(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201890291 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2018.07.31

(22) Дата подачи заявки
2016.08.03

(51) Int. Cl. *A61L 27/12* (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)

(54) БОЛЬШИЕ ТРЕХМЕРНЫЕ КАРКАСЫ, ВЫПОЛНЕННЫЕ ИЗ АКТИВНОГО ГИДРОКСИАПАТИТА, ПОЛУЧЕННОГО БИОМОРФНЫМ ПРЕВРАЩЕНИЕМ ПРИРОДНЫХ СТРУКТУР, И СПОСОБ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

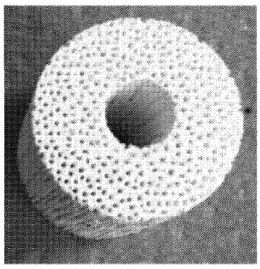
(31) **102015000042762; 102015000042834**
(32) **2015.08.06**
(33) **IT**
(86) **PCT/IB2016/054665**
(87) **WO 2017/021894 2017.02.09**

(71) Заявитель:
ГРИНБОУН ОРТО С.Р.Л. (IT)

(72) Изобретатель:
Тампиери Анна, Сприо Симоне, Руффини Андреа (IT)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В., Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев А.В. (RU)

(57) Изобретение относится к гидроксиапатиту, полученному из пористой древесины, обладающему высокой прочностью на сжатие и размерами, подходящими для клинических применений. Пористая древесина имеет пористость от примерно 60 до примерно 95%, причем указанная пористость измерена после подвергания древесины стадии пиролиза и выбрана из древесины ротанга, сосны, абаша, бальзы, сипо, дуба, палисандра, кемпаса и грецкого ореха. Гидроксиапатит может быть замещен одним или более ионами, такими как магний, стронций, кремний, титан, карбонат, калий, натрий, серебро, галлий, медь, железо, цинк, марганец, европий, гадолиний. Также предложен заменитель костной ткани, содержащий гидроксиапатит, полученный из пористой древесины. Заменитель костной ткани используют для замены и регенерации кости или части кости, предпочтительно для костей, подверженных механическим нагрузкам, таких как длинные кости ног и рук, предпочтительно большой берцовой кости, малой берцовой кости, бедренной кости, плечевой кости и лучевой кости. Изобретение также относится к способу изготовления биоморфного гидроксиапатитного каркаса из древесины.



201890291 A1

201890291 A1

Большие трехмерные каркасы, выполненные из активного гидроксиапатита, полученного биоморфным превращением природных структур и способ их получения

Область техники

Изобретение относится к гидроксиапатиту, полученному из пористой древесины, в частности, изобретение относится к биоморфному гидроксиапатитному каркасу, полученному из пористой древесины, для применения в качестве заменителя костной ткани. Изобретение также относится к способу превращения древесины в биоморфный гидроксиапатитный каркас, который можно использовать в качестве заменителя костной ткани.

Уровень техники

Современная керамическая технология и конструирование основаны на хорошо отработанной последовательности, обеспечивающей получение больших трехмерных изделий. Более конкретно, керамические фазы нового типа можно синтезировать в виде порошков, в которых конкретные признаки, такие как стехиометрия/ионные замещения, наноразмер и поверхностная активность отвечают за конкретные функциональные свойства. Керамическая технология, используемая в настоящее время для получения макроскопических трехмерных керамических изделий с надлежащей формой и пористостью, подразумевает тепловую обработку (спекание) синтезированных керамических порошков, сформованных подходящим образом в трехмерное изделие (для затвердевания изделия). Все эти стадии необходимы для получения трехмерной керамики с надлежащими физико-химическими и механическими свойствами, большая часть из которых ухудшается в течение вышеупомянутой технологической обработки керамики (в особенности спекания). Серьезные ограничения в разработке функционального керамического материала, связанные с современной керамической технологией, препятствуют дальнейшему прогрессу в данной области.

В настоящее время, с развитием современного общества, технологичные продукты играют постоянно возрастающую роль в жизни и производительности

людей, так что существует сильная потребность в интеллектуальных средствах, способных обеспечить решения для сложных и индивидуальных требований в различных областях применения, например, здоровье, экология, энергия. Поэтому существует широкое согласие, что требуются новые подходы для повторяемого и массового производства макроскопических устройств со сложной структурной организацией в макромасштабе, однако, в то же время, со сложной структурой, определенной в наномасштабе, и даже в кристаллическом масштабе. Такие макро- и наноструктуры имеют значение для возникновения нетривиальных, интеллектуальных функциональных эффектов.

Что касается вышеупомянутых проблем, относящихся к керамическим материалам, требуется изменение парадигмы, чтобы разработать большую высокоактивную керамику со сложными микро- и макроструктурами.

Каркасы костной ткани, с особой направленностью на регенерацию больших несущих нагрузку дефектов кости, можно принять в качестве характерного примера, так как они должны быть пористой трехмерной керамикой с высокой биоактивностью, чтобы их могли колонизировать клетки, и они могли окончательно регенерировать большие дефекты кости. В самом деле, до настоящего времени не было найдено никаких надлежащих решений этой клинической потребности.

В течение многих десятилетий гидроксиапатит ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) признавали как первичный материал для образования каркаса костной ткани, так как он имеет близкое сходство с минеральным составом костной ткани и показывал превосходную биосовместимость и остеокондуктивность. Однако биомимикрия гидроксиапатита относится к его наноразмеру и присутствию множества ионов, частично замещающих кальций и фосфат в решетке апатита, которые являются источником биологической активности костной ткани в течение образования новой ткани, ремоделирования и рассасывания костной ткани.

Применение спекания к гидроксиапатитным каркасам активирует поверхность и объемные реакции на границе раздела между прилегающими зернами гидроксиапатита, что обеспечивает кристаллическое упорядочивание с удалением посторонних ионов из решетки апатита и соединение зерен вплоть до нескольких микрометров с уменьшением удельной поверхности, гидрофильности и сродства с белками и клетками.

Экстенсивное соединение зерен, активированное спеканием, обеспечивает упрочнение всего гидроксиапатитного изделия посредством уменьшения межзеренной пористости и, в свою очередь, общего объема. Это также вызывает остаточные напряжения, которые являются одними из основных источников структурных дефектов в керамических материалах. В самом деле, ослабление остаточных напряжений в керамических материалах является сложным в силу их высокой жесткости (по сравнению с металлами и полимерами) и является одним из наиболее значительных факторов, ухудшающих механические характеристики керамических материалов, в особенности в случае больших изделий, характеризующихся сложной формой и пористыми структурами, в которых изменения объема, вызванные циклами нагревания/охлаждения, легко вызывают критическое повреждение структуры.

По указанным выше причинам классический способ керамического синтеза не обеспечивает производства керамических материалов, в частности гидроксиапатитов, обладающих биомиметическим составом и структурой, высокой биоактивностью и способностью к рассасыванию костной ткани. Это особенно справедливо, когда синтезируют большие пористые трехмерные керамические изделия для регенерации дефектов кости критического размера (то есть ≥ 2 см).

Биомиметические состав и структура имеют ключевое значение для возникновения регенеративного каскада in vivo, который может однозначно определить регенерацию и способствовать регенерации больших несущих нагрузку частей кости, таких как длинные трубчатые кости конечностей. Эти явления, которые тесно взаимосвязаны и должны происходить синергетично для активирования и поддержания регенерации кости со всеми ее функциями, представляют собой: i) быстрые остеогенезис, остеопроводимость и остеоинтеграцию, ii) экстенсивное образование кровеносных сосудов, iii) способность к прогрессивному биологическому рассасыванию костной ткани.

Быстрый остеогенезис и остеопроводимость обеспечивают экстенсивное образование костной ткани и проникновение в каркас, что таким образом приводит к плотной поверхности раздела кости и каркаса и оптимальной остеоинтеграции. Для достижения этих эффектов требуются химический состав, подобный костной ткани, а также широко открытая и взаимосвязанная пористость, так чтобы помимо экстенсивного проникновения новой костной ткани можно было достичь

одновременного образования сосудистой сети, способствующей образованию и созреванию новой костной ткани. Неполная колонизация каркаса может привести к образованию полостей, волокнистых фиброзных тканей или некротических областей и уменьшить общую прочность и биомеханическую характеристику структуры кости/каркаса.

В течение времени, сравнимого с образованием новой костной ткани, каркас должен постепенно рассасываться для достижения оптимальной регенерации кости после повреждения или болезни. Все до сих пор разработанные трехмерные каркасы костной ткани основаны на спеченных фосфатах кальция, которые являются кристаллическими материалами, затрудняющими активность остеокластов по сравнению с нанокристаллическим замещенным ионами апатитом наноразмера; поэтому, даже если пористые гидроксиапатитные каркасы костной ткани можно хорошо интегрировать в окружающую кость путем поверхностной адгезии, недостаток биологического рассасывания не обеспечивает полного процесса ремоделирования, то есть замены каркаса новой костной тканью. Это приводит к неполному восстановлению функциональной способности поврежденной кости, особенно в случае очень длинных, несущих нагрузку долей кости.

В частности, в случае длинных, несущих нагрузку костей каркас также должен проявлять надлежащие механические характеристики, при этом сохраняя широко открытую макропористость, что является проблемой с учетом того, что эти признаки обычно имеют противоположную направленность (то есть чем выше пористость, тем ниже механическая стойкость) и что высокая степень пористости требуется для обеспечения надлежащей колонизации и остеоинтеграции каркаса. Это является одним из наиболее существенных факторов, ограничивающих применение существующих в настоящее время каркасов в регенерации больших частей длинных, несущих нагрузку костей. В этой связи, каркасы с иерархически организованными пористым структурами могут показывать превосходные механические характеристики по сравнению с материалами со сходной, но случайно организованной пористостью. В этой связи, только каркасы с такой организованной структурой могут эффективно активировать способы механотрансдукции на клеточном уровне, запуская таким образом регенерацию созревшей, организованной и механически прочной кости.

Предложенная инновация основана на изменении парадигмы со способа классического керамического синтеза на новый режим *реактивного спекания*, который обеспечивает образование керамических фаз с заданным химическим составом, организованных в большие трехмерные изделия со сложной морфологией, иерархической структурой и, в то же время, с оптимизированными механическими характеристиками, исходя из иерархически организованных природных структур. В этой связи биоморфная трансформация является средством для достижения этого нового подхода, который можно применить для иерархически организованных природных структур (например, древесины, растений, экзоскелетов).

Биоморфную трансформацию древесных структур в имитирующую кость керамику успешно предпринимали с использованием древесины с пористой структурой, такой как сосна и ротанг, и более плотной древесины, такой как красный дуб и сипо (красное дерево), в качестве шаблонов для воспроизводства структуры и механической характеристики губчатого слоя и кортикального слоя кости, соответственно.

Об использовании древесины в образовании биомиметических гидроксиапатитных каркасов сообщали Anna Tampieri et al. в *Journal of Material Chemistry*, 2009, 19, 4973-4980. В этой публикации Tampieri et al. описывают способ превращения деталей длиной 1 см (то есть небольших деталей, не подходящих для регенерации дефектов критического размера) из древесины ротанга и древесины сосны в гидроксиапатит. Способ включал пиролиз образцов древесины при температуре 1000^0C с использованием небольшой скорости нагрева, после чего следовало науглероживание, в котором углеродный шаблон превращали в карбид кальция. Науглероживание осуществляли либо путем инфильтрации жидкой фазы, либо путем инфильтрации паровой фазы. Инфильтрацию паров проводили при температуре выше температуры кипения кальция (1484^0C). Процесс науглероживания включал начальный нагрев пиролизной древесины до 800^0C, последующий нагрев до 1100^0C и окончательно до 1650^0C в течение 3 часов. Было необходимо нагреть пиролизную древесину до этой температуры в течение 3 часов для того, чтобы обеспечить полное прохождение реакции. После науглероживания трехмерный каркас из карбида кальция окисляли для превращения карбида кальция в оксид кальция, при этом

сохраняя морфологию изначальной древесины. После окисления трехмерный каркас из оксида кальция карбонизировали для превращения каркаса из оксида кальция в каркас из карбоната кальция. Применяли высокие значения давления (2,2 МПа) для обеспечения проникновения CO_2 ко всему образующемуся $CaCO_3$, вплоть до сердцевины структуры CaO. В завершение выполняли стадию фосфатирования для превращения каркаса из карбоната кальция в гидроксиапатитный каркас с иерархически организованной анизотропной морфологией, похожей на морфологию изначальной древесины. В течение этой стадии полученные из древесины шаблоны $CaCO_3$ вымачивали в водном растворе KH_2PO_4 при температуре 200^0C под давлением 1,2 МПа в течение 24 часов.

В описанном выше способе получали гидроксиапатитные керамические каркасы с иерархически организованной анизотропной морфологией изначальной древесины.

Прочность на сжатие каркаса, полученного из сосновой древесины, измеренная в продольном направлении, составляла от 2,5 до 4 МПа и в поперечном направлении составляла от 0,5 до 1 МПа. Поэтому с помощью указанного способа можно получить только каркасы ограниченного размера, обычно менее 1 см. Низкие значения прочности на сжатие, также в сочетании с размером $\leq$ 1 см, делают эти каркасы не подходящими для регенерации костной ткани, в особенности в случае несущих нагрузку костей. Фактически, считается, что для того, чтобы быть критическим, дефект кости должен иметь длину, составляющую 2 – 3 диаметра травмированной кости. Следовательно, каркас размером 1 см нельзя рассматривать как подходящий в этом отношении.

Об упомянутой выше стадии фосфатирования в превращении древесины в гидроксиапатит сообщали более подробно Ruffini et al. в Chemical Engineering Journal, 217 (2013), 150-158. В этой публикации в качестве исходных материалов использовали цилиндрические шаблоны из полученного из ротанга карбоната кальция, имеющие диаметр 8 мм и длину 10 мм. Процесс фосфатирования осуществляли с использованием водных растворов гидрофосфата диаммония, дигидрофосфата аммония и аммиака.

Патентная заявка WO 2012/063201, опубликованная 18 мая 2012 г, описывает заменитель костной ткани, содержащий сердцевину на основе

гидроксиапатита, полученную из по меньшей мере одной пористой древесины, и оболочку из гидроксиапатита или карбида кремния, полученную из по меньшей мере одной древесины, имеющей более низкую пористость, чем по меньшей мере одна древесина в сердцевине. Оболочку приготавливали в полой цилиндрической форме, подходящей для размещения сердцевины, которую можно приготовить в виде твердого цилиндра, который вставляют в полость оболочки. В заявке также описан процесс получения заменителя костной ткани из древесины. Первой стадией является пиролиз изначальной древесины, такой как ротанг или сосна, путем нагрева ее до температуры от 800 до 2000^0C. Из этого процесса получают углеродный материал. На второй стадии углеродный материал превращают в карбид кальция при температуре от 1500 до 1700^0C. Затем карбид кальция окисляют при температуре от 900 до 1000^0C. Чтобы превратить материал из оксида кальция в карбонат кальция, выполняют карбонизацию в автоклаве при температуре 400^0C с давлением CO_2 2,2 МПа в течение 24 часов. Материал из карбоната кальция затем превращают в гидроксиапатит, частично замещенный карбонатом, путем фосфатирования. Получающиеся гидроксиапатитные каркасы, полученные из ротанга, имеют прочность на сжатие от 4 до 5 МПа в продольном направлении и прочность на сжатие 1 МПа в поперечном направлении.

Хотя в упомянутых выше публикациях описано успешное превращение древесины, такой как ротанг и сосна, в гидроксиапатит, при этом вполне воспроизводя трехмерную морфологию древесины, нельзя получить каркасы, обладающие свойствами, подходящими для регенерации длинных отделов несущей нагрузку кости.

В самом деле, все упомянутые публикации относятся к полученным из древесины гидроксиапатитным каркасам, имеющим небольшие размеры (то есть объем менее 1 $см^3$), которые не могут иметь реальных клинических применений, в особенности для регенерации больших частей несущей нагрузку кости. Описанные в предшествующем уровне техники способы не подходят для изготовления гидроксиапатитных каркасов, имеющих размеры, которые подходят для клинических применений, например, для регенерации критического размера дефектов несущей нагрузку кости, когда требуются большие каркасы, то есть размером, по меньшей мере равным 2 см.

Таким образом, в уровне техники остается потребность в биоморфном каркасе, в особенности пористом трехмерном каркасе, с биомиметическим химическим составом, который обладает соответствующими механическими характеристиками, морфологией, которая является выгодной для клеточной колонизации и роста сосудов, и в то же время который имеет размеры, которые подходят для клинических применений.

Такой биоморфный каркас должен особенно подходить для регенерации костной ткани, в особенности для имплантации в дефекты несущей нагрузку кости, такой как длинные кости конечностей (например, бедренная кость, большая берцовая кость, плечевая кость, малая берцовая кость, лучевая кость), а также для замены и регенерации позвоночных костей (например, тел позвонков, межпозвоночных дисков), частей черепных костей или частей челюстно-лицевых костей.

Настоящее изобретение удовлетворяет указанным выше потребностям путем обеспечения биоморфного каркаса, предпочтительно гидроксиапатитного каркаса, особенно подходящего для замены и регенерации костной ткани, в частности для замены и регенерации длинных несущих нагрузку костей.

Настоящее изобретение удовлетворяет указанным выше потребностям путем обеспечения способа изготовления биоморфного каркаса, предпочтительно трехмерного биоморфного каркаса. В частности, биоморфный каркас является гидроксиапатитным каркасом.

Сущность изобретения

В общем, в изобретении предложен гидроксиапатитный каркас, полученный из древесины, имеющей общую пористость от 60% до 95%, причем указанная пористость измерена после осуществления стадии пиролиза древесины, причем каркас имеет длину, измеренную вдоль направления, в котором размер каркаса является максимальным, больше или равную 2 см.

Более конкретно, в изобретении предложен биоморфный гидроксиапатитный каркас, полученный из древесины, имеющей общую пористость от 60% до 95% (указанная пористость измерена после подвергания древесины стадии пиролиза), причем указанный гидроксиапатит отличается иерархически организованной структурой пор и прочностью на сжатие более 5

МПа, предпочтительно от 10 МПа до 20 МПа, измеренной в направлении вдоль подобных каналам пор (продольное направление). Предпочтительно гидроксиапатит согласно изобретению показывает прочность на сжатие вдоль перпендикулярного к длинной оси каналов направления (поперечного направления) до 10 МПа.

Предпочтительно биоморфный гидроксиапатитный каркас, полученный из древесины, имеет иерархически организованную пористую структуру, которая получена из иерархически организованной пористой структуры древесины, из которой он получен (изначальная древесина).

Настоящее изобретение также относится к биоморфному гидроксиапатитному каркасу, полученному из древесины, в котором гидроксиапатит частично замещен (допирован) одним или более ионами, выбранными из группы, включающей магний, стронций, кремний, титан, карбонат, натрий, калий, галлий, серебро, медь, железо, цинк, марганец, европий и гадолиний.

Древесина, из которой получают биоморфный гидроксиапатит, имеет общую пористость от 60% до 95%, предпочтительно от 65% до 85% (указанная пористость измерена после подвергания древесины стадии пиролиза). Древесина, показывающая пористость в этих интервалах, включает древесину ротанга, сосны, абаша, бальзы, сипо, дуба, палисандра, кемпаса и грецкого ореха. Предпочтительно биоморфный гидроксиапатит получают из древесины ротанга.

Полученный из древесины биоморфный гидроксиапатитный каркас по изобретению имеет структурную связность и механические свойства, которые делают его особенно подходящим для применения в качестве заменителя костной ткани.

Соответственно, изобретение относится к применению биоморфного гидроксиапатитного каркаса в качестве заменителя костной ткани, а также к заменителю костной ткани, содержащему указанный биоморфный гидроксиапатитный каркас. Изобретение также относится к заменителю костной ткани, состоящему из указанного биоморфного гидроксиапатитного каркаса.

Полученный из древесины биоморфный гидроксиапатитный каркас можно использовать в качестве заменителя костной ткани для регенерации кости или части кости, в особенности костей человека или животного. Предпочтительно

полученный из древесины биоморфный гидроксиапатитный каркас можно использовать в качестве заменителя костной ткани для костей или частей костей, которые подвергаются механическим нагрузкам. Более предпочтительно кость или части кости являются длинными костями ноги или руки, такими как большая берцовая кость, малая берцовая кость, бедренная кость, плечевая кость и лучевая кость.

Полученный из древесины биоморфный гидроксиапатитный каркас также можно использовать при замене и/или реконструкции частей костей черепа, частей челюстно-лицевых костей и позвоночных костей (например, тел позвонков, межпозвоночных дисков).

Биоморфный гидроксиапатитный каркас по изобретению также можно использовать в качестве фильтра для жидкостей или газов.

В настоящем изобретении также описан способ получения биоморфного гидроксиапатитного каркаса, полученного из древесины.

Более конкретно в настоящем изобретении описан способ получения биоморфного гидроксиапатитного каркаса, имеющего длину, измеренную вдоль направления, в котором размер каркаса является максимальным, больше или равную 2 см, включающий стадии пиролиза, науглероживания, окисления, гидратации, карбонизации и фосфатирования деревянной детали (изначальной древесины), имеющей общую пористость по меньшей мере 20%, предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно от 60% до 95%, где указанную пористость измеряют после подвергания древесины стадии пиролиза.

Примерами изначальной древесины, которую можно подвергнуть способу по изобретению, являются ротанг, сосна, абаш, бальза, сипо, дуб, палисандр, кемпас и грецкий орех.

В то время как описано множество воплощений, из последующего подробного описания специалисту станут понятны еще и другие воплощения. Как будет понятно, некоторые описанные в данном документе воплощения могут быть модифицированы в отношении различных очевидных аспектов, но без выхода за рамки изобретения. Соответственно, чертежи и подробное описание необходимо рассматривать как иллюстративные по их природе и не ограничивающие изобретение.

Краткое описание чертежей

На следующих чертежах показаны предпочтительные воплощения объекта изобретения, описываемого в данном документе. Заявленный объект изобретения можно понять путем ссылки на следующее описание, рассматриваемое в сочетании с приложенными чертежами, где:

На Фиг. 1 представлено конкретное воплощение биоморфного каркаса, на котором присутствует центральный канал.

На Фиг. 2 представлены фотографии, показывающие ткани извлеченного из организма мышиного свода черепа спустя 8 недель. Экстенсивное образование костной ткани и проникновение в поры каркаса достигалось в схожей степени при одной только имплантации или с остеогенными стромальными клетками, где a) представлена древесина и никаких клеток, b) представлен гидроксиапатит и никаких клеток, c) представлена древесина и клетки и d) представлены гидроксиапатит и клетки. Стрелки на Фиг. 2 f) указывают на подобные каналу поры каркаса, которые копируют гаверсовы системы. Гаверсовы системы, или остеоны являются функциональной единицей компактной кости в форме цилиндров, изготовленных из тонких пластинок кости, организованных в концентрические слои. В середине остеонов существует канал, содержащий костный нерв и кровеносную сеть.

На Фиг. 3 показана кривая зависимости деформации от напряжения биоморфного каркаса, подвергнутого сжимающей нагрузке, где y = напряжение (Н) и x = деформации (мм).

На Фиг. 4 показано распределение внутреннего объема пор биоморфного гидроксиапатита по настоящему изобретению по сравнению с объемом пор иерархически структурированного гидроксиапатита, полученного способом, известным в уровне техники.

На Фиг. 5 показан график, изображающий повышенную жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток при контакте с каркасами, содержащими 2 и 5 мол.% Sr, по сравнению с не содержащим стронций каркасом (BC) после 24 часов, 48 часов, 72 часов, 7 суток и 14 суток. y = % по отношению к BC.

На Фиг. 6 показан график, изображающий экспрессию относящихся к остеогенезу генов, таких как (a) RUNX2 и (b) ALP, в каркасах, содержащих 2 мол.%

(Sr2%-BC) и 5 мол.% (Sr5%-BC) стронция. y = кратное изменение экспрессии относительно BC и x = сутки.

На Фиг. 7 показан график, изображающий жизнеспособность остеобластов при контакте с каркасами, содержащими 2 мол.% (Sr2%-BC) и 5 мол.% (Sr5%-BC) Sr, по сравнению с не содержащим стронций каркасом (BC) после 24 часов, 48 часов, 72 часов, 7 суток и 14 суток. y = % по отношению к BC.

На Фиг. 8 показан график, изображающий экспрессию относящихся к остеогенезу генов, таких как (a) Osterix, (b) BGlap и c) IBSP в каркасах, содержащих 2 мол.% (Sr2%-BC) и 5 мол.% (Sr5%-BC) стронция. y = кратное изменение экспрессии относительно BC и x = сутки.

На Фиг. 9 показан график, изображающий экспрессию относящихся к остеогенезу генов, таких как (a) Osacr, (b) CTSK и c) Itg β3 в каркасах, содержащих 2 мол.% (Sr2%-BC) и 5 мол.% (Sr5%-BC) стронция. y = кратное изменение экспрессии относительно BC и x = сутки. Можно наблюдать значительное уменьшение со временем генов, включенных в основные молекулярные пути остеокластов, таким образом показывающее, что присутствие ионов Sr^{2+} в каркасе подавляет образование и активность остеокластов. На чертеже a) данные за 14 суток были ниже предела обнаружения.

На Фиг. 10 показано сравнение распределения пор в двух каркасах из карбида кальция, полученных после стадии науглероживания предшествующего уровня техники и стадии науглероживания по настоящему изобретению, также сравниваемое с распределением пор исходной пиролизной древесины. На чертеже также приведена удельная площадь поверхности двух каркасов из карбида кальция.

На Фиг. 11, 12 и 13 (две верхние картинки) показаны изображения СЭМ двух каркасов из карбида кальция, полученных с помощью способа по изобретению и способа предшествующего уровня техники, соответственно.

На двух нижних картинках Фиг. 13 показано сравнение размера зерен карбида кальция.

На Фиг. 14 показано сравнение кристаллической фазы двух каркасов из карбида кальция, измеренное с помощью рентгеновской дифракции, полученных с помощью способа по изобретению и способа предшествующего уровня техники, соответственно.

На Фиг. 15 показаны изображения СЭМ каркаса из оксида кальция, полученного после стадии окисления по настоящему изобретению и стадии окисления предшествующего уровня техники.

На Фиг. 16 изображено распределение пор двух каркасов из оксида кальция, полученных после стадии окисления по настоящему изобретению и стадии окисления предшествующего уровня техники, соответственно.

На Фиг. 17 и 18 показаны изображения СЭМ карбоната кальция, полученных после стадии карбонизации по настоящему изобретению и стадии карбонизации предшествующего уровня техники, соответственно.

На Фиг. 19 показано распределение пор двух каркасов из карбоната кальция, полученных после стадии карбонизации по настоящему изобретению и стадии карбонизации предшествующего уровня техники, соответственно.

На Фиг. 20 показано сравнение распределения пор конечного биоморфного гидроксиапатитного каркаса (после фосфатирования), полученного с помощью способа по изобретению, и конечного биоморфного гидроксиапатитного каркаса предшествующего уровня техники.

На Фиг. 21 показан результат, полученный после подвергания куска ротанговой древесины, имеющего длину, измеренную вдоль направления, в котором размер каркаса является максимальным, равную или больше 2 см, стадиям способа согласно условиям, описанным в предшествующем уровне техники: даже перед стадией фосфатирования каркас может разрушиться.

На Фиг. 22 показан результат, полученный после подвергания куска ротанговой древесины, имеющего длину, измеренную вдоль направления, в котором размер каркаса является максимальным, равную или больше 2 см, стадиям способа согласно условиям, описанным в предшествующем уровне техники: даже если каркас выдерживает стадии способа вплоть до фосфатирования, после фосфатирования каркас разрушается.

На Фиг. 23 показано относительное количественное определение ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) экспрессии генов по отношению к экспрессии недопированного каркаса предшествующего уровня техники, используемого в качестве калибратора, после 14 суток трехмерного культивирования мезенхимальных стволовых клеток в динамических условиях со всеми испытываемыми образцами.

На Фиг. 24 показано воплощение биоморфного каркаса с кубовидной формой.

На Фиг. 25 показано, что подобная каналу структура биоморфного гидроксиапатитного каркаса, полученного с помощью способа по настоящему изобретению, уникально отличается проницаемыми большими каналами (100 – 300 микрон в диаметре) (микрокомпьютерная томография). Такие каналы допускают образование подходящих кровеносных сосудов, что поддерживает регенерацию костной ткани.

Подробное описание изобретения

Используемая в настоящем описании и в приложенной формуле изобретения «иерархическая пористая структура» или «иерархически организованная пористая структура» обозначает материал, имеющий анизотропную трехмерную пористую структуру, в которой подобные каналам поры взаимосвязаны посредством поперечных каналов и в которой в области, окружающей подобные каналам поры, присутствуют микро- и нанопоры.

Используемые в настоящем описании и в приложенной формуле изобретения значения «прочности на сжатие» получают с помощью способа, описанного в последующем описании, путем приложения механических усилий вдоль продольного и поперечного направлений по отношению к подобным каналам порам.

Используемый в настоящем описании и в приложенной формуле изобретения «дефект кости» относится к недостающей детали или части кости или ко всей кости, которая отсутствует и требует полной замены каркасом по изобретению.

Используемый в настоящем описании «биоморфный гидроксиапатит» относится к материалу, который: 1) состоит из гидроксиапатита, или 2) содержит гидроксиапатит, или 3) является материалом, содержащим или состоящим из гидроксиапатита и трикальцийфосфата. В случае, когда материал состоит из гидроксиапатита и трикальцийфосфата, материал является двухфазным материалом. В воплощении изобретения, в котором «биоморфный гидроксиапатит» является материалом, содержащим или состоящим из гидроксиапатита и трикальцийфосфата, гидроксиапатит допирован одним или

более ионами, выбранными из группы, состоящей из магния, стронция, кремния, титана, карбоната, калия, натрия, серебра, галлия, меди, железа, цинка, марганца, европия, гадолиния и их смесей.

Авторы настоящей патентной заявки неожиданно обнаружили, что можно получить из древесины биоморфный гидроксиапатитный каркас, который обладает биомиметическим химическим составом, соответствующими механическими характеристиками, морфологией, которая является выгодной для клеточной колонизации и роста сосудов, и, в то же время, имеет размеры, которые подходят для клинических применений.

В первом аспекте в настоящем изобретении предложен биоморфный гидроксиапатитный каркас, полученный из древесины, имеющей общую пористость по меньшей мере 20%, предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно от 60% до 95%, где указанную пористость измеряют после подвергания древесины стадии пиролиза, причем каркас имеет длину, измеренную вдоль направления, в котором размер каркаса является максимальным, больше или равную 2 см.

Общая пористость биоморфного гидроксиапатитного каркаса, полученная после способа по изобретению, является такой же, как общая пористость исходной древесины, измеренная после подвергания древесины стадии пиролиза. В частности, общая пористость биоморфного гидроксиапатитного каркаса, полученная после способа по изобретению, составляет по меньшей мере 20%, предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно от 60% до 95%.

Предпочтительно каркас имеет длину, измеренную вдоль направления, в котором размер каркаса является максимальным, которая больше или равна 2 см, и достигает конечного значения, которое определяют согласно клиническому применению. Например, в случае замены костной ткани длинных костей, таких как большая берцовая кость, бедренная кость, малая берцовая кость, плечевая кость, лучевая кость, длина каркаса, измеренная вдоль направления, в котором размер каркаса является максимальным, может составлять от 2 до 20 см.

Предпочтительно каркас по изобретению имеет прочность на сжатие, измеренную в продольном направлении, более 5 МПа, предпочтительно от 10 МПа до 20 МПа.

Предпочтительно каркас по изобретению показывает прочность на сжатие вдоль поперечного направления до 10 МПа.

Предпочтительно биоморфный гидроксиапатитный каркас отличается иерархически организованной пористой структурой.

«Иерархическую пористую структуру» или «иерархически организованную пористую структуру» гидроксиапатитного каркаса по изобретению получают из сложной трехмерной иерархической структуры исходной древесины, из которой получают каркас, и поэтому она имеет интервал пор с различными размерами. Поры с различными размерами в иерархической структуре делают ее подходящей для применения в качестве заменителя костной ткани.

Например, поры, имеющие диаметр ≥ 200 мкм, предпочтительно 150 – 300 мкм, более предпочтительно 200 – 300 мкм, допускают клеточную колонизацию и количественный рост клеток и образование соответствующей древовидной системы кровеносных сосудов. Поры, имеющие диаметр ≤ 10 мкм, предпочтительно < 1 мкм, более предпочтительно от 0,01 до 0,1 мкм (микро- и нанопоры), которые частично связывают подобные каналам поры, допускают обмен питательными текучими средами и выделение продуктов жизнедеятельности клеточного метаболизма.

Сохранение иерархической пористой структуры древесины в гидроксиапатите создает каркасы с оптимальными механическими свойствами и обеспечивает эффективное распределение механических нагрузок.

Так как полученный из древесины гидроксиапатит детально воспроизводит структуру природного материала, его таким образом можно назвать биоморфным.

В частности, иерархически организованная пористая структура каркаса по изобретению включает от 30% до 80% (от общей пористости) пор, имеющих диаметр менее 150 мкм, остаток до 100% общей пористости составляют поры, имеющие диаметр более 150 мкм.

В одном воплощении, предпочтительно когда исходная древесина является ротангом, от 30% до 80% от общей пористости каркаса обусловлены порами, имеющими диаметр ≤ 10 мкм.

В одном воплощении, предпочтительно когда исходная древесина является ротангом, по меньшей мере 25% от общей пористости, предпочтительно от 25% до 50% от общей пористости гидроксиапатитного каркаса обусловлены порами,

имеющими диаметр ≤ 1 мкм, предпочтительно ≤ 0,1 мкм, в особенности, от 0,01 до 0,1 мкм.

В одном воплощении, предпочтительно когда исходная древесина является ротангом, по меньшей мере 20% от общей пористости гидроксиапатитного каркаса обусловлены порами, которые имеют диаметр ≥ 150 мкм.

Предпочтительно гидроксиапатитный каркас имеет удельную площадь поверхности (УПП) > 9 $м^2$/г, предпочтительно от 9 до 20 $м^2$/г.

Древесина, используемая для получения гидроксиапатитного каркаса, может быть любой древесиной, имеющей общую пористость по меньшей мере 20%, предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно от 60% до 95%, даже более предпочтительно пористость от 65% до 85% (причем указанная пористость измерена после подвергания древесины стадии пиролиза).

Примеры подходящей древесины, используемой для получения гидроксиапатита, включают ротанг, сосну, абаш, бальзу, сипо, дуб, палисандр, кемпас и грецкий орех, предпочтительно используемая древесина является древесиной ротанга.

Полученный из древесины гидроксиапатитный каркас может содержать гидроксиапатит, который частично замещен одним или более ионами. Примерами таких ионов являются карбонат, магний, стронций, кремний, титан, натрий, калий, серебро, галлий, медь, железо, цинк, марганец, европий или гадолиний. Введение карбоната в фосфатный центр повышает биологическую растворимость и усиливает поверхностное сродство к клеткам остеобластов.

Введение магния обеспечивает усиленную способность новой костной ткани к присоединению новых слоев и образованию. Введение стронция способствует восстановлению разрастания кости, подверженной метаболическим болезням, таким как остеопороз, так что его присутствие может усилить регенерацию костной ткани.

Введение серебра, галлия, меди и цинка обеспечивает антибактериальные свойства.

Когда полученный из древесины гидроксиапатитный каркас содержит гидроксиапатит, который частично замещен одним или более ионами, каркас является материалом, содержащим или состоящим из допированного гидроксиапатита и трикальцийфосфата. Согласно дополнительному воплощению

биоморфный гидроксиапатитный каркас по настоящему изобретению может содержать:

0 – 15 масс.% магния, предпочтительно 1 – 10 масс.%, и/или

0 – 15 масс.% карбоната, предпочтительно 1 – 10 масс.%, и/или

0 – 15 масс.% стронция, предпочтительно 1 – 10 масс.%, и/или

0 – 20 масс.% титана, предпочтительно 1 – 10 масс.%, и/или

0 – 15 масс.% калия, предпочтительно 1 – 10 масс.%, и/или

0 – 15 масс.% натрия, предпочтительно 1 – 10 масс.%, и/или

0 – 15 масс.% кремния, предпочтительно 1 – 10 масс.%, и/или

0 – 15 масс.% серебра, предпочтительно 1 – 10 масс.%, и/или

0 – 15 масс.% галлия, предпочтительно 1 – 10 масс.%, и/или

0 – 15 масс.% меди, предпочтительно 1 – 10 масс.%, и/или

0 – 30 масс.% железа, предпочтительно 1 – 10 масс.%, и/или

0 – 15 масс.% цинка, предпочтительно 1 – 10 масс.%, и/или

0 – 15 масс.% марганца, предпочтительно 1 – 10 масс.%, и/или

0 – 15 масс.% европия, предпочтительно 1 – 10 масс.%, и/или

0 – 15 масс.% гадолиния, предпочтительно 1 – 10 масс.%.

Полученный из древесины биоморфный гидроксиапатитный каркас по настоящему изобретению имеет характеристики биологической активности и способности к рассасыванию в сочетании с характеристиками механической прочности и размеры, которые делают его особенно подходящим для клинического применения в качестве заменителя костной ткани, в особенности у людей и животных. Такой заменитель костной ткани можно использовать для замены и/или восстановления и/или регенерации костной ткани, частей кости или дефектов кости. Например, заменитель костной ткани можно использовать для замены или регенерации кости или частей кости, которые подвергаются механическим нагрузкам. Например, заменитель костной ткани можно использовать для замены или регенерации длинных костей рук или ног. Такие длинные кости могут включать большую берцовую кость, бедренную кость, малую берцовую кость, плечевую кость, лучевую кость и т. п.

Заменитель костной ткани также можно использовать при замене и/или восстановлении частей костей черепа, частей челюстно-лицевых костей и

позвоночных костей, например, тел позвонков, межпозвоночных дисков, и в хирургических процедурах по спондилодезу.

При использовании в качестве заменителя костной ткани биоморфный гидроксиапатитный каркас может иметь форму, которая адаптирована к форме дефекта кости, который необходимо восстановить, таким образом, чтобы по существу заполнять зазор в кости. Поэтому каркас и заменитель костной ткани по изобретению может иметь любую форму, которая подходит для цели восстановления и регенерации дефектов кости или для замены любой недостающей части кости.

Например, каркас или заменитель костной ткани по настоящему изобретению может принимать форму цилиндра, прямоугольной призмы или кубоида, или клиньев. В одном воплощении каркас или заменитель костной ткани содержит центральный канал с диаметром от примерно 20% до примерно 60% от диаметра каркаса или заменителя костной ткани. В частности, каркас или заменитель костной ткани имеет трубчатую форму.

В одном воплощении настоящее изобретение дополнительно относится к каркасу или заменителю костной ткани, имеющему цилиндрическую форму, форму прямоугольной призмы, кубоида или трубчатую форму, имеющему высоту, больше или равную 2 см.

В одном воплощении настоящего изобретения каркас или заменитель костной ткани может быть покрыт тонким слоем на основе гидроксиапатита и/или коллагена для увеличения клеточной адгезии и разрастания и, таким образом, остеоинтеграции в окружающей костной ткани. Слой может дополнительно содержать гидроксиапатит, замещенный одним или более ионами, существенными для стимуляции регенерации кости, такими как карбонат, магний, кремний, титан, калий, натрий и стронций, или с антибактериальным эффектом, такими как галлий, серебро, медь или цинк.

В другом воплощении настоящего изобретения каркас или заменитель костной ткани может быть пропитан природным полимером (выбранным из группы, содержащей желатин, коллаген, альгинат, хитозан, геллан, целлюлозу) для дополнительного увеличения механических свойств и дополнительного способствования клеточной адгезии.

К каркасу или заменителю костной ткани можно добавлять клетки, богатую тромбоцитами плазму, антитела, белки - стимуляторы роста, фрагменты ДНК, микро-РНК, малые интерферирующие РНК, чтобы способствовать адгезии клеток.

Также к каркасу или заменителю костной ткани можно добавлять лекарства, такие как антибиотики или противораковые лекарства.

Изобретение также относится к способу восстановления и/или регенерации имеющей дефект кости человека или животного, содержащему стадии:

- предоставления заменителя костной ткани, содержащего или состоящего из биоморфного гидроксиапатитного каркаса по изобретению, имеющего форму, которая соответствует форме дефекта кости,

- имплантации заменителя костной ткани в дефект кости пациента.

Предпочтительно способ восстановления и/или регенерации включает стадии предоставления трехмерной модели дефекта кости и, на основе полученной трехмерной модели, придания каркасу формы, соответствующей форме дефекта кости. Стадию придания формы каркасу можно применять к исходному куску древесины или к гидроксиапатитному каркасу, полученному в конце способа превращения по изобретению, или к каркасу, полученному после каждой стадии способа (например, после стадии карбонизации). Предпочтительно стадию придания формы применяют к исходному куску древесины.

Биоморфный гидроксиапатитный каркас по изобретению и биоморфный гидроксиапатитный каркас, частично замещенный одним или более ионами, получают из многостадийного способа превращения, содержащего следующие стадии:

1) Пиролиз: изначальную древесину нагревают при температуре в интервале от 600^0C до 1000^0C в инертной атмосфере, чтобы обеспечить разложение и устранение всех органических веществ. Из этого процесса получают углеродный шаблон.

2) Науглероживание: углеродный шаблон пропитывают кальцием в состоянии пара при температуре в интервале от 900 до 1200^0C и при давлении < 100 кПа (< 1000 мбар), предпочтительно < 60 кПа (< 600 мбар), более предпочтительно в интервале от 5 Па до 10 кПа (от 0,05 до 100 мбар), превращая таким образом углеродный шаблон в карбид кальция (CaC_2).

3) Окисление: шаблон из карбида кальция нагревают в воздухе при температуре в интервале от 750 до 1300^{0}C, предпочтительно 1000 - 1200^{0}C, обеспечивая таким образом превращение карбида кальция в оксид кальция (CaO).

4) Гидратация: шаблон из оксида кальция подвергают воздействию воды, обеспечивая таким образом поглощение воды в количестве 1 – 25 мол.%, предпочтительно 5 – 15 масс.%.

5) Карбонизация: шаблон из оксида кальция превращают в карбонат кальция путем нагрева при температуре в интервале от 500 до 900^{0}C, предпочтительно при температуре в интервале от 750 до 850^{0}C под давлением CO_2 или смеси CO_2 и инертного газа (например, аргона, азота). Интервал давления составляет от 4 до 20 МПа.

6) Фосфатирование: шаблон из карбоната кальция обрабатывают по меньшей мере одной фосфатной солью.

На стадии 1) пиролиза многостадийного способа изначальную древесину предпочтительно выбирают из ротанга, сосны, абаша, бальзы, сипо, дуба, палисандра, кемпаса и грецкого ореха. Более предпочтительно изначальная древесина является древесиной ротанга.

Изначальная древесина имеет общую пористость по меньшей мере 20%, предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно от 60% до 95%, где указанную пористость измеряют после подвергания древесины стадии пиролиза.

До стадии 1) пиролиза исходную изначальную древесину можно, при необходимости, высушить при температуре от 50^{0}C до 90^{0}C, предпочтительно при температуре от 60^{0}C до 80^{0}C, более предпочтительно при температуре от 65^{0}C до 75^{0}C. Изначальную древесину можно высушивать в течение более 6 часов, предпочтительно в течение более 12 часов, предпочтительно в течение более 18 часов, предпочтительно в течение времени от 20 до 30 часов.

На стадии пиролиза многостадийного способа инертная атмосфера может быть атмосферой газа, выбранного из группы, включающей азот и аргон.

На стадии пиролиза многостадийного способа изначальную древесину можно нагреть при температуре от 600^{0}C до 1000^{0}C, предпочтительно при температуре от 800^{0}C до 1000^{0}C. Стадия пиролиза может длиться более 6 часов,

предпочтительно более 12 часов, предпочтительно более 18 часов, предпочтительно указанная стадия может длиться в течение времени от 20 до 30 часов.

Тепловой цикл стадии 1) пиролиза можно выполнять путем нагрева изначальной древесины со скоростью не более 5^0C/мин, предпочтительно не более 3^0C/мин, и путем охлаждения со скоростью не более 3^0C/мин, предпочтительно не более 2^0C/мин, чтобы препятствовать образованию трещин и внутреннему разрушению материала.

До стадии 1) пиролиза многостадийный способ может дополнительно включать стадию i) выбора и приготовления изначальной древесины, на которой из указанной изначальной древесины можно вырезать кусок, имеющий форму, соответствующую форме восстанавливаемого дефекта кости. В частности, изначальной древесине придают форму куска дерева, имеющего длину, измеренную вдоль направления, в котором размер древесины является максимальным, которая больше или равна 2 см. Предпочтительно размер древесины достигает конечного значения, которое определяют согласно клиническому применению.

Например, изначальной древесине можно придать форму цилиндра, прямоугольной призмы или кубоида. Изначальной древесине также можно придать форму таким образом, чтобы она включала центральный канал с диаметром от примерно 20% до примерно 60% диаметра куска древесины. В частности, изначальной древесине можно придать трубчатую форму.

Предпочтительно стадия i) выбора и приготовления изначальной древесины включает стадии получения трехмерной модели дефекта кости и, на основе полученной трехмерной модели, придания изначальной древесине формы, соответствующей форме дефекта кости. Стадию придания формы изначальной древесине можно применять к исходной изначальной древесине или к гидроксиапатитному каркасу, полученному в конце многостадийного способа превращения. Предпочтительно стадию придания формы применяют к исходной изначальной древесине, чтобы избежать внутреннего или внешнего повреждения (разрушения) каркаса.

На стадии 2) науглероживания многостадийного способа реакцию предпочтительно выполняют с молярным отношением Ca/C (в начале реакции) в

интервале от 1,10 до 2,50, предпочтительно в интервале от 1,50 до 2,00. Молярное отношение Ca/C является важным, потому что отношения ниже данного интервала приводят к незавершенным реакциям, а отношения выше данного интервала приводят к закупориванию пор остатками Ca.

На стадии науглероживания многостадийного способа углеродный шаблон нагревают со скоростью нагрева от 1 до 10^0C/мин, предпочтительно со скоростью нагрева в интервале от 1 до 7^0C/мин.

Авторы настоящей патентной заявки неожиданно обнаружили, что выполнение стадии науглероживания при описанном выше пониженном давлении является преимуществом для успешного применения последующих технологических стадий, в особенности, когда требуется получить большой биоморфный каркас.

Фактически, при использовании описанных выше условий давления, испарение кальция может происходить при температурах, которые на примерно 400 – 500^0C ниже температуры кипения кальция при атмосферном давлении (то есть 1484^0C), таким образом неожиданно давая полное превращение пиролизной древесины в карбид кальция при температуре намного более низкой, чем любые другие способы, известные в уровне техники. В частности, применение давления в интервале 5 Па – 60 кПа (0,05 – 600 мбар) или предпочтительно от 5 Па до 10 кПа (от 0,05 до 100 мбар) приводит к по существу полному превращению пиролизной древесины в карбид кальция.

По существу полное превращение пиролизной древесины в карбид кальция приводит к преимуществу для выходов последующих стадий превращения.

Условия науглероживания по настоящему изобретению также улучшают сохранение микро- и нанопор, имеющих диаметры ≤1 мкм (предпочтительно от 0,01 до 0,1 мкм), изначальной древесины как в каркасе после науглероживания, так и в конечном биоморфном каркасе по отношению к известным каркасам, полученным из древесины с использованием известных способов.

Фаза науглероживания является критической стадией в способе, потому что хорошее сохранение микро- и нанопористости после этой стадии обеспечивает то, что конечный биоморфный каркас показывает похожую нано/микропористость. Присутствие высокой процентной доли хорошо взаимосвязанных микро- и нанопор в конечном биоморфном каркасе обеспечивает обмен питательными

текучими средами и выделение отходов жизнедеятельности клеточного метаболизма.

Помимо улучшения сохранения микро- и нанопор, имеющих диаметры ≤1 мкм, описанные здесь условия науглероживания дают каркас после науглероживания (а также конечный биоморфный каркас) с удельной площадью поверхности (УПП) от 9 до 20 $м^2$/г. Такая удельная площадь поверхность примерно в 2 раза выше УПП каркаса, полученного с помощью способа, известного в уровне техники, которая составляет примерно 5 – 6 $м^2$/г (см. сравнительный пример 4 и Фиг. 10 – 13).

Условия науглероживания по настоящему изобретению также дают пористый каркас из карбида кальция, содержащий зерна карбида кальция, которые меньше зерен каркаса, полученного с помощью известного способа (см. сравнительный пример 4 и Фиг. 13 (нижние картинки)).

В сравнительных примерах показано, что размеры зерен карбида кальция в каркасе после науглероживания по настоящему изобретению составляют примерно 5 – 15 мкм (предпочтительно примерно 10 мкм), при этом кристаллические размеры каркаса после науглероживания, полученного с помощью известного способа, составляют примерно 100 мкм.

Авторы настоящей патентной заявки неожиданно обнаружили, что более высокая удельная площадь поверхности (УПП) и меньший размер зерен, которые получают при описанных выше условиях науглероживания и которые нельзя получить путем ранее известных способов, являются важными для обеспечения высокого выхода превращения изначальной древесины после каждой стадии способа.

В сравнительном примере 4 и на Фиг. 14 также показано, что каркас после науглероживания по настоящему изобретению содержит карбид кальция со смесью тетрагональной и кубической кристаллических решеток, при этом каркас, полученный с помощью известных способов, содержит карбид кальция только с тетрагональной кристаллической решеткой. Так как оксид кальция имеет только кубическую кристаллическую структуру, превращение из карбида кальция, который частично находится в кубической форме, в оксид кальция может происходить с меньшей опасностью образования микроскопических разрушений в

каркасе. Это является чрезвычайно полезным преимуществом для качества конечного биоморфного каркаса.

Поэтому условия, применяемые на стадии науглероживания, сильно уменьшают количество дефектов, которые можно наблюдать в иерархической пористой структуре карбида кальция.

К тому же, низкие температуры, применяемые в настоящем изобретении (то есть намного ниже 1500^0C), препятствуют срастанию зерен и излишнему упрочнению карбида кальция, которое вызывает структурную деформацию и отклонения от первоначальной микроструктуры исходной древесины, таким образом ухудшая результаты последующих технологических стадий.

На стадии 3) окисления многостадийного способа шаблон из карбида кальция можно нагреть до конечной температуры в интервале от 800 до 1300^0C, предпочтительно до конечной температуры в интервале от 1000 до 1200^0C.

На стадии окисления шаблон из карбида кальция можно нагревать со скоростью нагрева в интервале от 1 до 15^0C/мин, предпочтительно со скоростью нагрева в интервале от 1 до 7^0C/мин. Окисление карбида кальция, полученного под давлением согласно описанной выше стадии науглероживания, приводит к каркасу из оксида кальция с более высокой удельной площадью поверхности (УПП) и пористостью с более высокой фракцией микро- и нанопор по отношению к каркасам, получаемым с помощью известных способов (см. сравнительный пример 4 и Фиг. 16). Сравнительный эксперимент показывает, что микро- и нанопористость также сохраняются после стадии окисления.

На стадии 4) гидратации многостадийного способа шаблон из оксида кальция подвергают воздействию воды, обеспечивая таким образом поглощение воды в количестве предпочтительно находящемся в интервале от 1 до 25 мол.%, более предпочтительно в интервале от 5 до 15 мол.%. Эта стадия приводит к образованию гидратированного оксида кальция, содержащего гидроксид кальция в количестве $\leq$ 50 масс.% трехмерной структуры, который катализирует последующую карбонизацию CaO. Количество гидроксида кальция ($Ca(OH)_2$) в качестве промежуточного продукта необходимо строго регулировать для того, чтобы избежать обрушения трехмерной структуры. Описанные здесь условия гидратации позволяют удерживать количество гидроксида кальция $\leq$ 50%.

В предпочтительном воплощении стадию гидратации проводят в то же время, что и стадию карбонизации, например, используя обогащенный водой CO_2.

На стадии 5) карбонизации многостадийного способа применение высокой температуры и при этом постепенное увеличение давления CO_2 в системе вплоть до указанных выше значений неожиданно обеспечивает по существу полное превращение гидратированного оксида кальция в шаблон из карбоната кальция, который показывает неожиданно высокую когезионную прочность и механическую прочность.

Стадию карбонизации многостадийного способа можно выполнять согласно одному из следующих тепловых циклов:

- при постоянном давлении CO_2, составляющем примерно 10 – 15 МПа, медленно повышая температуру до значения в интервале от примерно 750 до 850^0C, предпочтительно до примерно 800^0C,

- при постоянной температуре, составляющей примерно 750 - 850^0C (или от примерно 700 до 800^0C), предпочтительно примерно 800^0C, повышая давление до примерно 10 – 15 МПа,

- поддерживая давление на уровне примерно 4 – 6 МПа, при этом повышая температуру до примерно 750 - 850^0C (или от примерно 700 до 800^0C), предпочтительно до примерно 800^0C, и затем повышая давление до 10 – 15 МПа.

Процесс карбонизации происходит посредством образования промежуточных продуктов реакции, таких как гидроксид кальция. Это приводит к конечному карбонату кальция, отличающемуся мелкозернистой структурой, по существу не содержащей каких-либо больших кубических кристаллов карбоната кальция (> 10 мкм), которые могут ухудшить структурную целостность трехмерной структуры. В сравнительном примере 4 и на Фиг. 17 -18 показано, что благодаря применению стадии гидратации, после стадии карбонизации получают мелкозернистую структуру, по сравнению с промежуточной трехмерной структурой, которую получают с помощью способов, известных в уровне техники.

Стадию карбонизации выполняют при описанных выше условиях, что приводит к превосходным механическим свойствам биоморфного гидроксиапатитного каркаса, получаемого способом по изобретению, по сравнению с похожими способами, известными в уровне техники, в котором

стадию карбонизации выполняют при высокой температуре и низком давлении или при высоком давлении и низкой температуре.

Авторы настоящей патентной заявки неожиданно обнаружили, что достижение указанных выше признаков в карбонате кальция является важным условием для обеспечения полного превращения больших кусков (то есть $\geq$ 2 см) в конечный биоморфный каркас, имеющий требуемый состав, и для поддержания первоначальной микроструктуры древесины.

На стадии 6) фосфатирования многостадийного способа по меньшей мере одну фосфатную соль можно выбрать из группы, состоящей из фосфата аммония, фосфата натрия и фосфата калия. Использование фосфата аммония обеспечивает лучшее регулирование pH, следовательно, процесс превращения является более эффективным, и получающееся тело имеет выгодные механические свойства и физическую когезию.

На стадии фосфатирования многостадийного способа шаблон из карбоната кальция можно погрузить в раствор, содержащий по меньшей мере одну из указанных фосфатных солей. Раствор может иметь концентрацию от 0,1 до 5М, предпочтительно концентрацию от 0,5 до 2,0М.

Исходное отношение PO_4/CO_3 на стадии фосфатирования многостадийного способа предпочтительно составляет от 1,5 до 5 раз по отношению к теоретическому стехиометрическому значению, предпочтительно от 2 до 4 раз по отношению к теоретическому стехиометрическому значению.

На стадии фосфатирования многостадийного способа шаблон из карбоната кальция, погруженный в богатый фосфатом раствор, можно нагреть от 25^0C до 300^0C под давлением пара в интервале от 0,1 до 2,5 МПа (гидротермальные условия).

Стадия фосфатирования может длиться от примерно 12 до примерно 180 часов, предпочтительно от примерно 48 до примерно 120 часов, более предпочтительно от 24 до 72 часов.

Исходный pH богатого фосфатом раствора на стадии фосфатирования многостадийного способа предпочтительно составляет от 7 до 12.

Замещение гидроксиапатита другими ионами можно достичь путем введения подходящих растворимых солей, содержащих представляющие интерес ионы, в течение или после завершения процесса, предпочтительно в течение

процесса фосфатирования. Подходящие ионы могут включать стронций, магний, кремний, титан, карбонат, натрий, калий, галлий, серебро, медь, железо, цинк, марганец, европий, гадолиний и их смеси. Примером раствора, содержащего ионы магния, является $MgCl_2*6H_2O$, и примером раствора, содержащего ионы стронция, является $SrCl_2*6H_2O$.

Вследствие допирования ионами конечный биоморфный каркас содержит материал или состоит из материала, содержащего или состоящего из допированного гидроксиапатита и трикальцийфосфата.

Согласно менее предпочтительному воплощению, в котором изначальной древесине не была придана форма и размеры, подходящие для использования в качестве заменителя костной ткани (то есть, если стадию i) не выполняют), полученному из многостадийного способа биоморфному гидроксиапатитному каркасу можно удобным образом придать форму каркаса, имеющего требуемую конфигурацию и форму, с помощью известных технологий.

Изобретение также относится к биоморфному гидроксиапатитному каркасу, полученному (или получаемому) из описанного выше способа, имеющему улучшенные физические и механические свойства по сравнению с иерархически структурированными гидроксиапатитами, полученными с помощью похожих способов, известных в уровне техники.

В частности, биоморфный гидроксиапатитный каркас, полученный (или получаемый) из способа по настоящему изобретению, обладает всеми описанными выше признаками для каркаса или заменителя костной ткани по изобретению.

В частности, по отношению к предшествующему уровню техники, конечный биоморфный каркас, полученный с помощью описанного здесь способа, обладает пористостью, которая состоит из более высокой процентной доли микро- и нанопор по сравнению с каркасами, полученными с помощью похожих способов, известных в уровне техники. В частности, по меньшей мере 25% от общей пористости, предпочтительно от 25% до 50% от общей пористости гидроксиапатитного каркаса по изобретению обусловлены порами, имеющими диаметр $\leq$ 1 мкм, предпочтительно $\leq$ 0,1 мкм, в особенности от 0,01 до 0,1 мкм.

Эта высокая процентная доля микро- и нанопористости является чрезвычайно выгодной с клинической точки зрения, потому что микро- и нанопоры

обеспечивают обмен питательными текучими средами и усиливают выделение продуктов жизнедеятельности клеточного метаболизма, улучшая таким образом регенерацию костной ткани.

Более того, биоморфный каркас по изобретению показывает более высокую удельную площадь поверхности (от 9 до 20 $м^2$/г против 5 – 6 $м^2$/г) по сравнению с каркасом, полученным способом, известным в уровне техники. Более высокая площадь поверхности определяет усиленную поверхностную биологическую активность и усиленную способность к смачиванию каркаса или заменителя костной ткани, улучшая таким образом остеоинтеграцию и процесс биологического рассасывания костной ткани.

Также биоморфный каркас по изобретению включает гидроксиапатитные зерна примерно 100 – 200 нм (то есть нанозерна), намного меньше зерен, присутствующих в спеченном гидроксиапатите (то есть обычно > 1 мкм). Небольшие зерна показывают клиническое преимущество для регенерации костной ткани, потому что они могут более легко рассасываться клетками, обеспечивая таким образом лучшую регенерацию костной ткани по сравнению с известными в уровне техники каркасами.

К тому же, биоморфный каркас по изобретению показывает прочность на сжатие более 5 МПа, предпочтительно от 10 МПа до 20 МПа, измеренную в направлении вдоль подобных каналам пор (продольное направление), и прочность на сжатие вдоль направления поперечных каналов (поперечное направление) до 10 МПа. Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что эти механические признаки делают конечный гидроксиапатитный каркас единственным в своем роде материалом, поэтому его можно применять в процедурах регенерации несущих нагрузку частей кости без использования какой-либо усиливающей или поддерживающей структуры, такой как оболочки или перемычки.

По своей природе нанокристаллический, замещенный ионами гидроксиапатит является основным компонентом, присутствующим в твердотельных тканях, фактически, минеральная фаза в кости является наноструктурированной фазой, составленной из мелкодиспергированных гидроксиапатитных пластинок с размерами менее 100 нм, которые организованы в

трехмерную иерархически организованную пористую структуру, представляющую всю костную ткань.

В связи с этим авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что при сравнении с ранее известным уровнем техники биоморфное превращение структур природной древесины, полученное с помощью описанного выше способа, может уникальным образом привести к конечным гидроксиапатитным каркасам кости, одновременно обладающим составом, имитирующим костную ткань, высокой пористостью открытых и взаимосвязанных макро/микро/нанопор и превосходной механической прочностью, связанной с размером, существенным для применения в несущих нагрузку местах, в особенности в длинных сегментарных костях конечностей или в больших челюстно-лицевых областях или в позвоночнике.

Все эти признаки, которые никогда ранее не проявлялись одновременно, имеют наибольшую важность для обеспечения экстенсивной регенерации кости в несущих нагрузку местах. Отличия в структуре биоморфного гидроксиапатитного каркаса, получаемого с помощью способа по настоящему изобретению, дают важные клинические преимущества, которые показаны в сравнительном примере 6. В частности, настоящие каркасы проявляют более высокую индуктивную мощность экспрессии связанных с остеогенезом генов по отношению к каркасам предшествующего уровня техники, которая преобразовывается в лучшую клиническую характеристику в показателях регенерации кости.

Настоящее изобретение дополнительно иллюстрировано с помощью следующих не ограничивающих его примеров.

Примеры

Способы измерения

Общая пористость древесины, подвергнутой стадии пиролиза (пиролизной древесины)

Кусок пиролизной древесины, которому была придана форма призмы или цилиндра, взвешивают, затем получают объем путем измерения диаметра и высоты. Абсолютную плотность (АП) пиролизной древесины получают с помощью отношения массы к объему, относительную плотность (ОП) получают путем

деления АП пиролизной древесины на теоретическую плотность углерода (то есть ОП = АД/2,25). Общую пористость (%) получают как (1 – ОП)x100.

Общая пористость каркаса, полученного после каждой стадии способа, и биоморфного гидроксиапатитного каркаса, полученного в конце способа

Пористость вычисляют путем применения такого же способа, как указанный выше способ, используя соответствующие значения для теоретической плотности каждого материала, полученного после каждой стадии (то есть теоретической плотности CaC_2, CaO, $CaCO_3$, ГА (гидроксиапатита)).

Прочность на сжатие

Конечный каркас или заменитель костной ткани, которому придана форма призмы или цилиндра, подвергают нагрузке путем использования универсальной машины для испытаний червячного типа для получения кривых зависимости деформации от напряжения и разрушающей нагрузки. Прочность на сжатие приведена в виде отношения разрушающей нагрузки и подвергнутой сжатию площади.

Диаметр пор

Распределение размеров пор и морфологию пор конечного каркаса или после каждой стадии способа оценивают посредством измерения пористости путем внедрения ртути и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), соответственно. Анализ пористости путем внедрения ртути основан на измерении внедрения ртути в поры образца при различных давлениях.

Кристаллические фазы: идентификация и количественное измерение

Идентификацию и количественное измерение кристаллических фаз каркасов выполняют с помощью технологии порошковой рентгеновской дифракции (РД), оценивая результат падения рентгеновского излучения на образец с различными и непрерывными углами.

Удельная площадь поверхности

Общую площадь поверхности материалов на единицу общего объема ($м^2/г$) оценивают, используя способ БЭТ, оценивая ее из количества газа, адсорбированного в зависимости от его давления.

Пример 1. Приготовление полученного из древесины гидроксиапатита с использованием многостадийного способа

i) Куску изначальной древесины ротанга придают форму цилиндра, имеющего следующие размеры: диаметр = 2 см, высота = 3 см.

1) Пиролиз изначальной древесины

Кусок исходной древесины сушат при 70°C в течение 24 часов, затем обрабатывают при 800°C в течение более 30 минут в потоке азота, превращая таким образом в шаблон из чистого углерода. Тепловой цикл: нагрев при 1°C/мин до 350°C и при 2°C/мин от 350°C до 800°C. Образец поддерживают при температуре 800°C в течение примерно по меньшей мере 30 мин и затем шаблон охлаждают при 1°C/мин.

2) Науглероживание

Углеродный шаблон подвергают нагреву при 1000°C в атмосфере аргона и кальция при 50 Па (0,5 мбар), превращая таким образом в карбид кальция. Время пребывания при 1000°C = 30 мин.

3) Окисление

Шаблон из карбида кальция нагревают в воздухе до 1100°C, следуя скорости нагрева в интервале 1 - 7°C/мин, обеспечивая таким образом полное превращение в оксид кальция.

4) Гидратация

Изделие из оксида кальция активируют путем подвергания воздействию воды, обеспечивая таким образом поглощение воды в количестве примерно 10 мол.%.

5) Карбонизация

Предварительно обработанное гидратированное изделие нагревают до 800°C при постепенно повышающемся давлении CO_2 от 0,5 до 10 МПа. Это превращает изделие из оксида кальция в карбонат кальция.

6) Фосфатирование

Изделие из карбоната кальция погружают в 0,5 М раствор фосфата аммония с исходным отношением PO_4 к CO_3 в 2 раза больше теоретического стехиометрического значения при температуре 200°C при давлении водяного пара 2 МПа.

Прочность на сжатие каркаса оценивали путем прикладывания механических усилий вдоль перпендикулярного и поперечного направления по отношению к ориентации подобных каналам пор.

Путем прикладывания нагрузки вдоль направления пор (что в наибольшей степени отражает клиническую конфигурацию для копирования in vivo биомеханических стимулов в случае длинных сегментарных костей) каркас (разработанный в виде полого цилиндра с внешним диаметром 15 мм, внутренним диаметром 6 мм, высотой 20 мм и пористостью 60 – 65 об.%) показывал прочность на сжатие до 16 МПа (то есть 250 кг конечной нагрузки (Фиг. 1 и 3)). В поперечном направлении каркас показывал прочность на сжатие до 4 МПа.

Каркас также можно подвергнуть тепловой обработке при максимальной температуре 1300°C в регулируемой атмосфере для дополнительного увеличения механической прочности каркаса.

Подобные костной ткани микроструктурные признаки биоморфного каркаса обеспечивают поставку топологической информации клеткам для строительства новой костной ткани с организованной структурой. Это подтверждалось испытаниями in vivo, в которых каркас имплантировали в бедренные кости кроликов и свод черепа мышей.

Каркас не вызывал ни каких-либо токсичных вредных реакций, ни каких-либо некрозов или инфекций после хирургии. Каркас давал экстенсивную колонизацию вновь образованной костной ткани спустя 1 месяц, аналогично контрольному образцу, который представлял собой промышленный пористый апатитный каркас EngiPore, Finceramica S.p.A., Италия.

Ткани, извлеченные из свода черепа мышей, показывали экстенсивное образование костной ткани и проникновение в поры каркаса как в случае, когда каркас имплантировали сам по себе, так и в случае, когда к имплантированному каркасу добавляли остеогенные стромальные клетки (Фиг. 2a – 2d). Подобная каналам пористость каркаса вызывала образование костных структур, подобных гаверсовым системам (как показано стрелками на Фиг. 2f). Более того, подобные каналам поры каркаса вызывали быстрое развитие кровеносных сосудов, так чтобы содействовать образованию и проникновению новой кости. Этот результат подтверждает, что подходящая ориентация пористости по отношению к

ориентации эндогенной сосудистой сети может быть эффективной для содействия ускорению экстенсивного развития кровеносных сосудов.

Пример 2. Сравнение биоморфного гидроксиапатита по изобретению и известного в уровне техники иерархически структурированного гидроксиапатита

Проводили сравнительное испытание распределения размеров пор биоморфного гидроксиапатита по настоящему изобретению, полученного из изначальной древесины ротанга, и распределения размеров пор иерархически структурированного гидроксиапатита, полученного из такой же изначальной древесины, согласно исследованию Anna Tampieri et al. в *Journal of Material Chemistry*, 2009, 19, 4973-4980 с использованием исследования Ruffini *et al.* в Chemical Engineering Journal 217 (2013) 150-158 только для стадии фосфатирования (смесь $NH_4H_2PO_4$–$(NH_4)_2HPO_4$, pH=9, Tmax=60°C, время = 80 часов).

Результаты показаны на Фиг. 4, на которой черные колонки относятся к биоморфному гидроксиапатиту по изобретению, и темно-серые колонки - к известному в уровне техники гидроксиапатиту.

Очевидно увеличение количества пор, имеющих диаметр в интервале 200 – 300 нм в биоморфном гидроксиапатите по настоящему изобретению по сравнению с известным иерархически организованным гидроксиапатитом, причем указанные поры являются порами с наиболее соответствующими размерами для содействия физиологическому образованию сосудов в биоморфном гидроксиапатите при имплантации в качестве заменителя костной ткани.

Более того, на той же Фиг. 4 показано повышенное число пор, имеющих диаметр в интервале 0,01 – 0,1 мкм, что явно указывает на то, что микроструктура изначальной древесины сохраняется в конечном продукте.

Пример 3. Приготовление полученного из древесины гидроксиапатита, допированного Mg^{2+} и/или Sr^{2+}

За стадиями 1 – 5 многостадийного способа, описанного в примере 1, следует извлечение изделия из карбоната кальция. Допирование ионами Mg^{2+} и/или Sr^{2+} было достигнуто согласно каждому из следующих способов.

Способ 1

Раствор Sr^{2+} (в форме SrCl) добавляют в 1,0 М богатый фосфатом раствор. Изделие из карбоната кальция, приготовленное согласно многостадийному способу, затем погружают в объединенный раствор и нагревают до температуры 200^0C при давлении водяного пара 2 МПа. Это дает допированный Sr^{2+} гидроксиапатит с морфологией куска исходной древесины.

Способ 2

Изделие из карбоната кальция погружают в 1,0 М богатый фосфатом раствор. При нагревании его до температуры 25 – 90^0C при давлении водяного пара 0,1 МПа постепенно добавляют раствор Sr^{2+}. Это дает допированный Sr^{2+} гидроксиапатит с морфологией куска исходной древесины.

Способ 3

Изделие из чистого карбоната кальция (или частично превращенного в гидроксиапатит путем погружения в 1,5 М богатый фосфатом раствор при комнатной или более высокой температуре в течение 24 часов) погружают в водный или органический раствор, содержащий ионы Sr^{2+}, в течение 24 часов. Его затем извлекают из раствора и погружают в 1,5 М богатый фосфатом раствор. При этом нагревают его до температуры 200^0C при давлении водяного пара в интервале 0,5 – 1,5 МПа. Это дает допированный Sr^{2+} гидроксиапатит с морфологией куска исходной древесины.

Свойства замещенного стронцием каркаса

Были разработаны замещенные стронцием гидроксиапатитные каркасы и было обнаружено, что они обеспечивают повышенную жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток (МСК) по сравнению с не содержащими стронция каркасами (Фиг. 5).

Стронциевые каркасы также показывали хорошо развитую морфологию и повышенную экспрессию относящихся к остеогенезу генов, таких как RUNX2 и ALP (Фиг. 6), таким образом действуя в качестве промоторов дифференциации остеобластов. В частности, при сравнении с не содержащим Sr каркасом было зарегистрировано значительное увеличение уровня микро-РНК обоих генов ($p < 0,05$). Это увеличение было особенно высоким для каркасов с 2 мол.% Sr.

Наблюдали усиленное размножение пре-остеобластов за 14 суток исследования, когда использовали замещенные Sr гидроксиапатитные каркасы

(Фиг. 7). Фактически, увеличение стронция в каркасе давало намного более высокую жизнеспособность клеток в долгосрочной перспективе. Эти результаты подразумевают, что можно успешно вызвать и поддерживать образование новой костной ткани.

Каркас также демонстрирует возможность поддержания остеобластного фенотипа в течение двух недель исследования (Фиг. 8).

Также исследовали поведение клеток при контакте с замещенным стронцием каркасом, наблюдая поведение остеокластов. Выполняли предварительный морфологический анализ для подтверждения и обоснования модели генезиса остеокластов. Остеокласты, выросшие на поверхности каркаса, показывают их обычную морфологию.

Оценивали относительную экспрессию генов основного маркера, включенных в активность и образование остеокластов (Oscar, Integrin β3 и CatepsinK) (Фиг. 9). Анализ показал значительное уменьшение со временем экспрессии всех генов, включенных в основные молекулярные пути остеокластов, указывая таким образом, что присутствие ионов Sr^{2+} в каркасе подавляет образование и активность остеокластов.

В заключение, замещение гидроксиапатитов ионами Sr^{2+} производило биологическое воздействие на клетки костной ткани, в частности вызывая: 1) значительное индуцирующее воздействие на гены, связанные с остеогенными МСК, 2) индуцирующее воздействие на размножение остеобластов и 3) ингибирующее воздействие на активность остеокластов.

В случае имплантации в сегментарный дефект кости, новый каркас конструируют так, чтобы в нем присутствовал центральный канал, который проходит в направлении, параллельном основной однонаправленной пористости, так чтобы быть открытым к обломкам кости в качестве проводника для развития нового костного мозга (Фиг. 1). Размер канала определяют на основе конкретного дефекта, однако, для поддержания надлежащей прочности, канал имеет диаметр в интервале 20 – 60% по отношению к общей ширине каркаса.

Пример 4. Сравнение биоморфного гидроксиапатита по изобретению и известного в уровне технике иерархически структурированного гидроксиапатита

Проводили сравнительное испытание биоморфного гидроксиапатита, изготовленного с использованием способа по изобретению, и гидроксиапатитного каркаса, полученного из такой же изначальной древесины (ротанга), согласно исследованию Anna Tampieri et al. в *Journal of Material Chemistry*, 2009, 19, 4973-4980. Древесина ротанга, использованная в способе по изобретению, имеет длину, измеренную вдоль направления, в котором размер каркаса является максимальным, равную 2 см. Древесина ротанга, использованная в способе предшествующего уровня техники, имеет длину, измеренную вдоль направления, в котором размер каркаса является максимальным, равную 1 см.

После каждой стадии двух способов анализировали и сравнивали удельную площадь поверхности (УПП) и распределение пор промежуточного и конечного каркасов (см. Фиг. 10, 16, 19 и 20). Помимо этого, после стадии науглероживания сравнивали размеры кристаллов карбида кальция двух промежуточных каркасов (см. Фиг. 13 (нижние картинки)).

Структуру кристаллической решетки двух каркасов из карбида кальция сравнивали после стадии науглероживания. Сравнение показано на Фиг. 14.

На Фиг. 10 показано сравнение распределения пор двух каркасов из карбида кальция, полученных после соответствующих стадий науглероживания, дополнительно сравниваемое с распределением пор исходной пиролизной древесины. На чертеже также показана удельная площадь поверхности двух каркасов из карбида кальция. Результаты показывают, что только каркас из карбида кальция, полученный после стадии науглероживания по изобретению, сохраняет распределение микро- и нанопор древесины ротанга (размеры пор < 1 мкм). Также сравнение двух удельных площадей поверхности показывает улучшение для каркаса по настоящему изобретению.

На Фиг. 11, 12 и 13 (две верхние картинки) показаны изображения СЭМ двух каркасов из карбида кальция, из которых можно явно видеть лучшее сохранение микро- и нанопористости изначальной древесины.

На Фиг. 13 (нижние две картинки) показано сравнение размеров кристаллов карбида кальция. Карбид кальция, полученный по настоящему изобретению, имеет зерна со средним размером примерно 10 мкм, при этом зерна, полученные

с помощью способа предшествующего уровня техники, имеют средний размер примерно 100 мкм.

На Фиг. 14 показано сравнение кристаллической фазы двух каркасов из карбида кальция, измеренное с помощью рентгеновской дифракции. Результаты показывают, что карбид кальция, полученный по настоящему изобретению, имеет как тетрагональную, так и кубическую кристаллическую решетку, при этом карбид кальция предшествующего уровня техники имеет только тетрагональную решетку. Каркас из карбида кальция по изобретению содержит более высокое количество $Ca(OH)_2$ по отношению к каркасу предшествующего уровня техники.

На Фиг. 15 показаны изображения СЭМ каркаса из оксида кальция, полученного после соответствующих стадий окисления. Изображения, соответствующие каркасу, полученному по настоящему изобретению, сохраняют микропористость между зернами CaO, при этом в каркасе предшествующего уровня техники микропористость полностью теряется.

На Фиг. 16 изображено распределение пор двух каркасов из оксида кальция. Сравнение явно показывает, что фракция микро- и нанопористости, а также удельная площадь поверхности, полученная после стадии окисления, выше в каркасе по настоящему изобретению.

На Фиг. 17 и 18 показаны изображения СЭМ карбоната кальция, полученного после соответствующей карбонизации. Материал по настоящему изобретению показывает протяженную тонкую структуру по сравнению с предшествующим уровнем техники, в котором большие кристаллы кальцита (до примерно 50 мкм) характеризуют всю структуру. Большие кристаллы вызывают разрушение или коллапс структуры в течение стадии фосфатирования.

На Фиг. 19 показано распределение пор двух каркасов из карбоната кальция, полученных после стадии карбонизации. Сравнение распределения пор и удельной площади поверхности показывает результат, аналогичный обсуждавшемуся выше результату для оксида кальция: с помощью данного способа сохраняют структуру микро- и нанопор < 1 мкм и получают более высокую УПП по отношению к предшествующему уровню техники.

На Фиг. 20 показано сравнение распределения пор конечного биоморфного гидроксиапатитного каркаса (после фосфатирования), полученного с помощью способа по изобретению, и конечного биоморфного гидроксиапатитного каркаса

предшествующего уровня техники. Также показано сравнение соответствующей УПП.

Результаты показывают, что биоморфный каркас по изобретению обладает более высокой фракцией микро- и нанопористости по сравнению с каркасом предшествующего уровня техники, а также более высокой удельной площадью поверхности.

Пример 5. Способ предшествующего уровня техники, примененный к куску древесины ротанга, имеющему длину, измеренную вдоль направления, в котором размер каркаса является максимальным, равную 2 см

Производили испытание для того, чтобы продемонстрировать, что способ предшествующего уровня техники (Anna Tampieri et al. в *Journal of Material Chemistry*, 2009, 19, 4973-4980) не обеспечивает изготовления каркасов, имеющих длину, измеренную вдоль направления, в котором размер каркаса является максимальным, равную или больше 2 см, то есть каркасов, представляющих клинический интерес для регенерации кости.

Для этой цели кусок древесины ротанга был подвергнут технологическим стадиям согласно условиям, описанным Tampieri et al.

На Фиг. 21 показано, что даже перед стадией фосфатирования каркас может разрушиться. На Фиг. 22 показано, что даже если каркас выдерживает технологические стадии до фосфатирования, после фосфатирования каркас разрушается.

Испытание ясно показывает, что увеличение масштаба керамического изделия часто не является простой операцией; наоборот, необходимо изменять (иногда сильно изменять) условия способа, чтобы приготовить большие изделия, даже когда способ производства небольших керамических изделий известен в уровне техники.

Пример 6. Сравнительное испытание

Исследование *in vitro* выполняли с мезенхимальными стволовыми клетками мышей (мМСК). Анализировали профиль экспрессии генов, чтобы исследовать избыточную экспрессию конкретных генов, включенных в остеогенную дифференциацию, вызванную биоморфным гидроксиапатитным каркасом,

полученным с помощью способа по настоящему изобретению, и биоморфным гидроксиапатитным каркасом, полученным с помощью способа предшествующего уровня техники.

Описание образцов

Два испытываемых каркаса определены следующим образом.

	Образец			Размер диска	Кол-во образцов	Способ стерилизации
Каркас по настоящему изобретению	Допированный (по изобретению)	Ca/P Mg/Ca Sr/Ca	1,65 1,64 0,59	Ø 8,00 мм L 4,00 мм	5	EtOH + УФ облучение
	Недопированный (по изобретению)	Ca/P	1,70	Ø 8,00 мм L 4,00 мм	5	EtOH + УФ облучение
Каркас Tampieri et al.	Недопированный (уровень техники)	Ca/P = 1,77		Ø 8,00 мм L 4,00 мм	8	25 кГр γ-излучение

Результаты

Испытываемые гены, относящиеся как к ранней (Runx2 и ALP), так и к поздней стадии (OPN) детерминации остеогенной дифференциации, по-видимому имеют повышенную экспрессию в клетках, выросших во всех каркасах по изобретению по сравнению с каркасами предшествующего уровня техники, со значительной разницей для Runx2 и OPN ($p \leq 0{,}0001$). Никаких отличий не наблюдали в экспрессии генов BMP2 и Col15 во всех испытываемых образцах, возможно потому, что BMP2, который является апстрим-регулятором пути дифференциации, после 14 суток динамического культивирования уже выполнил свою биологическую функцию, о чем свидетельствует повышенная экспрессия Runx2, Alp и OPN [1]. Наоборот, Col15 является очень поздним маркером, связанным с производством минерализованной костной матрицы [2] и, возможно, время культивирования не было достаточным для индуцирования экспрессии. Никаких различий не наблюдали между индуктивным эффектом допированного и недопированного каркасов по изобретению (см. Фиг. 23).

На Фиг. 23 показано относительное количественное определение ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) экспрессии генов по отношению к экспрессии недопированного каркаса предшествующего уровня техники, использованного в качестве калибратора,

после 14 суток трехмерного культивирования мМСК в динамических условиях со всеми испытываемыми образцами. Была указана средняя и стандартная ошибка для трех образцов. Статистический анализ производили путем двухфакторного дисперсионного анализа, с последующим ретроспективным испытанием Bonferroni, и на графике указано значительное различие: ****p≤0,0001.

Из приведенных выше испытаний можно утверждать, что каркасы по изобретению показывают более высокую индуктивную мощность экспрессии связанных с остеогенезом генов по отношению к каркасам предшествующего уровня техники.

Ссылки

[1] Arch Oral Biol. 2013 Jan;58(1):42-9. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.07.010. Epub 2012 Aug 9. Leader genes in osteogenesis: a theoretical study. Orlando B, Giacomelli L, Ricci M, Barone A, Covani U.

[2] J Cell Physiol. 2012 Aug;227(8):3151-61. doi: 10.1002/jcp.24001. Extracellular calcium chronically induced human osteoblasts effects: specific modulation of osteocalcin and collagen type XV. Gabusi E, Manferdini C, Grassi F, Piacentini A, Cattini L, Filardo G, Lambertini E, Piva R, Zini N, Facchini A, Lisignoli G.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биоморфный гидроксиапатитный каркас, полученный из древесины, имеющей общую пористость по меньшей мере 20%, предпочтительно по меньшей мере 40%, причем указанная пористость измерена после подвергания древесины стадии пиролиза, и указанный каркас имеет длину, измеренную вдоль направления, в котором размер каркаса является максимальным, больше или равную 2 см.

2. Биоморфный гидроксиапатитный каркас по п. 1, в котором общая пористость древесины составляет от 60% до 95%.

3. Биоморфный гидроксиапатитный каркас по п. 1 или 2, имеющий прочность на сжатие, измеренную в продольном направлении, более 5 МПа, предпочтительно от 10 МПа до 40 МПа, более предпочтительно от 10 до 20 МПа.

4. Биоморфный гидроксиапатитный каркас по любому из п.п. 1 – 3, имеющий иерархически организованную пористую структуру, которая получена из иерархически организованной пористой структуры древесины, из которой он получен.

5. Биоморфный гидроксиапатитный каркас по любому из п.п. 1 – 4, в котором древесина выбрана из древесины ротанга, сосны, абаша, бальзы, сипо, дуба, палисандра, кемпаса и грецкого ореха, предпочтительно ротанга.

6. Биоморфный гидроксиапатитный каркас по любому из п.п. 1 – 5, в котором иерархически организованная пористая структура содержит от 30 до 80% от общей пористости пор, имеющих диаметр менее 150 мкм, причем остаток до 100% от общей пористости представляют собой поры, имеющие диаметр более 150 мкм.

7. Биоморфный гидроксиапатитный каркас по п. 6, в котором, предпочтительно когда древесина является ротангом, от 30% до 60% от общей пористости каркаса обусловлено порами, имеющими диаметр ≤ 10 мкм.

8. Биоморфный гидроксиапатитный каркас по п. 6, в котором, предпочтительно когда древесина является ротангом, по меньшей мере 25% от общей пористости, предпочтительно от 25% до 50% от общей пористости каркаса обусловлено порами, имеющими диаметр ≤ 1 мкм, предпочтительно ≤ 0,1 мкм, более предпочтительно от 0,01 до 0,1 мкм.

9. Биоморфный гидроксиапатитный каркас по любому из п.п. 6 - 8, в котором, предпочтительно когда древесина является ротангом, по меньшей мере 20% от общей пористости каркаса обусловлены порами, которые имеют диаметр ≥ 150 мкм.

10. Биоморфный гидроксиапатитный каркас по любому из п.п. 6 - 9, имеющий удельную площадь поверхности (УПП) > 9 $м^2$/г, предпочтительно от 9 до 20 $м^2$/г.

11. Биоморфный гидроксиапатитный каркас по любому из п.п. 1 - 10, в котором указанный гидроксиапатит частично замещен одним или более ионами, выбранными из группы, содержащей магний, стронций, кремний, карбонат, натрий, калий, серебро, галлий и медь.

12. Биоморфный гидроксиапатитный каркас по любому из п.п. 1 - 11 для применения в области медицины.

13. Биоморфный гидроксиапатитный каркас по п. 12 для применения в качестве заменителя костной ткани.

14. Биоморфный гидроксиапатитный каркас для применения по п. 13, имеющий форму, соответствующую форме подлежащего восстановлению дефекта кости.

15. Биоморфный гидроксиапатитный каркас по любому из п.п. 12 - 14 для применения в замене или регенерации кости или части кости.

16. Биоморфный гидроксиапатитный каркас для применения по п. 15, в котором указанная кость или части кости являются костью или частями кости, подвергаемыми механическим нагрузкам.

17. Биоморфный гидроксиапатитный каркас для применения по п. 16, в котором указанная кость или части кости являются длинными костями ноги или руки, предпочтительно большой берцовой костью, плюсневой костью, малой берцовой костью, бедренной костью, плечевой костью или лучевой костью.

18. Биоморфный гидроксиапатитный каркас для применения по п. 16, в котором указанная кость или части кости являются частями костей черепа, костями позвоночника или частями челюстно-лицевых костей.

19. Заменитель костной ткани, содержащий биоморфный гидроксиапатитный каркас по любому из п.п. 1 – 11.

20. Способ получения биоморфного гидроксиапатитного каркаса по любому из п.п. 1 – 18 или заменителя костной ткани по п. 19, включающий стадии:

1) пиролиза: изначальную древесину нагревают при температуре в интервале от 600^0C до 1000^0C в инертной атмосфере для получения углеродного шаблона,

2) науглероживания: углеродный шаблон пропитывают кальцием в состоянии пара при температуре в интервале от 900 до 1200^0C и при давлении < 100 кПа (< 1000 мбар) для получения шаблона из карбида кальция,

3) окисления: шаблон из карбида кальция (CaC_2) нагревают на воздухе при температуре в интервале от 750 до 1300^0C, предпочтительно 1000 - 1200^0C, для получения шаблона из оксида кальция,

4) гидратации: шаблон из оксида кальция подвергают воздействию воды, обеспечивая таким образом поглощение воды в количестве 1 – 25 мол.%, предпочтительно 5 – 15 мол.%,

5) карбонизации: шаблон из оксида кальция превращают в карбонат кальция путем нагрева при температуре в интервале от 500 до 900^0C,

предпочтительно при температуре в интервале от 750 до 850^{0}C под давлением в интервале от 4 до 20 МПа,

6) фосфатирования: шаблон из карбоната кальция обрабатывают по меньшей мере одной фосфатной солью для получения биоморфного гидроксиапатитного каркаса.

21. Способ по п. 20, в котором после стадии 1) изначальная древесина имеет общую пористость по меньшей мере 20%, предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно от 60% до 95%.

22. Способ по п. 20 или 21, в котором на стадии 1) изначальную древесину выбирают из ротанга, сосны, абаша, бальзы, сипо, дуба, палисандра, кемпаса и грецкого ореха, предпочтительно она является куском древесины ротанга.

23. Способ по любому из п.п. 20 – 22, в котором до стадии 1) пиролиза способ включает стадию i) выбора и приготовления изначальной древесины, где из указанной изначальной древесины вырезают кусок, имеющий длину, измеренную вдоль направления, в котором размер древесины является максимальным, больше или равную 2 см.

24. Способ по п. 23, в котором стадия i) выбора и приготовления изначальной древесины включает стадии предоставления трехмерной модели дефекта кости и, на основе полученной трехмерной модели, придания изначальной древесине формы, соответствующей форме дефекта кости.

25. Способ по любому из п.п. 20 – 24, в котором стадию 2) науглероживания выполняют с молярным отношением Ca/C в начале реакции в интервале от 1,10 до 2,50, предпочтительно в интервале от 1,50 до 2,00.

26. Способ по любому из п.п. 20 – 24, в котором стадию 2) науглероживания выполняют при температуре от 900 до 1200^{0}C и при давлении < 100 кПа (< 1000 мбар), предпочтительно < 60 кПа (< 600 мбар), более предпочтительно в интервале от 5 Па до 10 кПа (от 0,05 до 100 мбар).

27. Способ по любому из п.п. 20 – 26, в котором на стадии 4) гидратации шаблон из оксида кальция подвергают увлажнению водой, обеспечивая таким образом поглощение воды в количестве в интервале от 1 до 25 мол.%, более предпочтительно в интервале от 5 до 15 мол.%.

28. Способ по любому из п.п. 20 – 27, в котором стадию 5) карбонизации выполняют согласно одному из следующих тепловых циклов:

- при постоянном давлении CO_2, составляющем примерно 10 МПа, медленно повышая температуру до значения в интервале примерно от 750 до 850^{0}C, предпочтительно примерно до 800^{0}C,

- при постоянной температуре, составляющей примерно 750 - 850^{0}C, предпочтительно примерно 800^{0}C, повышая давление примерно до 10 МПа,

- поддерживая давление на уровне примерно 4 – 6 МПа, при этом повышая температуру примерно до 750 - 850^{0}C, предпочтительно примерно до 800^{0}C, и затем повышая давление примерно до 10 МПа.

29. Способ по любому из п.п. 20 – 28, в котором на стадии 6) фосфатирования по меньшей мере одну фосфатную соль выбирают из группы, состоящей из фосфата аммония, фосфата натрия, фосфата калия и их смесей, предпочтительно фосфата аммония.

30. Способ по любому из п.п. 20 – 29, в котором на стадии 6) фосфатирования шаблон из карбоната кальция погружают в раствор на водной основе, содержащий по меньшей мере одну фосфатную соль, причем указанный раствор имеет концентрацию фосфата от 0,1 до 5 М, предпочтительно концентрацию от 0,5 до 2,0 М.

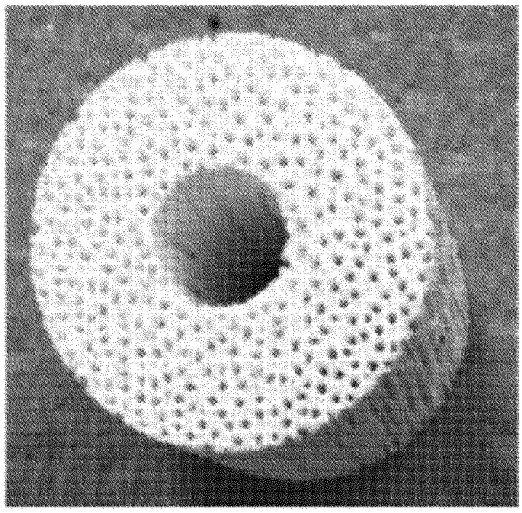
31. Способ по любому из п.п. 20 – 30, в котором исходное отношение PO_4/CO_3 на стадии 6) фосфатирования от 1,5 до 5 раз больше теоретического стехиометрического значения, предпочтительно от 2 до 4 раз больше теоретического стехиометрического значения.

32. Способ по любому из п.п. 20 – 31, в котором стадию 6) фосфатирования выполняют в присутствии ионов магния, стронция, кремния, карбоната, натрия, калия, серебра, галлия или меди или их смесей.

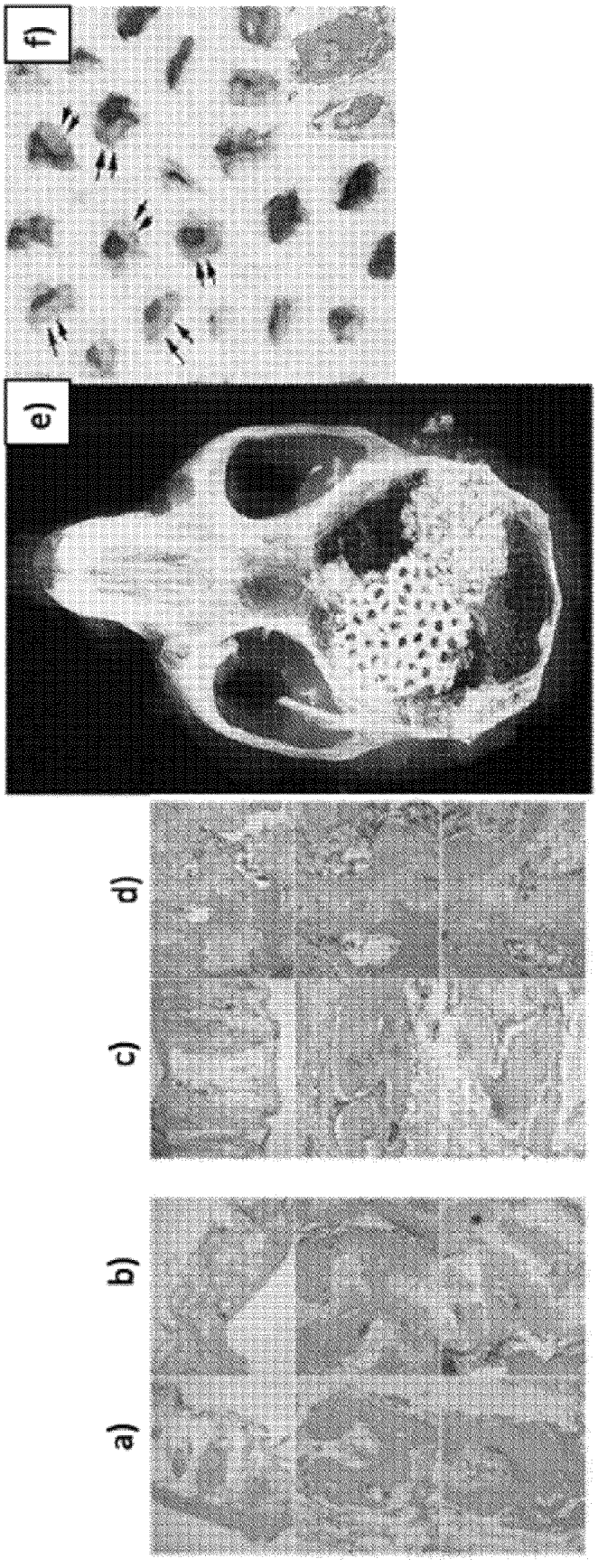
33. Полученный из древесины биоморфный гидроксиапатитный каркас, получаемый способом, описанным в любом из п.п. 20 – 32.

34. Полученный из древесины биоморфный гидроксиапатит, имеющий общую пористость от 60% до 95%, причем указанная пористость измерена после подвергания древесины стадии пиролиза, при этом указанный гидроксиапатит отличается иерархически организованной пористой структурой и прочностью на сжатие, измеренной вдоль продольного направления, более 5 МПа, предпочтительно от 10 МПа до 20 МПа.

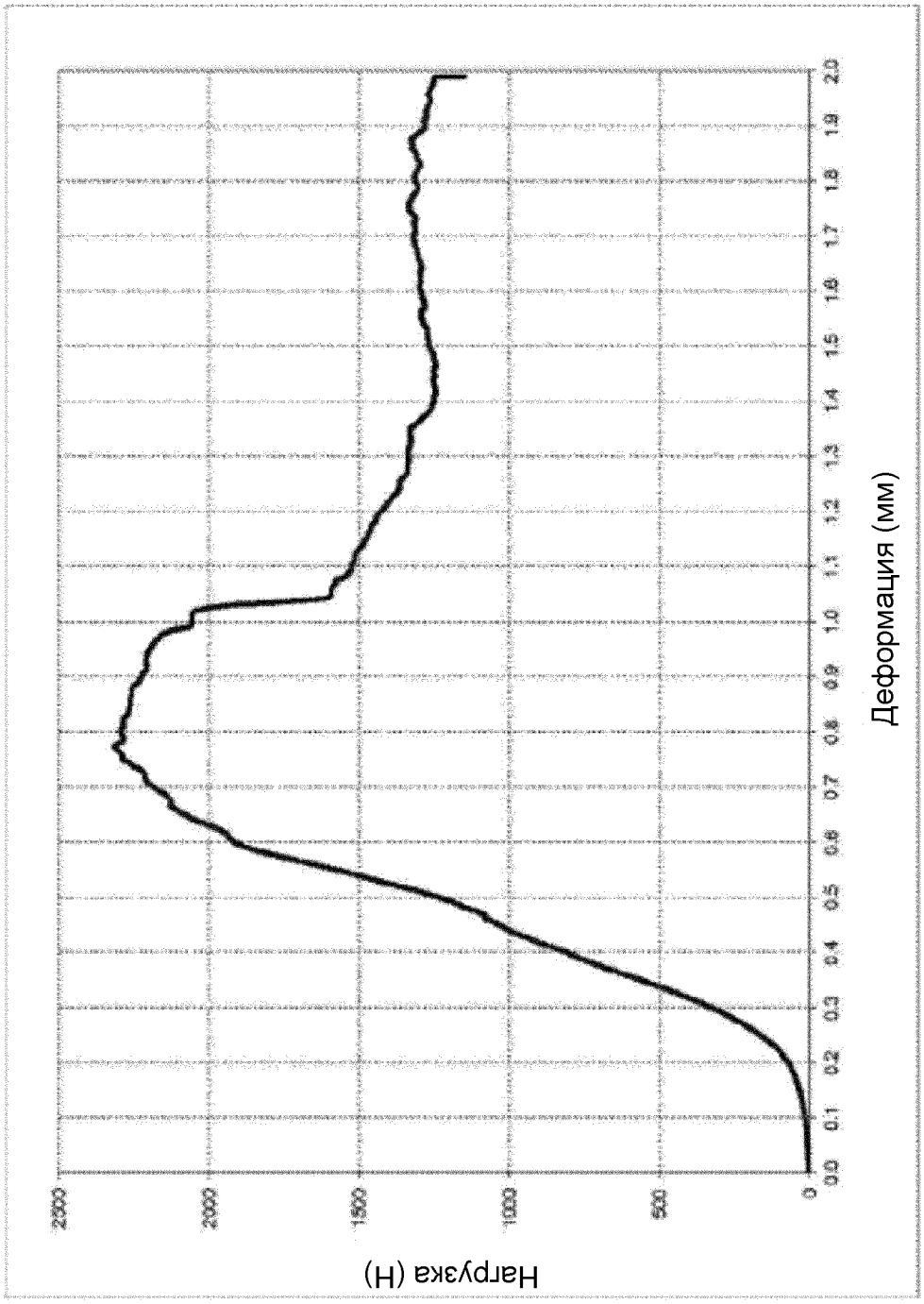
35. Заменитель костной ткани, содержащий биоморфный гидроксиапатитный каркас по п. 33.



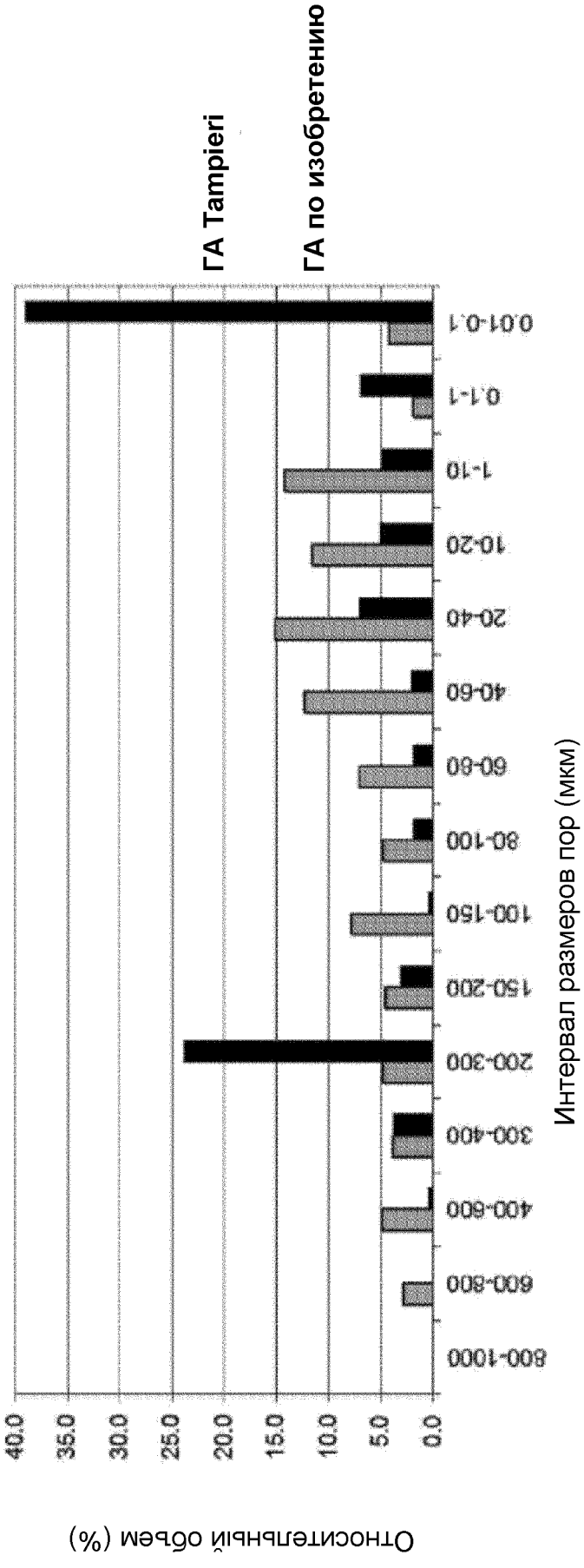
Фиг. 1



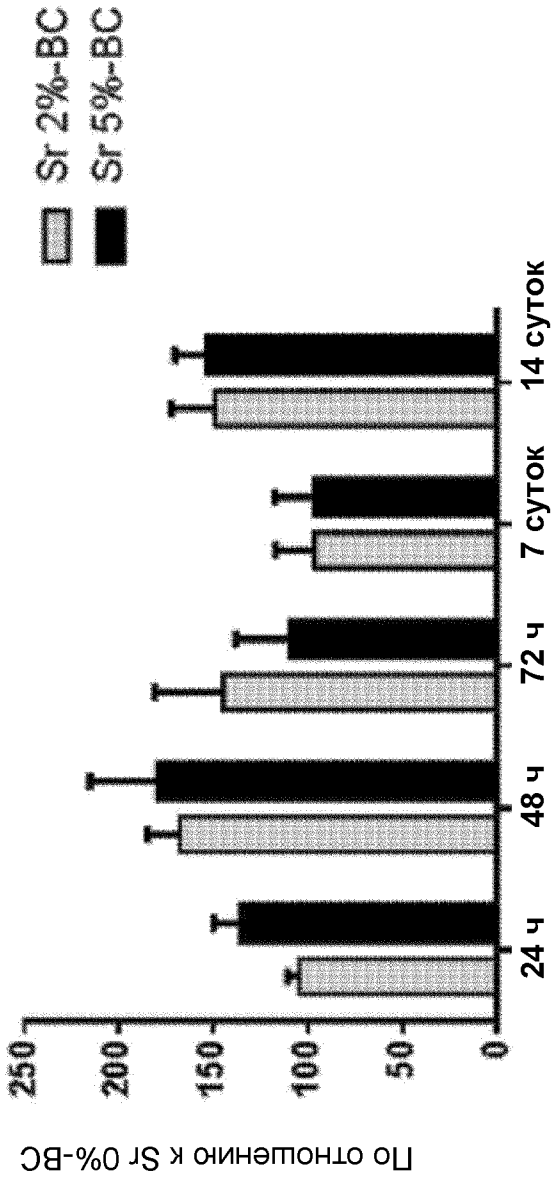
Фиг. 2


Нагрузка (Н)
2500
2000
1500
1000
500
0
Деформация (мм)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1.0
1.1
1.2
1.3
1.4
1.5
1.6
1.7
1.8
1.9
2.0

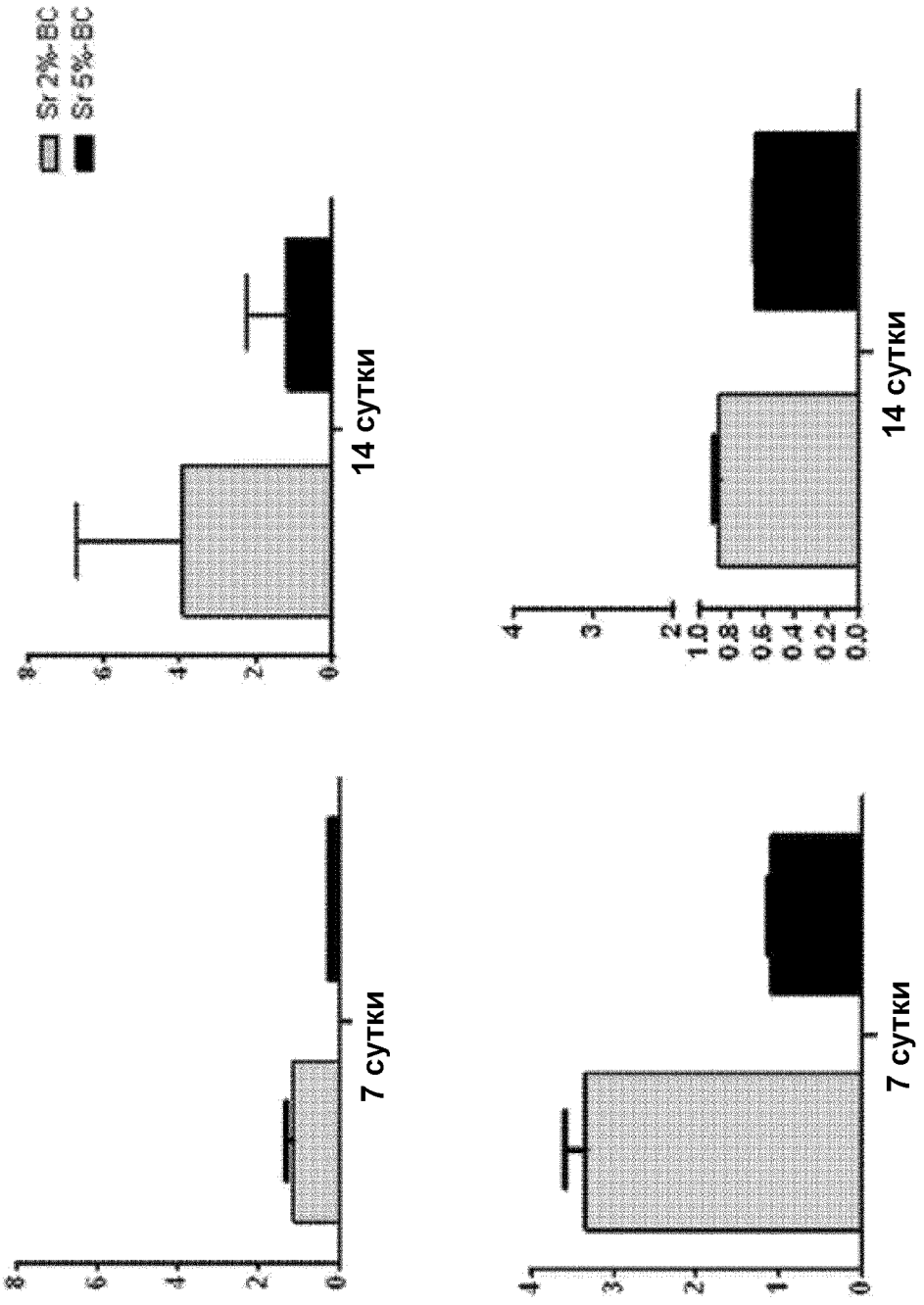
Фиг. 3


ГА Tampieri
ГА по изобретению
0.01-0.1
0.1-1
1-10
10-20
20-40
40-60
60-80
80-100
100-150
150-200
200-300
300-400
400-600
600-800
800-1000
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
Относительный объем (%)
Интервал размеров пор (мкм)

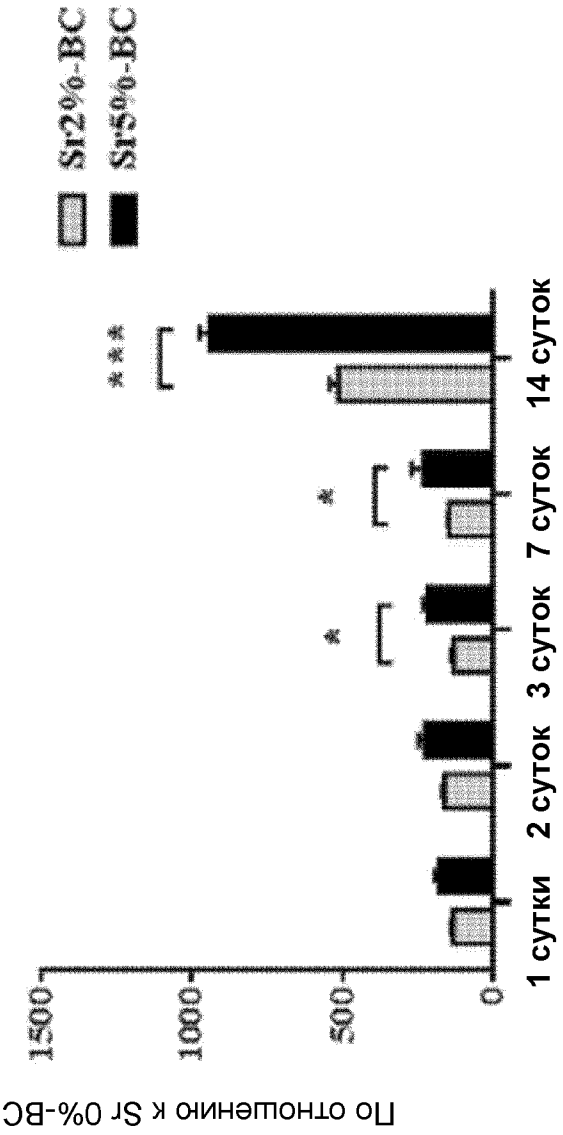
Фиг. 4


Sr 2%-BC
Sr 5%-BC
250
200
150
100
50
0
По отношению к Sr 0%-BC
24 ч
48 ч
72 ч
7 суток
14 суток

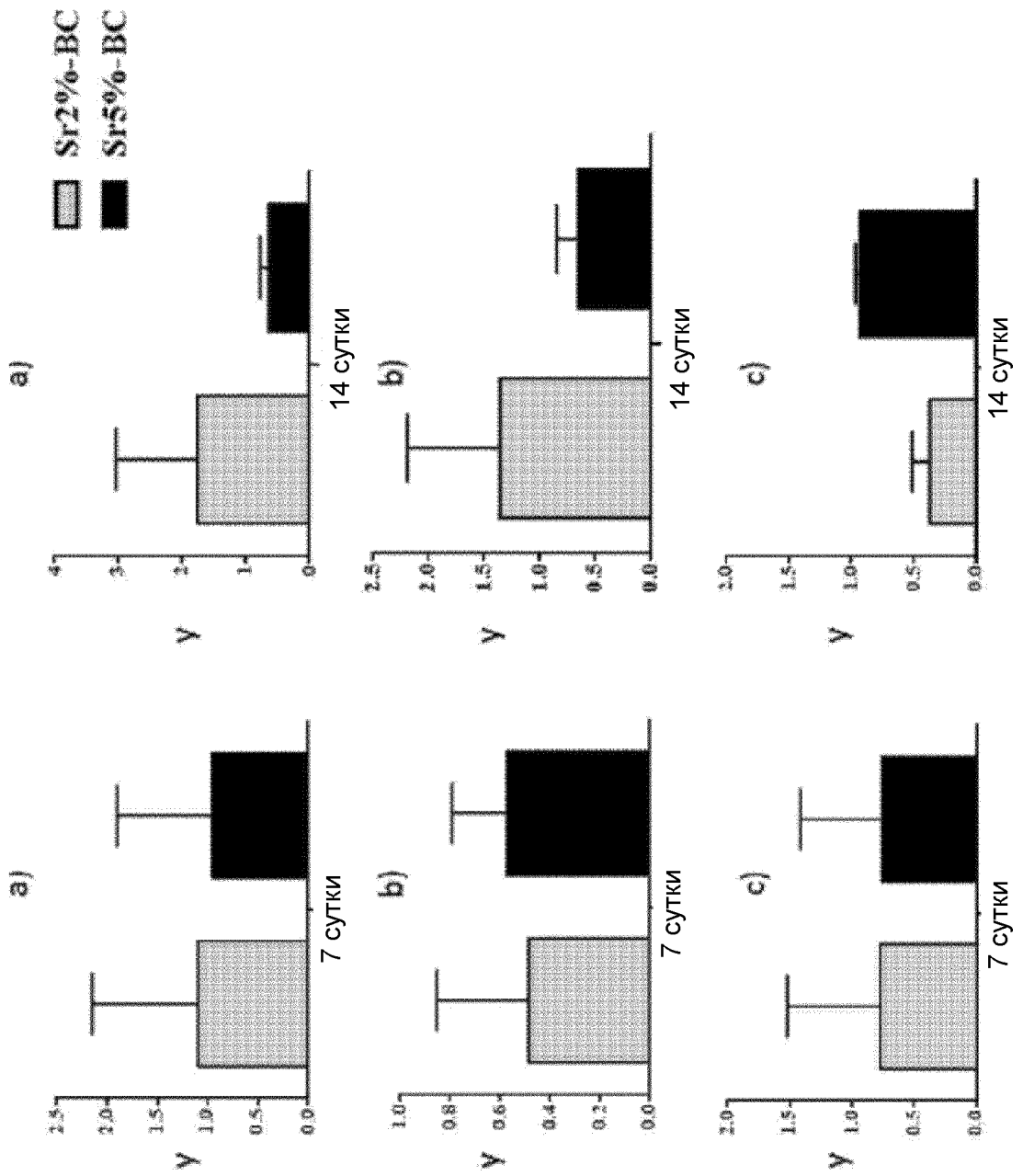
Фиг. 5



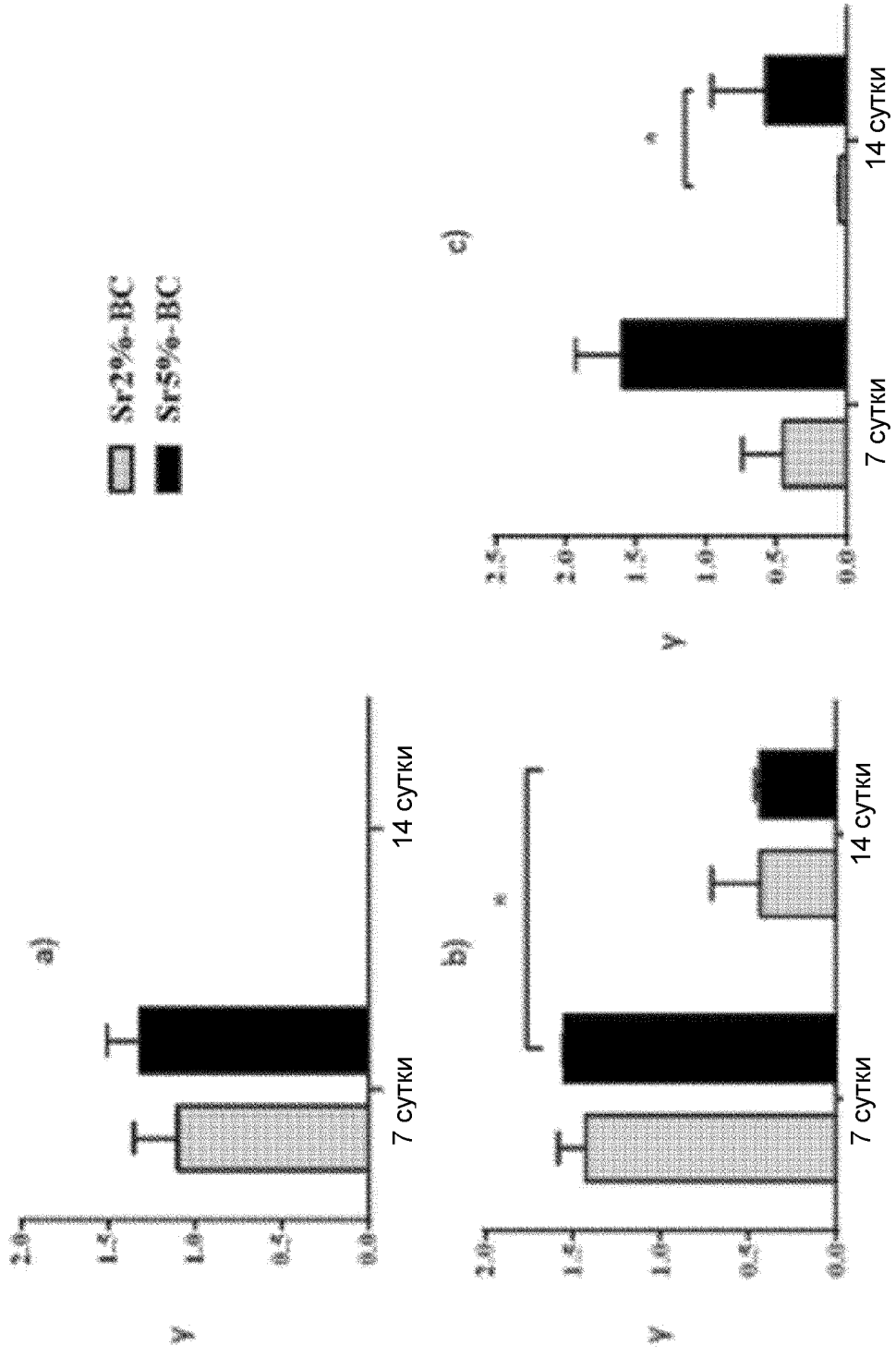
Фиг. 6


Sr2%-BC
Sr5%-BC
***
*
*
1 сутки
2 суток
3 суток
7 суток
14 суток
0
500
1000
1500
По отношению к Sr 0%-BC

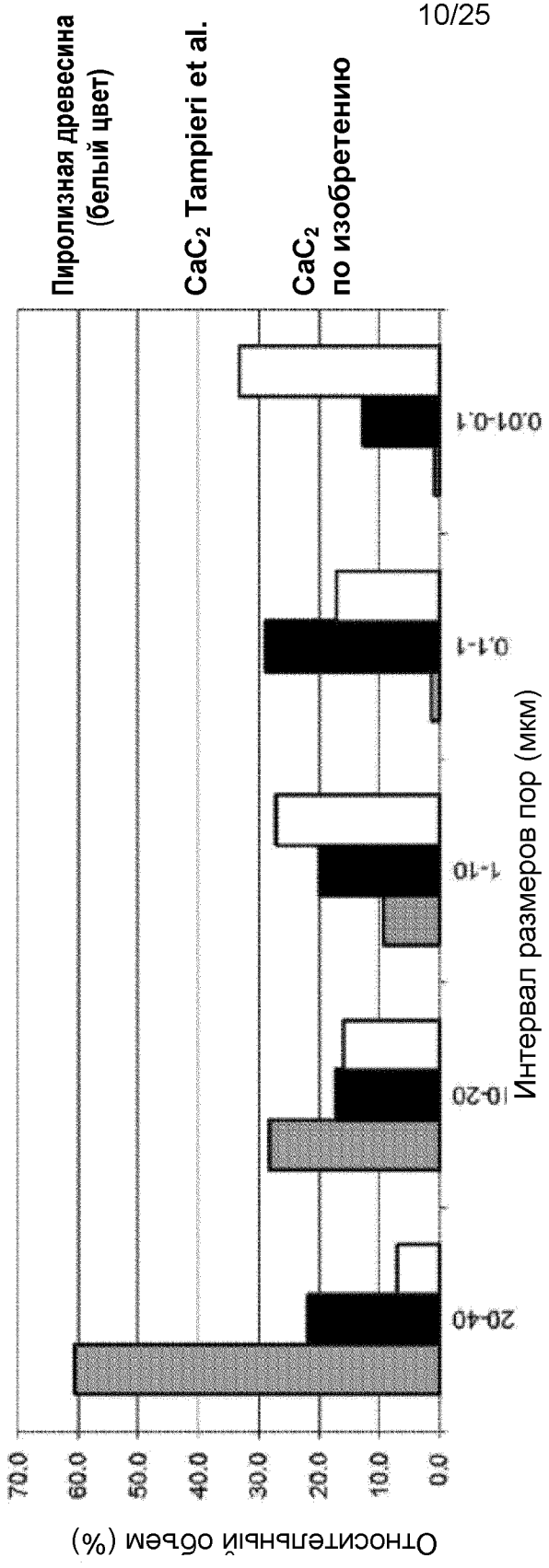
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



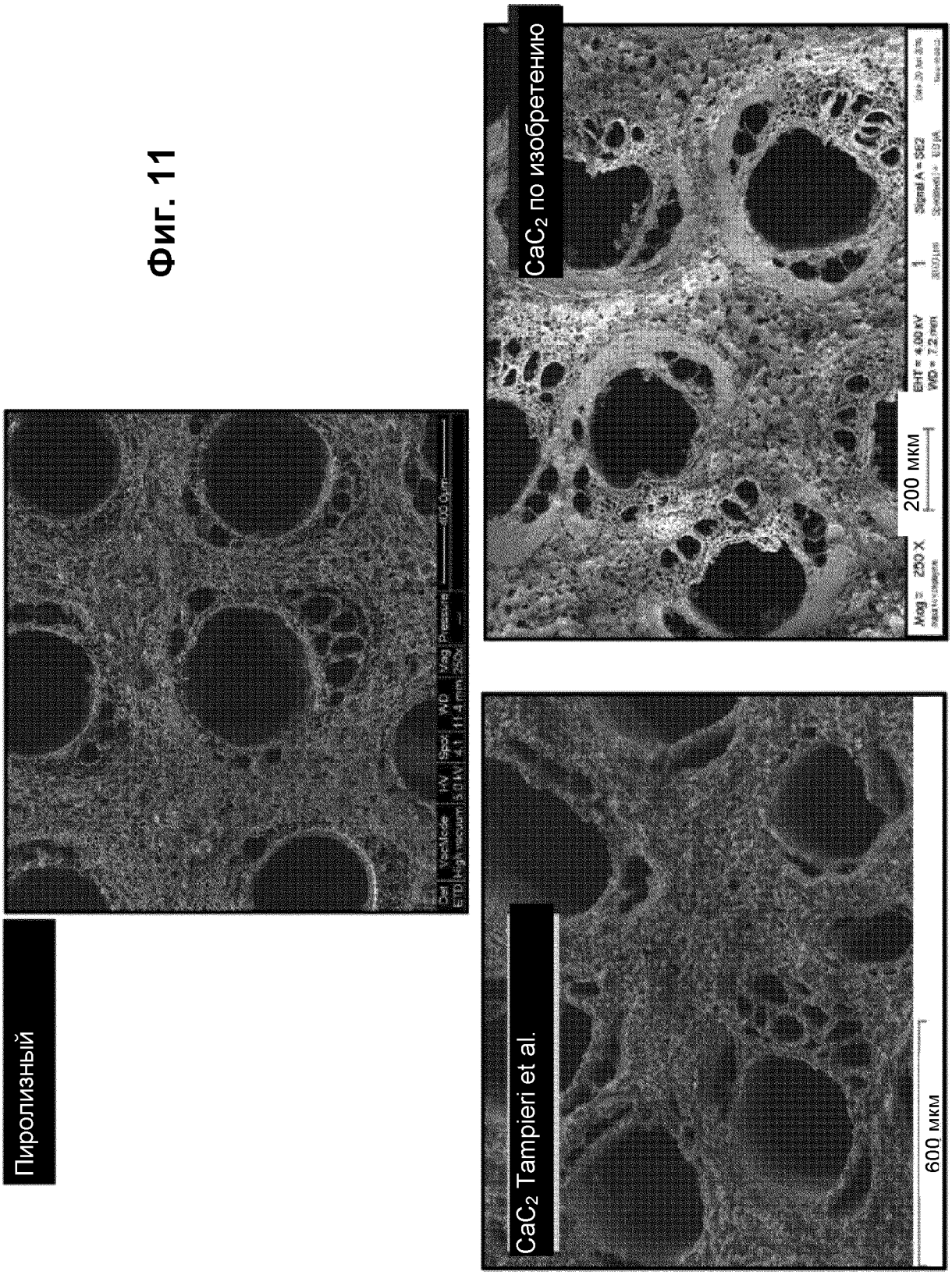
Удельная площадь поверхности - УПП ($м^2/г$)

Tampieri et al. = 5,30

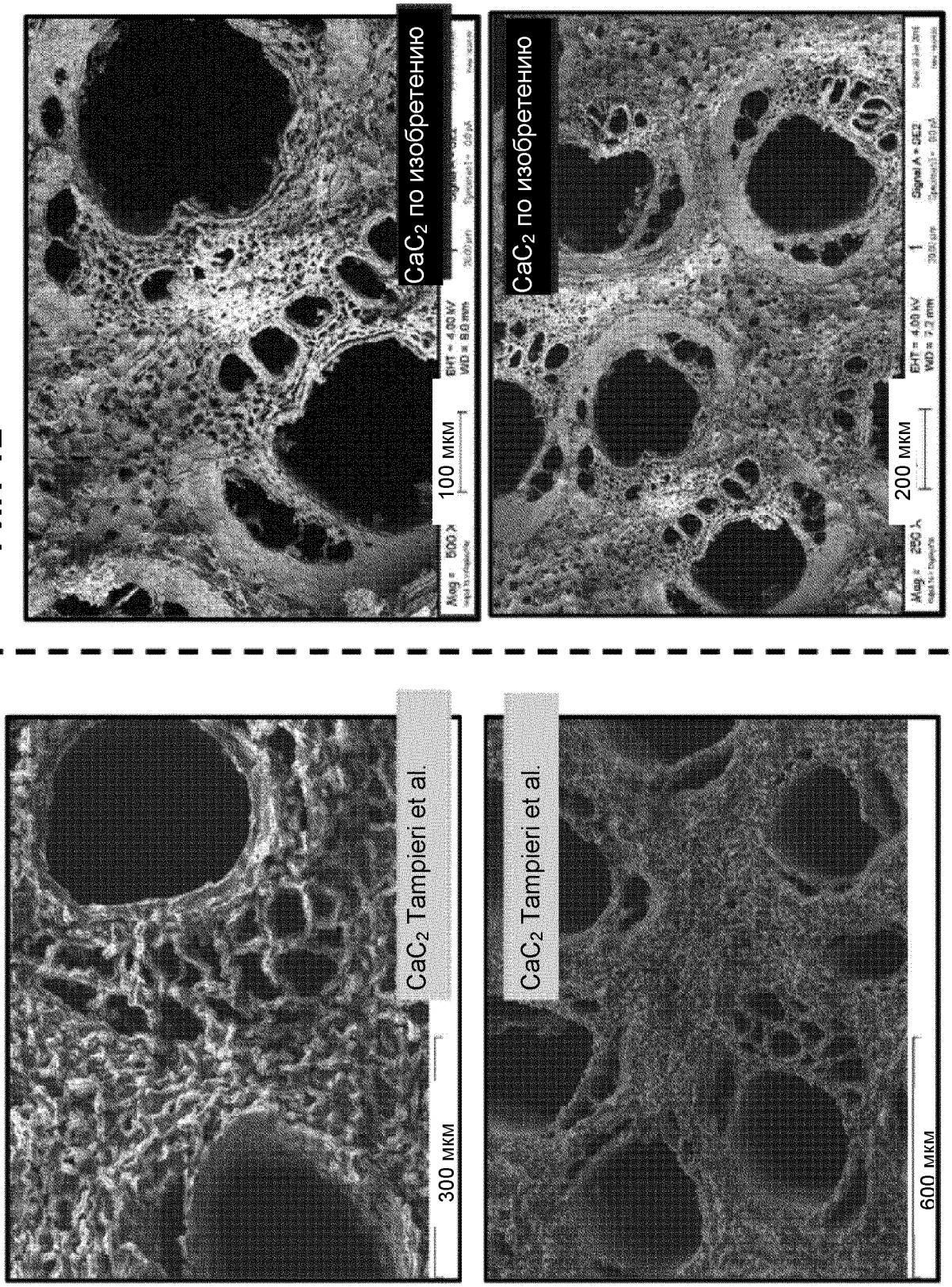
по изобретению = 8,53

Фиг. 10

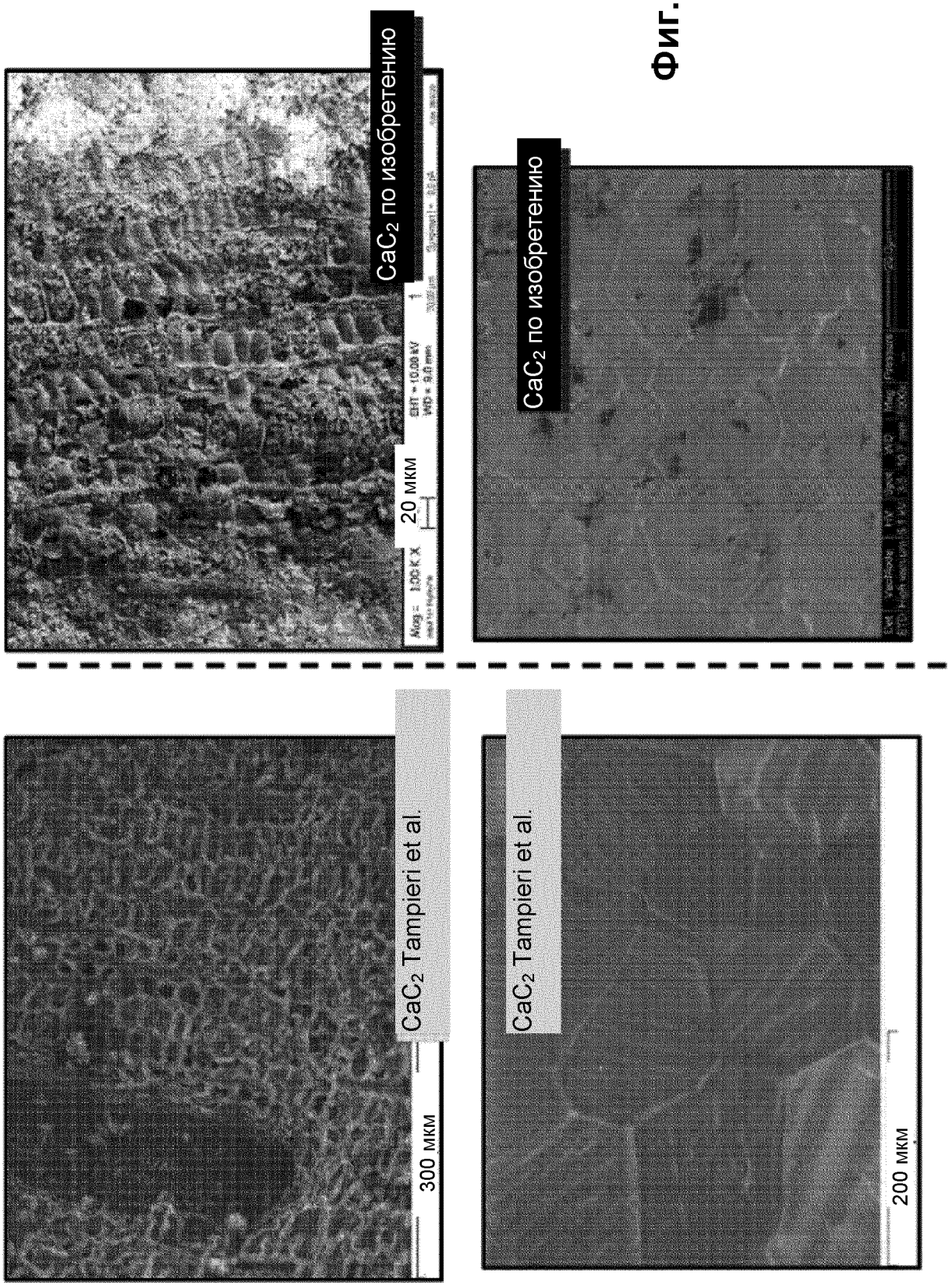
Фиг. 11

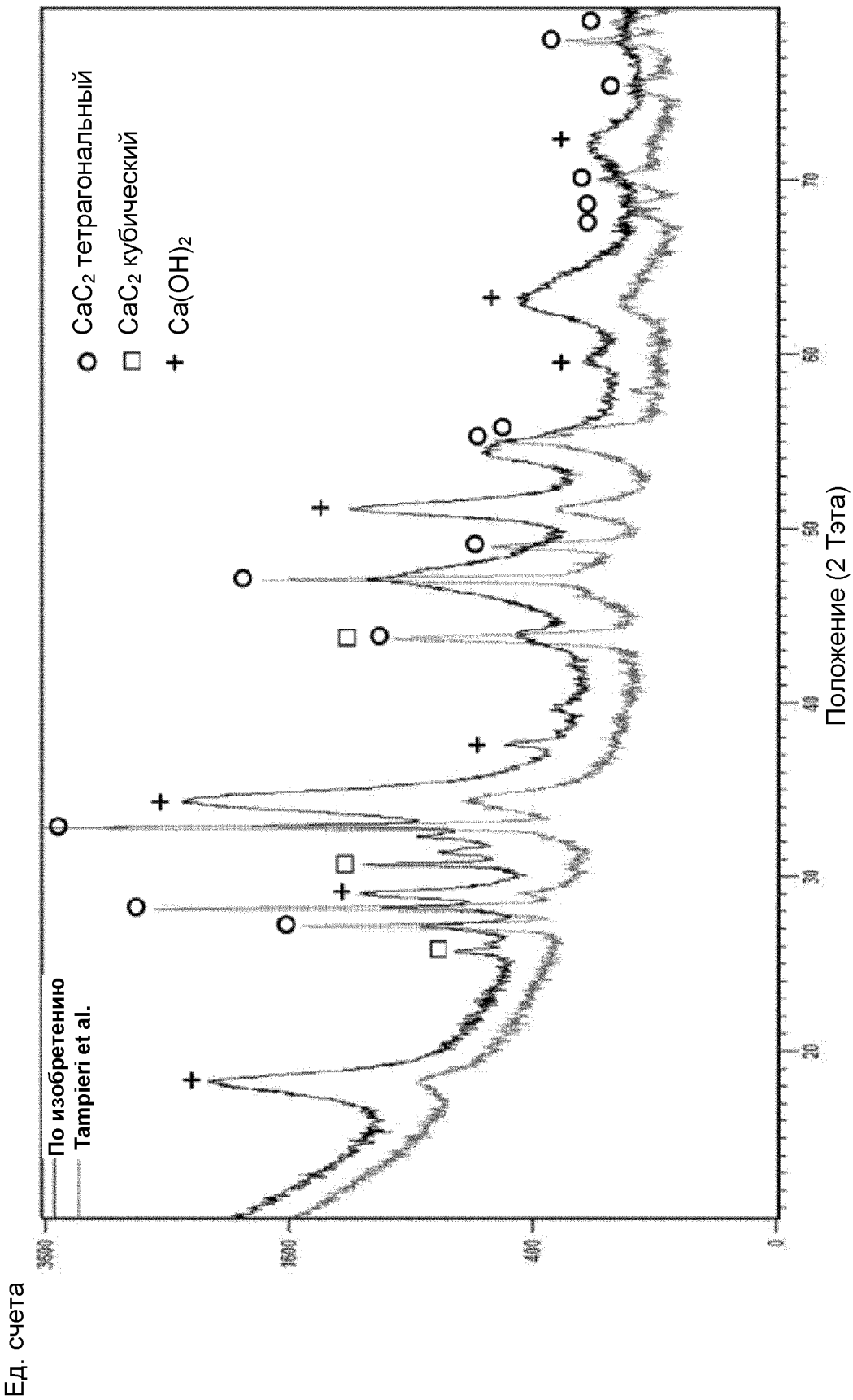

Пиролизный
CaC_2 Tampieri et al.
600 мкм
CaC_2 по изобретению
200 мкм

Фиг. 12

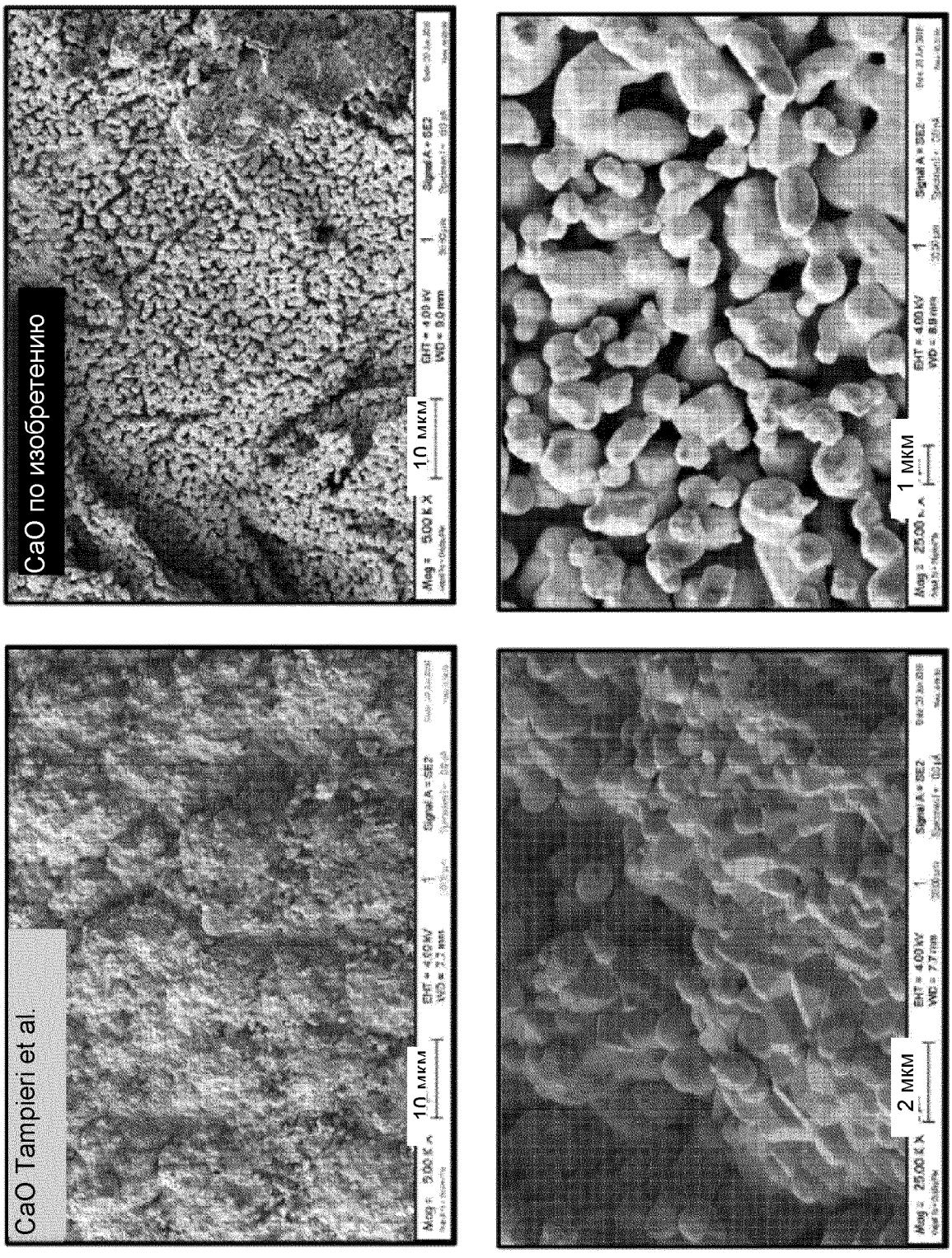

CaC_2 по изобретению
100 мкм
CaC_2 по изобретению
200 мкм
CaC_2 Tampieri et al.
300 мкм
CaC_2 Tampieri et al.
600 мкм

Фиг. 13

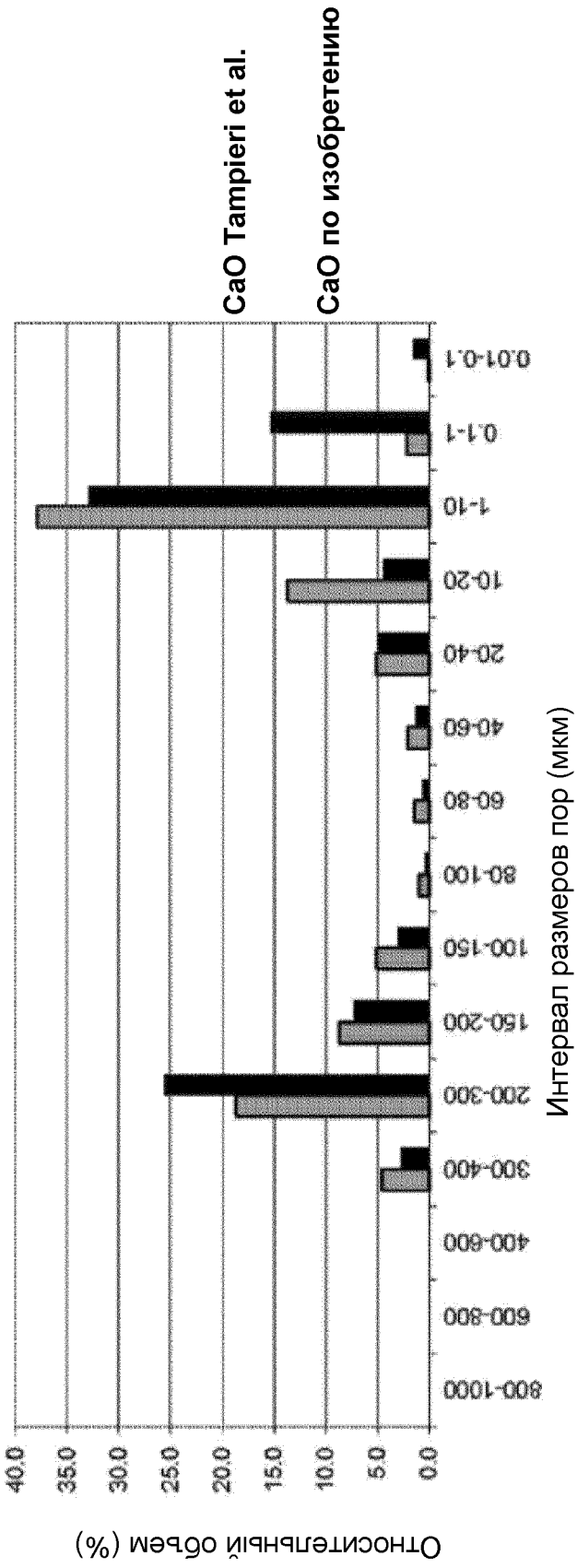

CaC_2 по изобретению
20 мкм
CaC_2 по изобретению
CaC_2 Tampieri et al.
300 мкм
CaC_2 Tampieri et al.
200 мкм


Ед. счета
3600
1600
400
0
По изобретению
Tampieri et al.
CaC2 тетрагональный
CaC2 кубический
Ca(OH)2
20
30
40
50
60
70
Положение (2 Тэта)

Фиг. 14



Фиг. 15

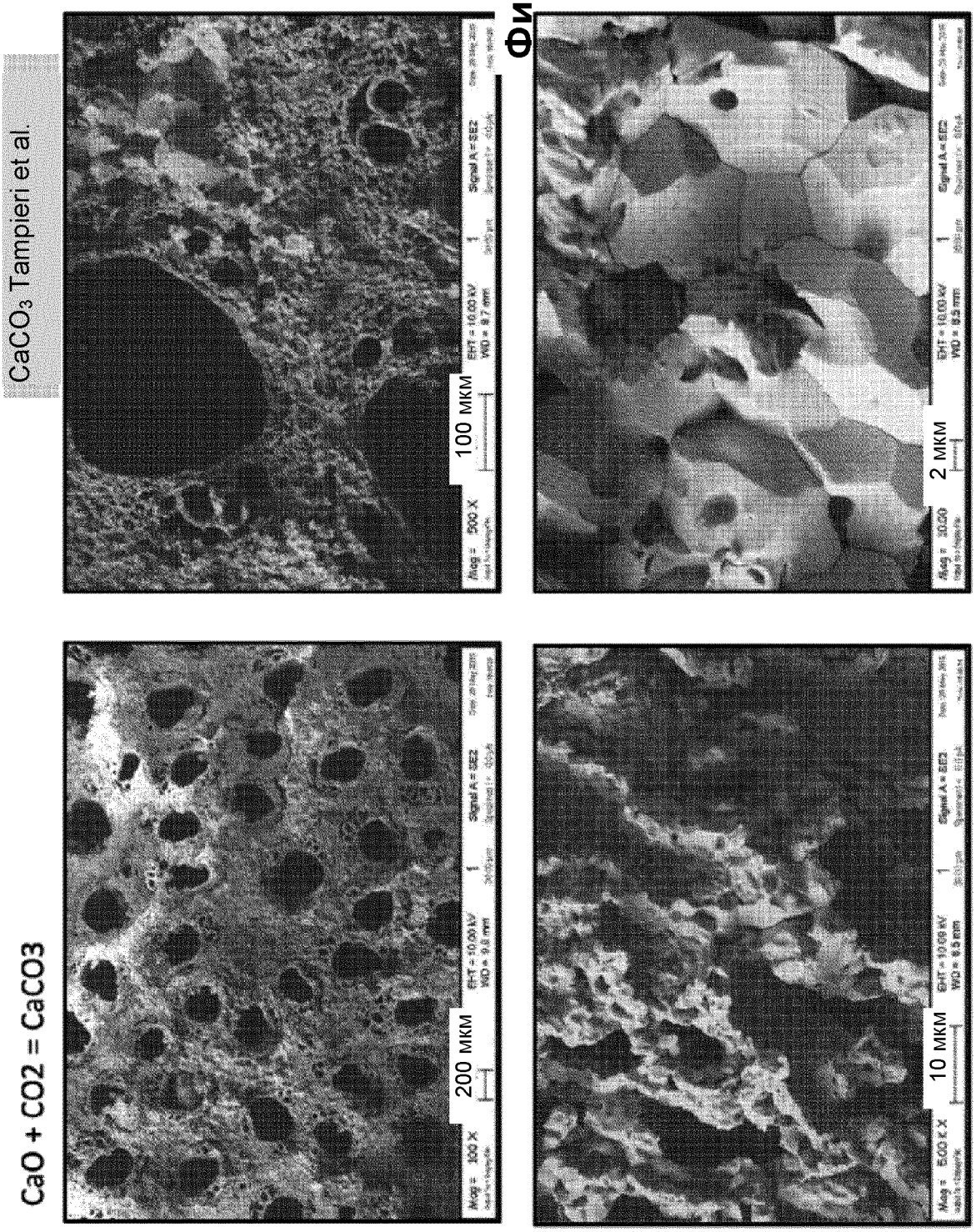


Удельная площадь поверхности – УПП ($м^2/г$)

Tampieri et al. = 6,69

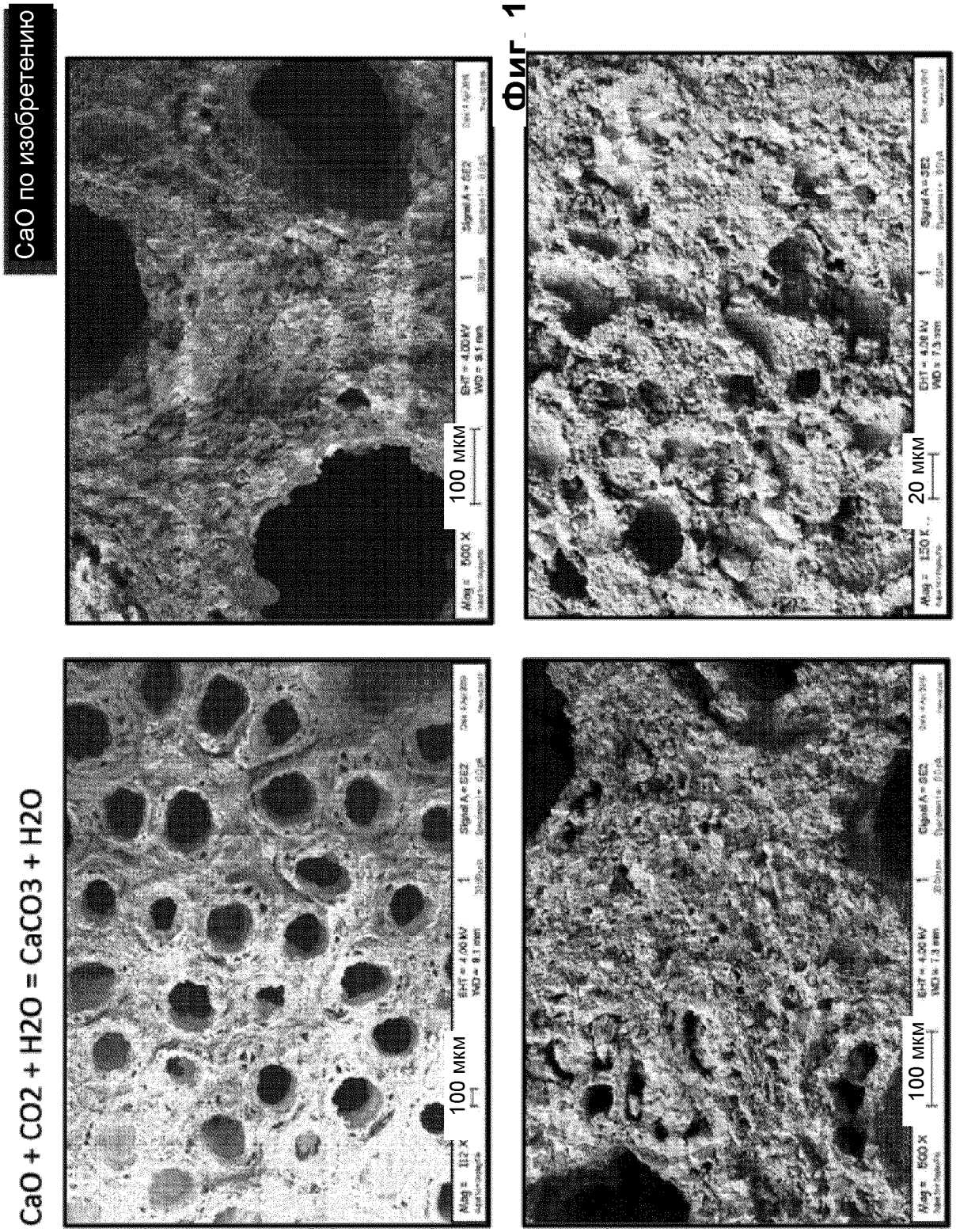
по изобретению = 9,56

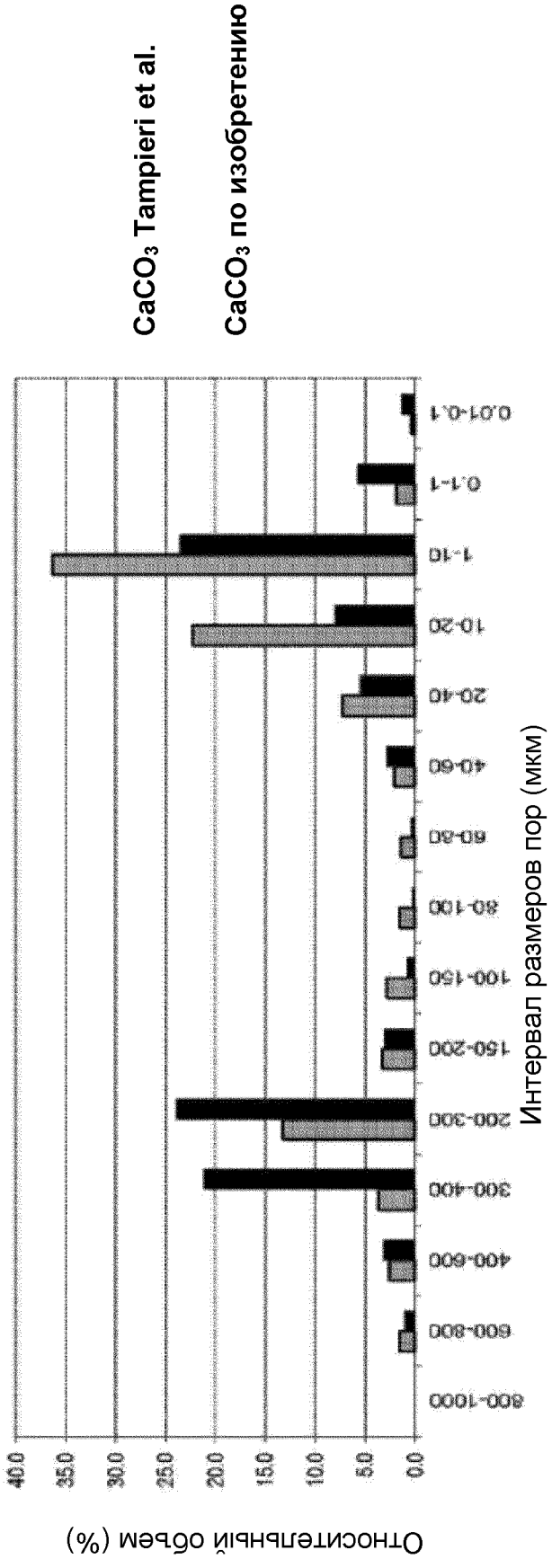
Фиг. 16



Фиг. 17

Фиг. 18

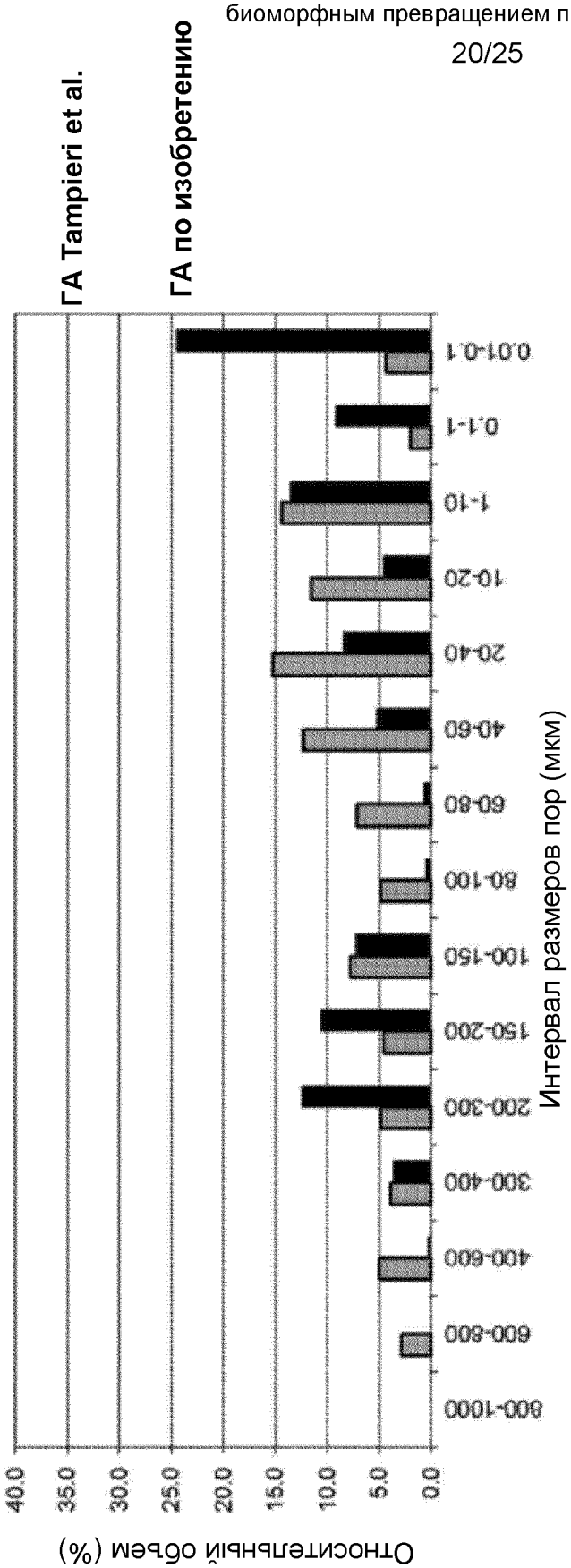

CaO по изобретению
CaO + CO2 + H2O = CaCO3 + H2O
100 мкм
100 мкм
20 мкм
100 мкм



Удельная площадь поверхности –УПП ($м^2/г$)

Tampieri et al. = 3,57
по изобретению = 5,52

Фиг. 19



Удельная площадь поверхности - УПП ($м^2/г$)

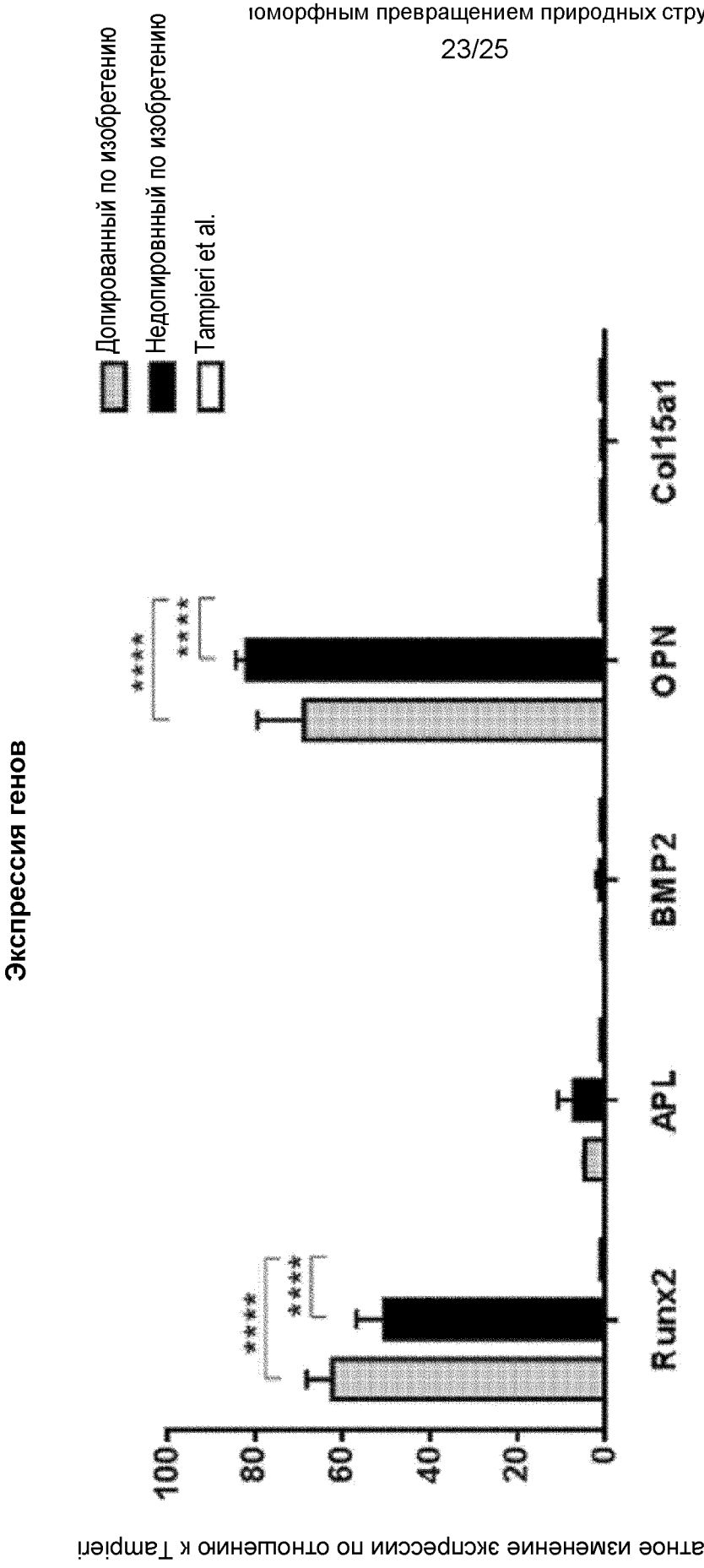
Tampieri et al. = 6,28

по изобретению = 9,60

Фиг. 20

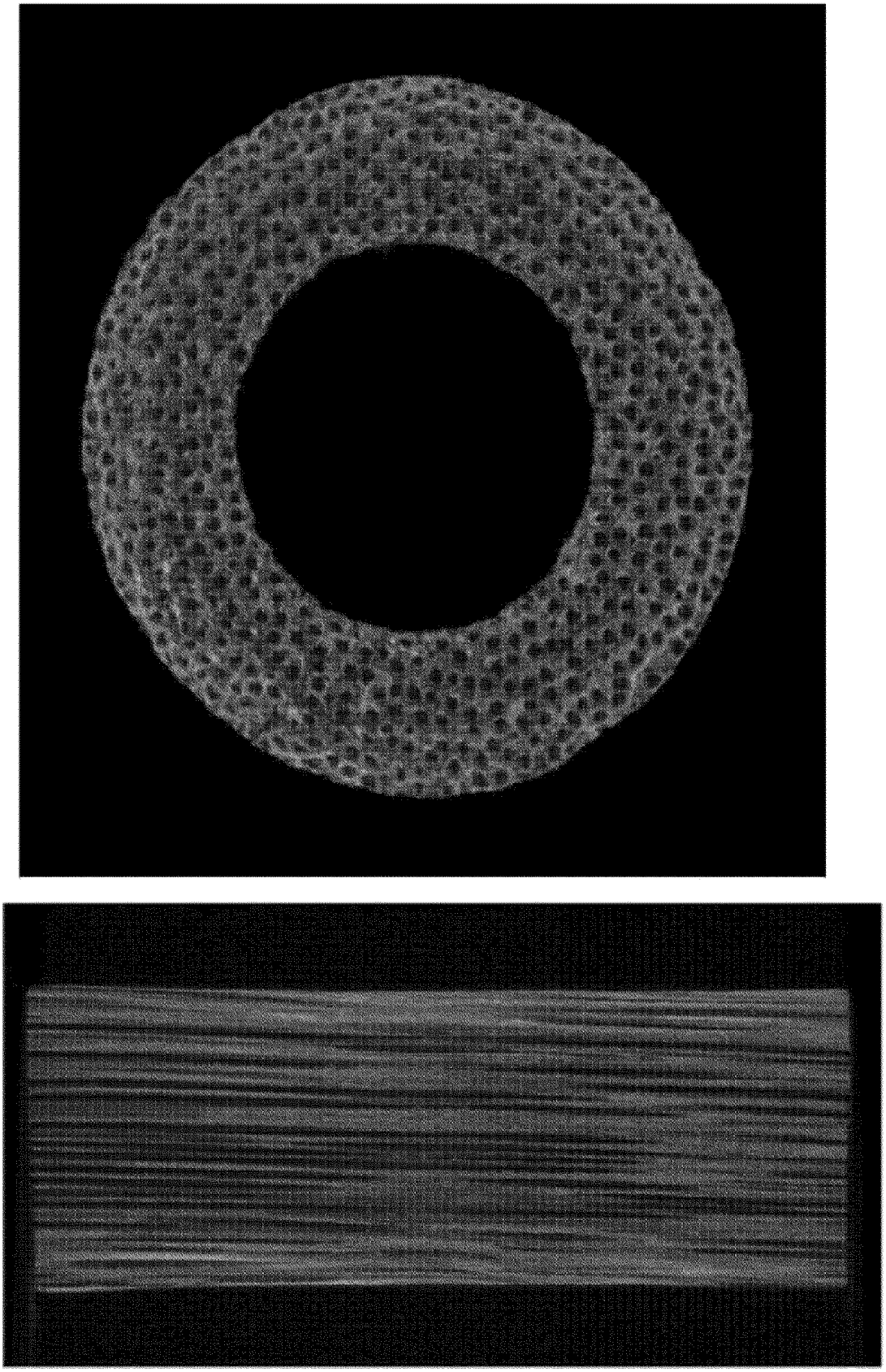
Фиг. 21

Фиг. 22


Допированный по изобретению
Недопировнный по изобретению
Tampieri et al.
Экспрессия генов
Кратное изменение экспрессии по отношению к Tampieri
100
80
60
40
20
0
****
****
****
****
Runx2
APL
BMP2
OPN
Col15a1

Фиг. 23

Фиг. 24



Фиг. 25