



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I852918 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 08 月 21 日

(21)申請案號：107145009

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 12 月 13 日

(51)Int. Cl. : A61L27/12 (2006.01)

A61L27/32 (2006.01)

A61L27/58 (2006.01)

A61L27/56 (2006.01)

(30)優先權：2017/12/14 歐洲專利局

17207235.7

(71)申請人：瑞士商蓋茲特利製藥公司 (瑞士) GEISTLICH PHARMA AG (CH)

瑞士

(72)發明人：祖曼 克勞迪歐 ZIHLMANN, CLAUDIO (CH)；巴佛勒 麥可 BUFLER, MICHAEL (CH)

(74)代理人：陳長文

審查人員：簡正芳

申請專利範圍項數：20 項 圖式數：6 共 40 頁

(54)名稱

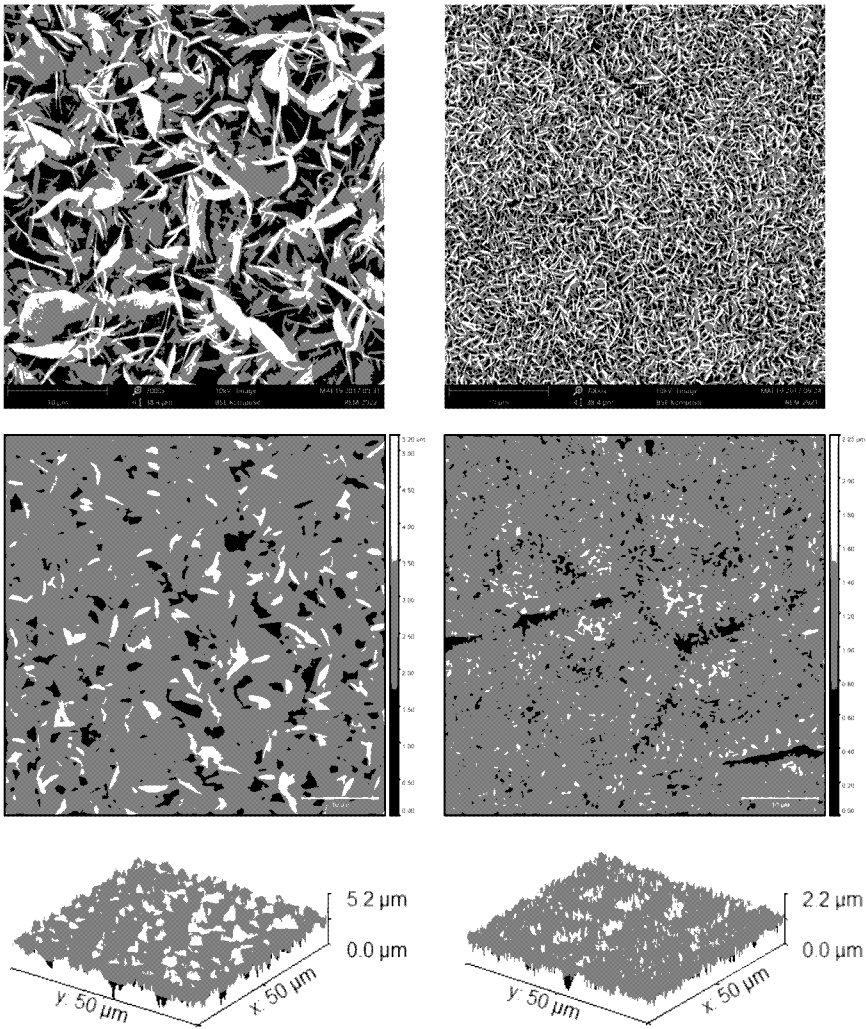
骨替代材料

(57)摘要

本發明係關於一種展現經增強成骨反應之兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料，其具有燒結 CAP 核及封閉的奈米晶 HAP 磊晶生長層，該磊晶生長層沈積於該燒結 CAP 核之外表面上，其中沈積於該燒結 CAP 核之外表面上的該封閉的奈米晶 HAP 磊晶生長層具有包含扁平晶體薄片之均質粗糙外表面；一種藉由植入該兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料來促進骨形成、骨再生及/或骨修復之方法；及一種製備其之方法。

A biphasic calcium phosphate/hydroxyapatite (CAP/HAP) bone substitute material having a sintered CAP core and a closed epitactically grown layer of nanocrystalline HAP deposited on the external surface of the sintered CAP core, wherein the closed epitactically grown layer of nanocrystalline HAP deposited on the external surface of the sintered CAP core has a homogeneous coarse external surface comprising flat crystal platelets, which shows an enhanced osteogenic response, a method of promoting bone formation, bone regeneration and/or bone repair by implanting the biphasic calcium phosphate/hydroxyapatite (CAP/HAP) bone substitute material, and a process of preparation thereof.

指定代表圖：



【圖4】



公告本

I852918

【發明摘要】

【中文發明名稱】

骨替代材料

【英文發明名稱】

BONE SUBSTITUTE MATERIAL

【中文】

本發明係關於一種展現經增強成骨反應之兩相磷酸鈣/羥基磷灰石 (CAP/HAP) 骨替代材料，其具有燒結CAP核及封閉的奈米晶HAP磊晶生長層，該磊晶生長層沈積於該燒結CAP核之外表面上，其中沈積於該燒結CAP核之外表面上的該封閉的奈米晶HAP磊晶生長層具有包含扁平晶體薄片之均質粗糙外表面；一種藉由植入該兩相磷酸鈣/羥基磷灰石 (CAP/HAP) 骨替代材料來促進骨形成、骨再生及/或骨修復之方法；及一種製備其之方法。

【英文】

A biphasic calcium phosphate/hydroxyapatite (CAP/HAP) bone substitute material having a sintered CAP core and a closed epitactically grown layer of nanocrystalline HAP deposited on the external surface of the sintered CAP core, wherein the closed epitactically grown layer of nanocrystalline HAP deposited on the external surface of the sintered CAP core has a homogeneous coarse external surface comprising flat crystal platelets, which shows an enhanced osteogenic response, a method of promoting bone formation, bone regeneration and/or bone repair by implanting the biphasic calcium phosphate/hydroxyapatite

(CAP/HAP) bone substitute material, and a process of preparation thereof.

【指定代表圖】

圖4

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

骨替代材料

【英文發明名稱】

BONE SUBSTITUTE MATERIAL

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種新型兩相骨替代材料，其具備具有均質粗糙外表面之基於磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)的雙層結構；一種用於製備該材料之方法；及其在人類或動物中之缺損部位處作為支持骨形成、骨再生、骨修復及/或骨置換之植入物或假體之用途。

【先前技術】

【0002】 骨結構中之缺損出現於諸如外傷、疾病及手術之多種情況中，且在各種外科手術領域中仍存在對骨骼缺損進行有效修復之需求。

【0003】 已使用多種天然與合成材料及組合物來刺激骨骼缺損部位處之癒合。在牙周及頷面骨缺損中促進骨骼生長之熟知的天然骨傳導性骨替代材料為可購自Geistlich Pharma AG之Geistlich Bio-Oss®。該材料係藉由美國專利第5,167,961號中所述之方法由天然骨骼製成，該方法使得能夠保存天然骨骼之小樑架構及奈米晶結構，產生不會或極為緩慢地經再吸收之極佳骨傳導性基質。

【0004】 磷酸三鈣/羥基磷灰石(TCP/HAP)系統及其作為骨替代材料之用途描述於例如US-6,338,752中，該案揭示了一種藉由在1200至1500℃下加熱磷酸銨與HAP之粉末混合物來製備 α -TCP/HAP兩相膠結劑之方法。

【0005】 歐洲專利EP-285826描述了一種在用於植入物之金屬及非金屬體上製造HAP層之方法，該方法係藉由塗覆 α -TCP層，且藉由與pH 2至pH 7之水在80°C至100°C下反應而將該 α -TCP層完全轉化為HAP。獲得的產物為覆蓋有HAP層之金屬或非金屬體。

【0006】 WO 97/41273描述了一種用碳酸化羥基磷灰石(亦即其中磷酸根及/或羥基離子經碳酸氫根離子部分置換之羥基磷灰石)塗料塗佈基板，尤其諸如羥基磷灰石(HAP)或其他磷酸鈣(CAP)的方法，其利用包含以下之方法：(a)將基板浸入處於低於50°C之溫度下的含有鈣離子、磷酸根離子及碳酸氫根離子之pH 6.8至8.0的溶液中，(b)將與基板接觸的溶液之一部分加熱至50°C至80°C之溫度，直至pH大於8，(c)維持基板與步驟(b)中所獲得之鹼性溶液接觸，形成碳酸化羥基磷灰石塗層，及(d)自溶液中取出基板且對塗層進行乾燥。已揭示碳酸氫根離子充當羥基磷灰石晶體成長之抑制劑，產生含有缺陷且具有相當小尺寸，亦即長度為10至40 nm且寬度為3至10 nm的非化學計量晶體(參見第7頁，第1至7行)。

【0007】 磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)系統，尤其TCP/HAP系統之組分在熱力學穩定性方面有所差異。由於此差異，當CAP/HAP系統植入哺乳動物，尤其人類患者時，TCP及其他磷酸鈣在體內之溶解度要高於HAP之溶解度。磷酸鈣與HAP之間的溶解度差異引起CAP/HAP系統之無序燒結結構發生斷裂，因為溶解度更高之化合物CAP(例如，TCP)要比HAP更快地移除。在高溫下產生的CAP與HAP之間的燒結互連亦將對裝置在生理環境中之較高溶解度起顯著作用。兩種不同類型的反應支配此類陶瓷之加速活體內降解：化學溶解及細胞之生物再吸收。兩個過程均導致陶瓷材料溶解，進一步導致鈣離子之局部過飽和，由此釋放之鈣離子要多

於經吸收之鈣離子。鈣離子之天然平衡在胞外基質及植入物周圍組織中均不復存在。與鈣離子過飽和有關的天然鈣平衡之局部紊亂導致破骨細胞活性提高，且因此導致被疾病控制的陶瓷材料再吸收發生加速，以及可能出現不良的發炎反應的風險，尤其在使用大量合成骨替代材料時。

【0008】 當骨替代材料Geistlich Bio-Oss®植入人類患者中時，天然鈣平衡幾乎不受影響，材料表面上及其局部環境中之鈣離子濃度保持基本不變。材料的生物再吸收因此不會發生或以極緩慢之速率進行，同時不存在不良發炎反應之風險。

【0009】 EP-B1-2445543揭示了一種類似於骨替代材料Geistlich Bio-Oss®的極為有利的磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料，活體內安置後，其實現材料表面上及其局部環境中之鈣離子濃度保持基本不變，且因此不會導致破骨細胞活性提高。

【0010】 實際上，最佳骨再生所需的天然鈣均衡不應受到干擾或破壞。另外，骨替代材料應當持久地支持天然鈣濃度均衡，直至完成再生過程。當滿足彼等條件時，破骨細胞活性不會提高，因此不存在不利發炎反應之風險。

【0011】 EP-B1-2445543之發明係關於兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料，其包含燒結CAP核及至少一個均一旦封閉的奈米晶HAP磊晶生長層，其沈積於該燒結CAP核之頂部，其中磊晶生長的奈米晶體具有與人類骨礦物質相同的尺寸及形態，亦即長度為30至46 nm且寬度為14至22 nm。

【0012】 燒結CAP核可包含磷酸三鈣(TCP)，尤其 α -TCP (α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)或 β -TCP (β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)及/或磷酸四鈣(TTCP) $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ 。

【0013】 根據一常用實施例，燒結CAP核基本上由TCP組成，較佳 α -TCP。

【0014】 奈米晶HAP磊晶生長層在結構及化學上與天然人類骨礦物質幾乎相同。

【0015】 奈米晶HAP磊晶生長層之厚度一般為至少15至50 nm，較佳至少20至40 nm，更佳至少25至35 nm。最小厚度對應於磊晶定向的一個HAP奈米晶體層。

【0016】 奈米晶HAP磊晶生長層可包含磊晶定向的單個或多個HAP奈米晶體層。奈米晶HAP磊晶生長層之厚度與磊晶定向的此類HAP奈米晶體層之數目有關，該厚度將根據骨替代材料作為植入物或假體在不同負荷之身體部位中的預期應用來選擇。該發明之骨替代材料實際上設計成活體內發揮類活體系統之作用，將燒結CAP核逐漸轉化為尺寸及形態類似於人類骨礦物質的羥基磷灰石，該轉化速率與燒結CAP核釋放鈣的速率相關，其在很大程度上受奈米晶HAP磊晶生長層之厚度控制。

【0017】 CAP/HAP骨替代材料之特性在很大程度上受結晶HAP磊晶生長層之厚度控制。術語「特性」包括CAP/HAP骨替代物釋放恆定濃度之鈣離子進入活體外及活體內局部環境中的能力。

【0018】 奈米晶HAP磊晶生長層之厚度與燒結CAP核材料與HAP之比率有關，該比率一般在5:95與95:5，較佳10:90至90:10之間。

【0019】 CAP/HAP骨替代材料可為微粒或顆粒，該等粒子或顆粒具有期望尺寸及形狀。一般而言，該等粒子或顆粒近似球形且直徑為250至5000 μm 。

【0020】 CAP/HAP骨替代材料亦可為成形體，例如，螺釘、釘子、

銷釘或具有骨體部分(尤其諸如髌、鎖骨、肋骨、下頷骨或顱骨部分)之輪廓的結構。此類螺釘、釘子或銷釘可在重建矯形外科中用於將韌帶固定於骨上，例如在膝蓋或肘關節中。具有骨體部分之輪廓的此類結構可在矯形外科手術中用作假體，用於置換缺失或缺損的骨或骨部分。

【0021】 據教示，EP-B1-2445543之CAP/HAP骨替代材料係藉由一種包含以下步驟之方法獲得：

- a) 製備燒結CAP核材料，
- b) 將燒結CAP核材料浸入處於10°C與50°C之間的溫度下的水溶液中，以開始CAP轉化為HAP之過程，藉此在燒結CAP核材料表面上形成均一且封閉的奈米晶羥基磷灰石之磊晶生長層，磊晶生長的奈米晶體具有與人類骨礦物質相同的尺寸及形態，
- c) 藉由當存在至少一個HAP奈米晶層之均一且封閉的塗層時，但在轉化過程完全結束之前，使固體材料與水溶液分離來終止轉化，
- d) 視情況地，對來自步驟c)之分離材料進行滅菌。

【0022】 燒結CAP核材料之製備可藉由此項技術中已知之方法進行，該等方法包含：首先混合磷酸氫鈣(CaHPO_4)、碳酸鈣及/或氫氧化鈣之粉末，隨後在適當溫度範圍內煅燒且燒結混合物，藉此得到塊狀燒結CAP核材料(參見例如，Mathew M.等人, 1977, Acta. Cryst. B33: 1325；Dickens B.等人, 1974, J. Solid State Chemistry 10, 232；及Durucan C.等人, 2002, J. Mat. Sci., 37:963)。

【0023】 塊狀燒結TCP核材料由此可藉由按化學計量比混合磷酸氫鈣(CaHPO_4)、碳酸鈣及/或氫氧化鈣之粉末，在1200°C至1450°C範圍內，較佳約1400°C之溫度下煅燒且燒結混合物來獲得。

【0024】 塊狀燒結TTCP核材料亦可藉由上述方法獲得。

【0025】 藉由此類方法製備之塊狀燒結CAP材料可為多孔的，其具有2至80體積%之孔隙率及廣泛孔隙分佈。孔隙率參數將根據CAP/HAP骨替代材料之預期應用來選擇。

【0026】 步驟b)中所用之燒結CAP核材料可為

- 如上文所述製備之塊狀燒結CAP核材料，
- 藉由使用諸如壓碎、研磨及/或銑削以及篩分之習知方法，由如上文所述製備之塊狀燒結CAP核材料獲得的燒結CAP核材料之微粒或顆粒，或
- 具有期望形狀及尺寸之燒結CAP核材料預成型坯，例如螺釘、釘子、銷釘或具有骨體部分之輪廓的結構。

【0027】 任何期望形狀及尺寸之此類預成型坯均可藉由使用熟知原型設計技術，諸如CNC銑削或3D打印(參見例如，Bartolo P.等人, 2008, Bio-Materials and Prototyping Applications in Medicine, Springer Science New York, ISBN 978-0-387-47682-7；Landers R.等人, 2002, Biomaterials 23(23), 4437；Yeong W.-Y.等人, 2004, Trends in Biotechnology, 22 (12), 643；及Seitz H.等人, 2005, Biomed. Mater. Res. 74B (2), 782)，由如上文所述製備的塊狀燒結核材料獲得。

【0028】 據教示，步驟b)之水溶液為純水、模擬體液或緩衝液。重要的是，步驟b)的浸入溶液之pH值接近中性且在整個轉化過程中保持穩定，較佳在5.5至9.0之pH範圍內。

【0029】 術語「模擬體液」係指模擬體液之任何溶液。較佳地，模擬體液具有與血漿類似之離子濃度。

【0030】 緩衝液可為處於上述pH範圍內之任何緩衝液，但較佳為具有或不具有鈣、鎂及/或鈉之磷酸鹽緩衝液。

【0031】 各實例(參見實例4及實例5)中所用的緩衝液為磷酸鹽緩衝水溶液。

【0032】 步驟b)中之溫度範圍一般介於10°C與50°C之間，較佳25°C與45°C之間，更佳35°C與40°C之間。

【0033】 浸入步驟b)在第一階段中誘導CAP核材料之一級相變，且因此誘導HAP奈米晶體前驅體之成核作用。在第二階段期間，由第一階段得到之HAP前驅體將生長且形成封閉(亦即完全塗佈)的磊晶奈米晶複合層。第一HAP奈米晶體層必須為均一且封閉的且與燒結CAP核材料磊晶連接。

【0034】 在第三階段期間，一級相變可在新近形成之雙層複合物中繼續進行，以進一步將燒結CAP核材料(TCP或TTCP)轉化為奈米晶HAP。在此第三相變步驟期間，鈣離子將藉由緩慢擴散受控過程釋放持續一定可控時間，直至燒結CAP核材料之一部分已轉化成奈米晶HAP。HAP層厚度及因此鈣釋放比率可藉由改變轉化時間來控制。

【0035】 適當厚度之磊晶生長的奈米晶HAP層將活體外製備，CAP至HAP之轉化在其完成之前停止。

【0036】 一旦CAP/HAP骨替代材料經活體內安置，將藉由與體液接觸再啟動CAP轉化為HAP之過程，且骨替代材料將充當類活體系統，形成尺寸及形態類似於人類骨礦物質的新型羥基磷灰石。在活體內相變過程中，所輸送的鈣離子將釋放至局部環境中，以支持局部鈣均衡，此對於骨再生過程至關重要且為有益的。

【0037】 由於不同負荷之身體區域中的骨骼缺損之再生時間有所不同，因此鈣釋放速率可受控制是至關重要的。此可藉由改變羥基磷灰石磊晶生長層之厚度來達成。

【0038】 因此步驟c)為非常關鍵之步驟。在步驟b)之水溶液中之暴露時間係基於HAP層之期望厚度。需要至少一個磊晶定向的奈米晶HAP層。CAP至HAP之轉化沒有完成是必需的。

【0039】 根據期望厚度的適當暴露時間可藉由使用熟習磷酸鈣、膠結劑及凝結物化學技術者熟知的若干熱力學微分方程式來計算。

【0040】 參見例如：Pommersheim, J.C.; Clifton, J.R. (1979) Cem. Conc. Res.; 9:765；Pommersheim, J.C.; Clifton, J.R. (1982) Cem. Conc. Res.; 12:765；及Schlüssler, K.H. Mcedlov-Petrosjan, O.P.; (1990): Der Baustoff Beton, VEB Verlag Bauwesen, Berlin。

【0041】 將上述微分方程式之方案轉移至CAP/HAP系統使得能夠預測CAP至HAP之相變及層厚度，使得可以穩定且可重複方式製備HAP磊晶層。

【0042】 在步驟c)結束時，通常藉由使用此項技術中熟知之技術進行過濾、洗滌及乾燥來使固體材料與水溶液分離。

【0043】 在EP-B1-2445543之實例(亦即實例4 [0057]及實例5 [0058])中，藉由用純化水洗滌經分離之顆粒3次來進行洗滌以自緩衝溶液移除殘餘物。

【0044】 視情況選用之滅菌步驟d)可藉由此項技術中熟知之技術，諸如 γ 照射或X射線輻射進行。

【0045】 如EP-B1-2445543之實例4及實例5中所教示，將磷酸鹽緩

衝水溶液用於步驟b)之水溶液，且在步驟c)結束時使用純化水洗滌分離顆粒3次，會獲得兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料，其包含燒結CAP核及封閉的奈米晶HAP磊晶生長層，其沈積於燒結CAP核之外表面上，其中磊晶生長的奈米晶體具有與人類骨礦物質相同的尺寸及形態，亦即長度為30至46 nm且寬度為14至22 nm，其中沈積於燒結CAP核之外表面上的封閉的奈米晶HAP磊晶生長層具有包含扁平晶體薄片之獨立(分離)團簇及扁平晶體薄片之獨立團簇之間的平滑區域的非均質外表面，該等扁平晶體薄片之獨立團簇由磊晶生長的HAP奈米晶體組成，扁平晶體薄片之獨立團簇之間的平滑區域所佔據的外表面%視給定轉化條件下之轉化時間而定。

【0046】 參見圖1A，其呈現利用30分鐘之轉化時間的原型1 (1至2 mm顆粒)之掃描電子顯微術(SEM)圖像，其中如藉由SEM所量測，平滑區域佔總外表面之約70%，且參見圖1B，其呈現利用40分鐘之轉化時間的原型2(1至2 mm顆粒)之SEM圖像，其中如藉由SEM所量測，平滑區域佔總外表面之約50%。

【0047】 WO 2015/009154揭示了一種用於製造具有經改良之骨誘導性能力的骨傳導性材料的方法，該方法包含在不控制pH之情況下，在2至4巴之壓力下在等於或高於125℃之溫度下，對具有由晶粒組成之表面構形的燒結兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)材料進行水熱處理持續一定持續時間，該持續時間足以使起始物質表面上之磷酸鈣晶粒變成直徑為10至1500 nm之磷酸鈣針狀物。至少125℃之溫度及至少2巴之壓力與EP-B1-2445543中所用之實現HAP奈米晶體之磊晶生長的(接近於人體生理)條件(溫度35℃至40℃，pH 5.5至9.0，環境壓力)相差很遠。彼等針狀物

未磊晶生長但附接於或沈積於核材料基部上且僅部分(通常40%至90%)塗佈後者，藉此增加比表面積及攜帶蛋白質之能力，由此提高其骨誘導潛力。

【0048】 現已發現，藉由在根據EP-B1-2445543的兩相磷酸鈣/羟基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料之製備中向步驟b)之磷酸鹽緩衝水溶液中添加10%至90%，較佳20%至60%短鏈脂族醇，包括(但不限於)甲醇、乙醇、丙醇或丁醇，沈積於兩相磷酸鈣/羟基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料之燒結CAP核之外表面上的封閉的奈米晶HAP磊晶生長層之非均質外表面(其包含扁平晶體薄片之獨立團簇及其間之平滑區域)經包含扁平晶體薄片但不存在扁平晶體薄片之任何獨立團簇的均質粗糙外表面置換。均質粗糙外表面一般包含磊晶生長的奈米晶羟基磷灰石薄片，形成如藉由SEM所測定，獨立薄片尺寸為0.2至20 μm ，較佳0.5至5 μm 的薄片之互鎖網路，其視所用脂族醇之量而定。

【0049】 如藉由人類胎間葉幹細胞(hMSC)之成骨分化的活體外測試所示，具有包含扁平晶體薄片之均質粗糙外表面的兩相磷酸鈣/羟基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料的活體內成骨反應有可能要比EP-B1-2445543所教示的具有包含扁平晶體薄片之獨立團簇及其間之平滑區域的非均質外表面的兩相磷酸鈣/羟基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料強。

【發明內容】

【0050】 因此，本發明涉及一種兩相磷酸鈣/羟基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料，其包含燒結CAP核及封閉的奈米晶HAP磊晶生長層，該磊晶生長層沈積於燒結CAP核之外表面上，其中磊晶生長的奈米晶體具有與人類骨礦物質相同的尺寸及形態，其中沈積於燒結CAP核之外

表面上的封閉的奈米晶HAP磊晶生長層具有包含扁平晶體薄片之均質粗糙外表面。

【0051】 該兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料顯示增加之人類胎間葉幹細胞(hMSC)之成骨分化，其為經增強之活體內成骨反應之有力指標。

【0052】 術語沈積於燒結CAP核之外表面上的「封閉的奈米晶HAP磊晶生長層」意謂奈米晶HAP磊晶生長層完全覆蓋燒結CAP核之整個外表面。

【0053】 術語「包含扁平晶體薄片之均質粗糙外表面」意謂宏觀上，由扁平晶體薄片所引起的外表面之粗糙係以統計上均勻之方式分佈於CAP核之表面上，而不存在扁平晶體薄片之獨立晶簇。參見呈現本發明之兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料之原型3至原型7的SEM圖像的圖2，該等原型具有不同粗度之均質粗糙外表面。

【0054】 術語「扁平晶體薄片」意謂其中就三個垂直方向而言，高度(厚度)顯著小於寬度及長度之晶體總成。此類扁平晶體薄片在圖3B中清晰可見。

【0055】 一般而言，均質粗糙外表面包含磊晶生長的奈米晶羥基磷灰石薄片，形成如藉由SEM所測定，尺寸(寬度及長度)為0.2至20 μm 之薄片之互鎖網路。薄片尺寸愈大，外表面之粗度愈高。

【0056】 較佳地，均質粗糙外表面包含磊晶生長的奈米晶羥基磷灰石薄片，形成如藉由SEM所測定，尺寸為0.5至5 μm 之薄片之互鎖網路。

【0057】 通常，均質粗糙外表面包含磊晶生長的羥基磷灰石薄片，形成含有如藉由注汞孔隙率測定法(Mercury Intrusion Porosimetry；

MIP)所測定，在0.03與2 μm 之間的孔隙之互鎖網路。0.03與2 μm 之間的孔隙體積愈高，外表面之粗度愈高。

【0058】 通常，均質粗糙外表面可藉由原子力顯微法(AFM)表徵，其中經AFM導出之均方根粗糙度(R_q)在50至400 nm範圍內，且平均最大輪廓高度(R_z)在500至2000 nm範圍內。

【0059】 較佳地，均質粗糙外表面之特徵可為經AFM導出之均方根粗糙度(R_q)在110至150 nm範圍內，且平均最大輪廓高度(R_z)在550至750 nm範圍內。

【0060】 通常，如藉由XRD所量測，兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料中的HAP之百分比為1%至90%。

【0061】 較佳地，如藉由XRD所量測，百分比為1.5%至30%，更佳2%至15%。

【0062】 燒結CAP核包含磷酸三鈣(TCP)，尤其 α -TCP ($\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)或 β -TCP ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)及/或磷酸四鈣(TTCP) $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ 。

【0063】 根據一常用實施例，燒結CAP核基本上由TCP組成，較佳 α -TCP。

【0064】 奈米晶HAP磊晶生長層在結構上與天然人類骨礦物質幾乎相同。

【0065】 CAP/HAP骨替代材料可為微粒或顆粒，該等粒子或顆粒具有期望尺寸及形狀。一般而言，該等粒子或顆粒之尺寸為250至5000 μm ，較佳1000至2000 μm 。

【0066】 CAP/HAP骨替代材料亦可為成形體，例如，螺釘、釘子、銷釘或具有骨體部分(尤其諸如髖、鎖骨、肋骨、下頷骨或顱骨部分)之輪

廓的結構。此類螺釘、釘子或銷釘可在重建矯形外科中用於將韌帶固定於骨上，例如在膝蓋或肘關節中。具有骨體部分之輪廓的此類結構可在矯形外科手術中用作假體，用於置換缺失或缺損的骨或骨部分。

【0067】 本發明亦係關於一種骨泥(putty)，其包含處於適合基質中的上文所定義之CAP/HAP骨替代物之粒子或顆粒，該基質一般包含天然或合成聚合物。一般而言，該等粒子或顆粒之尺寸為250至5000 μm ，較佳1000至2000 μm 。

【0068】 本發明進一步係關於一種製備上文所定義之CAP/HAP骨替代材料之方法，其包含以下步驟：

- a) 製備燒結CAP核材料，
- b) 將燒結CAP核材料浸入處於10°C與50°C之間的溫度下的含有10%至90%短鏈脂族醇之緩衝溶液中，以開始CAP轉化為HAP之過程，藉此在燒結CAP核材料表面上將形成封閉的奈米晶羟基磷灰石之磊晶生長層，其中磊晶生長的奈米晶體具有與人類骨礦物質相同的尺寸及形態，其中形成在燒結CAP核材料表面上的封閉的奈米晶HAP磊晶生長層具有包含扁平晶體薄片之均質外表面，
- c) 藉由當存在至少一個HAP奈米晶層之封閉的塗層時，但在轉化過程完全結束之前，使固體材料與水溶液分離來終止轉化，及
- d) 視情況地，對來自步驟c)之分離材料進行滅菌。

【0069】 適合的短鏈脂族醇可選自由以下組成之群：甲醇、乙醇、丙醇及丁醇。

【0070】 較佳地，短鏈脂族醇為乙醇。

【0071】 較佳地，步驟b)之緩衝溶液含有20%至60%，更佳30%至

50%短鏈脂族醇。

【0072】 沈積於燒結CAP核之外表面上的封閉的奈米晶HAP磊晶生長層之均質粗糙外表面的粗度參數，尤其

- AFM參數：經AFM導出之均方根粗糙度(R_q)及平均最大輪廓高度(R_z)，

- 如藉由SEM所測定的磊晶生長的奈米晶羥基磷灰石薄片之尺寸，及

- 如藉由MIP所測定的0.03與2 μm 之間的孔隙之體積

可宜由改變轉化溶液之緩衝溶液中的短鏈脂族醇之百分比來調整。

【0073】 該百分比愈高，經AFM導出之均方根粗糙度(R_q)及平均最大輪廓高度(R_z)愈低，如藉由SEM所測定的磊晶生長的奈米晶羥基磷灰石薄片之尺寸愈小，且如藉由MIP所測定的0.03與2 μm 之間的孔隙之體積愈小。

【0074】 含有10%至90%短鏈脂族醇的步驟b)之緩衝溶液係藉由將緩衝水溶液與不同量之短鏈脂族醇混合而獲得。選擇緩衝水溶液，以使得進一步含有10%至90%短鏈脂族醇的步驟b)之浸入溶液之pH值接近中性且在整個轉化過程中保持穩定，較佳在5.5至9.0之pH範圍內，更佳7.0至8.0。

【0075】 緩衝液可為處於上述pH範圍內之任何緩衝液，但較佳為具有或不具有鈣、鎂及/或鈉之磷酸鹽緩衝液。

【0076】 適合緩衝溶液為例如pH值為7.3至7.6之0.05至0.3 M磷酸二氫鈉(NaH_2PO_4)水溶液。

【0077】 步驟b)中之溫度範圍一般介於10°C與50°C之間，較佳25°C與

45°C 之間，更佳35°C 與40°C 之間。

【0078】 較佳地，步驟b)在35°C 至40°C 之溫度下在含有20%至60%短鏈脂族醇之pH 7.0至8.0之磷酸鹽緩衝溶液中進行。

【0079】 燒結CAP核材料之製備可藉由此項技術中已知之方法進行，該等方法包含：首先混合磷酸氫鈣(CaHPO_4)、碳酸鈣及/或氫氧化鈣之粉末，隨後在適當溫度範圍內煅燒且燒結混合物，藉此得到塊狀燒結CAP核材料(參見例如，Mathew M.等人, 1977, Acta. Cryst. B33: 1325；Dickens B.等人, 1974, J. Solid State Chemistry 10, 232；及Durucan C.等人, 2002, J. Mat. Sci., 37:963)。

【0080】 塊狀燒結TCP核材料由此可藉由按化學計量比混合磷酸氫鈣(CaHPO_4)、碳酸鈣及/或氫氧化鈣之粉末，在1200°C 至1450°C 範圍內，較佳約1400°C 之溫度下煅燒且燒結混合物來獲得。

【0081】 塊狀燒結TTCP核材料亦可藉由上述方法獲得。

【0082】 藉由此類方法製備之塊狀燒結CAP材料可為多孔的，其具有2至80體積%之孔隙率及廣泛孔隙分佈。孔隙率參數將根據CAP/HAP骨替代材料之預期應用來選擇。

【0083】 步驟b)中所用之燒結CAP核材料可為

- 如上文所述製備之塊狀燒結CAP核材料，
- 藉由使用諸如壓碎、研磨及/或銑削以及篩分之習知方法，由如上文所述製備之塊狀燒結CAP核材料獲得的燒結CAP核材料之微粒或顆粒，或
- 具有期望形狀及尺寸之燒結CAP核材料預成型坯，例如螺釘、釘子、銷釘或具有骨體部分之輪廓的結構。

【0084】 任何期望形狀及尺寸之此類預成型坯均可藉由使用熟知原型設計技術，諸如CNC銑削或3D打印(參見例如Bartolo P.等人，2008, Bio-Materials and Prototyping Applications in Medicine, Springer Science New York, ISBN 978-0-387-47682-7；Landers R.等人，2002, Biomaterials 23(23), 4437；Yeong W.-Y.等人，2004, Trends in Biotechnology, 22 (12), 643；及Seitz H.等人，2005, Biomed. Mater. Res. 74B (2), 782)，由如上文所述製備的塊狀燒結核材料獲得。

【0085】 浸入步驟b)在第一階段中誘導CAP核材料之一級相變，且因此誘導HAP奈米晶體前驅體之成核作用。在第二階段期間，由第一階段得到之HAP前驅體將生長且形成封閉(亦即完全塗佈)的磊晶奈米晶複合層。第一HAP奈米晶體層必須為均一且封閉的且與燒結CAP核材料磊晶連接。

【0086】 在第三階段期間，一級相變可在新近形成之雙層複合物中繼續進行，以進一步將燒結CAP核材料(TCP或TTCP)轉化為奈米晶HAP。在此第三相變步驟期間，鈣離子將藉由緩慢擴散受控過程釋放持續一定可控時間，直至燒結CAP核材料之一部分已轉化成奈米晶HAP。HAP層厚度及因此鈣釋放比率可藉由改變轉化時間來控制。

【0087】 適當厚度之磊晶生長的奈米晶HAP層將活體外製備，CAP至HAP之轉化在其完成之前停止。

【0088】 一旦CAP/HAP骨替代材料經活體內安置，將藉由與體液接觸再啟動CAP轉化為HAP之過程，且骨替代材料將充當類活體系統，形成尺寸及形態類似於人類骨礦物質的新型羟基磷灰石。

【0089】 在活體內相變過程中，所輸送的鈣離子將釋放至局部環境

中，以支持局部鈣均衡，此對於骨再生過程至關重要且為有益的。

【0090】 由於不同負荷之身體區域中的骨骼缺損之再生時間有所不同，因此鈣釋放速率可受控制是至關重要的。此可藉由改變羥基磷灰石磊晶生長層之厚度來達成。

【0091】 因此步驟c)為非常關鍵之步驟。在步驟b)之水溶液中之暴露時間係基於HAP層之期望厚度。需要至少一個磊晶定向的奈米晶HAP層。CAP至HAP之轉化沒有完成是必需的。

【0092】 根據期望厚度的適當暴露時間可藉由使用熟習磷酸鈣及膠結劑及凝結物化學技術者熟知的若干熱力學微分方程式來計算。

【0093】 參見例如：Pommersheim, J.C.; Clifton, J.R. (1979) Cem. Conc. Res.; 9:765；Pommersheim, J.C.; Clifton, J.R. (1982) Cem. Conc. Res.; 12:765；及Schlüssler, K.H. Mcedlov-Petrosjan, O.P.; (1990): Der Baustoff Beton, VEB Verlag Bauwesen, Berlin。

【0094】 將上述微分方程式之方案轉移至CAP/HAP系統使得能夠預測CAP至HAP之相變及層厚度，使得可以穩定且可重複方式製備HAP磊晶層。

【0095】 通常藉由使用此項技術中熟知之技術進行過濾及乾燥來使固體材料與水溶液分離。

【0096】 視情況選用之滅菌步驟d)可藉由此項技術中熟知之技術，諸如 γ 照射或X射線輻射進行。

【0097】 本發明亦涉及上文所定義之CAP/HAP骨替代材料在人類或動物中之缺損部位處作為支持骨形成、骨再生、骨修復及/或骨置換之植入物或假體之用途，其一般呈微粒、骨泥或成形體形式。

【0098】 本發明亦係關於一種促進人類或動物中之缺損部位處的骨形成、骨再生及/或骨修復之方法，其係藉由植入一般呈微粒、骨泥或成形體形式的上文所定義之CAP/HAP骨替代材料。

【0099】

本發明之CAP/HAP骨替代材料之優點及其製備方法.

相較於EP-B1-2445543所教示的具有包含扁平晶體薄片之獨立團簇及其間之平滑區域的非均質外表面的兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料，具有包含扁平晶體薄片之均質粗糙外表面的本發明之兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料顯示增加之人類胎間葉幹細胞(hMSC)之成骨分化，尤其較高之分化標記物骨橋蛋白(OPN)及骨鈣化素(OCN)之表現。此為經增強之活體內成骨反應之有力指標。

【0100】 此 與 由R.A. Gittens等 人 在Biomaterials 2011年5月, 32(13): 3395-3403中所公佈之結果一致，該文獻顯示，引入與微尺度-次微尺度粗糙度組合之奈米尺度結構會改良成骨細胞分化及局部因子產生，其反過來指示經改良之活體內植入物骨整合之潛力。

【0101】 本發明之兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料之製備方法允許以適宜方式調整沈積於燒結CAP核之外表面上的封閉的奈米晶HAP磊晶生長層之均質粗糙外表面之粗度參數，尤其

- AFM參數：經AFM導出之均方根粗糙度(R_q)及平均最大輪廓高度(R_z)，
- 如藉由SEM所測定的磊晶生長的奈米晶羥基磷灰石薄片之尺寸，及
- 如藉由MIP所測定的0.03與2 μm 之間的孔隙之體積，

所述方法係藉由調整轉化溶液之緩衝溶液中的短鏈脂族醇之百分比。

【0102】 該百分比愈高，經AFM導出之均方根粗糙度(R_q)及平均最大輪廓高度(R_z)愈低，如藉由SEM所測定的磊晶生長的奈米晶羧基磷灰石薄片之尺寸愈小，且如藉由MIP所測定的0.03與2 μm 之間的孔隙之體積愈小。

【圖式簡單說明】

【0103】 參照本發明之較佳實施例之說明性實例及隨附圖式在下文中將對本發明予以進一步詳細描述，在圖式中：

圖1A呈現具有30分鐘之轉化時間的EP-B1-2445543所揭示且在實例1中製備的骨替代材料之原型1 (1至2 mm顆粒)的SEM圖像，其中如藉由SEM所量測，平滑區域佔總外表面之約70%。

圖1B呈現具有40分鐘之轉化時間的EP-B1-2445543所揭示且在實例1中製備的骨替代材料之原型2 (1至2 mm顆粒)的SEM圖像，其中如藉由SEM所量測，平滑區域佔總外表面之約50%。

圖2A至圖2E呈現根據本發明之骨替代材料的原型3 (圖2A)：20%乙醇，1至2 mm顆粒)，原型4 (圖2B)：30%乙醇，1至2 mm顆粒)，原型5 (圖2C)：40%乙醇，1至2 mm顆粒)，原型6 (圖2D)：50%乙醇，1至2 mm顆粒)及原型7(圖2E)：60%乙醇，1至2 mm顆粒)的SEM圖像。

圖1及圖2A至圖2E之所有SEM圖像的放大倍數均為3500。

圖3A呈現在低放大倍數(1000 $\times$)下，原型5 (40%乙醇，1至2 mm顆粒)之截面的SEM圖像。右下角顯示顆粒之外表面，且顆粒之中心位置朝向左上角。

圖3B呈現在較高放大倍數(14'000 ×)下，原型5 (40%乙醇，1至2 mm 顆粒)之截面的SEM圖像。

圖4呈現實例2中製備的根據本發明之骨替代材料之無孔盤片的原型3a (左：20%乙醇)及6a (右：50%乙醇)之SEM圖像(兩個上圖)及AFM圖像(其他四個圖像)。

圖5A至圖5B呈現活體外測試中，與先前技術骨替代材料相比，與根據本發明之骨替代材料接觸之人類胎間葉幹細胞(hMSC)的骨鈣化素(OCN，圖5A)及骨橋蛋白(OPN，圖5B)反應。

圖6呈現實例2中製備的根據本發明之骨替代材料之1至2 mm顆粒的原型3 (20%乙醇)、原型5 (40%乙醇)及原型7 (60%乙醇)及如實例1中所述產生的純 α -TCP之1至2 mm顆粒的MIP圖式。

【實施方式】

【0104】

相關申請案之交叉引用

本申請案主張於2017年12月14日申請之歐洲專利申請案第17207235.7號之優先權，該申請案之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【0105】 以下實例說明本發明，但並不限制其範疇。

【0106】

實例1 根據EP-B1-2445543之兩相磷酸鈣/羟基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料的製備。

類似於EP-B1-2445543之實例1、實例2及實例4，製備 α -TCP之塊狀燒結材料、其粒度為1.0至2.0 mm之多孔顆粒及具有磊晶生長HAP塗層之轉化顆粒。

【0107】 使用實驗室用攪拌器以700 rpm使364 g磷酸二鈣無水粉末、136 g碳酸鈣粉末及220 ml去離子水混合持續5分鐘。緊接著將來自混合過程之漿液轉移至高溫穩定之鉑杯中。將經填充之鉑杯置放於低溫熔爐中。藉由使用每小時100℃之加熱速率將熔爐加熱至1400℃。保持此溫度12小時，且之後，以每小時500℃之冷卻速率將熔爐冷卻至800℃，隨後以每小時125℃之冷卻速率冷卻至300℃，且最後藉由關掉熔爐冷卻至室溫。自熔爐及鉑杯移除塊狀燒結材料(相純 α -Ca₃(PO₄)₂)。使用粉末X射線繞射分析進行相純度之控制。

【0108】 半製品藉由使用顎式破碎機(jaw crusher) (鄂部距離在10至1 mm間變化)進行破碎。藉由使用篩分機及網孔為2 mm及1 mm之篩網插入件來篩分所產生之顆粒。篩分之後，用乙醇沖洗顆粒以分離吸附至顆粒之精細粉末殘餘物。在80℃下在乾燥櫥中乾燥多孔顆粒1小時。沖洗之後的粒子表面之清潔度使用掃描電子顯微術進行表面觀測來控制。

【0109】 藉由將0.4 mol/l磷酸二氫鈉(NaH₂PO₄)溶解於蒸餾水中來製備適用於塗佈及相變過程之緩衝溶液。在室溫下藉由使用氫氧化鈉(NaOH)將溶液之pH調節至7.45。將根據先前段落產生之顆粒浸入所製得之溶液中且在充分回火之水浴(40℃)中分別儲存30分鐘(原型1)及40分鐘(原型2)。浸入之後，用蒸餾水沖洗顆粒3次以終止相變過程且自緩衝溶液移除殘餘物。在100℃下在乾燥櫥中乾燥多孔顆粒2小時。

【0110】 對原型1及原型2之顆粒進行放大倍數為3500×之SEM。

【0111】 如呈現原型1及原型2之SEM圖像之圖1A及圖1B所顯而易見，顆粒之外表面為非均質的，該外表面包含由磊晶生長的HAP奈米晶體組成之扁平晶體薄片之獨立(分離)團簇及該等晶體之間的平滑區域。

【0112】藉由量測原型1及原型2中之每一者的SEM圖像上獨立團簇及平滑區域所佔據之表面，測定出對於原型1，平滑區域佔外表面之約70%，且對於原型2，平滑區域佔外表面之約50%。

【0113】

實例2 根據本發明之兩相磷酸鈣/羟基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料的製備.

1)骨替代材料之顆粒之製備

如以上實例1中所述產生經大小設定之1至2 mm相純 α -TCP之多孔顆粒。

【0114】在置放於設定呈40°C之水浴中的玻璃燒瓶中進行相變及塗佈步驟。轉化緩衝液為與不同比例之乙醇混合的磷酸二氫鈉(NaH_2PO_4)之水溶液。磷酸二氫鈉水溶液之莫耳濃度在0.05 M與0.3 M之間變化且乙醇含量在20 w/w%與60 w/w%之間。轉化溶液之pH在7.3與7.6之間。

【0115】用轉化緩衝液及 α -TCP顆粒填充玻璃燒瓶，以1:40與1:80(顆粒與轉化溶液)之間的比率添加。在40°C下將顆粒浸入轉化溶液中持續24小時與72小時之間的時段。浸入之後，用去離子水(就重量而言，顆粒與水比率為1:10)沖洗顆粒5次，且用乙醇(99.9%，就重量而言，顆粒與乙醇比率為1:10)沖洗2次，以終止相變過程且自緩衝溶液移除殘餘物。在100°C下在乾燥櫥中乾燥多孔顆粒2小時。

【0116】使用SEM觀測塗佈及相變過程之後的表面形態。

【0117】圖2呈現具有3500 ×放大倍數的根據本發明之骨替代材料之原型3 (20%乙醇)、原型4 (30%乙醇)、原型5 (40%乙醇)、原型6 (50%乙醇)及原型7 (60%乙醇)的SEM圖像。藉由比較圖1A及圖1B與圖2可看

出，原型1及原型2之具有扁平晶體薄片之獨立團簇及其間之平滑區域的非均質外表面經不存在任何獨立晶簇之均質粗糙外表面置換。均質粗糙外表面建立磊晶生長的羥基磷灰石薄片之互鎖網路。如由SEM分析所觀測，藉由增加轉化溶液中之乙醇含量，獨立薄片尺寸降低，由此降低外表面之粗度或粗糙度。

【0118】 圖3A呈現在低放大倍數(1000 ×)下，原型5 (40%乙醇，1至2 mm顆粒)之截面的SEM圖像。右下角顯示顆粒之外表面，且顆粒之中心位置朝向左上角。

【0119】 圖3B呈現在較高放大倍數(14'000 ×)下，原型5 (40%乙醇，1至2 mm顆粒)之截面的SEM圖像，在該圖中，吾人可清楚地看到，呈粗糙表面之構建塊的獨立扁平晶體薄片。顆粒中心處之粗糙外表面與顆粒之外表面上的粗糙外表面之間沒有差異。

【0120】

藉由注汞孔隙率測定法(MIP)測定孔隙尺寸分佈

使用注汞孔隙率測定法(MIP)測定顆粒之孔隙尺寸分佈。MIP為用於測定多孔材料之孔隙尺寸分佈的標準表徵技術。該技術為此項技術中熟知的且例如描述於Gregg, S. J.及Sing, K.S.W., Adsorption, Surface Area and Porosity, 第2版, Academic Press Inc. (1982), 173-190中。

【0121】 圖6呈現與純 α -TCP (根據實例1產生及原型3、原型5及原型7之核材料)相比，根據本發明之骨替代材料的原型3、原型5及原型7之MIP圖式。所有量測均使用1至2 mm顆粒進行。

【0122】 可看出，由於純 α -TCP樣本之平滑表面，其不具有在0.03至2 μm 範圍內之任何孔隙。由於建立磊晶生長的羥基磷灰石薄片之互鎖

網路的均質粗糙外表面之多孔性質，所有根據本發明之骨替代材料均含有在0.03至2 μm 範圍內之孔隙。對應於0.03至2 μm 範圍內的MIP曲線下面積的粗糙外表面之孔隙體積視互鎖網路之獨立薄片尺寸而定。獨立薄片愈大，所包括的互鎖網路之孔隙體積愈高。因此，所包括的互鎖網路之孔隙體積可與表面粗度直接相關。MIP圖式中在0.03至2 μm 範圍內的孔隙體積愈高，表面粗度愈高。原型3具有所示原型之0.03至2 μm 範圍內之最大孔隙體積(曲線下面積)，繼之以原型5及原型7。在圖2A至圖2E中經SEM分析確認，原型之粗度自原型3降至原型5及原型7。

【0123】

2)骨替代材料之無孔盤片之製備

在20小時內以150 rpm用行星式銑削機(planetary mill)銑削如以上實例1中所述產生的1至2 mm經大小設定之相純 α -TCP顆粒，以獲得精細粉末。將精細粉末裝填於壓模中，且用手動壓力機以1噸之負荷壓實。自模移除生坯且轉移至高溫熔爐。藉由使用每小時250°C之加熱速率將熔爐加熱至1450°C。保持此溫度24小時，且之後，以每小時500°C之冷卻速率將熔爐冷卻至800°C，且隨後以每小時150°C之冷卻速率冷卻至室溫。自熔爐移除塊狀燒結無孔材料(相純 α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)。使用粉末X射線繞射分析進行相純度之控制且藉由使用SEM分析表面特徵。

【0124】 如上文在1)下所述進行所製得之盤片的相變及塗佈，唯一不同之處在於 α -TCP與轉化溶液之重量比為1至3.5。

【0125】 由此製備根據本發明之骨替代材料之原型3a (20%乙醇)及6a (50%乙醇)。

【0126】 使用SEM觀測塗佈及相變過程之後的表面形態。使用原子

力顯微法(AFM)測定對應粗糙度參數。

【0127】 圖4中之SEM影像證實，無孔盤片之均質粗糙外表面之形態與伴隨根據實例2第1段落之對應乙醇含量產生的顆粒之粗糙外表面具有一致性(原型3與原型3a及原型6與原型6a)。

【0128】

原子力顯微法(AFM)

使用原子力顯微法(TT-AFM，AFM Workshop)以輕敲模式評估奈米尺度表面量測。在環境氛圍下使用直徑為11 mm且高度為1 mm之無孔圓柱形盤片進行AFM分析。使用190千赫茲之共振頻率及至多10 nm之尖端半徑。在50 μm × 50 μm區域內進行各AFM分析且每組掃描三個樣本。藉由施用數值校正對原始資料進行平面調平以移除傾斜，且使用Gwyddion軟體測定均方根粗糙度(R_q)及平均最大輪廓高度(R_z)的平均值。

【0129】 表面之類似表面表徵例如描述於US-2013-0045360-A1中。

【0130】 圖4呈現根據本發明製備之無孔盤片的原型3a (20%乙醇，左側)及原型6a (50%乙醇，右側)之AFM圖像。原型3a及原型6a之經AFM導出之粗糙度值可見於下表1中。

表1

原型3a及原型6a之經AFM導出之粗糙度值.

	R _q [nm]	R _z [nm]
原型3a (20%乙醇)	237 ± 31	1391 ± 194
原型6a (50%乙醇)	130 ± 13	630 ± 82

【0131】 如表1中所見，藉由將乙醇含量自20%增加至50%，均方根粗糙度(R_q)之均值自237 nm降至130 nm，且平均最大輪廓高度(R_z)自1391 nm降至630 nm。

【0132】

實例3 人類胎間葉幹細胞(hMSC)之成骨分化之活體外測試.

為了評定實例1及實例2中製備的骨替代材料原型是否支持成骨分化，將自22週妊娠之後的人類胎股骨分離之約200'000個hMSC(可購自ScienCell：目錄號7500，批號6890)接種於320 mg彼等骨替代材料原型之顆粒上且培養三週。培養之前七天，使用市售hMSC擴增培養基(MSCM培養基，目錄號7501，ScienCell)來最佳地支持細胞增殖。對於之後的14天，將培養基改為補充有10% FBS及青黴素/鏈黴素之DMEM。未向細胞培養基添加額外成骨劑。在三週hMSC培養之後，分離總mRNA，轉錄於cDNA中且進行即時定量PCR。ΔΔCT方法(參見Livak K.J.及Schmittgen T.D., Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method, 2001, Methods 25, 第402-408頁)使用GAPDH作為管家基因計算基因表現。針對實例1及實例2中製備的呈顆粒狀形式(1至2 mm)的所有骨替代材料原型量測成骨分化標記物骨橋蛋白(OPN)及骨鈣化素(OCN)之表現。

【0133】 彼等量測顯示，實例2之根據本發明之骨替代材料原型的成骨分化標記物OPN及OCN之表現要明顯高於實例1之先前技術骨替代材料原型之OPN及OCN之表現(參見圖5A至圖5B)。

【0134】 基於此活體外結果，將期望活體內根據本發明之骨替代材料原型的經增強之成骨反應。

【0135】

實例4 本發明之兩相CAP/HAP骨替代材料之HAP奈米晶體與人類骨礦物質的晶體尺寸及形態之比較.

【0136】 如EP-B1-2445543中藉由使用X射線繞射資料之精確化，藉由對原型3之樣本及天然人類骨礦物質施用布拉格法(Bragg method)進行晶體尺寸分析。

【0137】 由此顯示，本發明之兩相CAP/HAP骨替代材料及人類骨礦物質具有相同形態及相同晶體尺寸。

【0138】 參見下表2。

表2

本發明之CAP/HAP骨替代物與人類骨礦物質的HAP晶體尺寸及形態之比較

晶體學軸 (六方空間群P6 ₃ /m)	生理溫度下製備的本發明之 CAP/HAP 晶體尺寸 ⁺ [nm]	天然人類骨礦物質 晶體尺寸 ⁺ [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

公告本

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料，其包含燒結CAP核及封閉的奈米晶HAP磊晶生長層，該磊晶生長層沈積於該燒結CAP核之外表面上，其中磊晶生長的奈米晶體具有與人類骨礦物質相同的尺寸及形態，其中沈積於該燒結CAP核之外表面上的該封閉的奈米晶HAP磊晶生長層，在放大倍數為3500X觀察時，具有均質的粗糙外表面，且其中該粗糙外表面包含扁平的磊晶生長的奈米晶HAP晶體薄片。

【第2項】

如請求項1之兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料，其中該粗糙表面包含磊晶生長的奈米晶羥基磷灰石薄片，形成藉由掃描電子顯微術(SEM)測定，獨立薄片尺寸為0.2至20 μm 的薄片之互鎖網路。

【第3項】

如請求項1之兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料，其中該粗糙表面包含磊晶生長的奈米晶羥基磷灰石薄片，形成藉由掃描電子顯微術(SEM)測定，獨立薄片尺寸為0.5至5 μm 的薄片之互鎖網路。

【第4項】

如請求項1至3中任一項之兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料，其中該均質粗糙外表面包含磊晶生長的羥基磷灰石薄片，形成含有藉由注汞孔隙率測定法(Mercury Intrusion Porosimetry；MIP)所測定，在0.03與2 μm 之間的孔隙之互鎖網路。

【第5項】

如請求項1至3中任一項之兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代

材料，其中該均質粗糙外表面以原子力顯微法(AFM)表徵，經AFM導出之均方根粗糙度 R_q 在50至400 nm範圍內，且平均最大輪廓高度 R_z 在500至2000 nm範圍內。

【第6項】

如請求項1至3中任一項之兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料，其中該均質粗糙外表面以原子力顯微法(AFM)表徵，經AFM導出之均方根粗糙度(R_q)在110至150 nm範圍內，且平均最大輪廓高度(R_z)在550至750 nm範圍內。

【第7項】

如請求項1至3中任一項之兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料，其中該燒結CAP核基本上由 α -TCP組成。

【第8項】

如請求項1至3中任一項之兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料，其中藉由X射線繞射(XRD)所量測，HAP之百分比為1.5至30重量%。

【第9項】

如請求項1至3中任一項之兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料，其為微粒或顆粒。

【第10項】

如請求項1至3中任一項之兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料，其為成形體。

【第11項】

一種骨泥(putty)，其含有處於合適的基質中的如請求項1至9中任一

項之兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料之顆粒。

【第12項】

一種製備如請求項1至10中任一項之CAP/HAP骨替代材料之方法，其包含以下步驟：

a) 製備燒結CAP核材料，

b) 在10℃與50℃之間的溫度下將該燒結CAP核材料浸入含有短鏈脂族醇之緩衝溶液中，以開始CAP轉化至HAP之過程，從而在該燒結CAP核材料表面上形成封閉的奈米晶羥基磷灰石之磊晶生長層，藉此該磊晶生長的奈米晶體具有與人類骨礦物質相同的尺寸及形態，其中形成於該燒結CAP核材料表面上的該封閉的奈米晶HAP磊晶生長層，在放大倍數為3500X觀察時，具有均質的粗糙外表面，且其中該粗糙外表面包含扁平的磊晶生長的奈米晶HAP晶體薄片，

c) 藉由當存在至少一個HAP奈米晶層之封閉的塗層時，但在該轉化過程完全結束之前，使固體材料與該水溶液分離來終止轉化，及

d) 視情況地，對來自步驟c)之經分離材料進行滅菌。

【第13項】

如請求項12之方法，其中該短鏈脂族醇為乙醇。

【第14項】

一種如請求項1之CAP/HAP骨替代材料之用途，其係用於製備在個體缺損部位處促進骨形成、骨再生及/或骨修復之製劑。

【第15項】

如請求項14之用途，其中該CAP/HAP骨替代材料呈顆粒形式。

【第16項】

如請求項14之用途，其中該CAP/HAP骨替代材料呈成形體形式。

【第17項】

一種骨泥之用途，其係用於製備在個體缺損部位促進骨形成、骨再生及/或骨修復之製劑，其中該骨泥含有處於聚合物基質中的如請求項1之兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料之顆粒。

【第18項】

一種如請求項1之CAP/HAP骨替代材料之用途，其係用於製備在個體缺損部位促進骨分化之製劑。

【第19項】

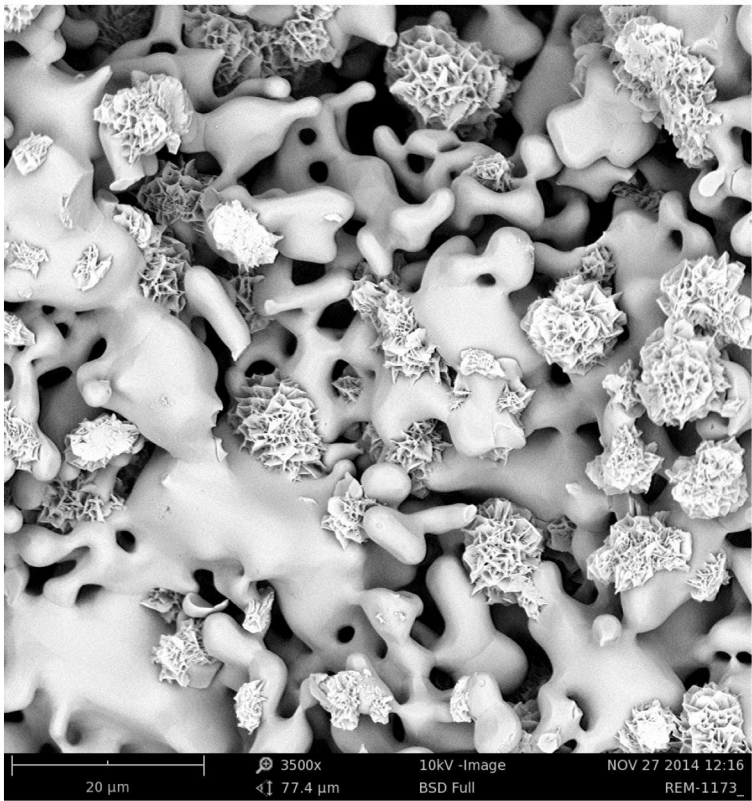
一種植入物，該植入物包含兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料，其包含燒結CAP核以及沈積於該燒結CAP核之外表面上的封閉的奈米晶HAP磊晶生長層，其中該磊晶生長的奈米晶體具有與人類骨礦物質相同的尺寸及形態，其中沈積於該燒結CAP核之外表面上的該封閉的奈米晶HAP磊晶生長層，在放大倍數為3500X觀察時，具有均質的粗糙外表面，且其中該粗糙外表面包含扁平的磊晶生長的奈米晶HAP晶體薄片，且其中該植入物具有適用於在缺損部位處支持骨形成、骨再生、骨修復和/或骨置換的形狀。

【第20項】

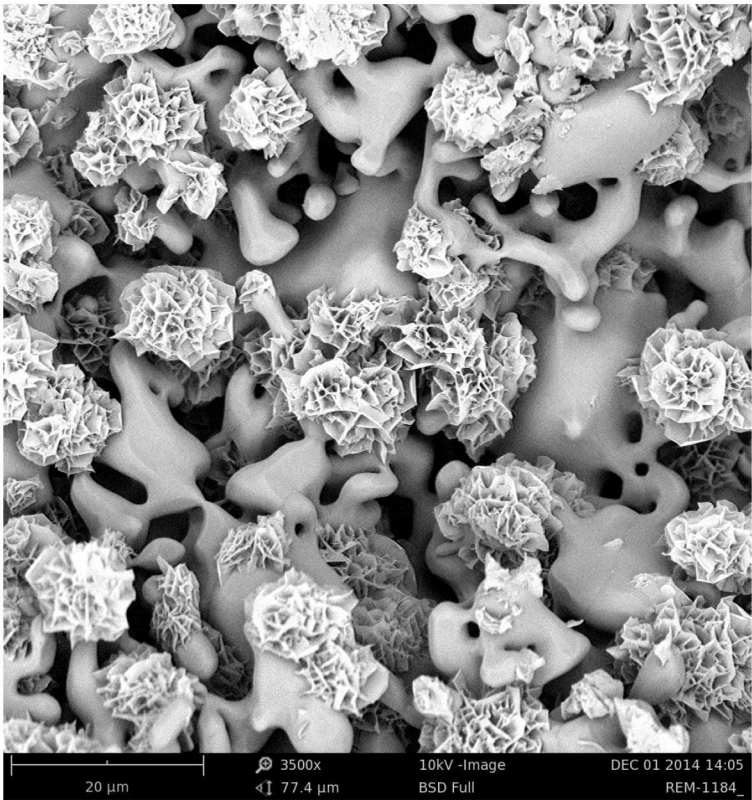
一種假體，該假體包含兩相磷酸鈣/羥基磷灰石(CAP/HAP)骨替代材料，其包含燒結CAP核以及沈積於該燒結CAP核之外表面上的封閉的奈米晶HAP磊晶生長層，其中該磊晶生長的奈米晶體具有與人類骨礦物質相同的尺寸及形態，其中沈積於該燒結CAP核之外表面上的該封閉的奈米晶HAP磊晶生長層，在放大倍數為3500X觀察時，具有均質的粗糙外表面，

且其中該粗糙外表面包含扁平的磊晶生長的奈米晶HAP晶體薄片，且其中該假體具有適用於在缺損部位處支持骨形成、骨再生、骨修復和/或骨置換的形狀。

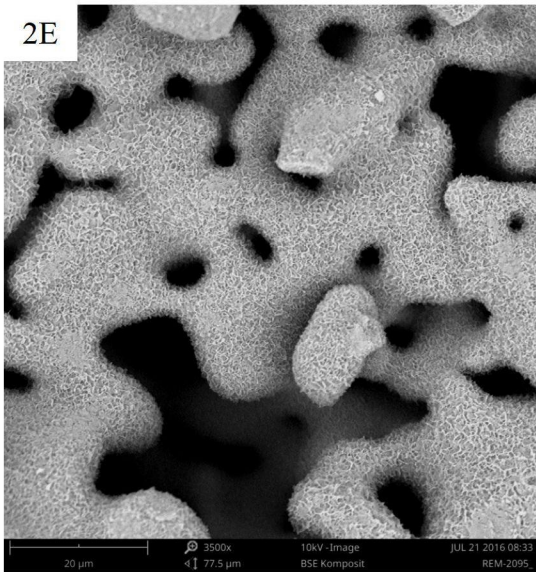
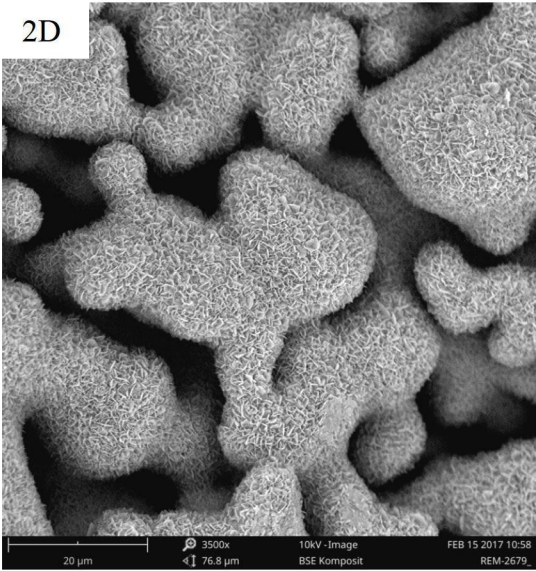
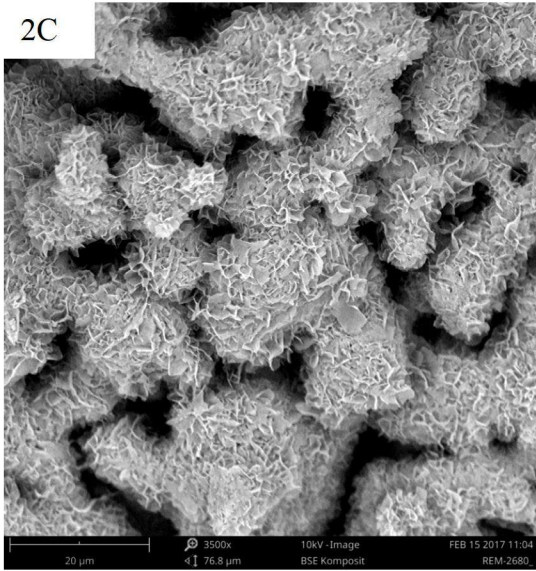
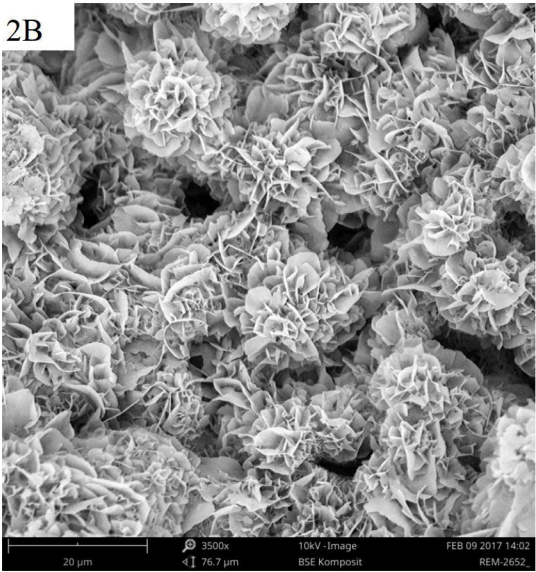
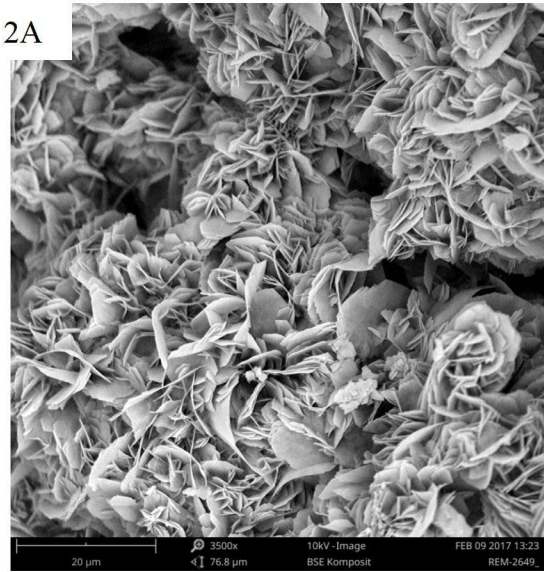
【發明圖式】



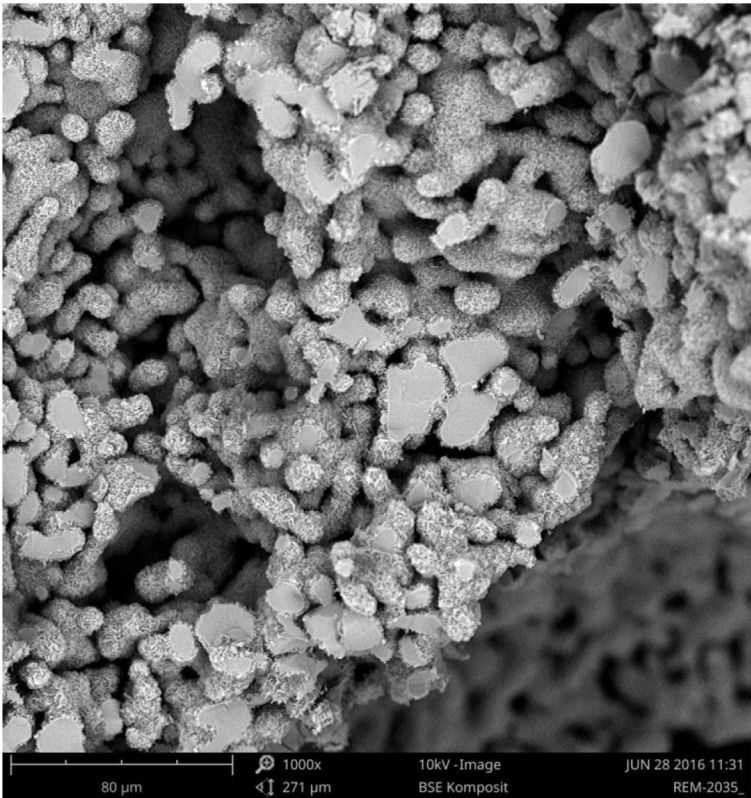
【圖1A】



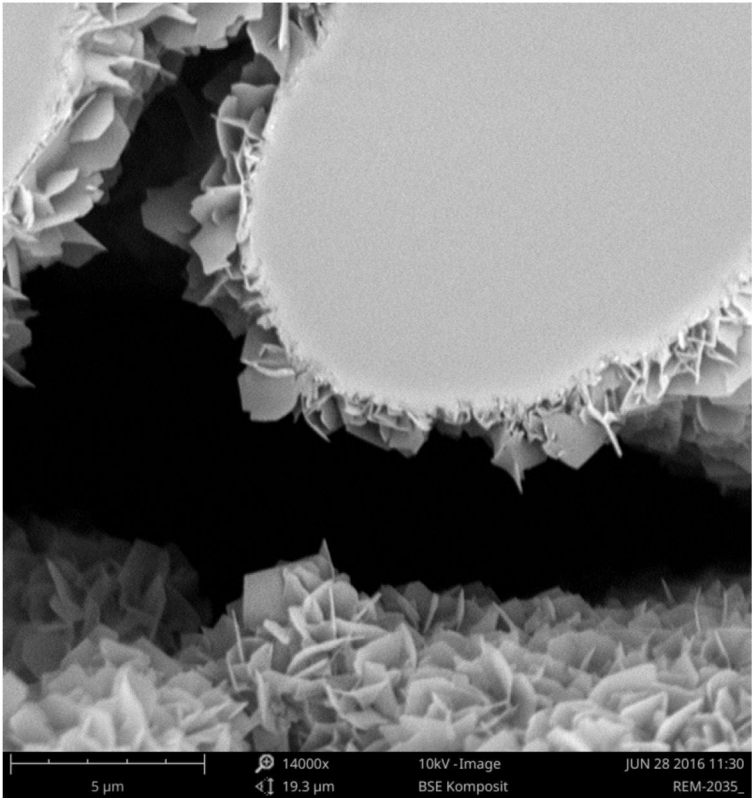
【圖1B】



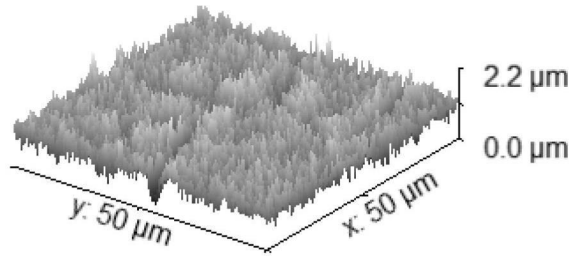
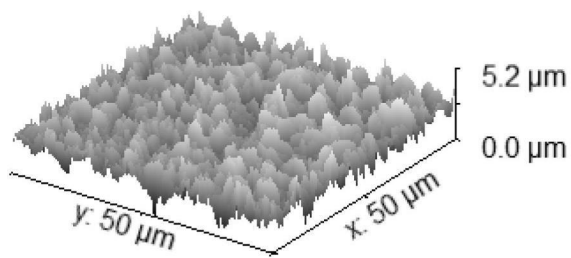
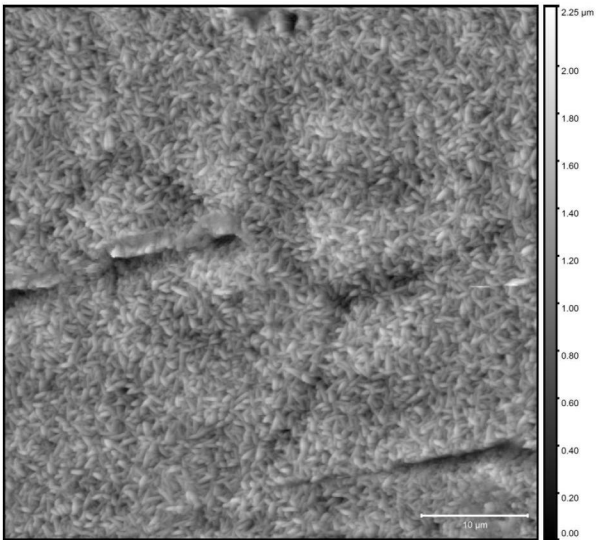
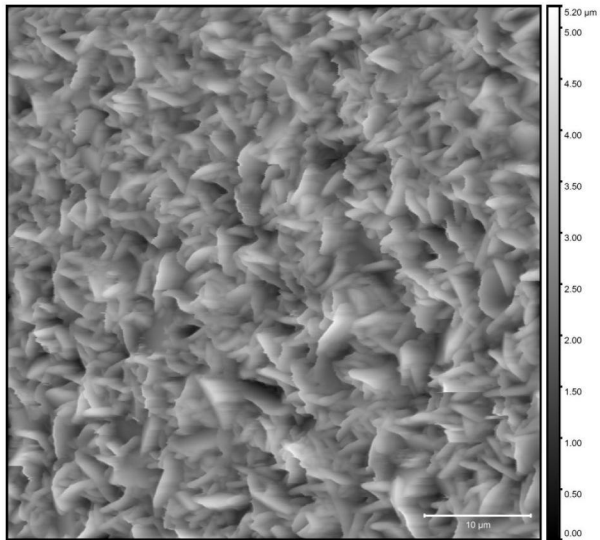
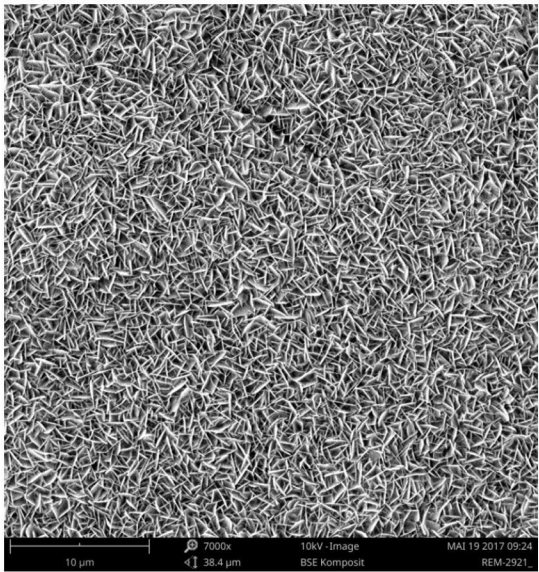
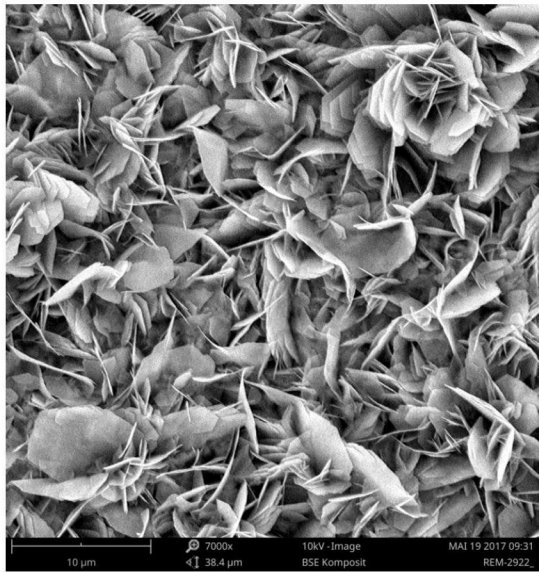
【圖2A-2E】



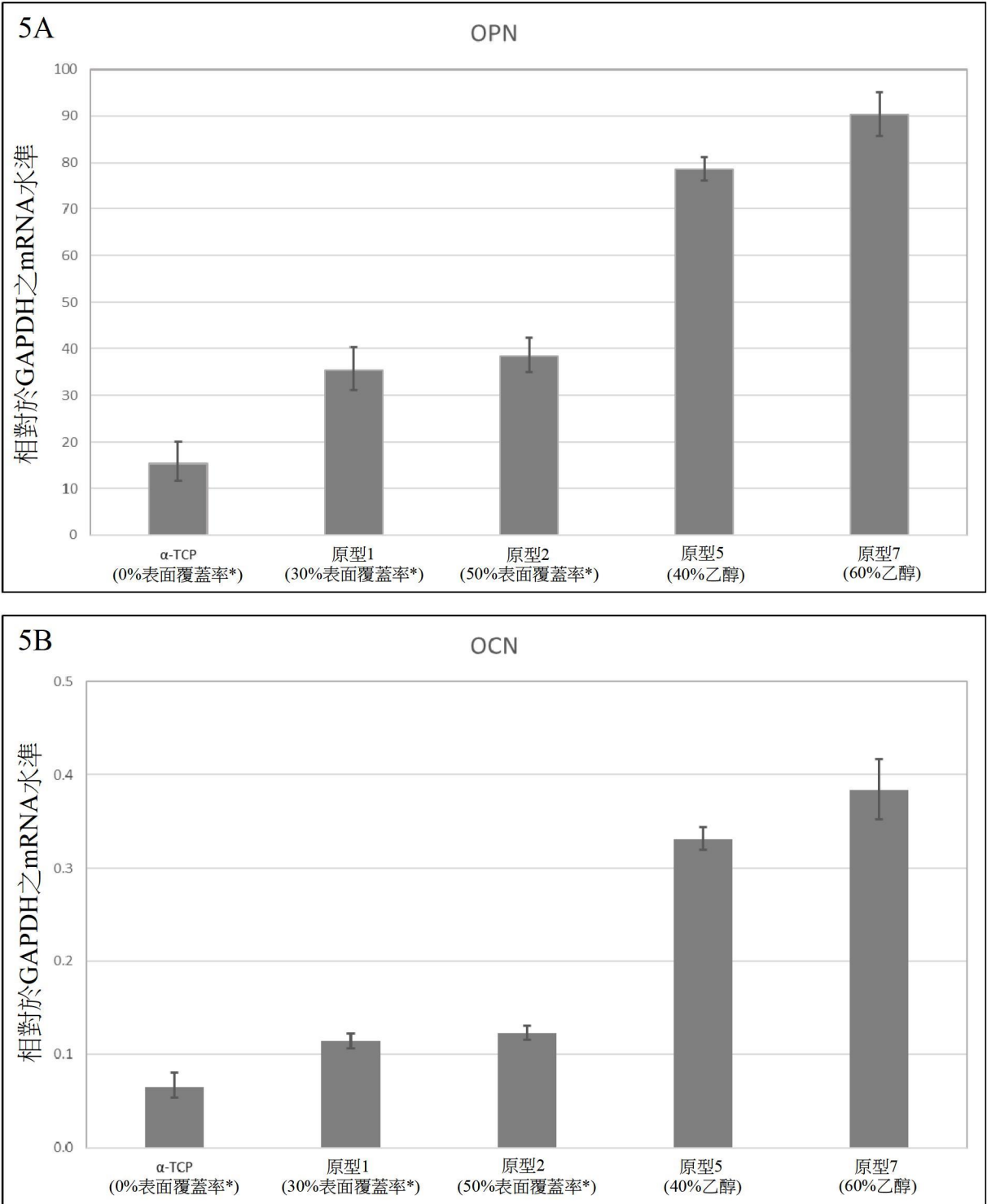
【圖3A】



【圖3B】

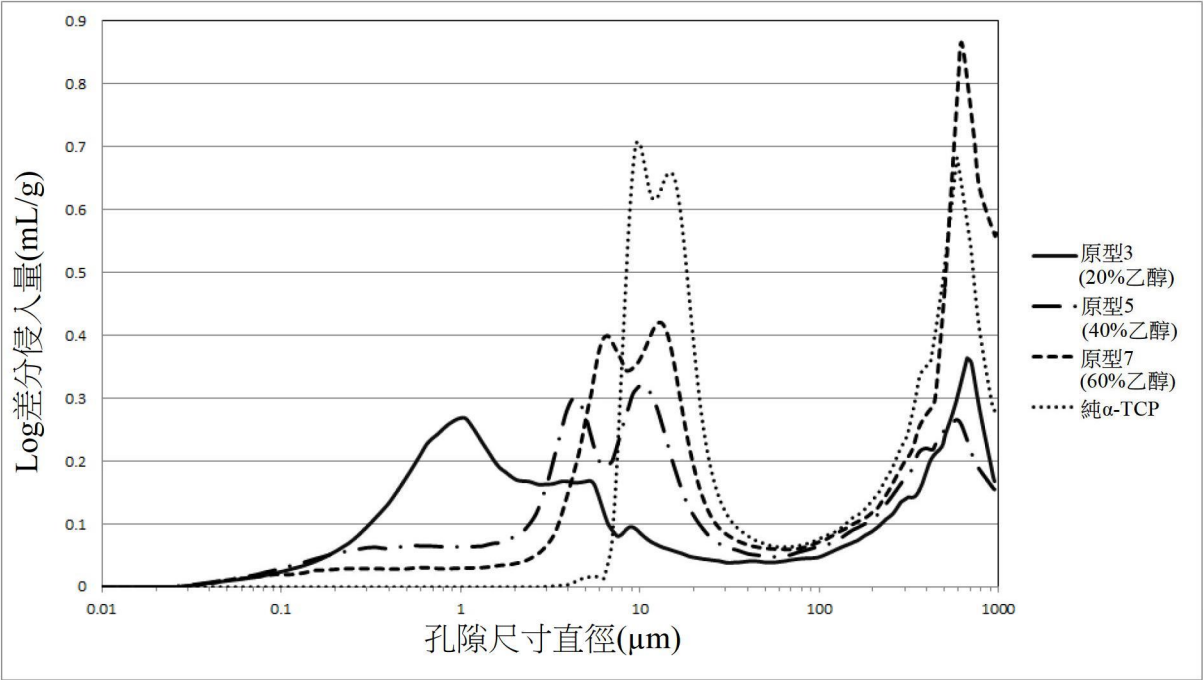


【圖4】



*如藉由SEM所量測，扁平晶體薄片之獨立團簇的表面覆蓋率

【圖5A-5B】



【圖6】