součást žvýkací gumy, ústní vody nebo zubní pasty, který se po vniknutí do ústních kapalin mění na krystalinický hydroxyapatit obsahující fluorid, který je užitečný pro remineralisaci zubní skloviny. Simkiss v PCT/GB93/01519 popisuje použití inhibitorů, jako jsou Mg ionty nebo pyrofosfát, smísených s amorfni fosforečnanem vápenatým a implantovaných do živých tkání. Když se, například, Mg ionty vylouží do obklopujících tělních kapalin, konvertuje amorfni vápenato-hořečnatý fosforečnan na krystalinický hydroxyapatit.

Zůstává potřeba vyvinout nový syntetický kostní materiál, který by dokonaleji napodobil vlastnosti přirozeně se vyskytujících minerálů v kosti. Zůstává zejména potřeba poskytnout syntetické kostní materiály, které jsou zcela bioresorbovatelné, s nízkou krystalinitou a s krystaly o nanometrové velikosti, které lze tvořit při nízkých teplotách.

Podstata vynálezu

Účelem předkládaného vynálezu je poskytnout materiál pro náhradu kosti, který je bioresorbovatelný.

Ještě jiným účelem předkládaného vynálezu je poskytnout materiál pro náhradu kosti, který se může tvořit při nízkých teplotách, a který je snadno tvarovatelný a injektovatelný.

Dalším účelem předkládaného vynálezu je vytvoření pevných hydroxyapatitů s nízkou krystalinitou, s nanometrovými rozměry částic a s Ca/P poměry, které jsou srovnatelné s přirozeně se vyskytujícími minerály kostí.

Účelem předkládaného vynálezu je poskytnout způsob konverse standardního, inertního a amorfního fosforečnanu vápenatého na reaktivní a amorfni fosforečnan vápenatý.

Účelem předkládaného vynálezu je poskytnout reaktivní a amorfni fosforečnan vápenatý s povrchovými vlastnostmi, které napodobují povrchovou reaktivitu přirozeně se vyskytujícího materiálu kosti.

Ještě jiným účelem předkládaného vynálezu je poskytnout reaktivní a amorfni fosforečnan vápenatý, který je schopen vytvářet hydroxyapatit s nízkou krystalinitou a při nízkých teplotách (při tělesné teplotě 37 C).

Ještě dalším účelem předkládaného vynálezu je poskytnout injektovatelnou směs fosforečnanu vápenatého.

V jednom provedení je předmětem vynálezu způsob získání reaktivního a amorfního fosforečnanu vápenatého. Reaktivní a amorfni fosforečnan vápenatý může být připraven reakcí iontů vápenatých, fosforečnanových iontů a třetího iontu tak, aby byl získán amorfni fosforečnan vápenatý a poté alespoň částečným odstraněním třetího iontu tak, aby byl získán reaktivní a amorfni fosforečnan vápenatý.

Termínem "amorfni", který je zde používán, se rozumí

materiál s výrazně amorfním charakterem. Za výrazně amorfni charakter se považuje více než 75 % amorfniho obsahu, výhodněji pak více než 90 %, a je charakterisován širokým rentgenovým difraktogramem bez výrazných rysů. Zjistilo se, že v materiálu může být nízký stupeň krystalinity, avšak v případě amorfniích komponent podle vynálezu se předpokládá, že taková krystalinita nebude větší než stupeň krystalinity vyžadovaný v produktu nízko krystalinického fosforečnanu vápenatého v hydroxyapatitu.

Termín "reaktivní", který se zde užívá, se vztahuje k reaktivitě amorfniho fosforečnanu vápenatého podle předkládaného vynálezu s ostatními fosforečnany vápenatými. Reaktivita je charakterisována schopností amorfniho fosforečnanu vápenatého tvrdnout při 37 C za méně než pět hodin a podstatně ztvrdnout ve zhruba jedné až pěti hodinách v přítomnosti fosforečnanu vápenatého nebo v přítomnosti promotoru krystalizace. Úplnost reakce, rychlost reakce, homogenita vzniklého produktu a schopnost reagovat s jinak inertními sloučeninami jsou charakteristické pro reaktivní ACP podle vynálezu.

V jiném provedení je předmětem vynálezu materiál z reaktivniho a amorfniho fosforečnanu vápenatého, který má nejméně z 90 % amorfni charakter a je charakterisován tím, že je-li připraven jako 1:1 směs s dikalcium difosfátem ve vodě při 37 C, dochází k tuhnutí směsi během zhruba 10 až zhruba 60 minut. Vynález také zahrnuje reaktivní a amorfni fosforečnan vápenatý získaný odstraněním karbonátových prekursorů amorfniho fosforečnanu vápenatého termickým rozkladem prekursoru na plynné nebo těkavé vedlejší produkty. Vynález ještě dále zahrnuje reaktivní a amorfni fosforečnan vápenatý získaný odstraněním labilní složky amorfniho fosforečnanu vápenatého termickým rozkladem složky na plynné nebo těkavé vedlejší produkty. Vynález ještě dále nicméně

zahrnuje reaktivní a amorfni fosforečnan vápenatý, který má nejméně z 90 % amorfni charakter a je charakterisován tím, že je-li připraven ve vodě při 37 C jako 1:1 směs s dikalcium difosfátem, proběhne ve směsi v podstatě úplná reakce během 75 minut, přednostně pak během 40 minut.

V dalším provedení je předmětem vynálezu způsob přípravy hydroxyapatitu s nízkou krystalinitou, při němž se reaktivní a amorfni fosforečnan vápenatý podle vynálezu podrobí reakci s druhým fosforečnanem vápenatým. Druhý fosforečnan vápenatý a reaktivní a amorfni fosforečnan vápenatý se mísí v takovém poměru, aby vznikl fosforečnan vápenatý jako je v hydroxyapatitu.

V jiném provedení je předmětem vynálezu způsob přípravy hydroxyapatitu s nízkou krystalinitou, při se němž reaktivní a amorfni fosforečnan vápenatý podle vynálezu podrobí reakci s promotorem. Promotor se volí tak, aby reaktivní a amorfni fosforečnan vápenatý konvertoval na fosforečnan vápenatý jako je v hydroxyapatitu.

Dalším předmětem vynálezu je resorbovatelný materiál pro náhradu kosti, zahrnující hydroxyapatit s nízkou krystalinitou, který má rentgenový difraktogram v podstatě jako na obr. 7d. Vynález také zahrnuje resorbovatelný materiál pro náhradu kosti, který zahrnuje hydroxyapatit s nízkou krystalinitou, jehož rentgenový difraktogram je tvořen širokými píky při 2θ hodnotách 26 , 28,5 , 32 a 33 . Dále zahrnuje vynález resorbovatelný materiál pro náhradu kosti, zahrnující hydroxyapatit s nízkou krystalinitou, s tou charakteristikou, že po umístění intramuskulárně do krys, nejméně 100 mg a výhodně pak 300 mg materiálu pro náhradu kosti je kompletně resorbováno během jednoho měsíce.

Resorbovatelný materiál pro náhradu kosti je dále charakterisován tím, že při jeho přípravě reakcí amorfniho

fosforečnanu vápenatého a druhého fosforečnanu v kapalném prostředí, reakční směs tvrdne kolem 22 C po době delší než 60 minut a při 37 C tvrdne reakční směs mezi asi 10 až 60 minutami. Při preferovaných provedeních je při 22 C směs injektovatelná po dobu delší než kolem 60 minut. Při jiných preferovaných provedeních je směs tvarovatelná kolem 22 C po dobu delší než asi 60 minut.

V dalším provedení je předmětem vynálezu formovatelná pasta, která se hodí jako resorbovatelný materiál pro náhradu kostí. Pasta zahrnuje směs reaktivního a amorfního fosforečnanu vápenatého podle vynálezu spolu s práškem druhého fosforečnanu vápenatého a kapalinou v množství dostačujícím pro dosažení žádané konsistence, přičemž řečená směs je schopná tvrdnout kolem 22 C.

Pasta podle vynálezu může také obsahovat reaktivní a amorfni fosforečnan vápenatý podle vynálezu a promotor zvolený tak, aby konvertoval reaktivní a amorfni fosforečnan vápenatý na fosforečnan vápenatý jako je v hydroxyapatitu a dále kapalinu v množství dostatečném pro dosažení žádané konsistence, přičemž řečená směs je schopná tvrdnout kolem 22 C. Při preferovaných provedeních tvrdne směs kolem 22 C po době delší než 60 minut, zatímco kolem 37 C tvrdne směs zhruba od 10 do 60 minut.

Přehled obrázků na výkresech

Popis vynálezu se odkazuje na následující obrázky:

Obrázek 1 je mikrosnímek elektronové transmise vysokého rozlišení pro reaktivní a amorfni fosforečnan vápenatý ukazující zrna nanometrového rozměru ve shlucích s relativně nejasným ohraničením a částečně vsazená do beztvaré formy (šípky).

Obrázek 2 je infračervené spektrum reaktivního a

amorfního fosforečnanu vápenatého podle předkládaného vynálezu (a) před a (b) po zahřívání. Pozoruhodné je vymizení absorpčního maxima skupiny H-O-H ($\approx 3.550 \text{ cm}^{-1}$ a 1.640 cm^{-1}) a skupiny CO_3^{2-} ($1420 - 1450 \text{ cm}^{-1}$) po tepelném zpracování.

Obrázek 3 je rentgenový difraktogram reaktivního a amorfního fosforečnanu vápenatého podle předkládaného vynálezu (a) před a (b) po zahřátí ve vakuu. Materiál vykazuje zachování amorfního stavu po tepelném zpracování ve vakuu. Je charakterisován absencí ostrých píků a širokých maxim mezi difrakčními úhly 20° a 35° . Amorfni stav pevné látky zůstával během celého postupu podle předkládaného vynálezu.

Obrázek 4 je spektrum disperse energie získané elektronovou mikrosondou u reaktivního a amorfního fosforečnanu vápenatého podle předkládaného vynálezu po tepelném zpracování, jehož výsledkem byl poměr Ca/P 1,58.

Obrázek 5 je rozpouštěcí křivka produktu hydroxyapatitu s nízkou krystalinitou, získaného z amorfního fosforečnanu vápenatého podle tohoto vynálezu ve srovnání s krystalickým hydroxyapatitem. Pozoruhodná je relativně vyšší rozpustnost materiálu podle tohoto vynálezu proti více krystalinické formě hydroxyapatitu, jak bylo změřeno množstvím vápenatých iontů uvolněných do roztoku při 37°C .

Obrázek 6 jsou rentgenové difraktogramy (a) reaktivního a amorfního fosforečnanu vápenatého, (b) dikalcium difosfátu užitého v reakci přípravy materiálu pro náhradu kosti podle vynálezu.

Obrázky 7a-d jsou rentgenové difraktogramy zaznamenávající průběh reakce směsi reaktivního a amorfního fosforečnanu vápenatého a dikalcium difosfátu za vzniku materiálu pro náhradu kosti podle předkládaného vynálezu.

Obrázek 8 jsou infračervená spektra (a) dihydrátu dikalcium fosfátu, (b) aktivovaného ACP podle vynálezu a (c)

HA s nízkou krystalinitou podle předkládaného vynálezu.

Obrázek 9 je rentgenový difraktogram přirozeně se vyskytující kosti.

Předkládaný vynález poskytuje zcela resorbovatelný a reosifikovatelný a nízko krystalinický hydroxyapatit (HA), který je použitelný jako materiál pro náhradu kosti (BSM) pro ošetření kostních poruch a poranění i pro další biologické aplikace, které potřebují resorbovatelný fosforečnan vápenatý. HA s nízkou krystalinitou podle vynálezu je charakterisován svojí biologickou resorbovatelností a minimální krystalinitou. Může být vysoce póresní a rychle resorbovatelný anebo se sníženou porositou a pomalu resorbovatelný. Jeho krystalický charakter je v podstatě stejný jako u přirozené kosti, bez vyššího stupně krystalinity, kterou je možno vidět u materiálů pro náhradu kosti podle dosavadních poznatků. Vynalezený málo krystalinický HA je také biokompatibilní a neškodný pro hostitele.

Významným aspektem vynálezu je podstatné zlepšení snadnosti aplikace HA s nízkou krystalinitou při chirurgických zákrocích ve srovnání s ostatními, v oboru známými materiály pro náhradu kosti. Je typické, že se reakce iniciuje mimo tělo a při teplotě místnosti probíhá pomalu, takže se minimalisuje jakákoliv možnost, že se materiál vytvrdí před aplikací na chirurgicky ošetřované místo a stane se nepoužitelným. Reakce je výrazně urychlována tělesnou teplotou a materiál se vytvrzuje na určeném místě. Dále pak lze konsistenci a formovatelnost HA s nízkou krystalinitou, právě tak jako reakční rychlost pozměňovat podle terapeutické potřeby modifikováním nemnoha jednoduchých parametrů.

Resorbovatelnost materiálu pro náhradu kosti podle

stávajícího vynálezu lze přičítat kombinaci jeho porosity a jeho výrazně amorfního charakteru. Materiál pro náhradu kosti podle vynálezu obsahuje fosforečnan vápenatý jako v apatitu, o nízké krystalinitě a podstatně podobný tomu, který se nalézá v přirozené kosti. Chybění krystalinity u apatitů je spojeno s poněkud zvýšenou rozpustností ve vodných prostředích ve srovnání s ostatními s jinými species s vyšší krystalinitou, takže se má za to, že nízká krystalinita a/nebo přítomnost stabilních amorfních apatitových domén podporuje resorbovatelnost v biologických systémech. Porosita usnadňuje jak penetraci buněk a buněčných pochodů do matrice z materiálu pro náhradu kosti tak difusi látek dovnitř a zevnitř matrice. Proto tedy náhradní kostní materiály s nízkou porositou resorbují *in vivo* pomaleji než ty, které mají porositu vysokou.

Při preferovaných provedeních se reaktanty mísí mimo tělo a získává se tak zpracovatelný materiál pro náhradu kosti vhodný pro chirurgický zákrok. Po aplikaci na chirurgicky ošetřované místo je reakce obvykle dokončena. Materiály pro náhradu kosti podle vynálezu ztuhnou obvykle po méně než pěti hodinách a za fyziologických podmínek se podstatně vytvrdí za dobu kolem jedné až pěti hodin, nejlépe pak za zhruba 10 až 30 minut. V preferovaném provedení se reakce iniciuje přidáním destilované vody ke směsi dvou suchých komponent, přičemž vznikne hustá pasta, která ztuhne asi za půl hodiny. Místo destilované vody lze užívat jiná činidla ve vodném roztoku jako je serum nebo medium tkáňové kultury. Vzniklý resorbovatelný hydroxyapatit s nízkou krystalinitou bude nejčastěji chudý na vápník a ve srovnání s ideálně stechiometrickou hodnotou přibližně 1,67 pro hydroxyapatit, má poměr vápníku k fosforu nižší než 1,5.

Vynález také poskytuje test pro identifikaci vhodných reaktivních materiálů pro náhradu kosti a reaktivních

prekursorů. Test zahrnuje kombinaci složek pro vytvoření tvarovatelné substance a demonstraci její schopnosti vytvrzovat v přijatelném čase a kolem tělesné teploty. Komponenty, které takto vytvrzují, mohou být potom intramuskulárně umístěny do testovacího zvířete a zkoušeny na biologickou bioresorbovatelnost. 100 mg, zvláště pak 300 mg materiálu pro náhradu kosti podle tohoto vynálezu bude resorbovat v krysím svalu za dobu menší než 1 měsíc. Některé pomaleji resorbovatelné materiály pro náhradu kosti mohou u hlodavců ke kompletní resopci vyžadovat více než rok.

Při reakci na tvarovatelný materiál pro náhradu kosti se uplatňuje nejméně jeden prekursor amorfního fosforečnanu vápenatého (ACP), přednostně pak aktivovaný ACP. V některých případech může být při reakci použit jen jeden prekursor ACP, který se z části nebo úplně konvertuje kontrolovaným způsobem na HA (materiál pro náhradu kosti) s nízkou krystalinitou podle vynálezu. Alternativně může být při reakci použit jeden nebo více dalších prekursorů, především zdroj vápníku a/nebo fosforečnanu, které kombinací s ACP poskytují hydroxyapatit podle vynálezu s nízkou krystalinitou. V každém případě jsou silně preferovány reakce, které mohou být iniciovány mimo tělo, provedeny v pastovitém stavu, a které jsou výrazně urychlovány při 37 C, poskytující vytvrzený produkt fosforečnanu vápenatého.

Pouze ACP prekursorů: Jestliže je pro získání resorbovatelného materiálu pro náhradu kosti používán amorfní fosforečnan vápenatý, je důležité kontrolovat přirozenou tendenci ACP konvertovat na hydroxyapatit s vysokou krystalinitou. Na druhé straně musí být doba pro konversi dostatečně rychlá, aby byla užitečná pro chirurgický zákrok. Jeden z přístupů je kombinování prekursoru ACP obsahujícího inhibitor růstu krystalů (např. ACP v příkladu provedení 1) s ACP, který inhibitor růstu krystalů neobsahuje (např.

promotor). Reaktanty mohou být míseny v suchém stavu a s příslušnou velikostí částic s přebytkem inhibitoru obsahujícího ACP. Potom mohou být reaktanty vystaveny podmínkám, při kterých vznikají krystaly, jako je přidání vody následované zvýšením teploty tak, jak k tomu dochází po zavedení do těla, aby reaktanty konvertovaly na HA s nízkou krystalinitou podle vynálezu.

Prekursor ACP plus dodatečné zdroje fosforečnanu vápenatého: ACP může být zreagován s druhým zdrojem vápníku (včetně druhého ACP) pomocí jakékoliv techniky vyvolávající reakci. Reakce, která má být vyvolána, je konverse amorfního fosforečnanu vápenatého na nanokrystalinický nebo nízkokrystalinický hydroxyapatit. Tyto reakce zahrnují reakci acidobasickou, záměnu, substituci a hydrolýzu stejně jako čistě fyzikální a mechanické reakce (např. mletí, mísení). Při jakémkoliv reakčním postupu je důležité, aby během průběhu reakce ACP nezměnil svůj výrazně amorfní charakter. Zejména pak nesmí celková krystalinita výchozích produktů překračovat hodnotu požadovanou pro konečný produkt. Tak určité reakční postupy mohou vyžadovat stabilizaci amorfni povahy ACP během reakční doby. Příklady takových inhibitorů tvorby krystalů podle dosavadních poznatků představuje uhličitan, fluorid a hořčík.

Při mnoha způsobech podle předkládaného vynálezu musí být nejméně jeden z prekursorů aktivován tak, aby reagoval s ostatními komponentami za fyziologických podmínek. U některých preferovaných provedení je komponenta ACP aktivována zahřátím, aby se usnadnila reakce s druhým reaktantem obsahujícím vápník. Příklady takových vhodných druhých reaktantů představují DCPD, jiné krystalinické nebo nízko krystalinické fosforečnany vápenaté, zdroje vápníku nebo zdroje fosforečnanů, anebo druhý ACP. Jiné, podle dosavadních poznatků známé metody aktivace jako je katalýza

nebo použití iontových rozpouštědel, lze rovněž pro vyvolání reakce mezi komponentami použít. Fosforečnan vápenatý jako druhý reaktant může mít jakoukoliv krystalickou strukturu a je jej třeba volit tak, aby byl reaktivní vůči prvnímu ACP buď přímo nebo za pomoci reakci vyvolávajících vehikulů jako jsou iontová rozpouštědla. Vhodné reakční podmínky určuje rychlé vytvrzení při 37 °C, nastupující po smísení reaktantů a přidání vody.

Reakce přípravy materiálu pro náhradu kosti může být upravena tak, aby poskytla konečný produkt, který je poresní. Při jednom provedení vede k poresnímu materiálu pro náhradu kosti využití principů acido-basické chemie a suché směsi reaktantů s kontrolovanou velikostí částic. Lze použít i jiné způsoby vyvolání porosity jako je chemické nebo fyzikální leptání a loužení.

Předkládaný vynález poskytuje nový způsob konverse precipitátu standardního, inertního a amorfního fosforečnanu vápenatého na vysoce reaktivní amorfni pevnou látku. Amorfni pevná látka může být používána ve svrchu popsaných reakcích pro přípravu nízko- nebo nano-krystalinického hydroxyapatitu, který je nadán bioaktivitou, bioresorbovatelností a strukturní stálostí. Tento nový amorfni materiál může reagovat s ostatními fosforečnany vápenatými při nebo pod 37 °C za vzniku kosti podobného materiálu tvořeného hydroxyapatitem s nízkou krystalinitou.

Amorfni fosforečnan vápenatý podle předkládaného vynálezu je vysoce reaktivní vůči jiným kyselým nebo zásaditým fosforečnanům vápenatým. Amorfni fosforečnan vápenatý podle předkládaného vynálezu je třeba mít za reaktivní i v tom, že je schopen za teploty místnosti reagovat s rozličnými sloučeninami obsahujícími vápník nebo fosfor, které jsou zpravidla považovány za "inertní" vůči ACP; je to například CaO , CaCO_3 a octan vápenatý. Původní

acido-basické reakce konvenčního krystalického fosforečnanu vápenatého poskytují málo zreagované pevné látky, obsahující reakční produkt, který je příliš krystalický, než aby byl dostatečně rozpustný v živých tkáních. Dosud známé reakce jsou zpravidla nekompletní a produkty jsou nehomogenní. Na rozdíl od toho, amorfni fosforečnan vápenatý podle předkládaného vynálezu reaguje rychle a úplně na homogenní produkt s širokou škálou fosforečnanů vápenatých a dalších vápník nebo fosfor obsahujících materiálů.

Původ zvýšené reaktivity není úplně znám. Má se však za to, že souvisí s amorficitou (nedostatkem krystalinity) a v některých případech s vakantními místy v materiálu, jak se získávají postupem podle předkládaného vynálezu. Vakance mohou poskytovat reaktivní místa pro následující reakci. Tato pozorování budou diskutována podrobněji níže.

Způsob podle předkládaného vynálezu umožňuje počáteční vznik částic amorfniho fosforečnanu vápenatého o méně než 100 nm (1000), lépe 20 až 50 nm (200 až 500) a nejlépe pak 30 nm (300), jejichž další růst je omezován rychlou precipitací produktu z roztoku. Během reakce zdrojů vápenatých a fosforečnanových iontů za vzniku amorfniho fosforečnanu vápenatého se do roztoku zavede třetí ion, takže tyto ionty jsou inkorporovány do struktury amorfniho precipitátu místo trojmocných PO_4^{3-} skupin. Protože některé PO_4^{3-} ionty jsou nahrazeny třetím iontem, celkový obsah PO_4^{3-} klesá, zatímco poměr Ca/P v amorfním precipitátu vzrůstá (ve srovnání se standardním amorfním fosforečnanem vápenatým) a dochází k modifikaci mocenství či nábojů ve fosforečnanu vápenatém. Amorfni pevná látka může být potom sušena vymrazením, aby byly zachovány chemické a fyzikální vlastnosti materiálu. Amorfni pevná látka může být potom podrobena specifickým operacím vybraným pro odstranění alespoň části třetího iontu. V případě uhličitanu vedou ke

snížení celkového obsahu uhlíku pravděpodobně ve formě plynného oxidu uhličitého a kyslíku, specifické teplotní a tlakové podmínky, přičemž amorficita zůstává nedotčena.

Výsledný materiál je amorfni pevná látka s poměrem Ca/P vyšším než je obvykle v amorfniích fosforečnanech vápenatých, u nichž se zpravidla udává, že je kolem 1,50. Odstranění uhlíku z materiálu dále způsobuje vznik vakancí v intersticiální struktuře amorfni hmoty a činí ji tak vysoce reaktivní. Zdrojů vakancí může být několik. Materiál má porositu, která napomáhá reaktivitě různým způsobem, například tím, že se zvyšuje plocha povrchu. U materiálu může také po odstranění třetího iontu dojít ke změně stechiometrického poměru. Stechiometrická změna může vyvolat nábojovou nerovnováhu, která je příčinou zvýšené reaktivity amorfniho fosforečnanu vápenatého.

Je žádoucí, aby během celého procesu byla zachována amorfni vlastnost materiálu. Jestliže došlo během procesu nebo v konečném produktu ke vzniku úplné krystalinity (jednotlivé krystalinické oblasti), stejně jako místních domén (mikrokrystalinické oblasti), bylo zjištěno, že materiál ztrácí svoji reaktivitu. Vznikající vysoce reaktivní fosforečnan vápenatý je svojí povahou amorfni a má poměr vápníku k fosforu v rozmezí od 1,55 do 1,65. V preferovaném případě je u amorfniho fosforečnanu vápenatého poměr Ca/P kolem 1,58.

Amorfni stav se vytváří kontrolou rychlosti a doby trvání precipitačního procesu. Amorfni hydroxyapatit podle tohoto vynálezu je z roztoku srážen za podmínek, za kterých je počáteční precipitace rychlá. Výsledkem rychlé precipitace je vznik extrémně malých jader fosforečnanu vápenatého. K tomu dále, rychlý růst krystalů či zrněk vede ke vzniku většího množství defektů v každém zrnku, čímž se rovněž zvyšuje rozpustnost. Na samém konci procesu je růst krystalů

či zrněk tak rychlý a hustota defektů tak výrazná, že vznikne amorfní fosforečnan vápenatý. Amorfní fosforečnan vápenatý má gelovitý charakter a obsahuje tuhé roztoky o různém složení. Tyto gely nemají ohraničenou strukturu, ale jsou homogenní, měří-li se v stupnici angströmů. Tyto amorfní sloučeniny mají za fyziologických podmínek vysoké rozpustnosti, vysoké rychlosti vzniku a konverse na hydroxyapatit s nízkou krystalinitou.

Pevné hmoty amorfního fosforečnanu vápenatého připravené touto metodou podržují svoji amorfní povahu dostatečně dlouho, aby mohly být do finální reakce nasazeny jako výrazně amorfní pevné látky. Mohou být také míseny a reagovat s dalšími hmotami obsahující fosforečnany, aby se získaly hmoty, které mají homogenní distribuci krystalů v nanometrových velikostech. Protože amorfní fosforečnan vápenatý reaguje s ostatními hmotami zcela, v preferovaných provedeních poměr Ca/P výsledné pevné hmoty udává celkový obsah vápníku a fosforu z takové reakce, to jest reakce bude v podstatě úplná. Jestliže s novým materiálem amorfního fosforečnanu vápenatého reaguje vhodná molární koncentrace fosforečnanu v roztoku nebo pevné fázi, získá se materiál jako hydroxyapatit s nízkou krystalinitou (Ca/P 1,1 až 1,9). Předkládaný vynález tudíž dovoluje určovat a modifikovat chemické složení vznikajícího produktu a takto poskytuje další způsob kontroly bioaktivity finálního produktu užitého jako materiál pro kostní štěp.

V jednom provedení předkládaného vynálezu se připravuje roztok, který obsahuje ionty vápníku, ionty fosforečnanové a třetí ion v koncentraci, při pH a teplotě, která vyvolává rychlou nukleaci a srážení fosforečnanu vápenatého. Je-li srážení dostatečně rychlé, vzniká amorfní, gelovitý fosforečnan vápenatý. Protože thermodynamicky preferovaná krystalická forma hydroxyapatitu se zvyšuje při snižování

20.01.98

reakční rychlosti, je třeba při postupu použít určité stupně zvyšující reakční rychlost, které zaručují, že se získá amorfni sloučenina. Mezi jinými je třeba vzít v úvahu následující faktory, pokud se plánuje roztok pro rychlou precipitaci amorfniho fosforečnanu vápenatého podle předkládaného vynálezu.

Preferované podmínky: rychlé smísení zdroje vápníku a fosforečnanu pro zvýšení rychlosti reakce. Rychlost reakce se zvyšuje, aby byly jako produkt zvýhodněny nestabilní fáze. Poskytnutí větší reakční doby pro každý z iontů, aby mohly dobře mezi sebou zreagovat za vzniku pevné hmoty s thermodynamicky favorisovanou a stabilní krystalickou strukturou.

Preferované zdroje vápníku a fosforečnanů: použití vysoce koncentrovaných nebo skoro přesycených roztoků zajišťuje, že proběhne rychlejší reakce.

Preferovaná teplota: přestože může být reakce prováděna při teplotě místnosti, jsou možným prostředkem zvýšení reakční rychlosti teploty blízké bodu varu, které zvyšují koncentraci jedné ze složek.

Při jednom provedení se vodný roztok vápenatých iontů a iontů uhličitanových spolu rychle smísí, aby vznikla pevná hmota amorfniho fosforečnanu vápenatého obsahující uhličitan. Relativní koncentrace iontů se volí tak, aby vzniklý precipitát měl požadovaný Ca/P poměr. Karbonátový ion nahrazuje v amorfni fosforečnanu vápenatém ion fosfátový. Amorfni fosforečnan vápenatý obsahující uhličitan může být získán srážením z vodného roztoku karbonátu. Vhodné vodné roztoky karbonátu zahrnují jen jako příklady roztok hydrogenuhličitanu, roztok uhličitanu sodného, roztok uhličitanu draselného. Dále je třeba v rozsahu vynálezu uvažovat i použití nevodných roztoků.

Použití karbonátového materiálu je žádoucí, protože

dovoluje manipulaci s Ca/P poměrem záměnou PO_4^{3-} za CO_3^{2-} . Navíc je známo, že přítomnost CO_3^{2-} zpomaluje v amorfním fosforečnanu vápenatém vývin krystalinity. Bylo však zjištěno, že jiné ionty nebo směsi iontů mohou být vhodné namísto nebo spolu s karbonáty pro modifikaci poměru Ca/P a vytváření vakancí jako reaktivních míst v amorfním fosforečnanu vápenatém; jen jako příklady to jsou ionty dusičnanové, dusitanové, octanové, Mg^{2+} a $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$.

Precipitát amorfního fosforečnanu vápenatého může být před aktivací shromažďován a filtrován. Je výhodné provádět tento stupeň v chladné místnosti nebo pod teplotou okolní tak, aby byl zachován amorfní charakter shromažďovaného precipitátu. Obvykle se shromažďování provádí konvenčními způsoby, které zahrnují, ale nikterak se neomezují na prostou filtraci, vakuovou filtraci a centrifugaci. Shromážděný precipitát je želatinosní a promývá se destilovanou vodou více než jedenkrát.

Promytý precipitát se potom suší jakýmkoliv způsobem, který zachovává amorfní charakter materiálu. Lyofilisace je vhodnou, ne však jedinou technikou. Po zmrazení se precipitát zbavuje sušením největší části kapaliny, kterou v sobě má, přičemž se udržuje zmrzlý. Tento pochod může být proveden tak, že se zmrzlý precipitát umístí na danou dobu do vakuové komory. Sušení vymrazováním obvykle probíhá při teplotách kapalného dusíku po dobu v rozmezí 12 až 78 hodin, nejlépe kolem 24 hodin a ve vakuu v rozmezí 13,3 až 0,01 Pa (10^{-1} až 10^{-4} torr), nejlépe 1,3 Pa (10^{-2} torr). S výhodou používaný způsob představuje lyofilisace, protože běžně užívané kryogenní teploty při lyofilisaci inhibují další krystalisaci materiálu. Výsledkem je, že takto získaný amorfní fosforečnan vápenatý je extrémně jemný, lehce poléťavý prášek.

Vysušený ACP může být potom aktivován. Při preferovaném provedení, když je v ACP přítomen karbonát, se práškovitý ACP

20.01.98

zahřívá, aby se odehnala zbylá volná voda, voda hydrátů a odstranil uhlík převážně rozkladem CO_3^{2-} na CO_2 a kyslík. Zahřátí se provádí při teplotě nižší než 500 °C, avšak vyšší než 425 °C, aby se zamezila konverse amorfního fosforečnanu vápenatého na krystalinický hydroxyapatit. S výhodou se zahřívání provádí při teplotě v rozmezí 450 až 460 °C. V preferovaném případě se prášek vymrazeného amorfního fosforečnanu vápenatého zahřívá ve vakuu. Ve vakuovém prostředí může být pro dosažení stejného výsledku teplota podstatně nižší, to jest v rozmezí kolem 175 až 225 °C. Nižší teploty mohou být žádoucí, protože snižují risiko, že amorfní prášek zkrystalisuje.

Nízká krystalinita a místní vakance (porosita a/nebo změny stechiometrie) mohou vysvětlovat pozorovanou vyšší reaktivitu amorfního fosforečnanu vápenatého podle tohoto vynálezu. Dokládají to následující pozorování. Bylo zjištěno, že se u amorfního fosforečnanu vápenatého obsahujícího uhličitan po zahřívání na 525 °C zvyšuje tvorba krystalického hydroxyapatitu a odpovídajícím způsobem snižuje reaktivita. Amorfní fosforečnan vápenatý, který byl zahřát jen na 400 °C, si svoji amorfní charakteristiku zachovává, avšak vykazuje sníženou reaktivitu. Pravděpodobně toto snížení reaktivity souvisí s vyššími obsahy uhličitanu (a menším množstvím místních vakancí), které byly zaznamenány v IČ spektrech u vzorků podrobených těmto nižším teplotám. To naznačuje, že faktorem v reaktivitě je jak amorficita, tak i snížený obsah uhlíku (vakantní reaktivní místa). Toto není považováno v žádném případě za jediný základ pro reaktivitu. Do rozsahu vynálezu jsou uvažovány i další příčiny pozorované reaktivity. Vznikající práškovitý amorfní fosforečnan vápenatý je vysoce reaktivní materiál amorfního fosforečnanu vápenatého s poměrem Ca/P mezi 1,1 až 1,9, výhodně zhruba od 1,55 do 1,65, nejlépe pak kolem 1,58. Práškovitý materiál byl

charakterisován různými analytickými technikami.

Na obrázku 1 je uveden mikrosnímek elektronové transmise vysokého rozlišení pro ilustraci morfologických charakteristik a angströmových rozměrů částic preferovaného reaktivního amorfního fosforečnanu vápenatého podle tohoto vynálezu. Preferovaná velikost částic je méně než 100 nm (1000 Å), nejvýhodněji v rozmezí 30 až 40 nm (300 až 400 Å). Pozoruhodné je, na rozdíl od krystalických materiálů, nejasné ohraničení oddělující shluky podobné globulím, s chybějícími hranami a povrchy. Obrázek 2a a 2b ukazují infračervená spektra amorfního fosforečnanu vápenatého po lyofilisaci (a) a po následujícím tepelném zpracování při 450 °C po dobu 1 hodiny (b). Infračervená maxima udávající přítomnost chemických skupin v materiálu ukazují, že se přítomnost skupin H-O-H (přibližně při 3400 cm⁻¹ a 1640 cm⁻¹) a CO₂²⁻ (při 1420 až 1450 cm⁻¹) po tepelném zpracování výrazně snížila. Avšak rentgenové difraktogramy podobných materiálů, které jsou na obrázku 3, ukazují, že se amorfní stav po lyofilisaci (a), po tepelném zpracování podstatně nemění (b). Amorfní stav materiálu podle předkládaného vynálezu charakterisují široké píky a nedefinované pozadí bez ostrých píků u každé pozice difrakčních úhlů, které odpovídají známým krystalickým fosforečnanům vápenatým. Výsledkem měření Ca/P, provedeného pomocí rentgenové analýzy s dispersivní vlnovou délkou elektronovou mikrosondou, bylo u téhož materiálu po tepelném zpracování Ca/P 1,58 (obrázek 4).

Tyto údaje ukazují, že i když místně dochází k částečným změnám určitých skupin v pevném amorfním fosforečnanu vápenatém, zůstává během procesu celková amorficita zachována. Tak lze vykládat, že materiál obsahuje v amorfní struktuře místní vakance nebo "díry", které mohou ACP aktivovat.

Při jiném výhodném provedení se vysoce reaktivní

20.01.98

fosforečnan vápenatý podrobí reakci s kyselým nebo zásaditým fosforečnanem vápenatým, aby se získal málo krystalinický hydroxyapatit. Jak bylo shora diskutováno, je hydroxyapatit termodynamicky preferovaný reakční produkt, který snadno krystaluje za vzniku produktu, který není biokompatibilní díky své nerozpustnosti za fyziologických podmínek. Použití amorfního fosforečnanu vápenatého, který může rychle a úplně, bez podstatné krystalisace, reagovat na hydroxyapatit, poskytuje novou cestu pro získání hydroxyapatitu s nízkou krystalinitou, který je za fyziologických podmínek resorbovatelný.

Práškovitý amorfní fosforečnan vápenatý podle předkládaného vynálezu je možné mísit s různými dalšími komponentami, aby tak došlo k reakci za vzniku hydroxyapatitu s nízkou krystalinitou. K této reakci dochází při teplotě místnosti po smísení prášku s různými, jak kyselými tak zásaditými, fosforečnany vápenatými za přítomnosti kapaliny, jako je, avšak neomezuje se jen na vodu, solný roztok, pufr, serum nebo medium pro tkáňovou kulturu. V závislosti na množství kapaliny přidané ke směsi amorfního fosforečnanu vápenatého podle předkládaného vynálezu a kyselého fosforečnanu vápenatého, vzniká velmi snadno tvarovatelná a/nebo velmi snadno injektovatelná pasta s různým stupněm pastovité konsistence.

Vhodné jsou jak kyselé tak zásadité fosforečnany vápenaté, které poskytnou potřebnou stechiometrii pro reakci poskytující fosforečnan vápenatý charakteru hydroxyapatitu. V jednom výhodném případě se použil kyselý fosforečnan vápenatý (pH 5 až 7). Vhodné kyselé fosforečnany vápenaté představují, ale v žádném případě se neomezují jen na, metafosforečnan vápenatý, dihydrát dikalcium fosfátu, heptakalcium fosfát, trikalcium fosfáty, dihydrát pyrofosforečnanu vápenatého, málo krystalinický HA,

20.01.98

pyrofosforečnan vápenatý a oktakalcium fosfát. Vhodné zásadité fosforečnany vápenaté představují další přidávaná množství ACP. Jiné pevné látky, které by mohly poskytovat zdroj fosforečnanu nebo vápníku, jen mimochodem jako příklad to jsou, CaO , CaCO_3 , octan vápenatý a H_3PO_4 , je možné rovněž použít k mísení tak, aby resultoval konečný produkt s požadovaným Ca/P poměrem blízký přírodní kosti. Je také žádoucí, aby i druhá komponenta byla v amorfním nebo málo krystalinickém stavu.

Hydroxyapatit je ternodynamicky preferovanou formou fosforečnanu vápenatého. Cílem vynálezu je tedy pouze podpořit konversi reaktivního ACP na málo krystalinický HA přidáním komponent, které umožňují konversi ACP na HA bez chemické reakce. Vhodné promotory jsou voda a teplo, avšak nejsou omezeny se jen na ně.

Druhý fosforečnan vápenatý je často krystalický, jak dokazují ostré difrakční píky v rentgenovém difraktogramu (obr. 6a), typické pro vybraný fosforečnan vápenatý. Na rozdíl od toho reaktivní ACP je amorfní a nevykazuje identifikovatelné píky v rentgenovém difraktogramu (obr. 6b). Avšak dikalcium difosfát, navzdory své vyšší krystalinitě, dává reakci s reaktivním ACP a produktem je HA s velice sníženou krystalinitou.

Protože nejméně jeden z reaktantů je amorfní a vysoce reaktivní, probíhá reakce při pokojové teplotě a poskytuje apatitový produkt, který má málo krystalinickou nebo mikrokrytalinickou mikrostrukturu. Reakce také proběhne v podstatě zúplna, takže je zajištěno, že všechen vápník a fosforečnan se spotřebuje na výsledný hydroxyapatitový produkt. To dovoluje spolehlivou přípravu hydroxyapatitového produktu jednoduše volbou poměrných proporcí výchozího amorfního a druhého fosforečnanu vápenatého. Je žádoucí udržovat poměr vápníku k fosfátu kolem 1,2 až 1,68, lépe méně

než 1,5 a nejlépe kolem 1,38.

Výsledný hydroxyapatitový materiál má labilní charakteristiku prostředí přirozeně se vyskytující kosti. V přirozeně se vyskytující kosti jsou minerály charakterisovány strukturou o nanometrových rozměrech, která poskytuje velké povrchové oblasti pro interakci s obklopujícím tkáňovým okolím, čehož výsledkem je resorpce a remodelace tkání. Předložený vynález, se svým produktem, majícím krystaly v nanometrových velikostech, věrně napodobuje přirozeně se vyskytující minerály kosti. Dále pak vlastnosti jako krystalinita a poměry Ca/P jsou v předkládaném vynálezu určeny tak věrně, že simulují vlastnosti minerálů nalezených v živých tkáních kostí.

Podle jiného preferovaného provedení může být připravena injektovatelná pasta, která může být zavedena na místo pro opravu kosti. Pasta se obvykle připravuje smísením amorfního fosforečnanu vápenatého podle předkládaného vynálezu s druhou složkou v takovém množství vody nebo pufru, které stačí, aby se získala pro injekci požadovaná konsistence. Nejčastěji bude natolik hustá, aby mohla projít stříkačkou velikosti 16 až 18. Vzhledem k amorfní povaze pevných látek v pastě má materiál zřetelně lepší charakteristiky toku než kompozice dřívější. Tokové charakteristiky výsledné pasty jsou podobné zubní pastě, zatímco dříve známým materiálům je vlastní konsistence granulární nebo ovesné kaši podobná. Pasta může být připravena až několik hodin před použitím, pokud je držena při teplotě místnosti a je minimalisováno odpařování. Skladovací dobu je možné prodloužit pokud je pasta udržována při snížených teplotách v rozmezí 1 až 10 °C v ledničce a zajištěny podmínky pro minimalisaci odpařování.

Viskozitu pasty materiálu pro náhradu kosti lze podle potřeby přizpůsobit volbou odpovídajícího množství kapaliny přidávané k reaktantům. Pasta může být připravena buď

v konsistenci pro injekci nebo pro tvarování. Pod konsistencí pro injekci se rozumí taková hustota, která je ještě schopná procházet jehlou stříkačky velikosti od 16 do 18. Nejčastěji to bývá konsistence jako má zubní pasta. Tvarovatelnost se vztahuje na konsistenci, která dovoluje, aby materiál podržel svůj tvar. V extrémním případě bude mít konsistence pro tvarování konsistenci sklenářského kytu nebo tmelících látek. Pasta může být také připravena právě s takovým množstvím kapaliny, aby byla jak injektovatelná tak tvarovatelná.

V některých preferovaných případech (např. viz níže příklady 9 až 14) probíhá při pokojové teplotě reakce pomalu, ale při tělesné teplotě je výrazně urychlována. Toto je zejména užitečné při chirurgických situacích, poněvadž pasta připravená smísením reaktantů s vodou zůstává injektovatelná po značně dlouhou dobu (až několik hodin), když je uchovávána při teplotě místnosti. Při teplotě místnosti (cca 22 C) tedy tvrdne pasta po době delší než jedna hodina a zůstává tvarovatelná a/nebo injektovatelná déle než 10 minut, v lepším případě déle než jednu hodinu a nejlépe pak déle než tři hodiny. Následně po injektáži na místo pro implantát (cca 37 C) tvrdne pasta za méně než kolem jedné hodiny, s výhodou kolem 10 až 30 minut.

Při jiném provedení vynálezu se do směsi amorfního fosforečnanu vápenatého a kyselého fosforečnanu vápenatého uvažuje zavádění proteinů pro regeneraci kosti (BRP). Bylo dokázáno, že BRP urychlují růst kosti a zkracují hojení kosti. Lze očekávat, že kostní štěp obsahující nanokrystalinický nebo málo krystalinický hydroxyapatit a BRP, napomůže právě rychlejšímu hojení kosti spíše než kostní štěp používající jen samotný hydroxyapatit podle tohoto vynálezu. Účinnost BRP se dále zvyšuje kontrolováním rozpustnosti nanokrystalinického či málo krystalinického hydroxyapatitu tak, že se rozpouští rychlostí, která dodává

20.01.98

BRP, vápník a fosfor v dávce optimální pro růst kosti. Takový způsob inkorporace BRP představuje, ale neomezuje se na to, že se místo s vodou, smísí s roztokem pufru obsahujícím BRP při optimálním pH zachovávajícím aktivitu proteinu. Příkladné BRP zahrnují, avšak v žádném případě se neomezují na transformační růstový faktor beta, faktory připojování buněk, endotheliální růstové faktory a kostní morfogenetické proteiny. Takové BRP jsou běžně vyvíjeny na Genetics Institute Cambridge, MA; Genentech, Palo Alto, CA a Creative Biomolecules, Hopkinton, MA.

Při jiném provedení vynálezu se zahrnuje přidávání antibiotik do amorfního fosforečnanu vápenatého a jeho směsí. Z klinického hlediska je hlavním požadavkem potřeba zvládnout pooperační zánět nebo infekci vznikající při chirurgii kostního štěpu. U kostního štěpu tvořeného málo krystalinickým hydroxyapatitem a antibiotikem/y se očekává, že sníží možnosti místní infekce v operovaném místě a přispěje k bezinfekčnímu a tedy rychlejšímu hojení kosti. Účinnost antibiotik se dále zvyšuje kontrolou uvolňování hydroxyapatitu s nízkou krystalinitou tak, že se rozpouští rychlostí, která dodává antibiotické peptidy nebo jejich aktivní složky v nejefektivnější dávce do oblasti nahrazované tkáně. Příklady antibiotik zahrnují, ale v žádném případě nejsou omezeny jen na penicilin, hydrochlorid chlortetracyklinu (aureomycin), chloramfenikol a oxytetracyklin (terramycin). S hydroxyapatitem s nízkou krystalinitou podle předkládaného vynálezu mohou být míseny antibiotika, nejčastěji polypeptidy, i kostní regenerační proteiny, aby místně dodaly všechny nebo většinu komponent potřebných pro usnadnění optimálního stavu pro obnovu kostní tkáně.

Příklady provedení vynálezu

Vynález je dále znázorněn odkazy na následující příklady, které jsou však presentovány s účelem pouze ilustrovat a nelze je považovat za vynález omezující.

Příklad 1

Tento příklad popisuje krok za krokem přípravu a metody jak učinit relativně inertní, tuhý materiál amorfního fosforečnanu vápenatého vysoce reaktivním amorfním fosforečnanem vápenatým podle předkládaného vynálezu.

Roztok A byl připraven rychlým rozpuštěním 55 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (fosforečnanu sodného), 50 g NaOH (hydroxidu sodného) a 30 g NaHCO_3 (hydrogenuhličitanu sodného) v 1,3 l destilované vody při teplotě místnosti. Byla použita i množství vody v rozmezí od 0,7 l do 1,3 l. Roztok B byl připraven rychlým rozpuštěním 43 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (dusičnanu vápenatého) v 0,5 l destilované vody při teplotě místnosti.

Inertní karbonisovaný amorfni fosforečnan vápenatý byl pak při teplotě místnosti připraven rychlým přidáním roztoku B k intensivně míchanému roztoku A. Takto se vytvořivší precipitát gelovitého amorfního fosforečnanu vápenatého byl bezprostředně filtrován ve vakuu asi 1,3 Pa (10^{-2} torr) za použití filtračního papíru ($0,05 \text{ m}^2$) se střední filtrační rychlostí. Materiál vytvořil tenký koláč a byl promyt přibližně 4 litry destilované vody tak, že voda byla přidána do filtrační nálevky. Promytý materiál byl pak pomocí špachtle sebrán a vložen do kapalného dusíku v 2,5 l kontejneru. Po vytvoření tvrdých zmrzlých kousků byl kontejner přemístěn na 24 hodin do vakuové komory 13 až 1,3 Pa (10^{-1} až 10^{-2} torr), dokud nebyl získán jemný a suchý prášek.

Třebaže shora popsaná procedura může být prováděna při teplotě místnosti, je dáána přednost tomu, aby celý proces probíhal pod okolní teplotou (4 až 5 C), čímž se dále zabraňuje konverzi amorfního stavu na stabilnější krystalickou formu. Dále mohou být ve stopových množstvích přidávány ty prvky nebo ionty, o nichž je známo, že působí jako inhibitory tvorby krystalického hydroxyapatitu. Mohou to být například Mg ionty v množství méně než 1,0 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (chlorid hořečnatý), nebo pyrofosforečnanové ionty v množství méně než 2 g $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (pyrofosforečnan sodný).

Infračervené spektrum inertního amorfního materiálu v tomto stadiu procesu je uvedeno na obrázku 2a. Toto spektrum má maxima charakteristická pro P-O skupiny (600 a 1000 cm^{-1}), CO_3^{2-} skupinu (1420 až 1450 cm^{-1}) a má relativně široké maximum O-H skupiny ($\approx 3550 \text{ cm}^{-1}$). Rentgenový difraktogram téhož materiálu (obrázek 3a) vykazuje amorfni charakter materiálu, jak to demonstruje nepřítomnost jakýchkoliv ostrých píků, když bylo měření krystalinity určeno pomocí poměru koherentních píků vzhledem k pozadí.

Nahoře popsaný inertní amorfni materiál byl potom převeden na reaktivní formu zahřátím na 450 C ($\pm 3 \text{ C}$) po dobu 60 minut. IČ spektrum materiálu po zahřátí je na obrázku 2b. Toto spektrum vykazuje snížení jednotlivých O-H a CO_3^{2-} skupin, indikujících výraznou redukci H_2O a CO_3^{2-} ve formě CO_2 a O_2 . Bylo zjištěno, že u podobně připravených vzorků obsah uhlíku klesá o přibližně 60 % a celkový obsah uhlíku se snižuje z 1,56 % na 0,5 %. Zaznamenejme však, že se během tohoto procesu neztrácí amorfni povaha materiálu, jak to dokazuje rentgenový difraktogram uvedený na obrázku 3b. Měření poměru Ca/P metodou kvantitativní analýzy elektronovou mikrosondou (obrázek 4) u tohoto materiálu po tepelném ošetření, ukázalo 1,575. Obrázek 1 ukazuje celkové morfologické a ultrastrukturální vlastnosti amorfního

materiálu jak jsou zobrazeny elektronovým mikroskopem. Zaznamenejme "amorfní" vzhled materiálu s nepřítomností ostrých hran oddělujících každou granuli s určitou částí materiálu vykazující beztvárovou formu (šipky). V tomto materiálu byla zjištěna extrémně vysoce specifická povrchová oblast $120 \text{ m}^2/\text{g}$ s průměrnou velikostí porů přibližně 13 nm (130).

Příklad 2

Příprava byla prováděna jako je popsáno shora v příkladu 1 s tou výjimkou, že příprava roztoků A a B byla nahrazena následujícími reakcemi. Roztok A byl připraven při teplotě místnosti rychlým rozpuštěním 90,68 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ v 1,2 l karbonisované, destilované vody. Roztok B byl připraven rozpuštěním 40,57 g K_2HPO_4 v 1,53 l destilované vody obsahující 24 ml 45% (obj.) roztoku KOH. Chemické a fyzikální vlastnosti amorfního fosforečnanu vápenatého resultujícího jako produkt při tomto procesu byly podobné vlastnostem materiálu připraveného podle příkladu 1.

Příklad 3

Příprava byla prováděna jako je popsáno shora v příkladu 1 s tou výjimkou, že příprava roztoků A a B byla nahrazena následujícími reakcemi. Roztok A byl připraven při teplotě místnosti rychlým rozpuštěním 10,58 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ v 0,15 l karbonisované, destilované vody při pH vyšším než 9,0, jak bylo upraveno pomocí NaOH. Roztok B byl připraven rozpuštěním 7,8 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ v 0,35 l destilované vody. Chemické a fyzikální vlastnosti amorfního fosforečnanu vápenatého resultujícího jako produkt při tomto procesu byly podobné vlastnostem materiálu připraveného podle příkladu 1 a 2.

Příklad 4

Tento příklad popisuje přípravu materiálu pro náhradu kosti podle předkládaného vynálezu.

Dihydrát dikalcium fosfátu (DCPD) použitého v tomto příkladu byl připraven následujícím způsobem. Roztok A byl při teplotě místnosti připraven rychlým rozpuštěním 10 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (diamonium hydrogenfosfátu) v 500 ml destilované vody při pH 4,6 až 4,8. Roztok B byl při teplotě místnosti připraven rychlým rozpuštěním 17,1 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (tetrahydrát dusičnanu vápenatého) ve 250 ml destilované vody. Dihydrát dikalcium fosfátu byl připraven rychlým přidáváním roztoku B k míchanému roztoku A při teplotě místnosti. Bezprostředně poté byl vzorek filtrován filtračním papírem ($0,05 \text{ m}^2$) se střední rychlostí filtrace ve vakuu kolem 1,3 Pa (10^{-2} torr). Materiál vytvořil tenký koláč, který byl promyt zhruba 2 l destilované vody a potom 24 až 72 hodin sušen při teplotě místnosti.

Reaktivní materiál amorfního fosforečnanu vápenatého připravený v příkladech 1, 2 a 3 byl 3 až 5 minut za použití třecí misky a tloučku, mísen ručně a za sucha s dihydrátem dikalcium fosfátu ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) v poměru 50 % : 50 % hmotnostních. Potom se k práškovité směsi přidala voda (1 ml/g směsi) a vytvořila se pastovitá konsistence. Podle toho, zda se požaduje hustá nebo řídká pasta, mění se přidávané množství vody. Pastovitý materiál se potom umístí do vlhkého prostředí tkáně, kde po dosažení tělesné teploty (37 C) ztvdne bez exothermího projevu na pevnou masu. Vytvrzovací proces může být o několik hodin prodloužen umístěním pasty do chladničky při teplotě 4 C. Vytvrzený materiál byl složen z málo krystalinického hydroxyapatitu s nanometrovými rozměry částic, kterému je vlastní rozpustnost, překračující

rozpustnosti publikované pro materiály ze syntetických hydroxyapatitů. To je demostrováno na obrázku 5, kdy koncentrace vápenatých iontů, uvolňovaných po 24 hodin při 37 °C do měřeného pufovacího roztoku, byla výrazně vyšší pro materiál málo krystalinického HA podle předkládaného vynálezu (křivka 50), než pro materiál standardního hydroxyapatitu (křivka 52).

Příklad 5

Tento příklad představuje přípravu materiálu pro náhradu kosti za použití materiálů s vybranou velikostí částic.

Materiál reaktivního amorfního fosforečnanu vápenatého připravený podle příkladů 1, 2 nebo 3 byl za sucha, v poměru 50 % : 50 % hmotnostních, mísen s dihydrátem dikalcium fosfátu ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) o velikosti částic menší než 100 μm , za použití laboratorního mlýnku SPEX 8510 s keramickou mlecí komorou z aluminy 8505 po 2 minuty a následně byl prosát na velikost menší než 100 μm . Potom byla k práškovité směsi přidána voda (1 ml/g směsi) a vytvořila se pastovitá konsistence.

Příklad 6

Materiál reaktivního fosforečnanu vápenatého připravený podle příkladů 1, 2 nebo 3 byl za sucha mísen s jinými sloučeninami na bázi fosforečnanu vápenatého metodou, která je popsána v příkladě 4. Tyto sloučeniny představují, ale nejsou omezeny jen na: $\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$ (metafosforečnan vápenatý), $\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$ (pentafosforečnan vápenatý), $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (pyrofosforečnan vápenatý), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (trikalcium fosfát). Proporce suché směsi byly v závislosti na Ca/P poměru sloučenin mísených s reaktivním amorfním fosforečnanem

vápenatým náležitě vypočítány tak, aby Ca/P poměry ležely mezi 1,5 až 1,70. Vzniklý materiál byl tuhý hydroxyapatit s nízkou krystalinitou se stejnými vlastnostmi rozpustnosti jako je ukázáno na obrázku 5.

Příklad 7

Tento příklad popisuje přípravu injektovatelné pasty pro vytvoření tuhého hydroxyapatitu s nízkou krystalinitou.

Za sucha smísené materiály připravené podle příkladů 4 nebo 6 byly smíseny s destilovanou vodou (2,3 ml/g). Vytvořila se pasta, která může být snadno tvarována rukou, nebo injektována pomocí jehly, která má vnitřní průměr nejméně 0,5 mm. Tekutost pasty se zvýšila po 2 až 3 hodinovém chlazení při 4 C.

Materiál lze v pastovité formě bez ztvrdnutí uchovávat 12 hodin při 4 C ve vzduchotěsném kontejneru.

Příklad 8

Krystalické podíly produktu jako materiálu pro náhradu kosti byly monitorovány rentgenovou difrakcí a infračervenou spektrometrií.

Obrázek 7a-d představuje rentgenová difrakční spektra produktu reakce mezi DCPD a reaktivním amorfním fosforečnanem vápenatým, jak je popsáno v příkladu 4. Reakční směs byla umístěna do vlhkého prostředí při 37 C a v různém čase podrobena rentgenové difrakční spektrometrii. Snímací podmínky byly (a) měděná anoda, (b) $\lambda = 1,4540598$ a (c) rozsah skenování 20 až 35 po 0,02 a v intervalu 2 sekund. Obrázek 8 ukazuje infračervená spektra dihydrátu dikalcium fosfátu (a), aktivovaného ACP podle vynálezu (b) a málo krystalinického HA podle předkládaného vynálezu (c).

Vzorky na obrázcích 7a až 7d byly ponechány reagovat postupně 0 minut, 20 minut, 75 minut a 5 hodin. Po udaném čase byly vzorky sebrány a lyofilisovány, aby se zachovaly chemické charakteristiky. Obrázek 7a ze začátku reakce představuje kombinaci píků, které se dají přisoudit výchozímu ACP a dikalcium fosfátu (viz obr. 6, rentgenogramy výchozích složek). Pro krystalinický dikalcium fosfát lze snadno zaznamenat ostré píky přibližně při 20,25 , 23,5 , 29,5 , 30,75 a 34,2 . S postupem reakční doby ubývají ostré píky krystalinických oblastí a objevují se široké píky (pro amorfní oblasti) se středy při 26 , 28,5 , 32 a 33 . Je zajímavé poznamenat, že po 75 minutách nedochází ve spektru ke změně, což naznačuje, že reakce proběhla v podstatě úplně o něco málo více než za hodinu. Rentgenový difraktogram materiálu pro náhradu kosti podle předkládaného vynálezu (obr. 7d) může být srovnán s rentgenogramem přirozeně se vyskytující kosti, který je na obrázku 9. Tato dvě spektra jsou téměř identická a to ukazuje blízkou biopodobnost materiálu pro náhradu kosti podle vynálezu.

Příklady 9 až 14

Tyto příklady demonstrují účinek objemu kapaliny na konsistenci a reaktivitu injektovatelné pasty, která má být použita při tvorbě materiálu pro náhradu kosti. Každá z past byla připravena jak uvedeno shora v příkladu 7 a konsistence i rychlost reakce byly stanoveny při teplotě místnosti a při 37 C. Pozorování jsou uvedena v tabulce 2.

Tabulka 2

Tvarovatelnost, injektovatelnost a reaktivita jednoho gramu materiálu pro náhradu kosti připraveného s různým množstvím vody.

Příklad čís.	objem vody (ml)	tvarovatelnost	injektovatelnost	dobu tvrdnutí (min) (4 C/RT/37 C)
9	0,7	- drobky	-	-/-/-
10	0,8 ^a	+++ pasta lehce vznikající	+	>60/>60/30
11	0,9 ^a	++ jako zubní pasta	++	>60/>60/30
12	1,0	+ jako tekutá zubní pasta	+++	>60/>60/30

^aZa určitých okolností (např. odpařením) mohou tyto vzorky při teplotě místnosti vyschnout trochu dříve než během jedné hodiny. V takových případech lze pro obnovení původní konsistence přidat vodu.

Příklad 13

Účelem této studie bylo modelové hodnocení pomocí analýzy efektivity implantovaného hydroxyapatitu s nízkou krystalinitou, jako fosfátového keramického materiálu pro náhradu kosti podle vynálezu, když byl implantován do chirurgicky vyvolaných defektů holenní kosti novozélandských bílých králíků.

I. Test na zvířatech

Provedení testu: test byl proveden jako v příkladu 7 s tou výjimkou, že byl použit roztok pufru s optimálním

rozsahem pH (solný roztok) pro bioaktivitu proteinu nebo peptidu.

Zvířata: v této studii bylo použito 7 dospělých samců a samic novozélandských bílých králíků (2,5 až 3,0 kg). Zvířata byla získána z farmy Pine Acres Rabbitry. Před začátkem studie byla zvířata držena v karanténě a aklimatizována 10 dní. Před propuštěním z karantény byl jejich celkový stav zhodnocen veterinářem. Zvířata byla jednotlivě umístěna do zavěšených klecí z nerezavějící oceli. V odkapních tácech pod klecemi byly použity dřevěné hobliny. Zvířata byla označena číslovaným štítkem na uchu nebo tetováním a odpovídající kartou pro klec. Všechna zvířata byla ošetřena stejně - na holenní kosti byl proveden defekt. Hodnocení bylo uskutečňováno po časových úsecích 0, 2, 4 a 8 týdnů.

Chirurgická procedura: po nasazení příslušné anestezie byla za aseptických podmínek provedena incise blízko nad holenní kostí. Měkká tkáň byla odkloněna a kost byla odkryta. Pomocí 5 mm trepanační pilky nasazené na pomaloběžnou zubní vrtačku s potřebnou irrigací (0,9% fyziologický solný roztok), byl vyříznut z kosti disk a připraveno místo pro implantaci. Do defektu byla umístěna zformovaná pasta materiálu pro náhradu kosti smísená s α -BSM se solným roztokem. Tímto způsobem byl podáván jeden vzorek na zvíře. Měkká tkáň byla potom uzavřena ve vrstvách pomocí šicího materiálu 3-0. Zvířata byla monitorována a po procitnutí jim byl podán buprenorfin (0,02 až 0,05 mg/kg s.c.) a cefalothin (20 mg/kg s.c.). Analgetikum a antibiotikum se podávaly dvakrát za den po pět až sedm dnů po chirurgickém zákroku.

II. Experimentální poznatky

Klinická pozorování a radiografie: klinická pozorování celkového zdravotního stavu zvířat a pohody se zvláštním

20.01.98

zřetelem na pohyb, byla prováděna nejméně týdně. Radiogramy holenní kosti byly dělány v plánovaných intervalech, včetně doby po chirurgickém zákroku a při pitvě.

Zvířatům byly pro hojení poskytnuty stanovené časové periody. Pro tibiální radiogramy, které byly snímány každé dva týdny během studie, byla zvířata podrobena anestézi. Radiogramy sloužily pro určení délky studie. Přibližně každé dva týdny byla obětována dvě zvířata a testované části byly odebírány pro histologii. Zvířata byla denně monitorována, aby se zjistilo, zda došlo k nějakým změnám v dietě nebo v chování. Ke konci studie byla zvířata usmrcena předávkováním roztokem pro euthanasii (hydrochlorid ketaminu a xylazin doplněný nasyceným roztokem KCl).

Mikroskopická pathologie: implantovaná místa byla preparována jako nedekalcifikované a dekalifikované řezy. Dekalcifikované řezy byly připraveny jako basickým fuchsinem světle zeleně zbarvené destičky o 90 μm , vsazené do plastu; nedekalcifikované řezy byly zbarveny hematoxylinem a eosinem a Massonovým trichromem. Řezy byly mikroskopicky vyhodnoceny aprobovaným vetrinárním pathologem (ACVP) se zkušeností v pathologii laboratorních zvířat.

III. Výsledky

Klinická pozorování a radiografie: Radiogramy tibiálních defektů vykazovaly s postupem času vzhledem k radiaci rostoucí hustotu.

Pitevní pozorování: Oblasti tibiálního defektu vykazují s časem zmenšení. Nebyl v podstatě zaznamenán žádný přílišný zánět než takový, jaký se očekává při každém chirurgickém zákroku.

Mikroskopická pathologie: Po dvou týdnech byl fosforečnan vápenatý pro náhradu kosti stále nacházen v oblasti defektu jako krystaly jak v místě tak v lokálních

20.01.98

makrofázích. Drobné jehličky kosti vláknité struktury byly vidět na okrajích a uvnitř oblasti defektu. Ve čtyřech týdnech, pokud nějaké byly, bylo v náhradě viditelných málo krystalů a v místě zákroku byla vidět kost s hustší vláknitou strukturou. Vzorky v šestém a osmém týdnu nevykazovaly žádné stopy po zákroku a kost v místě defektu měla velice hustou až korovitou strukturu.

Příklad 16

Tento příklad porovnává infračervená spektra krystalických a amorfních prekursorů připravených podle příkladů s finálním málo krystalinickým HA, připraveným reakcí podobných prekursorů. Obrázek 8a uvádí IČ spektrum materiálu (DCPD) připraveného jak je popsáno v příkladu 4. Obrázek 8b představuje spektrum ACP, připraveného jak uvedeno v příkladu 1, po tepelném zpracování. Obrázek 8c je IČ spektrum HA s nízkou krystalinitou, připraveného jak je popsáno v příkladu 4.

Rozumí se, že svrchu vyložené skutečnosti, mezi těmi, které jsou zřejmé z předcházejícího popisu, jsou uvedeny důvodně, ježto však mohou být učiněny určité změny v provádění postupu a ve složení směsí, aniž by byl opuštěn duch a rozsah vynálezu, je třeba mít za to, že vše, co je obsaženo ve shora uvedených popisech a uvedeno na doprovodných výkresech, je třeba považovat za ilustrativní a nikoliv v omezujícím smyslu.

Rozumí se dále, že následující patentové nároky jsou určeny k pokrytí obecných i specifických rysů zde popisovaného vynálezu a všech údajů týkajících se rozsahu vynálezu, o kterých lze říci, že tam spadají.

PV 3626-97
20.01.98

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob přípravy reaktivního amorfního fosforečnanu vápenatého v y z n a č u j í c í s e t í m , že

se nechají reagovat vápenaté ionty, fosforečnanové ionty a třetí ion tak, aby byl získán amorfni fosforečnan vápenatý a

odstraní se nejméně část třetího iontu tak, aby byl získán reaktivní amorfni fosforečnan vápenatý.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že třetí ion zahrnuje iont uhličitánový.

3. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že stupeň reakce vápenatých iontů, fosforečnanových iontů a třetího iontu zahrnuje srážení amorfni fosforečnanu vápenatého z roztoku obsahujícího vápenaté a fosforečnanové ionty a třetí ion.

4. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že roztok je vodným roztokem a stupeň odstranění zahrnuje odstranění části zbytkové vody z amorfni fosforečnanu vápenatého.

5. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že roztok je nevodným roztokem.

6. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že reaktivní amorfni fosforečnan vápenatý má poměr vápníku k fosfátu v rozmezí od asi 1,1 do asi 1,9.

7. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že třetí ion je volen tak, aby změnil poměr vápníku

20.01.98

k fosforečnanu v produktu reaktivního amorfního fosforečnanu vápenatého.

8. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že třetí ion je volen tak, aby stabilisoval amorfni charakter amorfního fosforečnanu vápenatého.

9. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že dále zahrnuje stupeň sušení amorfního fosforečnanu vápenatého před odstraněním třetího iontu za podmínek volených tak, aby byl zachován amorfni charakter fosforečnanu vápenatého.

10. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že stupeň odstranění třetího iontu zahrnuje stupeň zahřívání za podmínek volených tak, aby byl zachován amorfni charakter fosforečnanu vápenatého.

11. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že stupeň odstranění třetího iontu zahrnuje stupeň rozkladu třetího iontu.

12. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že stupeň odstranění třetího iontu zahrnuje rozpouštění třetího iontu z amorfního fosforečnanu vápenatého.

13. Způsob podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m , že stupeň odstranění třetího iontu zahrnuje odstranění kolem 60 % obsahu uhličitanu v amorfni fosforečnanu vápenatém.

14. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že během stupně odstranění uhličitanu vápenatého jsou do amorfního fosforečnanu vápenatého vnášena vakantní místa.

20.01.98

15. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že před sušením dále zahrnuje přidávání proteinu pro regeneraci kosti nebo antibiotika k amorfnnímu karbonisovanému fosforečnanu vápenatém.

16. Materiál reaktivního, amorfnního fosforečnanu vápenatého, mající alespoň z 90 % amorfnní charakter, v y z n a č u j í c í s e t í m, že připraví-li se jako směs 1:1 s dikalcium difosfátem ve vodě při 37 C, směs ztverdne během zhruba 10 až zhruba 60 minut.

17. Materiál reaktivního, amorfnního fosforečnanu vápenatého, získaný odstraněním přidané uhličitanové komponenty amorfnního fosforečnanu vápenatého pomocí tepelného rozkladu této složky na vedlejší produkty ve formě plynu nebo páry.

18. Reaktivní amorfnní fosforečnan vápenatý, získaný odstraněním labilní komponenty amorfnního fosforečnanu vápenatého tepelným rozkladem komponenty na vedlejší produkty ve formě plynu nebo páry.

19. Materiál reaktivního, amorfnního fosforečnanu vápenatého, mající alespoň z 90 % amorfnní charakter, v y z n a č u j í c í s e t í m, že připraví-li se jako směs 1:1 s dikalcium difosfátem ve vodě při 37 C, proběhne ve směsi v podstatě úplná reakce během zhruba 40 minut.

20. Materiál reaktivního, amorfnního fosforečnanu vápenatého podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že reakce je v podstatě skončena zhruba za 75 minut.

21. Materiál reaktivního, amorfnního fosforečnanu vápenatého

20.01.98

podle nároku 16, 17 nebo 18, kde poměr vápníku k fosfátu je v rozmezí od asi 1,1 do asi 1,9.

22. Materiál reaktivního, amorfního fosforečnanu vápenatého podle nároku 16, 17 nebo 18, kde poměr Ca/P je asi 1,58.

23. Způsob přípravy hydroxyapatitu s nízkou krystalinitou, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje reakci reaktivního amorfního fosforečnanu vápenatého podle nároku 16, 17 nebo 18 s druhým fosforečnanem vápenatým, přičemž druhý fosforečnan vápenatý a reaktivní amorfní fosforečnan vápenatý jsou v poměru, aby se vytvořil hydroxyapatitický fosforečnan vápenatý.

24. Způsob přípravy hydroxyapatitu s nízkou krystalinitou, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje reakci reaktivního amorfního fosforečnanu vápenatého podle nároku 16, 17 nebo 18 s promotorem voleným tak, aby konvertoval reaktivní amorfní fosforečnan vápenatý na hydroxyapatitický fosforečnan vápenatý.

25. Způsob podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m , že hydroxyapatitický fosforečnan vápenatý s nízkou krystalinitou je bioresorbovatelný.

26. Způsob podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se reakce provádí v kapalině a kapalina se volí ze skupiny zahrnující vodu, fyziologicky přijatelný roztok pufru, solný roztok, serum a medium pro kultivaci tkáně.

27. Způsob podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m , že stupeň reakce zahrnuje:

smísení amorfního fosforečnanu vápenatého a druhého

20.01.98

fosforečnanu vápenatého a

přidání vodného roztoku ke směsi v množství dostačujícím k iniciaci reakce.

28. Způsob podle nároku 24, v y z n a č u j í c í s e t í m, že promotor zahrnuje amorfnní fosforečnan vápenatý.

29. Způsob podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že materiál reaktivního fosforečnanu vápenatého se získá

reakcí vápenatých iontů, fosforečnanových iontů a třetího iontu tak, aby vznikl amorfnní fosforečnan vápenatý a odstraněním alespoň části třetího iontu z amorfnního fosforečnanu vápenatého tak, aby se získal reaktivní amorfnní fosforečnan vápenatý.

30. Způsob podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr Ca/P hydroxyapatitu s nízkou krystalinitou je menší než kolem 1,5.

31. Způsob podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že druhý fosforečnan vápenatý je amorfnní nebo mikrokrytalínický.

32. Způsob podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále zahrnuje přidávání proteinu pro regeneraci kosti nebo antibiotika ke směsi.

33. Resorbovatelný materiál pro náhradu kosti v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje hydroxyapatit s nízkou krystalinitou, jehož rentgenový difraktogram je v podstatě jak ukazuje obrázek 7a.

20.01.98

34. Resorbovatelný materiál pro náhradu kosti v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje hydroxyapatit s nízkou krystalinitou, jehož rentgenový difraktogram má široké píky při 2θ hodnotách 26 , 28,5 , 32 a 33 .

35. Resorbovatelný materiál pro náhradu kosti v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje hydroxyapatit s nízkou krystalinitou a po uložení do intramuskulárního místa u krysy je resorpce nejméně 100 mg materiálu pro náhradu kosti během jednoho měsíce úplná.

36. Resorbovatelný materiál pro náhradu kosti podle nároku 35, v y z n a č u j í c í s e t í m , že resorpce nejméně 300 mg materiálu pro náhradu kosti je úplná během jednoho měsíce.

37. Resorbovatelný materiál pro náhradu kosti podle nároku 33, 34, nebo 35, v y z n a č u j í c í s e t í m , že připraví-li se reakcí amorfního fosforečnanu vápenatého a druhého fosforečnanu v kapalině, reakční směs ztverdne kolem 22 C po čase delším než 60 minut a při 37 C ztverdne reakční směs zhruba mezi 10 až 60 minutami.

38. Resorbovatelný materiál pro náhradu kosti podle nároku 37, v y z n a č u j í c í s e t í m , že směs je injektovatelná kolem 22 C v čase delším než kolem 60 minut.

39. Resorbovatelný materiál pro náhradu kosti podle nároku 37, v y z n a č u j í c í s e t í m , že směs je tvarovatelná kolem 22 C v čase delším než kolem 60 minut.

40. Resorbovatelný materiál pro náhradu kosti podle nároku

20.01.98

33, 34, nebo 35, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že poměr vápníku k fosforu má v rozmezí zhruba od 1,1 do 1,9.

41. Resorbovatelný materiál pro náhradu kosti podle nároku 33, 34, nebo 35, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že poměr vápníku k fosforu má v rozmezí zhruba od 1,3 do 1,5.

42. Formovatelná pasta, vhodná pro použití jako resorbovatelný materiál pro náhradu kosti, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že zahrnuje:

směs reaktivního amorfního fosforečnanu vápenatého podle nároku 16, 17 nebo 18 a druhého práškovitého fosforečnanu vápenatého

a množství kapaliny dostačující pro dosažení žádané konsistence řečené směsi, přičemž tato směs je schopna vytvrzení kolem 22 C.

43. Formovatelná pasta, vhodná pro použití jako materiál pro náhradu kosti, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že zahrnuje:

směs reaktivního amorfního fosforečnanu vápenatého podle nároku 16, 17 nebo 18 a promotoru vybraného tak, aby konvertoval reaktivní amorfní fosforečnan vápenatý na hydroxyapatitický fosforečnan vápenatý

a množství kapaliny dostačující pro dosažení žádané konsistence řečené směsi, přičemž tato směs je schopna vytvrzení kolem 22 C.

44. Pasta podle nároku 42, v y z n a ě u j í c í s e t í m , že směs ztvdne kolem 22 C v čase delším než 60 minut, a že kolem 37 C ztvdne směs zhruba mezi 10 až 60 minutami.

45. Pasta podle nároku 44, v y z n a ě u j í c í s e

20.01.98

t í m , že směs je injektovatelná při asi 22 C po dobu delší než kolem 60 minut.

46. Pasta podle nároku 44, v y z n a č u j í c í s e t í m , že směs je tvarovatelná při asi 22 C po dobu delší než kolem 60 minut.

47. Pasta podle nároku 42, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se kapalina volí ze skupiny zahrnující vodu, fyziologicky přijatelný roztok pufru, solný roztok, serum a prostředí pro kultivaci tkáně.

48. Pasta podle nároku 42, v y z n a č u j í c í s e t í m , že druhý práškovitý fosforečnan vápenatý je amorfní nebo mikrokrystalinický.

49. Pasta podle nároku 42, v y z n a č u j í c í s e t í m , že dále zahrnuje protein pro regeneraci kosti nebo antibiotikum.

50. Způsob pro podporu růstu kosti v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje :

aplikaci směsi reaktivního amorfního fosforečnanu vápenatého podle nároku 16, 17 nebo 18 a druhého práškovitého fosforečnanu vápenatého v takovém množství kapaliny, aby bylo dosaženo žádané konsistence na místo vyžadující růst kosti a ponechání směsi tvrdnout.

51. Způsob podle nároku 50, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje dále přidávání proteinu pro regeneraci kosti nebo antibiotika ke směsi před aplikací.

52. Způsob podle nároku 50, v y z n a č u j í c í s e

20.01.98

t í m, že se kapalina volí ze skupiny zahrnující vodu, fyziologicky přijatelný roztok pufru, solný roztok, serum a medium pro kultivaci tkáně.

53. Způsob podle nároku 50, v y z n a č u j í c í s e t í m, že hydroxyapatitický fosforečnan vápenatý s nízkou krystalinitou je bioresorbovatelný.

54. Způsob podle nároku 24, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se reakce provádí v kapalině a kapalina se volí ze skupiny zahrnující vodu, fyziologicky přijatelný roztok pufru, solný roztok, serum a medium pro kultivaci tkáně.

55. Způsob podle nároku 24, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se materiál reaktivního amorfního fosforečnanu vápenatého získá

reakcí vápenatých a fosforečnanových iontů a třetího iontu tak, aby se získal amorfni fosforečnan vápenatý,

a odstraněním alespoň části třetího iontu z amorfního fosforečnanu vápenatého tak, aby se získal reaktivní amorfni fosforečnan vápenatý.

56. Způsob podle nároku 24, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr Ca/P u hydroxyapatitu s nízkou krystalinitou je menší než kolem 1,5.

57. Způsob podle nároku 24, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále zahrnuje přidávání proteinu pro regeneraci kosti nebo antibiotika ke směsi.

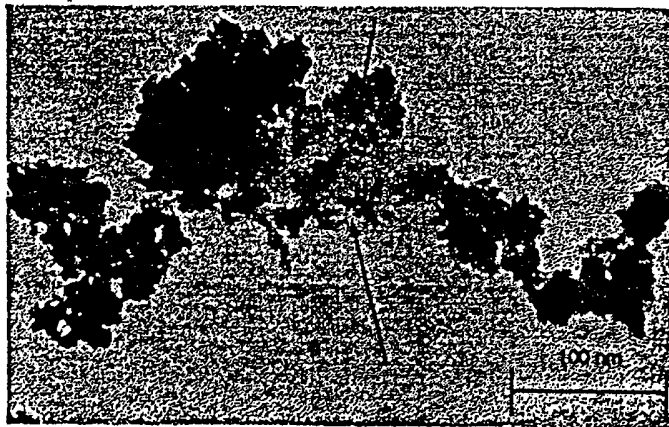
58. Pasta podle nároku 43, v y z n a č e n á t í m, že směs ztverdne kolem 22 C v čase delším než 60 minut a že kolem 37 C ztverdne směs zhruba mezi 10 až 60 minutami.

20.01.98

59. Pasta podle nároku 43, v y z n a č e n á t í m, že se kapalina volí ze skupiny zahrnující vodu, fyziologicky přijatelný roztok pufru, solný roztok, serum a prostředí pro kultivaci tkáně.

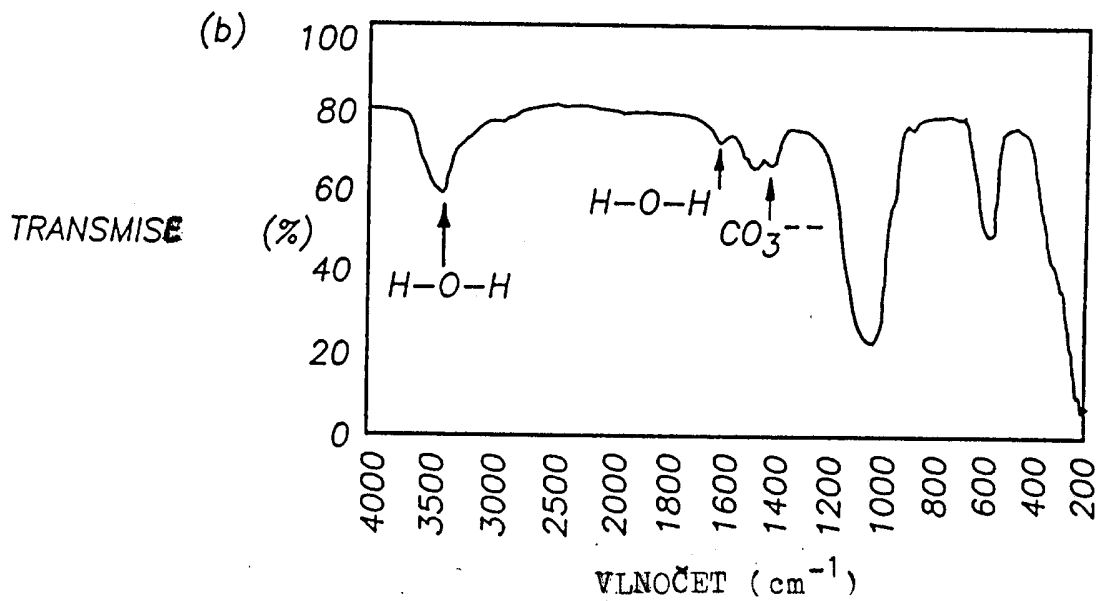
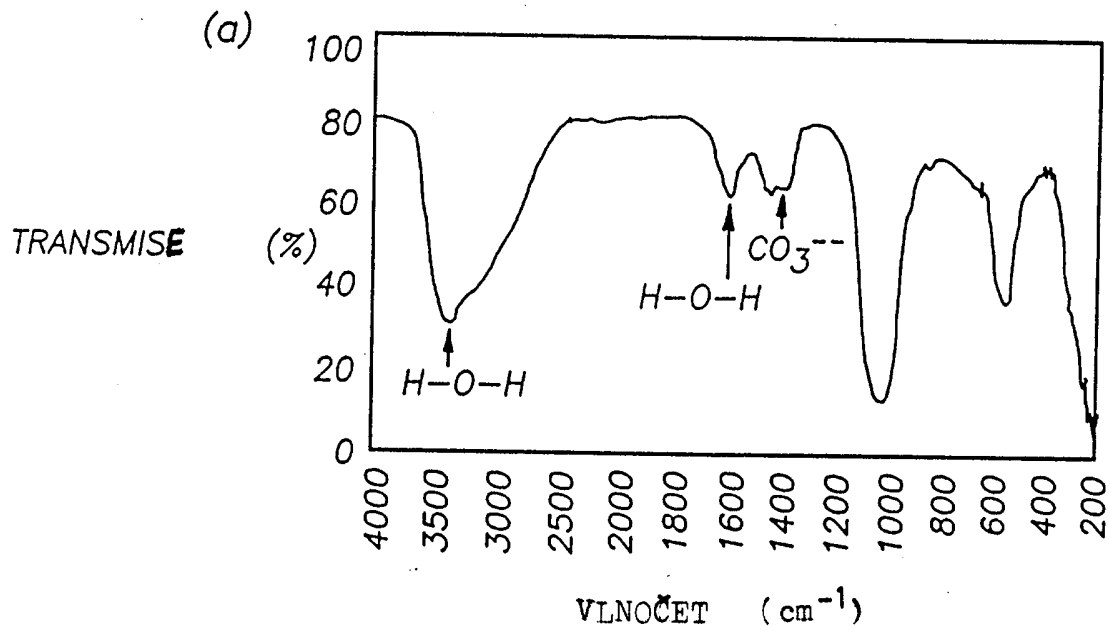
PV 3626-97

20.01.98



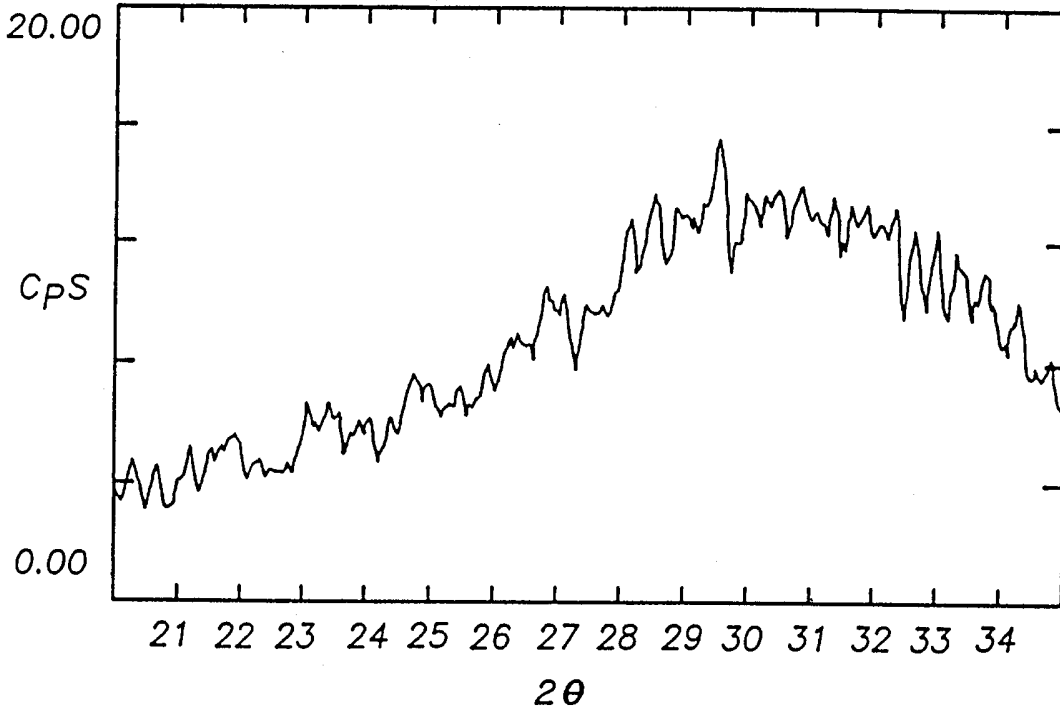
O B R. 1

O B R. 2

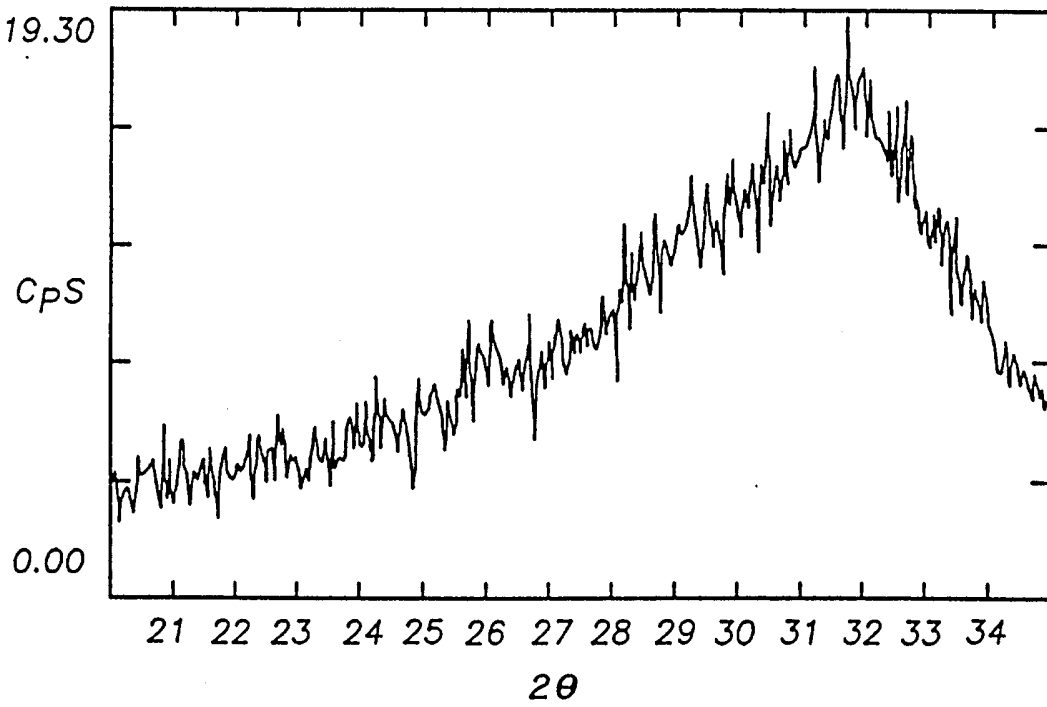


Q B R. 3

(a)



(b)

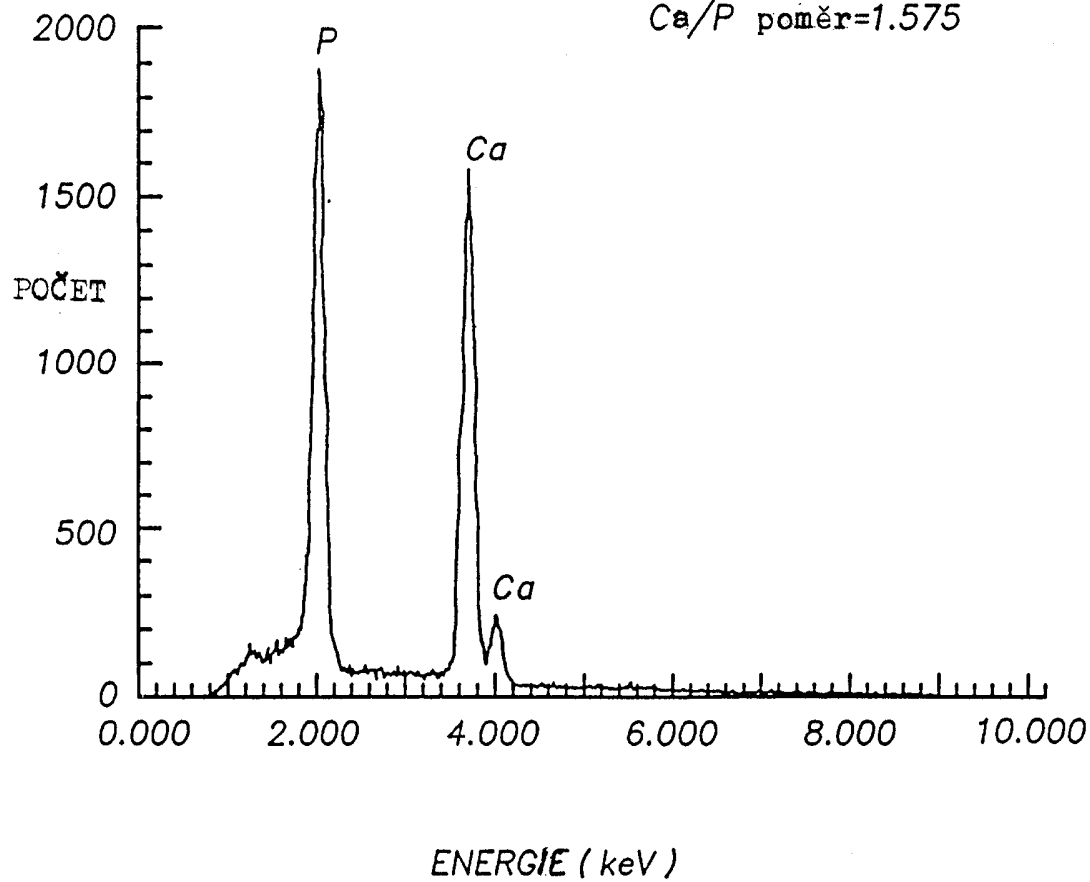


PV 3626-94
20.01.98

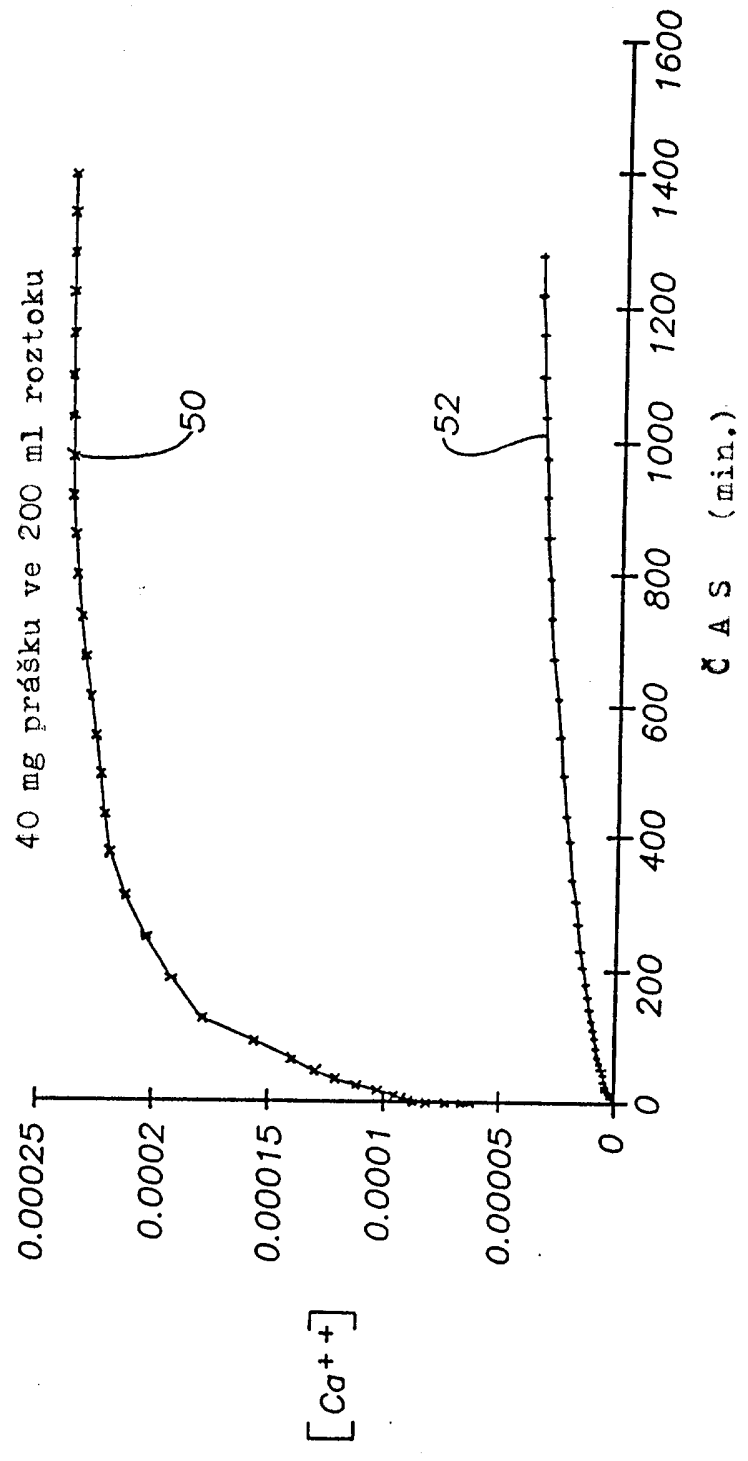
O B R. 4

	O	P	Ca	TOTAL
AVG	68.51	12.23	19.26	100.00
+-	0.80	0.11	0.11	POČET
LT= 60 SEC.	+- 0.56	+- 0.18	+- 0.39	1-SIGMA
ACP-H	+- 0.40	+- 0.13	+- 0.28	95% CONF

Ca/P poměr=1.575

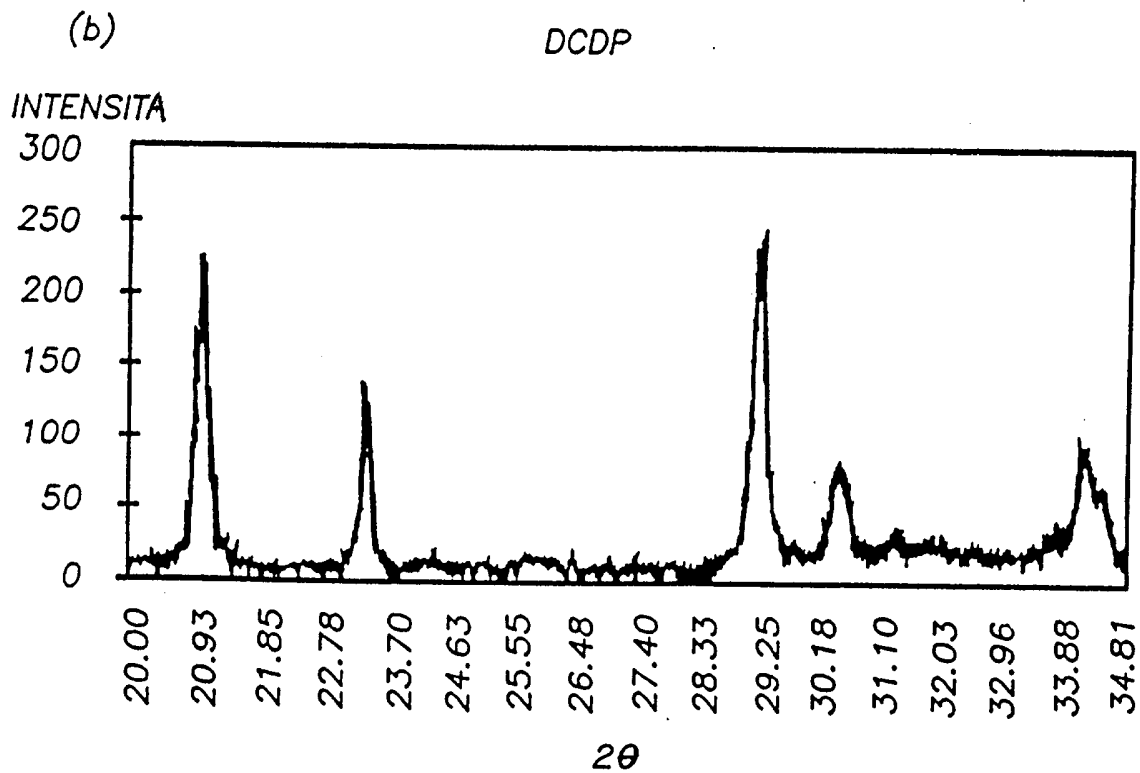
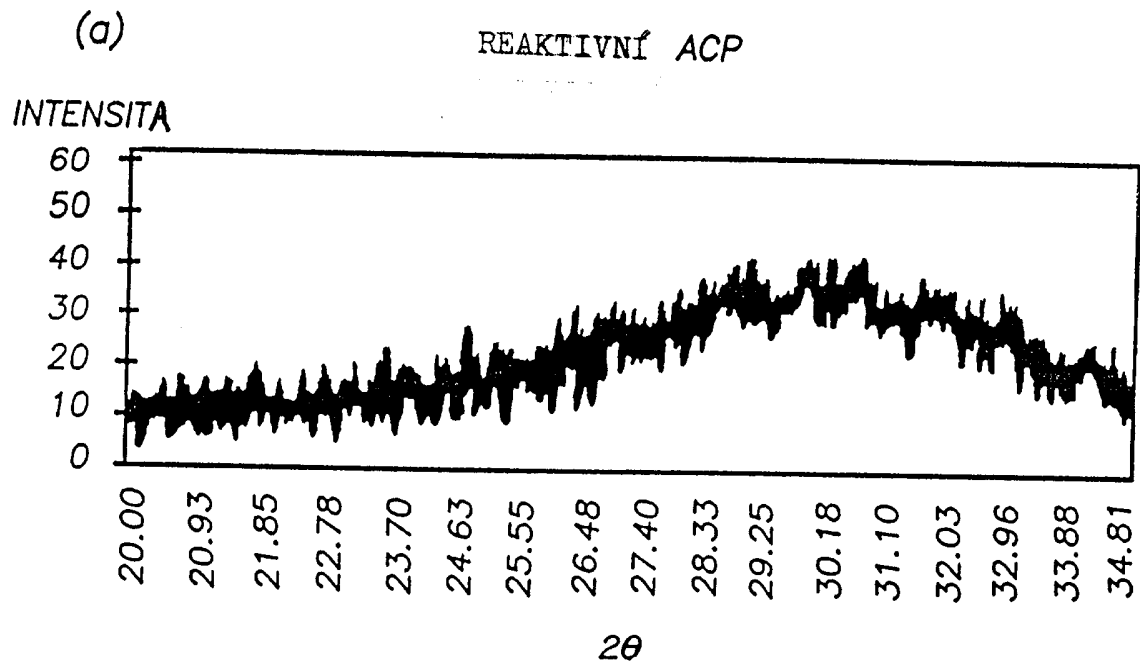


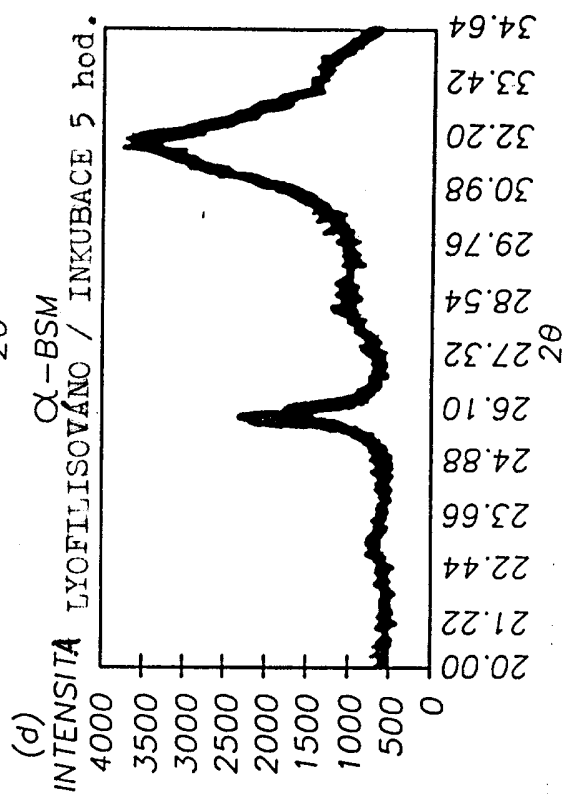
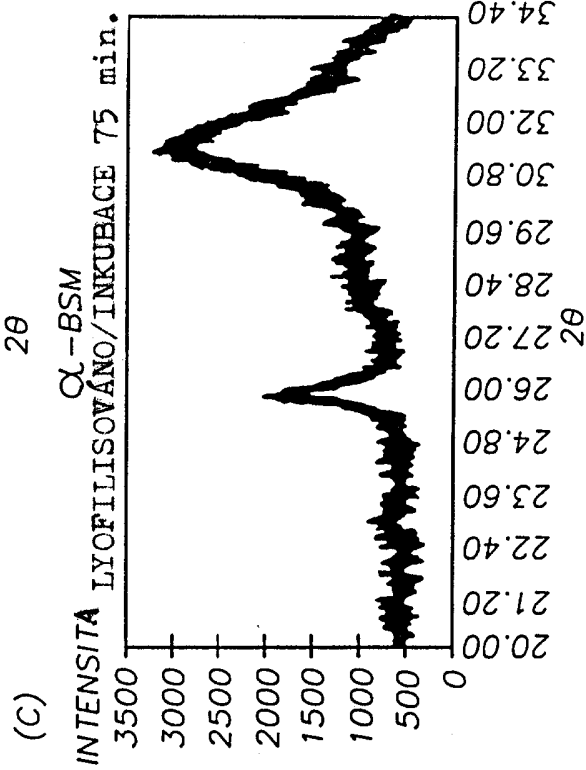
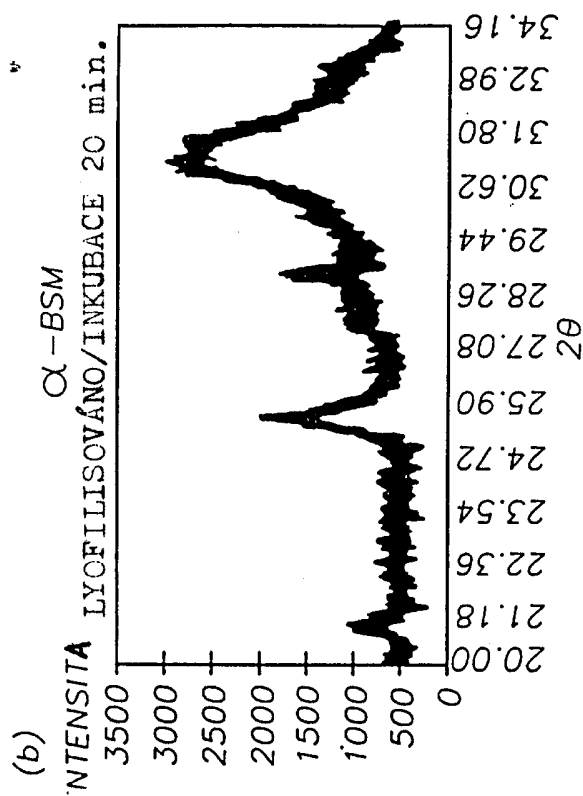
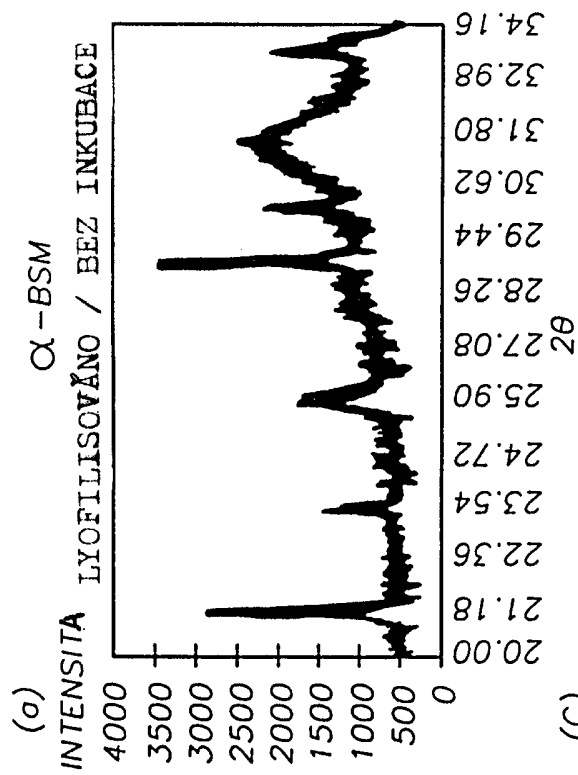
ROZPOUŠTĚNÍ V TRIS PUFERU PŘI 37°C,
pH 7,3



PV 3626-97
20.01.98

O B R. 6

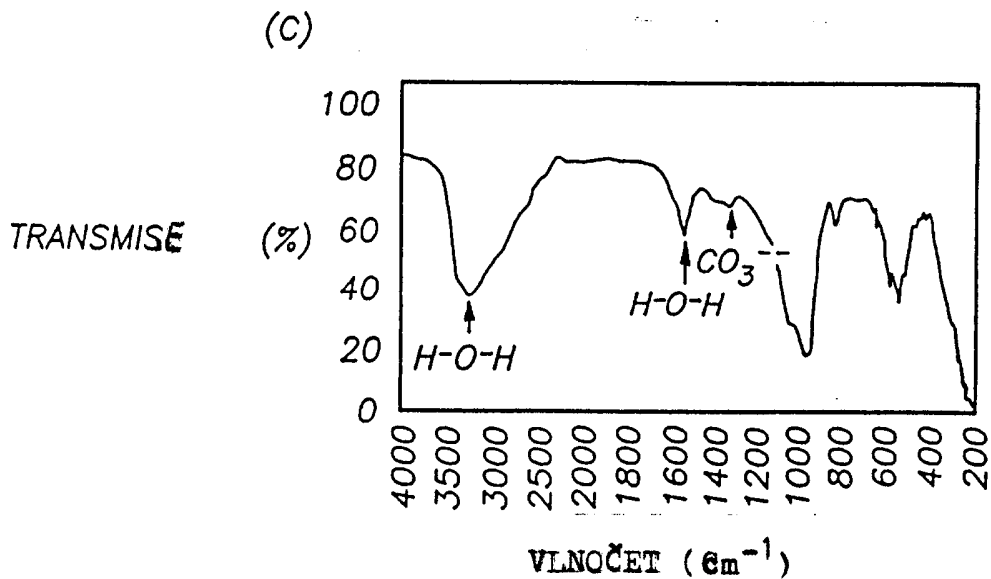
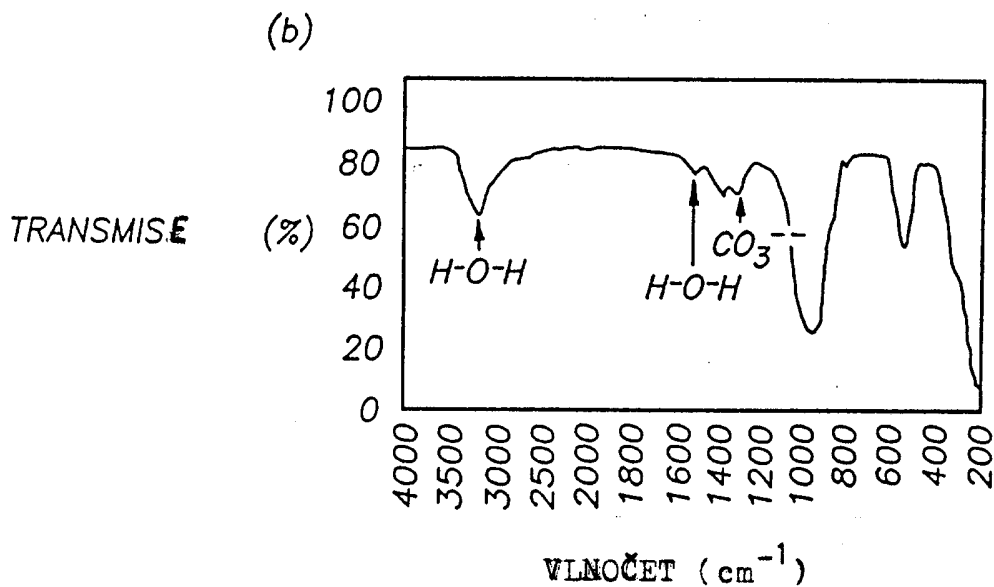
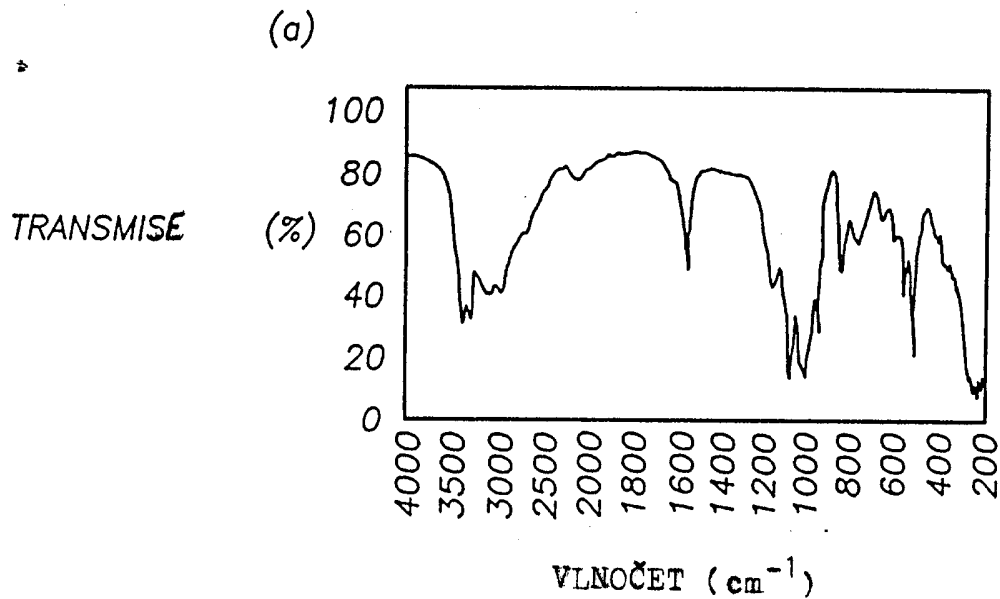




OBJ. 7

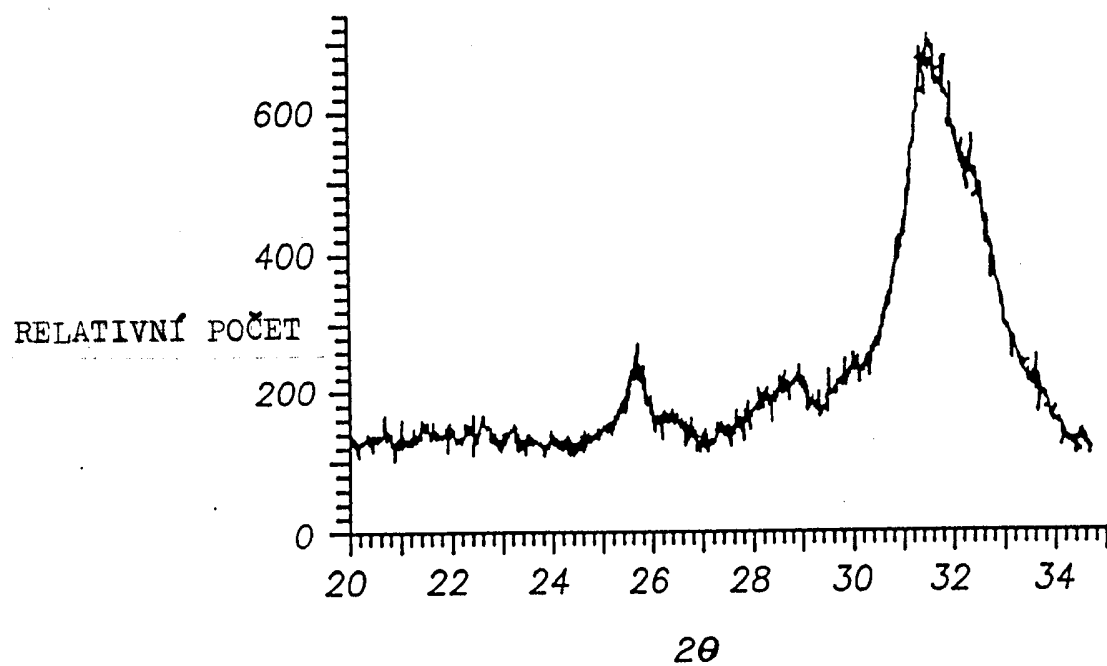
20.01.98 36-9293 NV

O B R. 8



PV 3626-97

20.01.98



O B R. 9