



Matthias Schnabelrauch

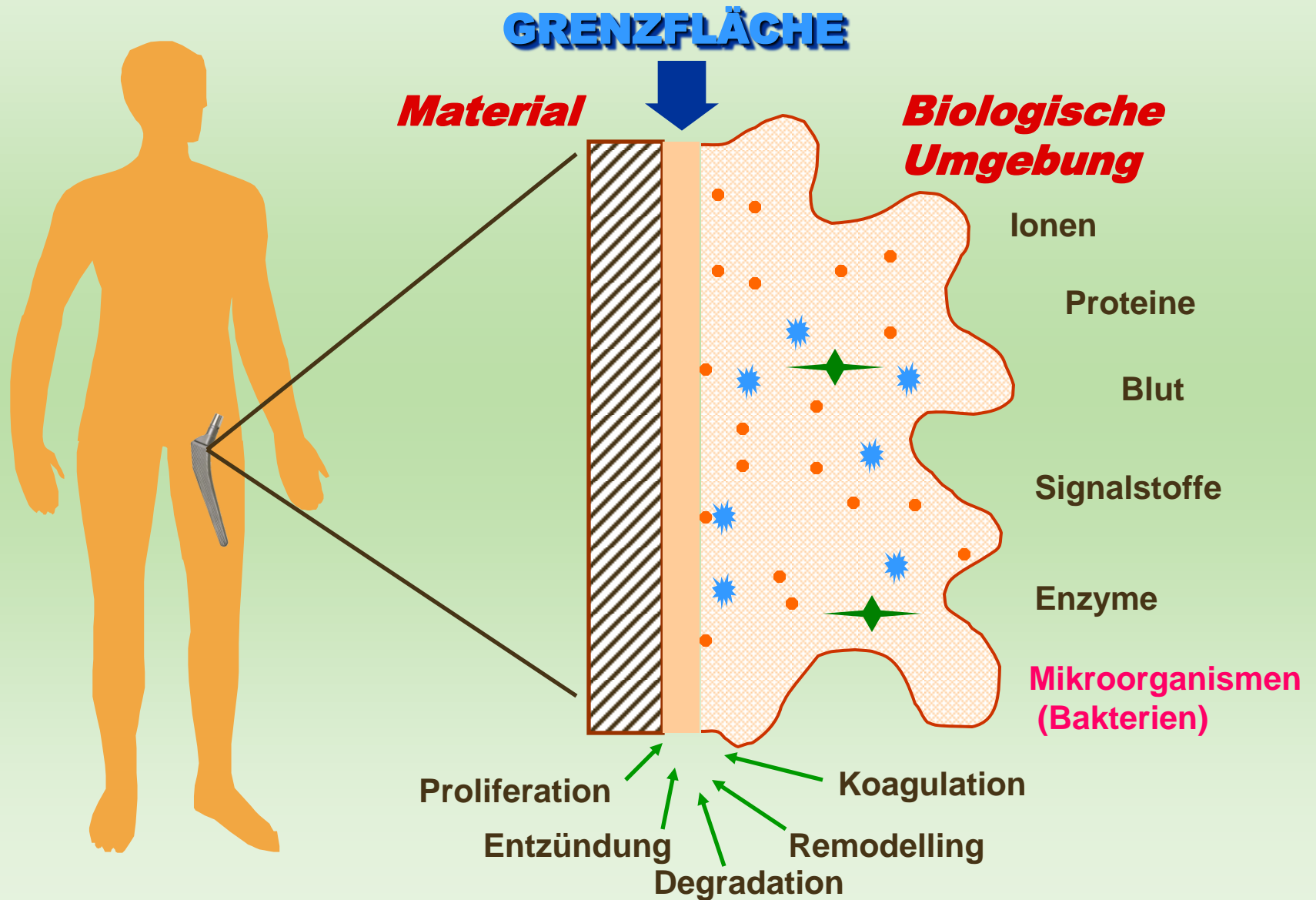
**INNOVENT e. V., Forschungsbereich Biomaterialien,
Prüssingstrasse 27B, D-07745 Jena, ms@innovent-jena.de**

RESORBIERBARE BIOAKTIVE UND WIRKSTOFF-HALTIGE BESCHICHTUNGEN FÜR IMPLANTATE IM HARTGEWEBEBEREICH

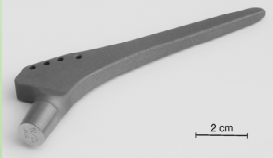
- 1. BIOAKTIVE IMPLANTATOBERFLÄCHEN**
- 2. BESCHICHTUNGSSYSTEME FÜR ZELLADHÄSIONSPEPTIDE**
- 3. PRÄZIPITIERENDE IONENPAAR-BILDUNG ALS METHODE ZUR
HERSTELLUNG VON WIRKSTOFFBESCHICHTUNGEN**
- 4. ZUSAMMENFASSUNG**



ZELL – MATERIAL – GRENZFLÄCHE



BIOAKTIVE IMPLANTBESCHICHTUNGEN



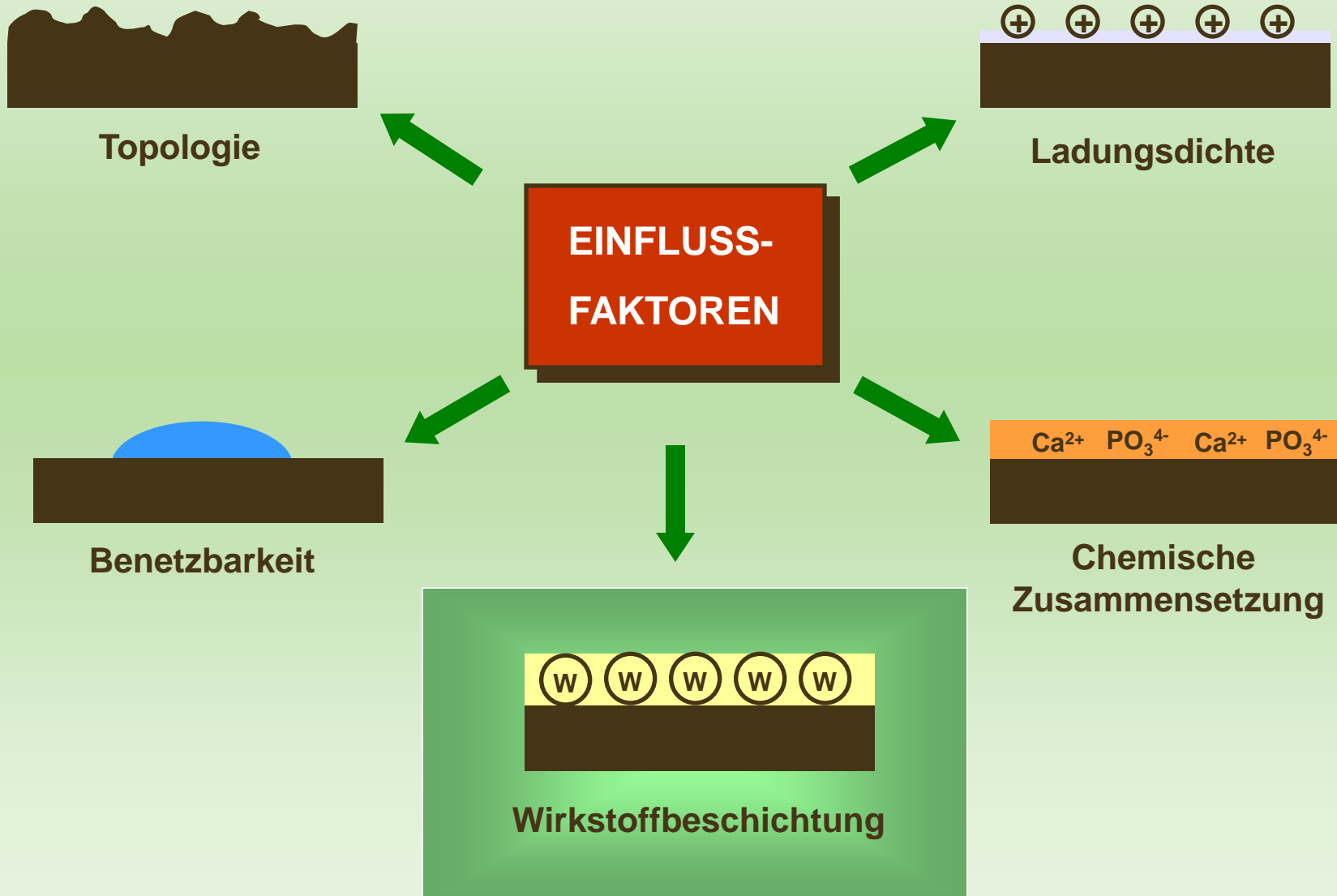
- Optimierung des Einwachsverhaltens von Implantaten
- Verbesserung der Langzeitstabilität und Funktionalität

STEUERUNG VON SPEZIFISCHE BIOLOGISCHE REAKTIONEN AN DER MATERIAL-GEWEBE-GRENZFLÄCHE

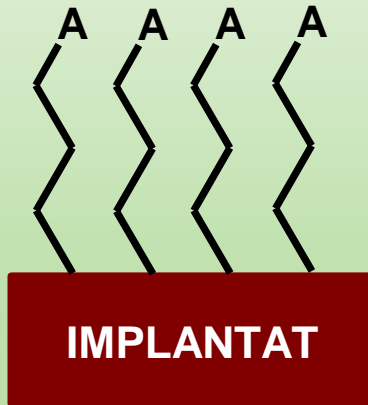
- Stimulierung von Zelladhäsion, -wachstum und –differenzierung
- Immobilisierung von antiproliferativen Wirkstoffen zur Inhibierung von unerwünschtem Zellwachstums (z. B. in Stents)
- Arzneistofffreisetzung aus Implantatoberflächen zur lokalen Wirkstofftherapie
- Antiadhäsive und antibakterielle Oberflächen



ZELLADÄSIONSFÖRDERNDE OBERFLÄCHEN



FIXIERUNG BIOAKTIVER MOLEKÜLE AUF IMPLANTATOBERFLÄCHEN



Kovalente Fixierung des Wirkstoffs über Anker- bzw. Spacergruppen



Direkte Adsorption bioaktiver Moleküle auf die Implantatoberfläche



Einbettung des Wirkstoffs in (an)organische Polymerschicht

PROBLEME

- Selektive Kopplung ohne Beeinträchtigung des aktiven Zentrums

- Steuerung der Wirkstofffreisetzung und Langzeitverfügbarkeit

- In klinischer Anwendung für verschiedene Wirkstoffe

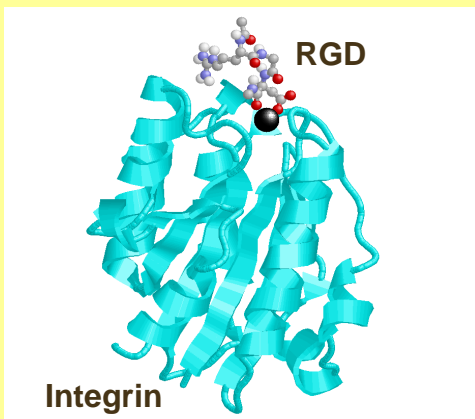
A: bioaktives Molekül oder Wirkstoff



MOLEKÜLE ZUR VERBESSERUNG DER IMPLANTATINTEGRATION

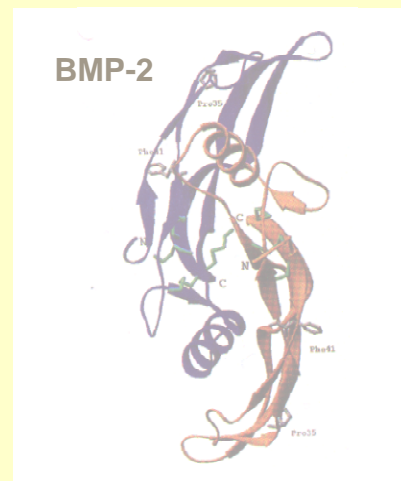
ADHÄSIONSPEPTIDE

- Rezeptor (Integrin)-bindende Aminosäuresequenzen (Oligopeptide) von ECM-Proteinen:
RGD (Fibronektin)
GFOGER (Kollagen)
IKVAV (Vitronektin)
- Stimulierung der Zelladhäsion auf Implantaten



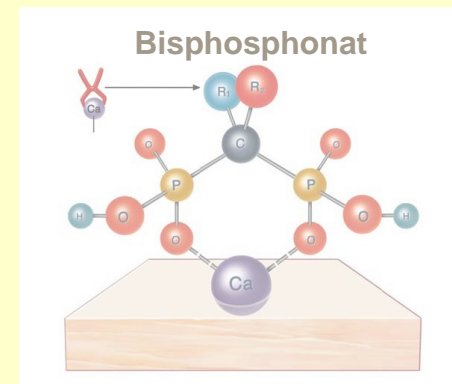
WACHSTUMSFAKTOREN

- Proteine, die Informationen zwischen Zellen übertragen:
Bone Morphogenetic Proteins (BMP)
Transforming Growth Factors (TGF- β)
- Stimulierung des Zellwachstums im Implantatbereich

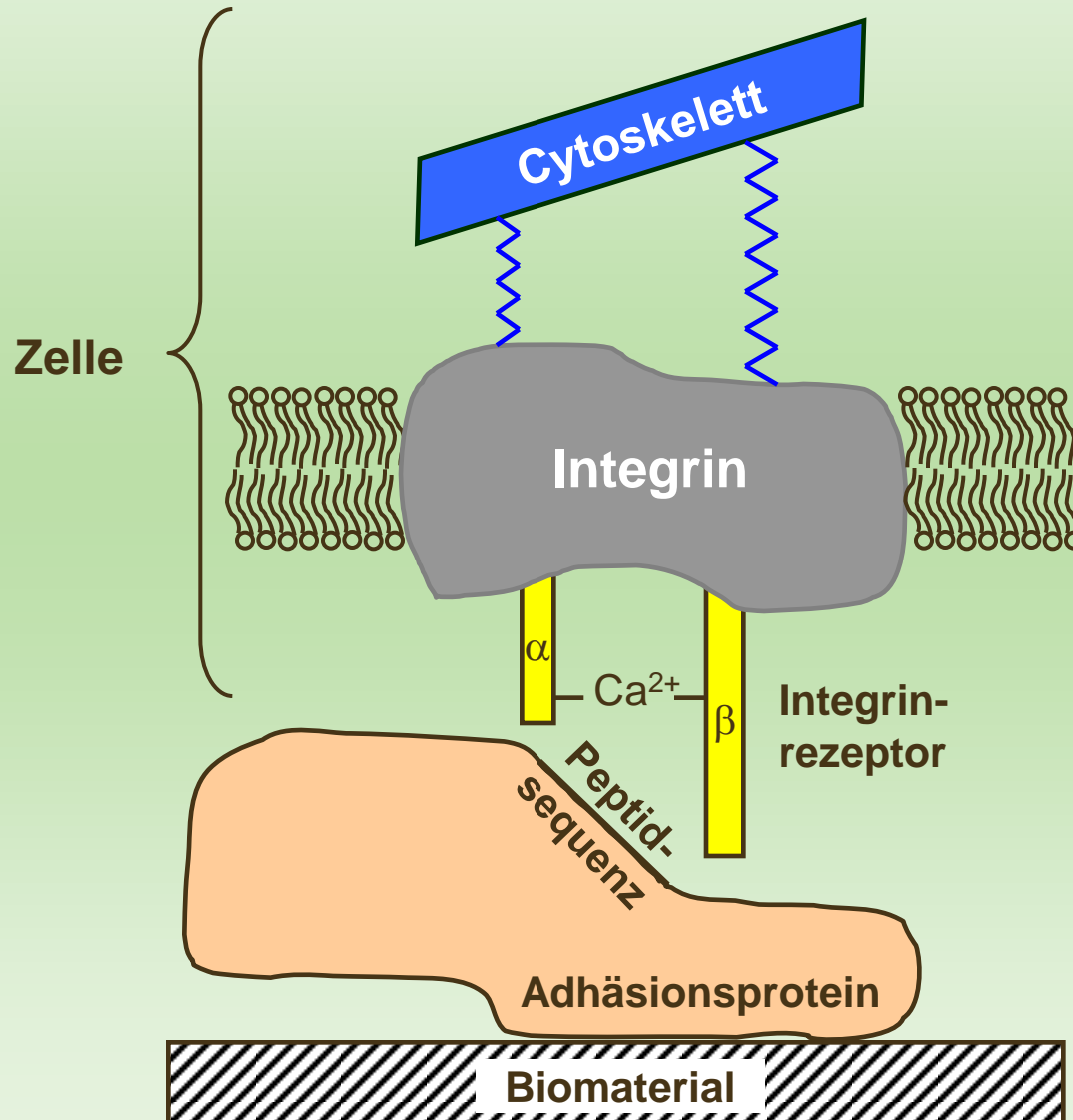


SYNTHETISCHE WIRKSTOFFE

- Niedermolekulare Wirkstoffe, die den Knochenstoffwechsel beeinflussen:
Bisphosphonate
Statine
- Inhibierung von Knochenabbau (Osteoklasten) bzw. Stimulierung von Knochenaufbau (Osteoblasten)



INTEGRIN-REZEPTOR VERMITTELTE ZELL-MATERIAL- WECHSELWIRKUNGEN



Zellmembran

Peptidsequenzen

RGD (arginine-glycine-aspartic acid),
GFOGER, IKVAV, etc.

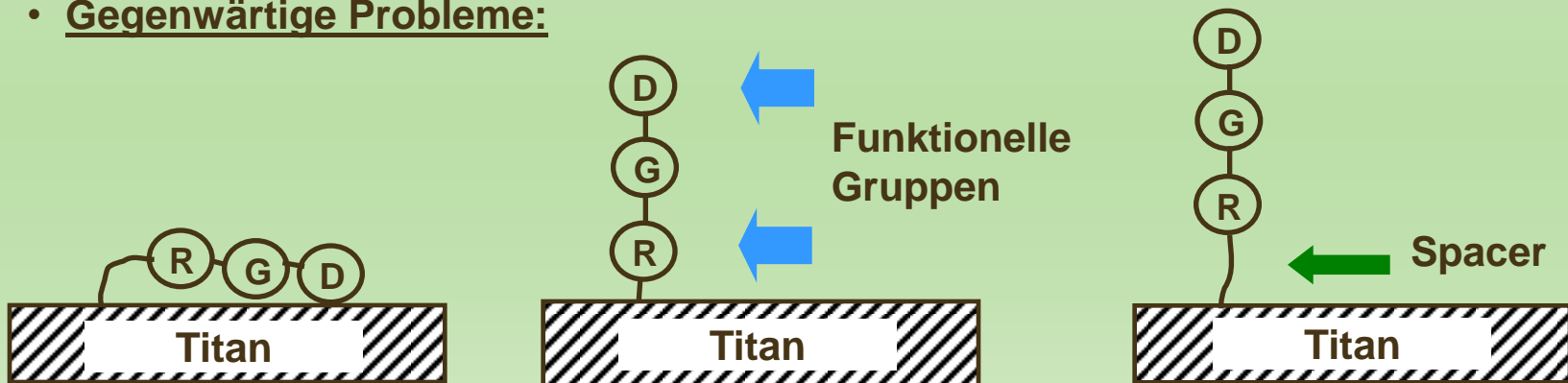
Adhäsionsproteine

z. B. Fibronectin,
Laminin, Vitronectin,
Kollagen



IMMOBILISIERUNG VON PEPTIDEN AUF TITANOBERFLÄCHEN

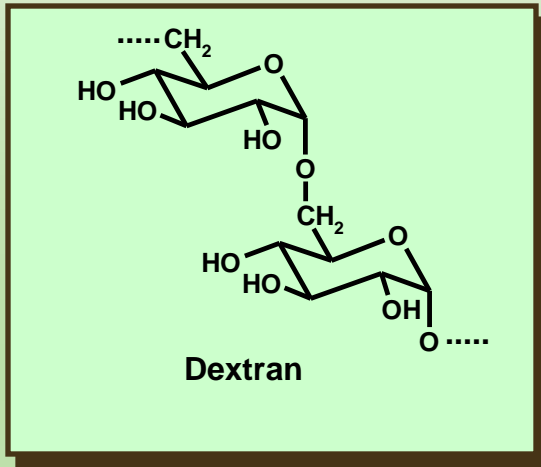
- Unterschiedliche Methoden zur Immobilisierung von Peptiden auf Titanoberflächen aus der Literatur bekannt
- Suche nach optimierten Immobilisierungsstrategien
- Gegenwärtige Probleme:



- Verhinderung des direkten Kontakts von Peptiden mit der Metalloberfläche
- Selektive Immobilisierungsverfahren
- Verwendung geeigneter Spacereinheiten

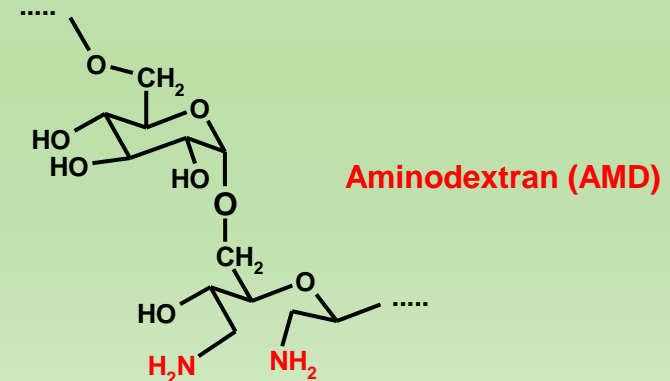
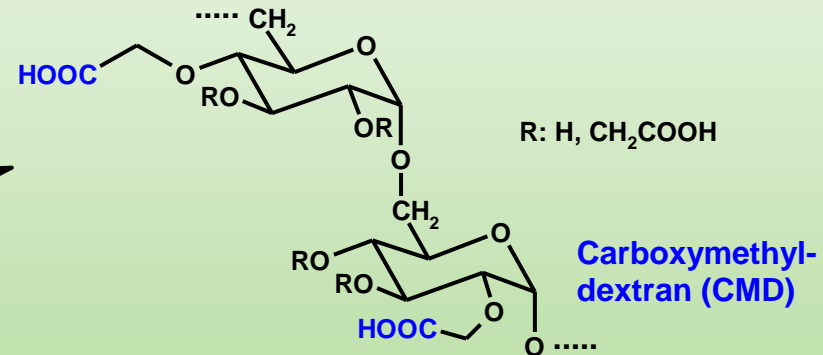


BESCHICHTUNGSSYSTEME AUF DEXTRAN-BASIS



Cl-CH₂COOH/
NaOH

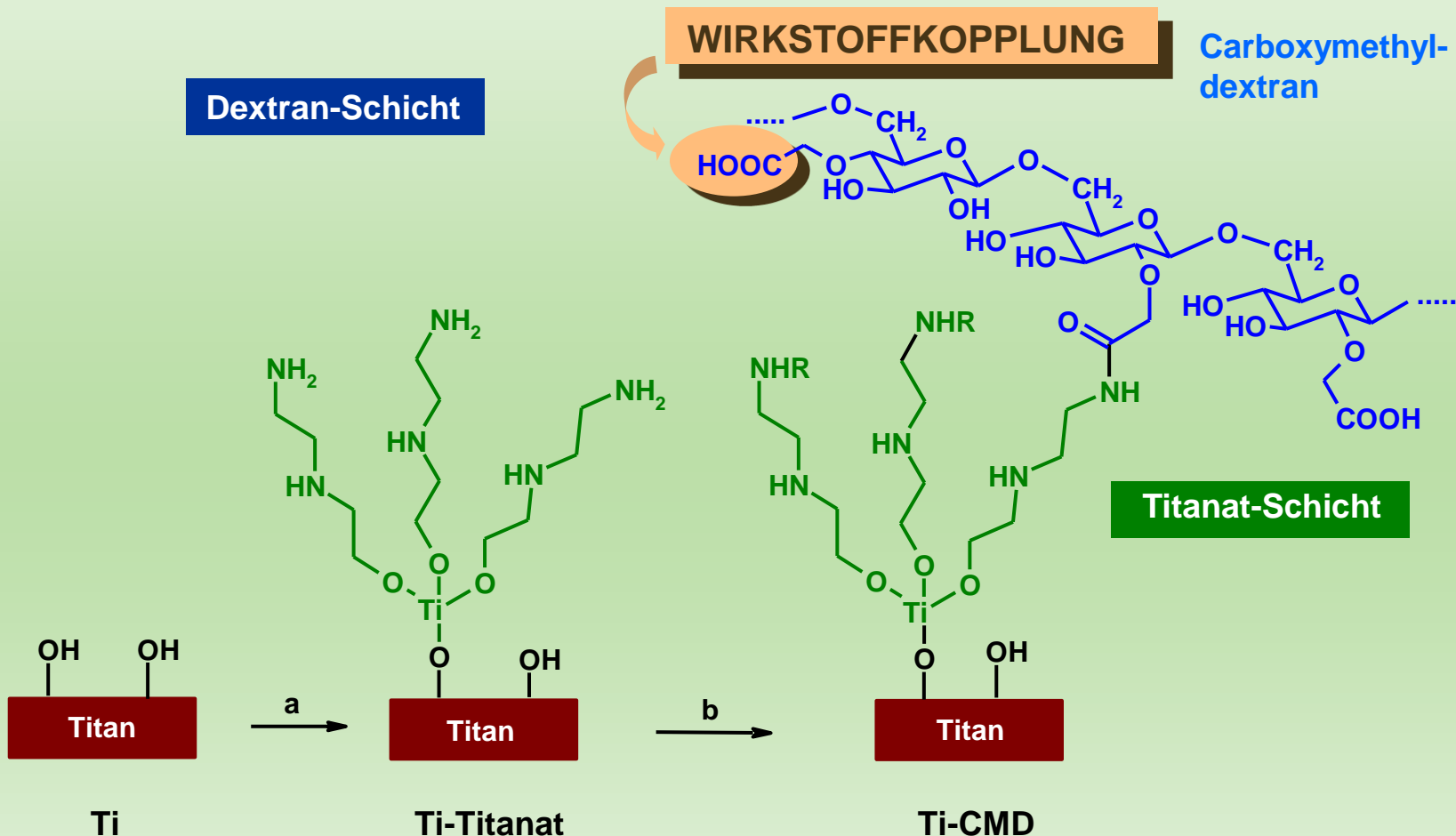
1. NaJO₄
2. NaCNBH₃/NH₃



Kopplungsfähige Derivate

- Natürliches Homopolysaccharid (α -1-6-verknüpfte D-Glucose-Hauptketten mit variierendem Gehalt an Seitenketten)
- Biodegradierbar, bioverträglich, geringe unspezifische Wechselwirkungen mit Proteinen
- Verwendung in der Medizin als Blutplasmaersatz und Wirkstoffträger

FUNKTIONELLE DEXTRAN-BESCHICHTUNG AUF TITAN (1)

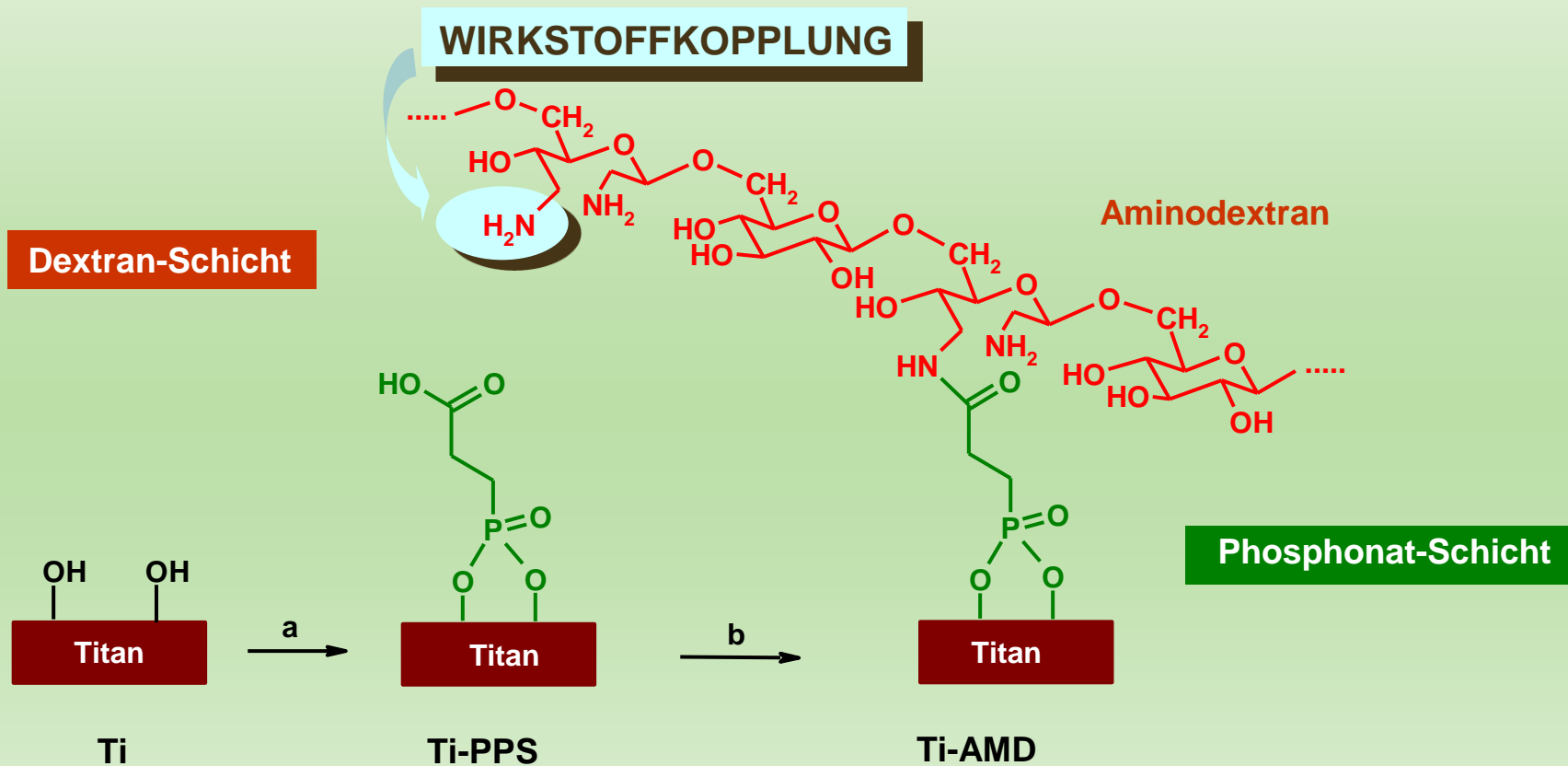


a: $\text{H}_3\text{C-CH}(\text{CH}_3)\text{-O-Ti-[-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH}_2\text{]}_3$
Isopropyl-[tri(N-ethylendiamino)ethyl]-titanat

b: Carboxymethyldextran (CMD) / EDC



FUNKTIONELLE DEXTRAN-BESCHICHTUNG AUF TITAN (2)

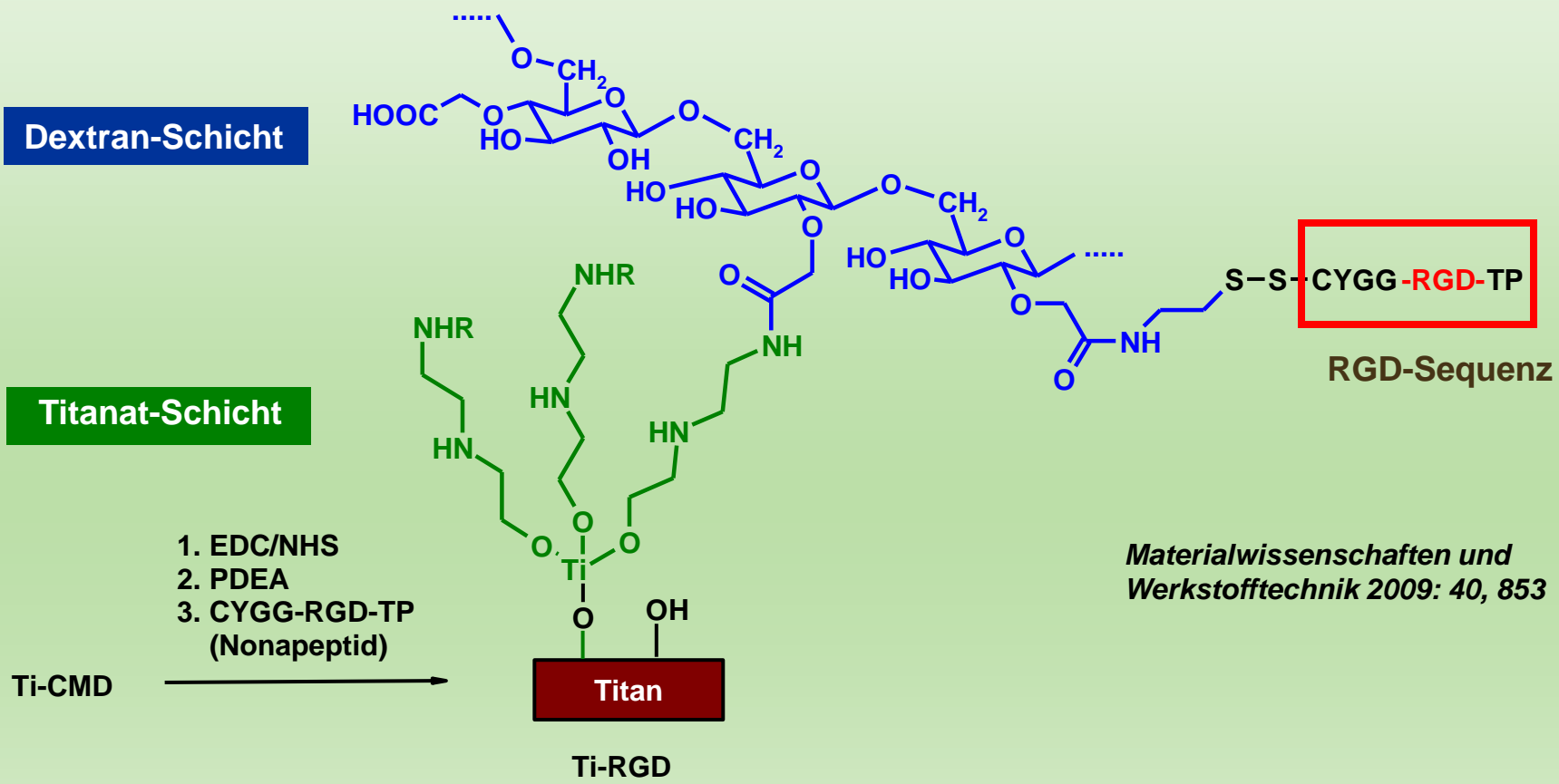


a: $(\text{OH})_2\text{PO}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$
3-Phosphonopropionsäure (PPS)

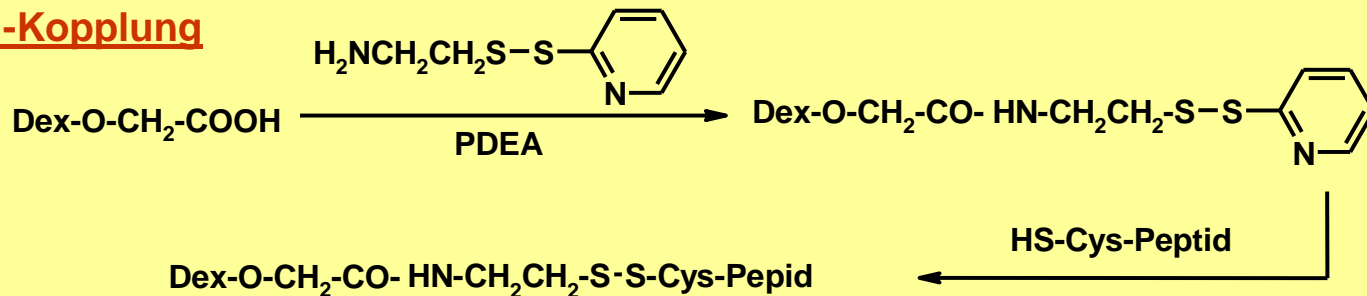
b: **Aminodextran (AMD) / EDC**



RGD-HALTIGE DEXTRANBESCHICHTUNG



Selektive SH-Kopplung



CHARAKTERISIERUNG DER DEXTRANBESCHICHTUNG

1 Kontaktwinkel

- CMD-basierte Beschichtung**

Beschichtung	Kontaktwinkel [°]
Ti	60,6 ± 0,9
Ti-Titanat	65,7 ± 0,6
Ti-Titanat-CMD	12,4 ± 2,8
Ti-Titanat-CMD-RGD	30,5 ± 1,3

- AMD-basierte Beschichtung**

Beschichtung	Kontaktwinkel [°]
Ti	65,9 ± 0,8
Ti-PPS	65,8 ± 5,8
Ti-PPS-RGD	56,2 ± 1,3
Ti-PPS-AMD	22,8 ± 4,3
Ti-PPS-AMD-RGD	54,5 ± 2,0



CHARAKTERISIERUNG DER DEXTRANBESCHICHTUNG

2 XPS

- Substrat: Titan-besputtertes Glas

Beschichtung	C [at-%]	O [at-%]	N [at-%]	Ti [at-%]	S [at-%]	Andere Elemente [at-%]
Ti-CMD	43.6	43.4	2.1	6.9	0.0	4.0
Ti-RGD	33.5	44.7	6.7	10.9	0.5	3.7

- Substrat: TiAl6V4

Beschichtung	C [at-%]	N [at-%]	O [at-%]	S [at-%]	Ti [at-%]
Ti	22,8	1,2	54,5	0,0	21,5
Ti-Titanat	24,4	1,5	52,9	0,0	21,2
Ti-Titanat-RGD	36,0	6,7	43,2	0,3	13,8
Ti-Titanat-CMD	33,7	1,2	51,9	0,0	13,2
Ti-Titanat-CMD-RGD	41,2	5,9	42,1	1,2	9,6

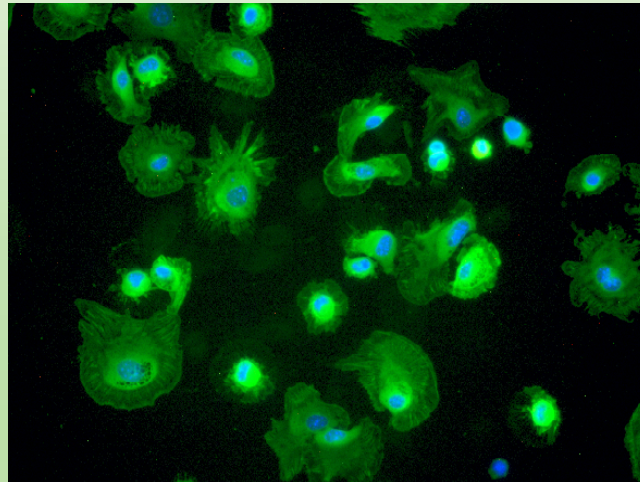


IN VITRO ZELLADHÄSION

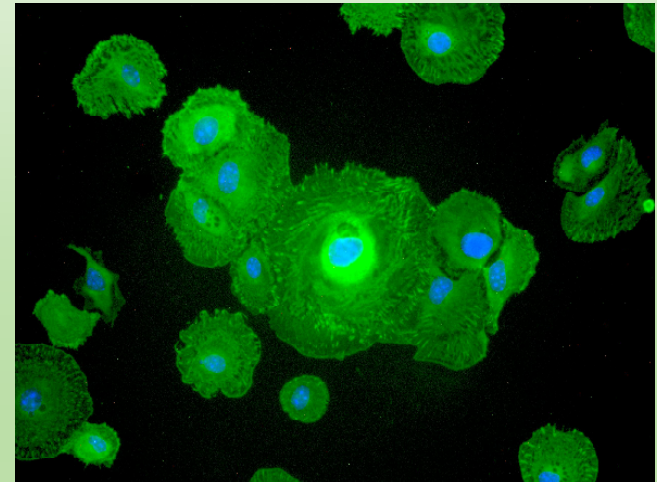
- Zellkultur: 3T3-Zellen (3 h)

- Vinculin-Immunofluoreszenz-, DAPI-Färbung

Ti-beschichtetes
Glass

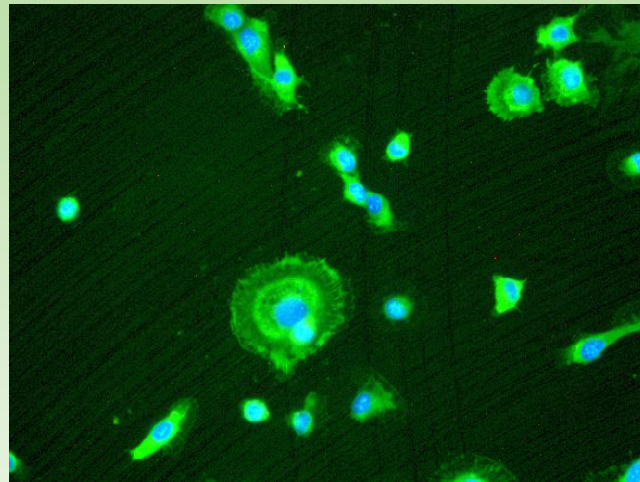


Ti-CMD

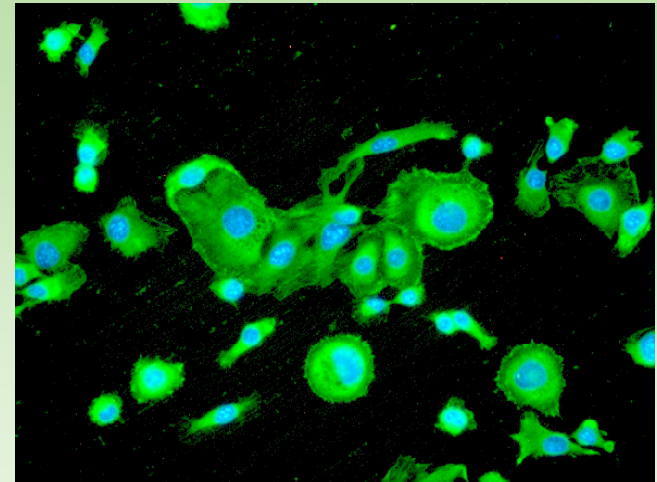


Ti-CMD-RGD

TiAl6V4



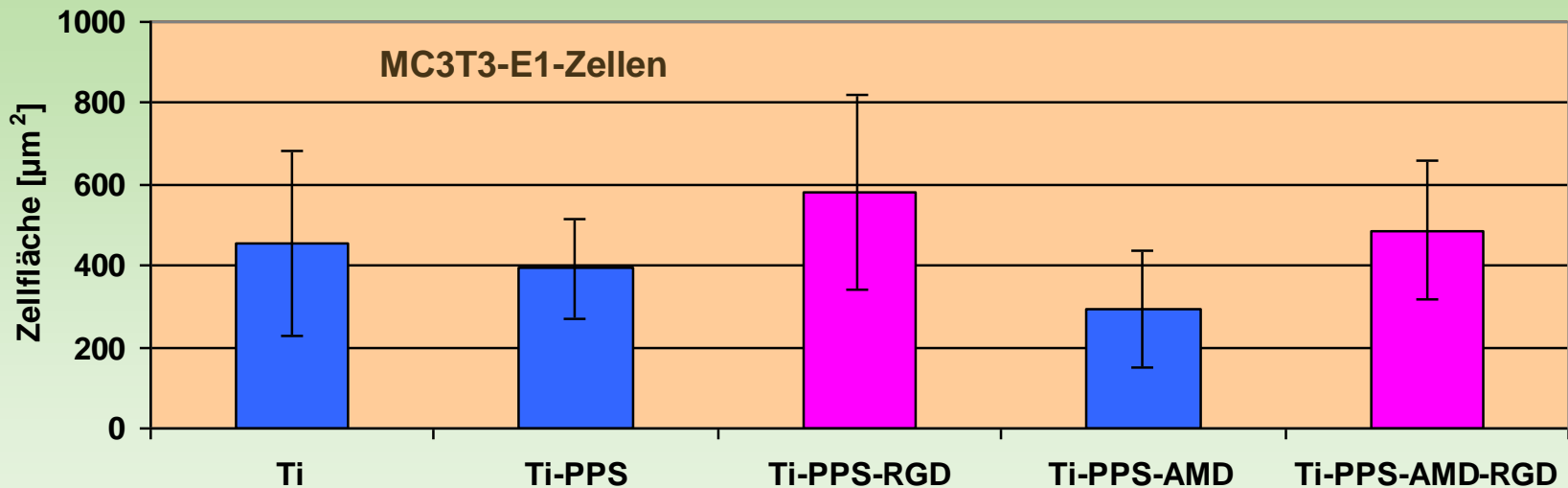
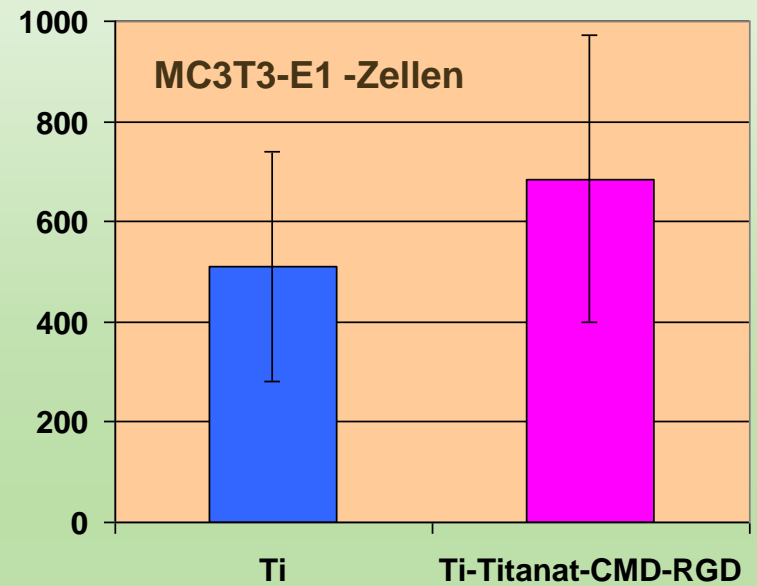
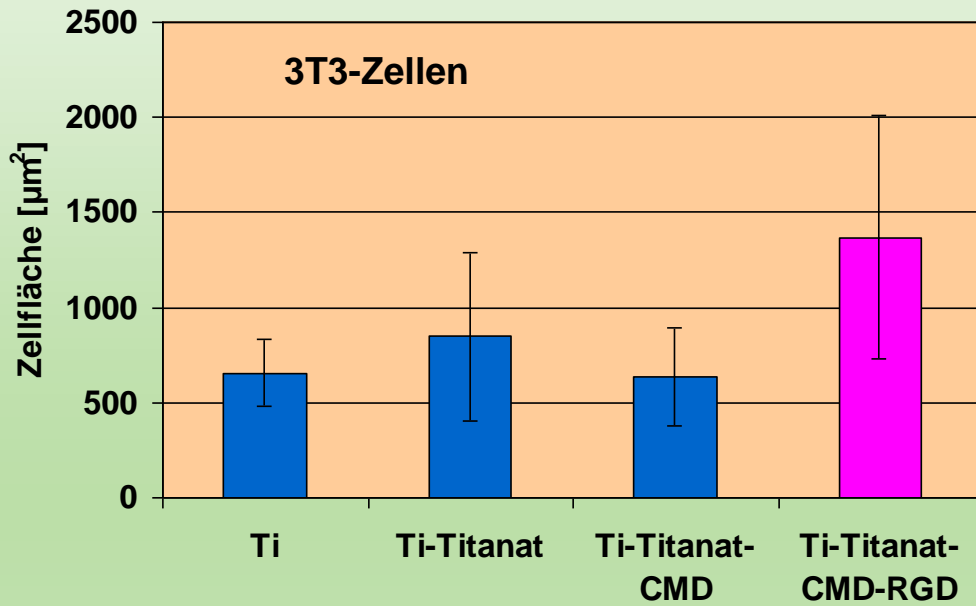
Ti



Ti-RGD



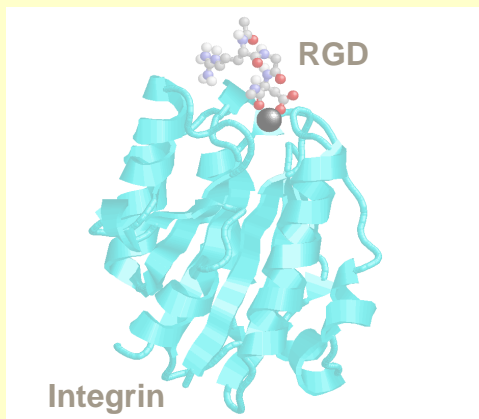
ZELLSPREITUNG AUF BESCHICHTETEN TITANOBERFLÄCHEN



MOLEKÜLE ZUR VERBESSERUNG DER IMPLANTATINTEGRATION

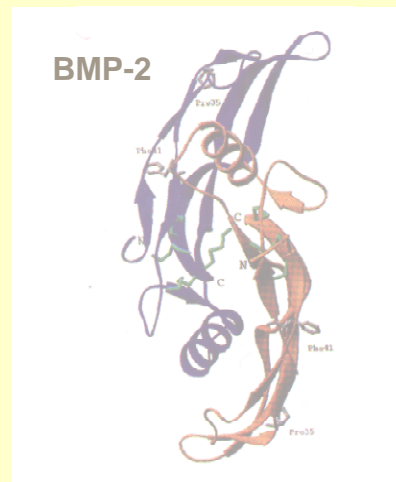
ADHÄSIONSPEPTIDE

- Rezeptor (Integrin)-bindende Aminosäuresequenzen (Oligopeptide) von ECM-Proteinen:
RGD (Fibronektin)
GFOGER (Kollagen)
IKVAV (Vitronektin)
- Stimulierung der Zelladhäsion auf Implantaten



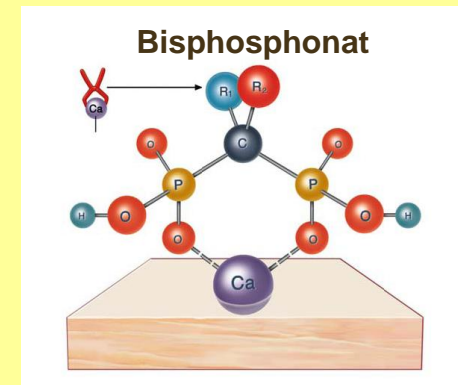
WACHSTUMSFAKTOREN

- Proteine, die Informationen zwischen Zellen übertragen:
Bone Morphogenetic Proteins (BMP)
Transforming Growth Factors (TGF- β)
- Stimulierung des Zellwachstums im Implantatbereich



SYNTHETISCHE WIRKSTOFFE

- Niedermolekulare Wirkstoffe, die den Knochenstoffwechsel beeinflussen:
Bisphosphonate
Statine
- Inhibierung von Knochenabbau (Osteoklasten) bzw. Stimulierung von Knochenaufbau (Osteoblasten)



OSTEOGENE WIRKSTOFFE

ANTI-KATABOLE SUBSTANZEN

- Bisphosphonate (Alendronat, Pamidronat, Zoldronat u. a.)
- Statine (Simvastatin)
- Selektive Oestrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs, Raloxifen)

ANABOLE SUBSTANZEN

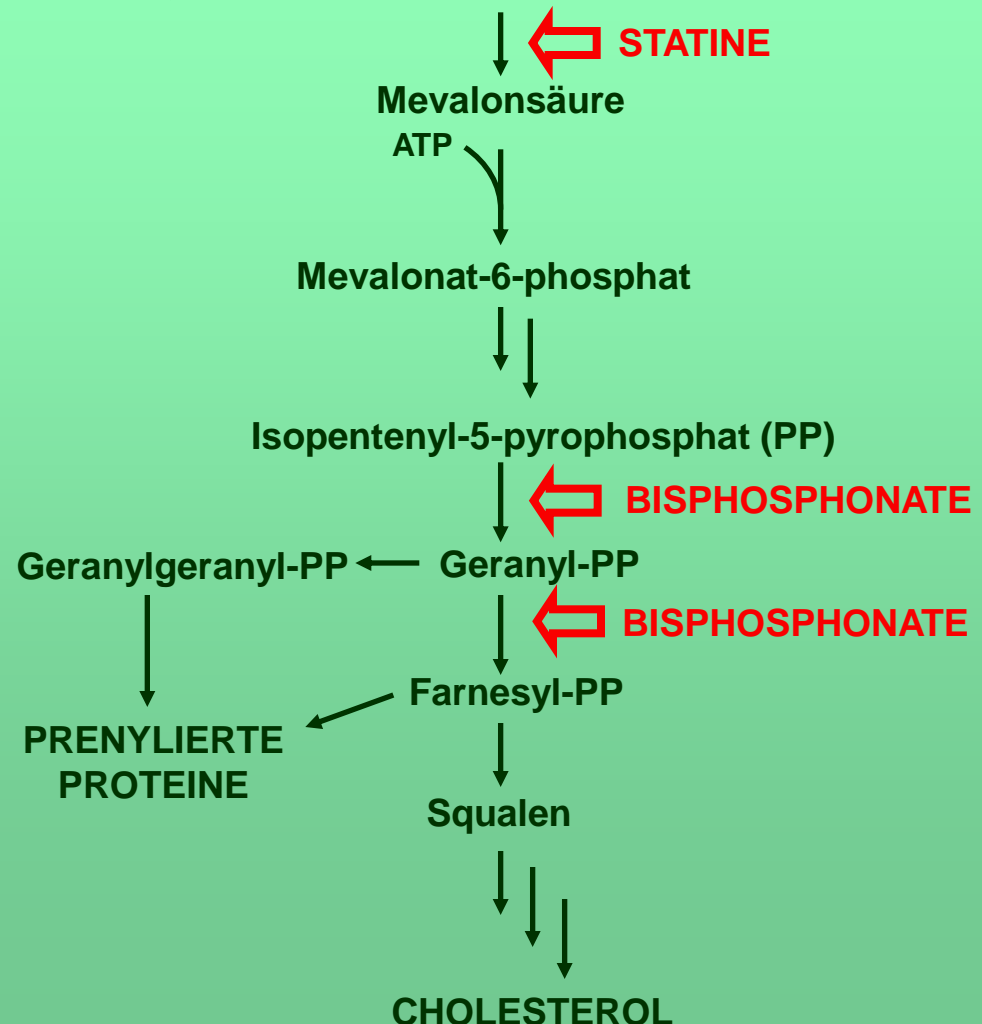
- Parathyroid-Hormone (Teriparatide)

ANABOLE /ANTI-KATABOLE SUBSTANZEN

- Strontium (Strontiumranelat)

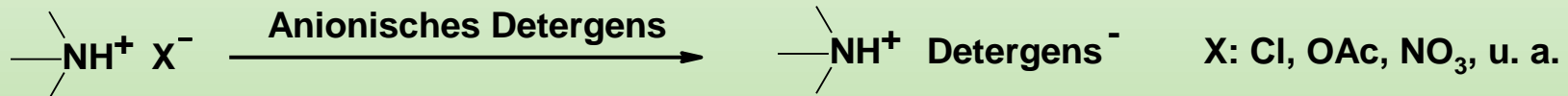
Wirkmechanismus Statine/Bisphosphonate

Acetyl-CoA \longrightarrow 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA



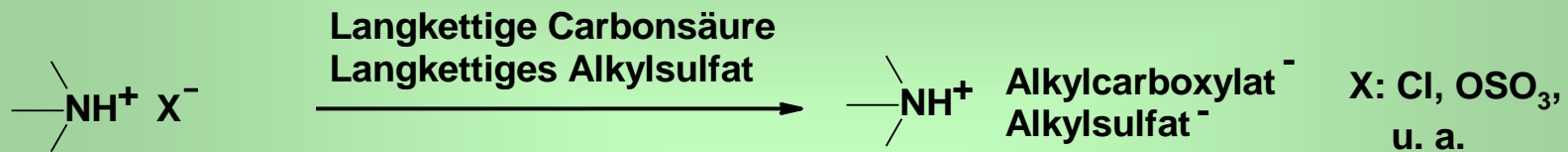
PRÄZIPIITIERENDE IONENPAAR-BILDUNG

- **Hydrophobic Ion Pairing** (*M. C. Manning u. Mitarbeiter, 1993*)



- Erhöhung der Löslichkeit von Proteinen in organischen Lösungsmitteln
- Erniedrigung der Löslichkeit in wässrigen Systemen

- **Präzipitierende Ionenpaar-Bildung** (*S, Vogt, M. Schnabelrauch, K.-D. Kühn, 2001*)



Wirkstoff
(wasserlöslich)

Wirkstoffsalz
(wasserunlöslich)

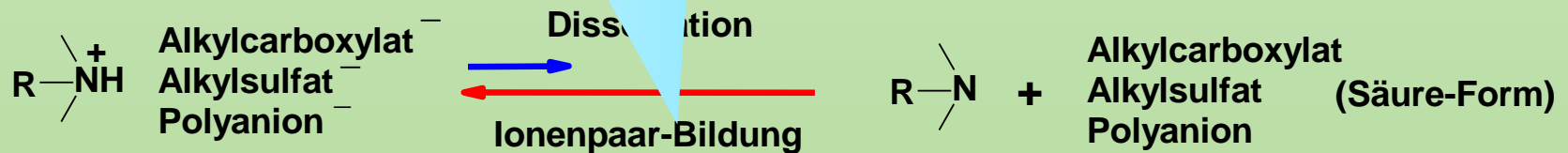
- Umwandlung von wasserlöslichen in temporär wasserunlösliche Wirkstoffe
- Steuerung der Freisetzung (Retardierung)
- Verbesserung der Beschichtungseigenschaften



FREISETZUNGSMECHANISMUS AUS SCHWERLÖSLICHEN WIRKSTOFFSALZEN

Löslichkeitsgleichgewicht des precipitierten Wirkstoffsalzes

- bestimmt die frei verfügbare Menge an Wirkstoff im System



Prezipitiertes Wirkstoffsalz
(schwerlöslich in
wässrigen Medien)

Freisetzungskinetik

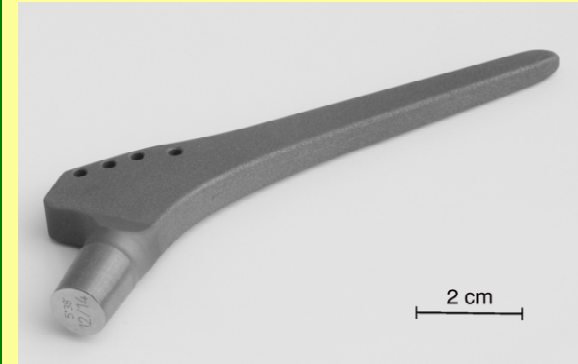
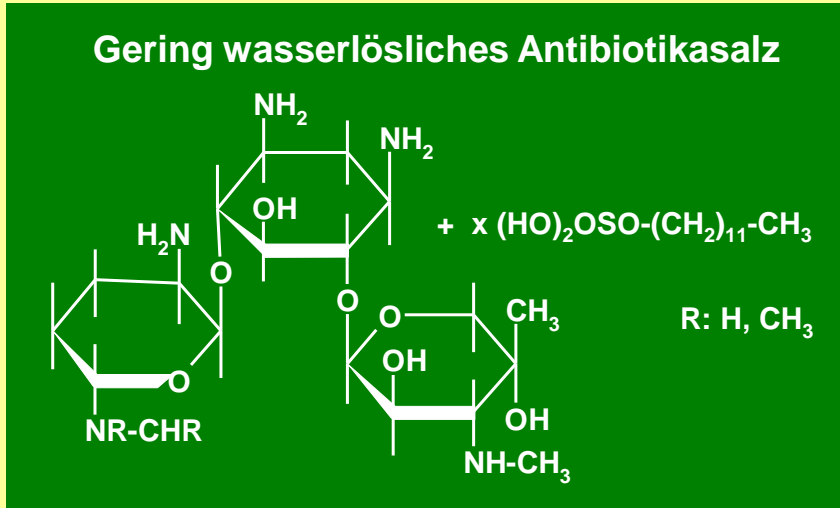
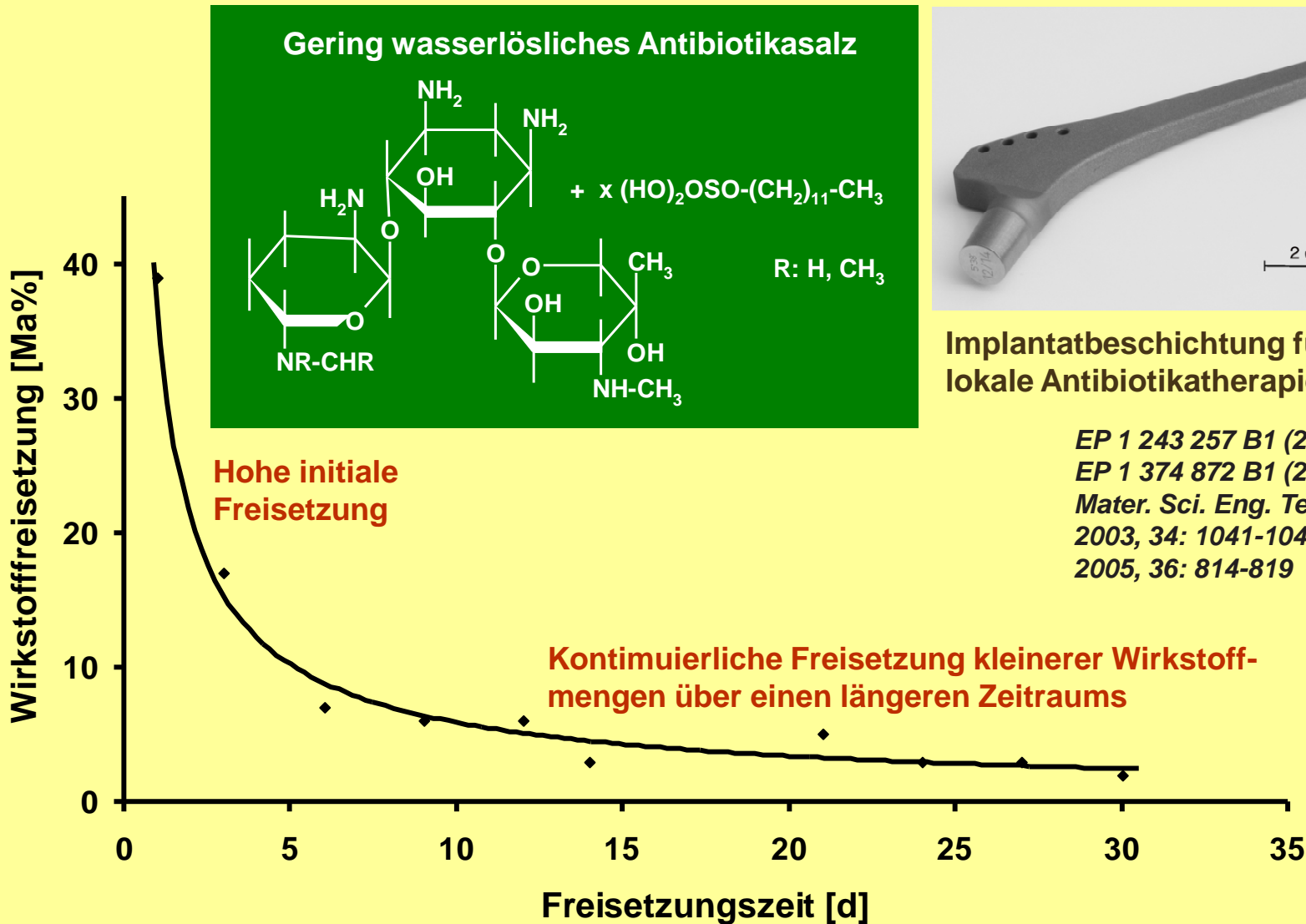
- Freisetzung zumeist
diffusionskontrolliert

Lokal freigesetzte Wirkstoffmenge
pro Zeiteinheit

- Wirkstofffreisetzung kann über das der Freisetzungskinetik vorgeschaltete Löslichkeitsgleichgewicht gesteuert werden



ANTIBIOTIKA-BESCHICHTUNGEN AUF BASIS SCHWERLÖSLICHER SALZE

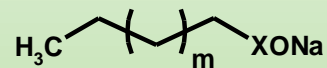


Implantatbeschichtung für die lokale Antibiotikatherapie

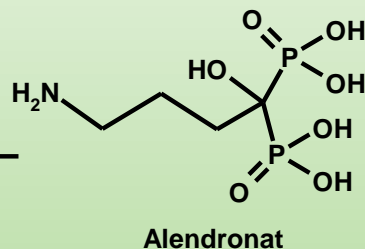
*EP 1 243 257 B1 (2002)
EP 1 374 872 B1 (2003).
Mater. Sci. Eng. Technol.
2003, 34: 1041-1047;
2005, 36: 814-819*



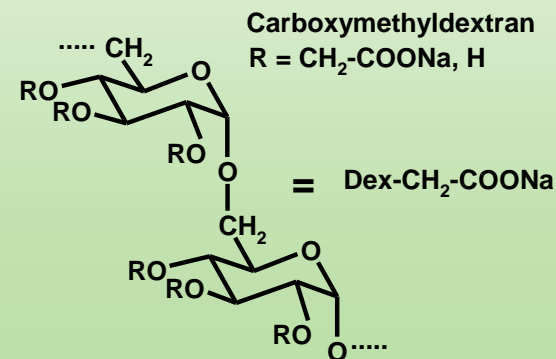
SCHWERLÖSLICHE BISPHOSPHONATSALZE



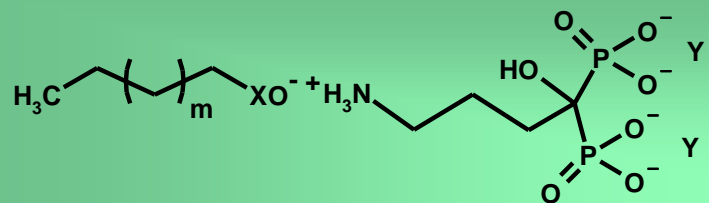
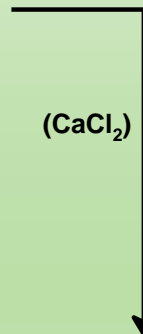
Natrium dodecylsulfat:
X = OSO₂, m = 9
Natrium stearat:
X = CO, m = 14



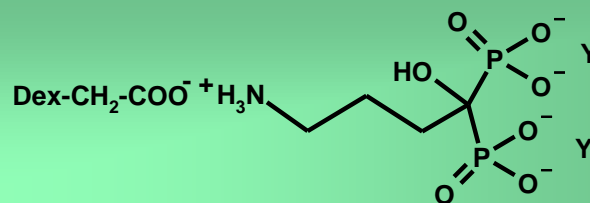
(CaCl₂)



(CaCl₂)



Y: Ca²⁺, Na⁺, H⁺

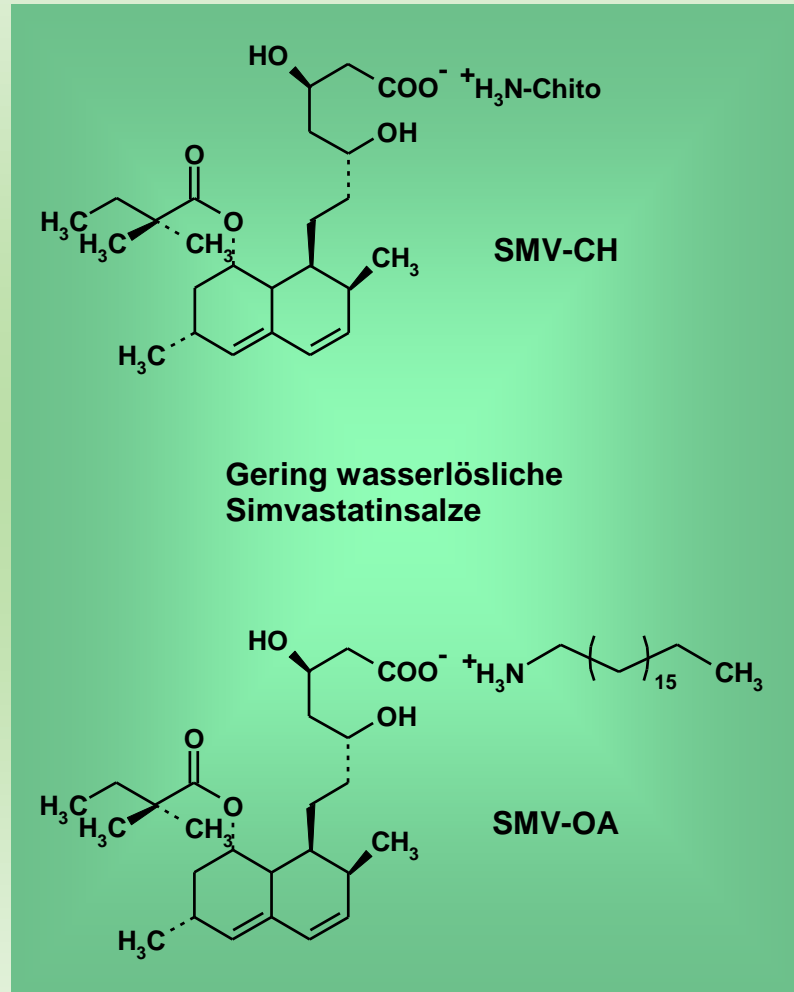
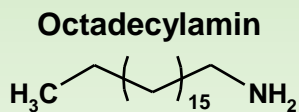
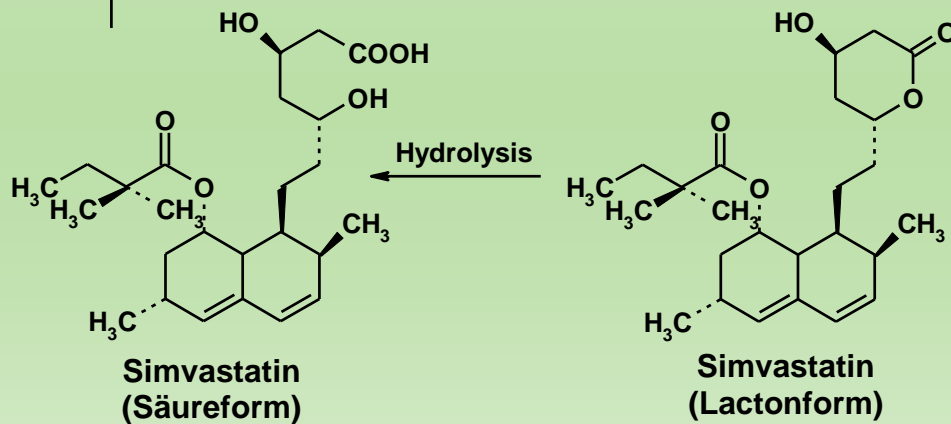
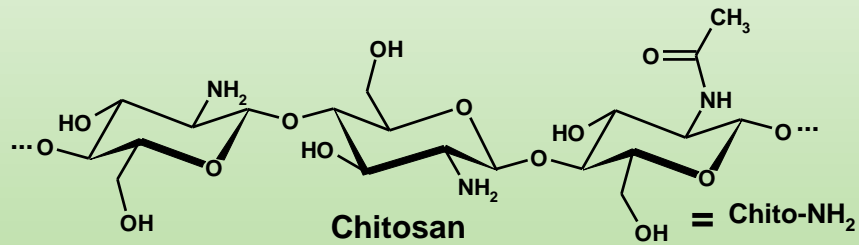


Y: Ca²⁺, Na⁺, H⁺

Gering wasserlösliches Alendronatsalz

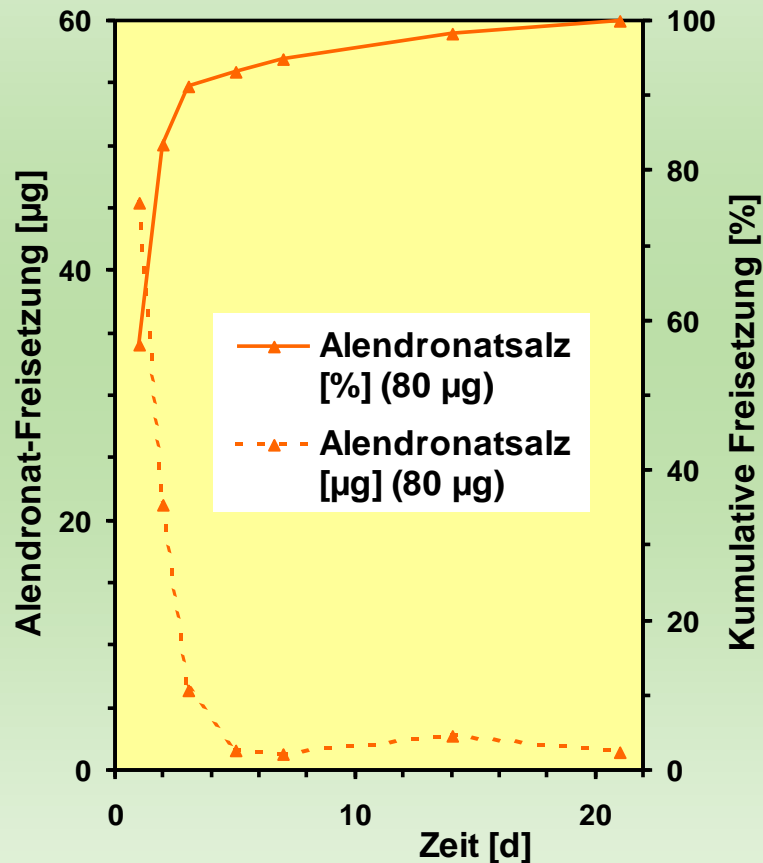


SCHWERLÖSLICHE SIMVASTATINSALZE

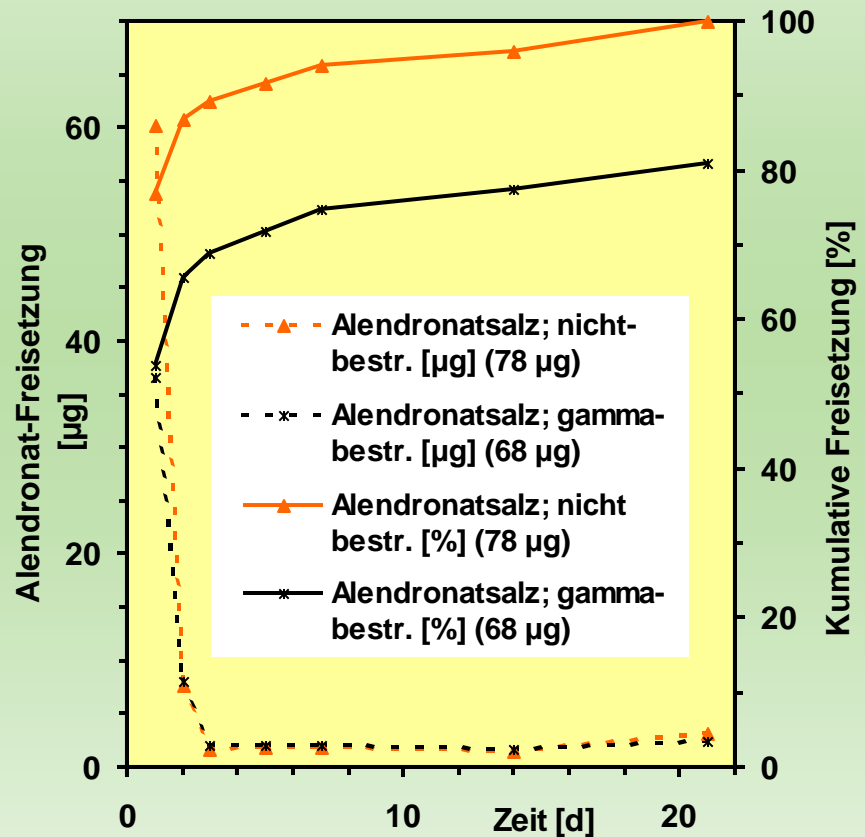


FREISETZUNGSUNTERSUCHUNGEN VON BISPHOSPHONATSALZEN

- Wirkstoff-Freisetzung aus Alendronat-stearat



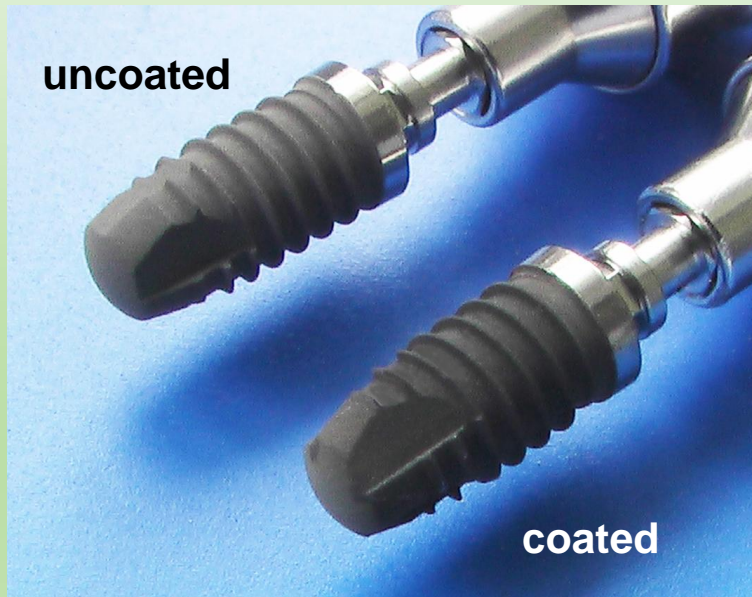
- Wirkstoff-Freisetzung aus Alendronat-dodecylsulfat (Beschichtung auf Titan)



Freisetungsbedingungen: Physiologische NaCl, 37 °C

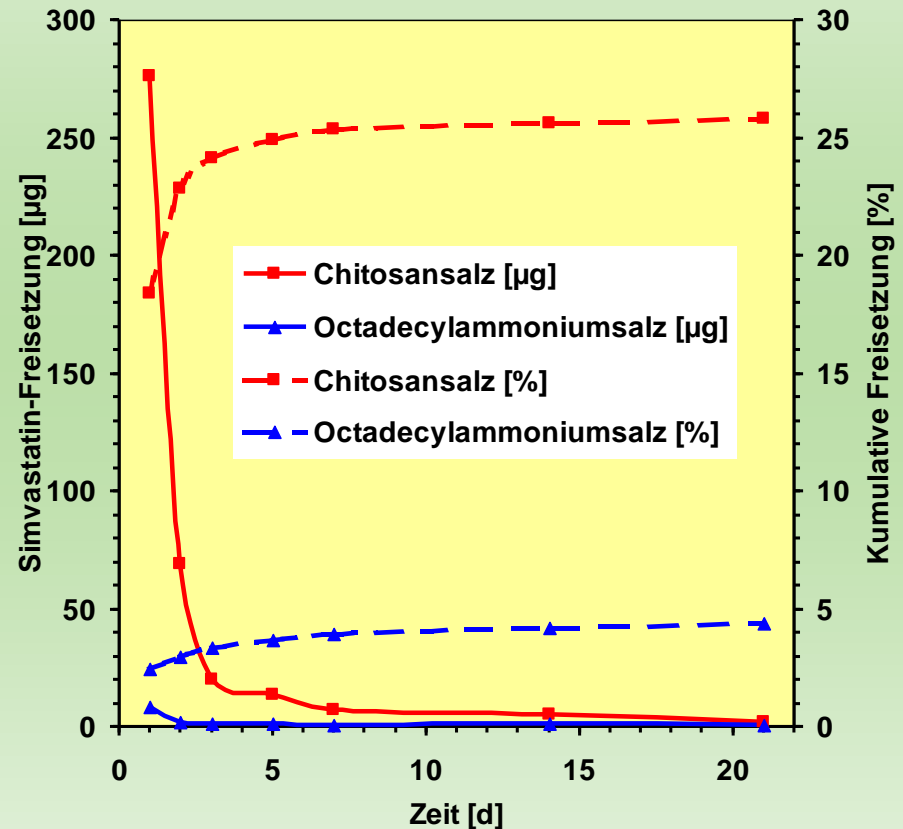


BESCHICHTUNGEN VON SIMVASTATINSALZEN

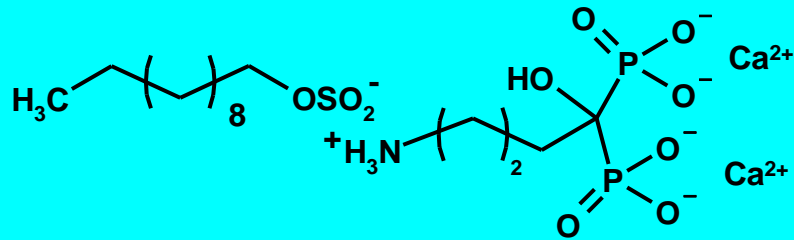


- Beschichtung von Dentalimplantaten (SPI Element, Thommen Medica, Titan, sandgestrahlt und geätzt) mit Simvastatin-Chitosan-Salz mittels Spraycoating-Technik

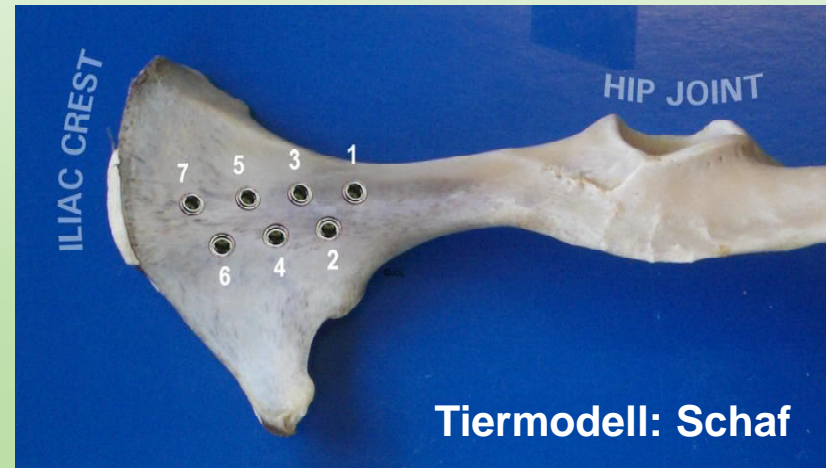
- Simvastatin-Freisetzung (SBF-Medium, 37 °C)



BISPHOSPHONAT-BESCHICHTUNGEN FÜR TITANOBERFLÄCHEN



Gering wasserlösliches Alendronatsalz



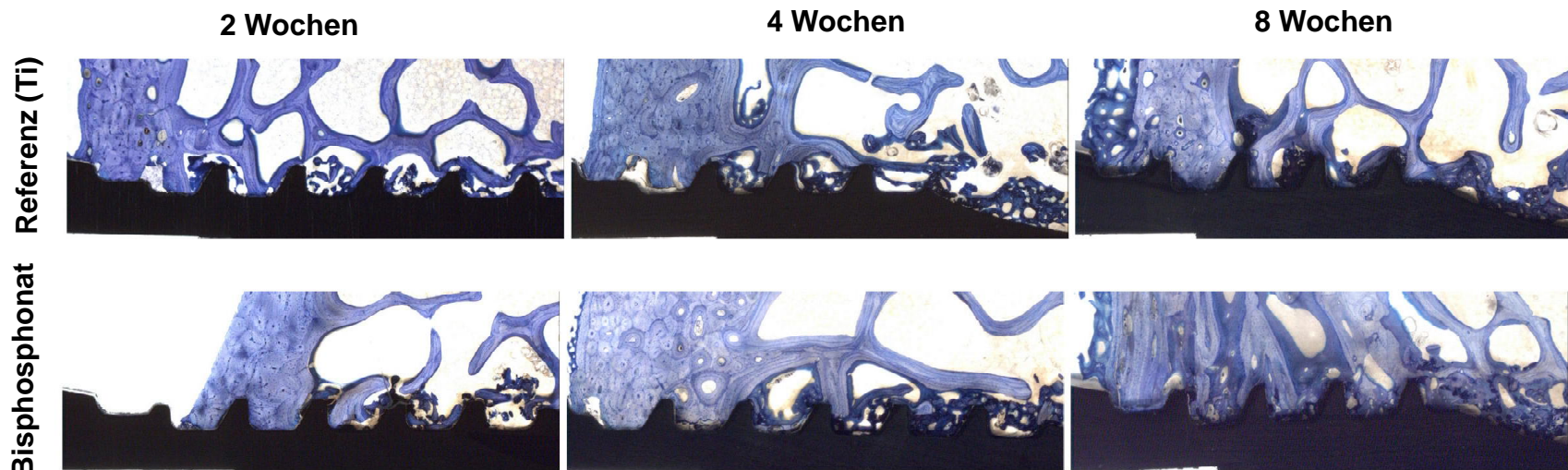
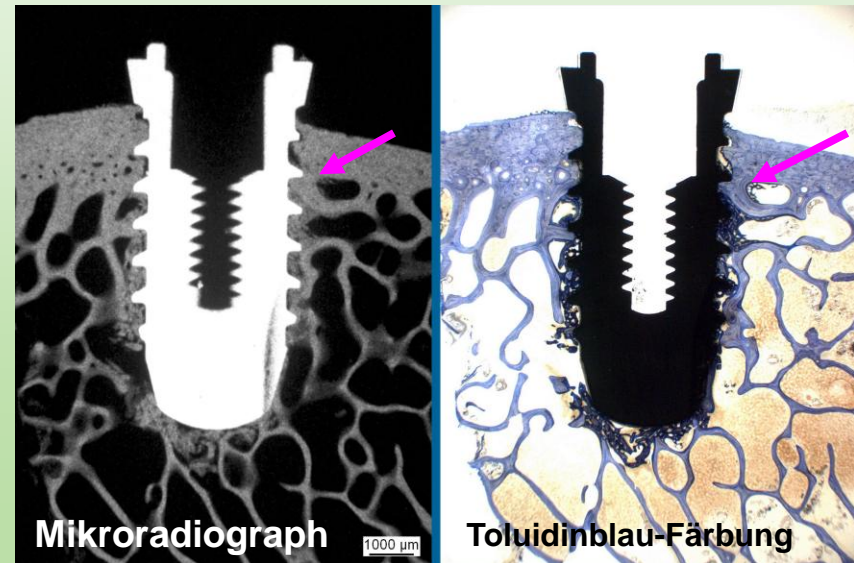
VERGLEICH UNTERSCHIEDLICHER SCHICHTSYSTEME

BESCHICHTUNG	AUSZUGSKRAFT [Nmm]		
	WOCHE 2	WOCHE 4	WOCHE 8
Ti	733 ± 240	1413 ± 266	1884 ± 227
ZrO ₂	550 ± 112	867 ± 308	1005 ± 281
Ti + CaP (Bonit®)	660 ± 110	1297 ± 166	1683 ± 214
Ti + CaP (PCO)	594 ± 169	779 ± 260	919 ± 312
Ti + Bisphosphonat	873 ± 196	1438 ± 332	1835 ± 301
Ti + Kollagen/CS	683 ± 115	1462 ± 245	1593 ± 308



HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DES EINWACHSVERHALTENS

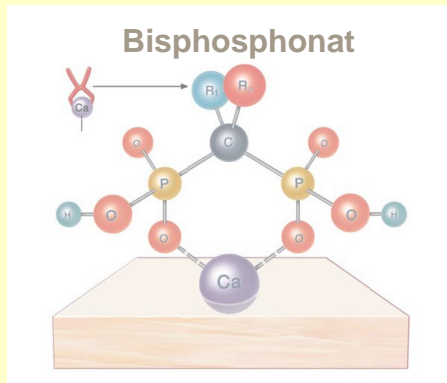
- Bildung von neuem Knochen an der Implantatgrenzfläche (Vergleich radio-dichter und gefärbter histologischer Schnitte, Übersichtsbild, x 5,8, Bisphosphonat, nach 4 Wochen)
- Zeitlicher Verlauf der Knochenbildung bei Bisphosphonat-beschichteten Implantaten (Vergrößerung x 10)



MOLEKÜLE ZUR VERBESSERUNG DER IMPLANTATINTEGRATION

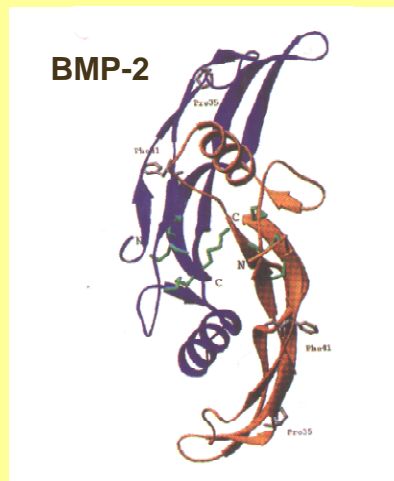
SYNTHETISCHE WIRKSTOFFE

- Niedermolekulare Wirkstoffe, die den Knochenstoffwechsel beeinflussen: Bisphosphonate
Statine
- Inhibierung von Knochenabbau (Osteoklasten) bzw. Stimulierung von Knochenaufbau (Osteoblasten)



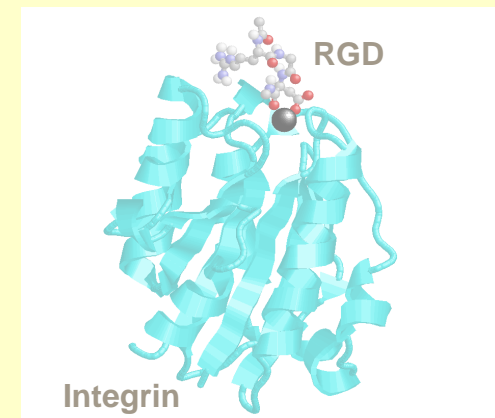
WACHSTUMSFAKTOREN

- Proteine, die Informationen zwischen Zellen übertragen: Bone Morphogenetic Proteins (BMP)
Transforming Growth Factors (TGF- β)
- Stimulierung des Zellwachstums im Implantatbereich

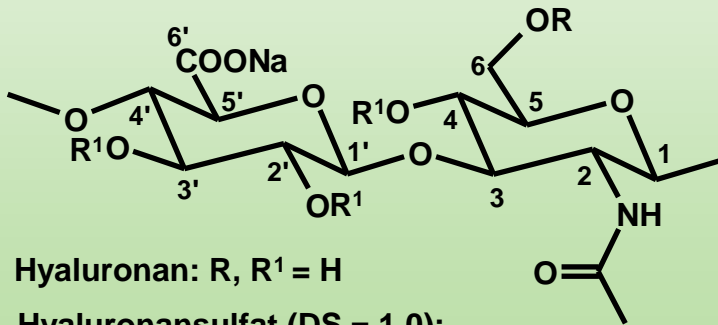


ADHÄSIONSPEPTIDE

- Rezeptor (Integrin)-bindende Aminosäuresequenzen (Oligopeptide) von ECM-Proteinen: RGD (Fibronektin)
GFOGER (Kollagen)
IKVAV (Vitronektin)
- Stimulierung der Zelladhäsion auf Implantaten



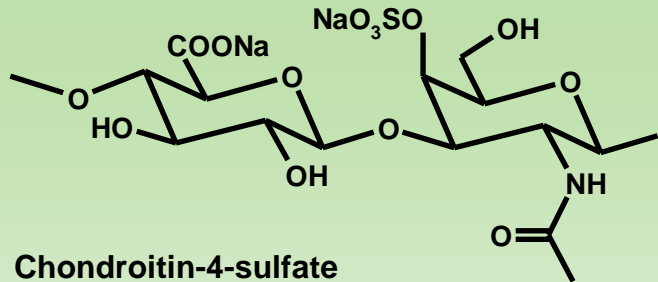
WECHSELWIRKUNG VON SULFATIERTEN GLYCOSAMINOGLYKANEN MIT WACHSTUMSFAKTOREN



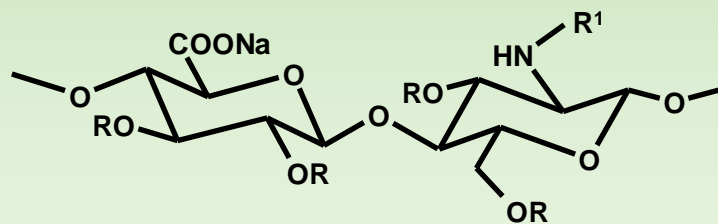
Hyaluronan: R, R¹ = H

Hyaluronansulfat (DS = 1,0):
R = SO₃Na, R¹ = H

Hyaluronansulfat (DS = 3,0):
R = SO₃Na, R¹ = H or SO₃Na

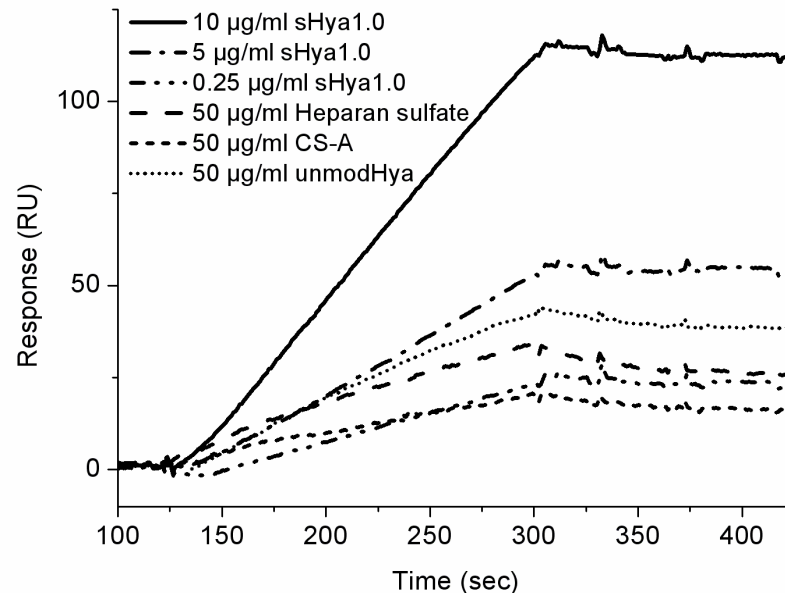


Chondroitin-4-sulfate



Heparansulfat: R = H, SO₃Na; R¹ = COCH₃, SO₃Na

- SPR-Sensogram der Wechselwirkung von verschiedenen Glycosaminoglykanen mit immobilisiertem rhBMP-4

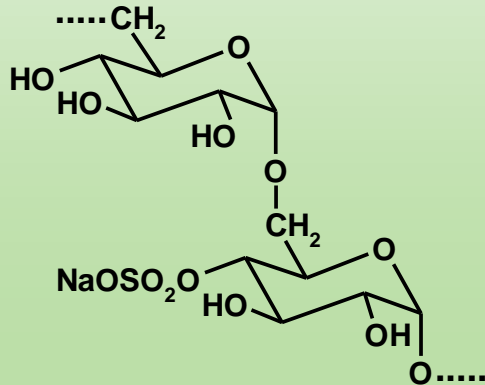


V. Hintze et al., *Biomacromolecules*, 2010

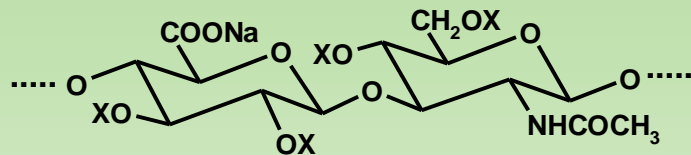


SCHWERLÖSLICHE WACHSTUMSFAKTORKOMPLEXE

POLYSACCHARIDE / GLYCOSAMINOGLYCANE



Dextransulfat (DS = 0,12 – 0,98)

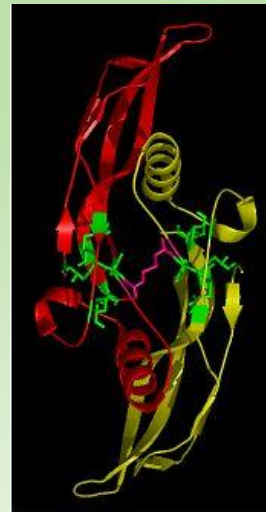
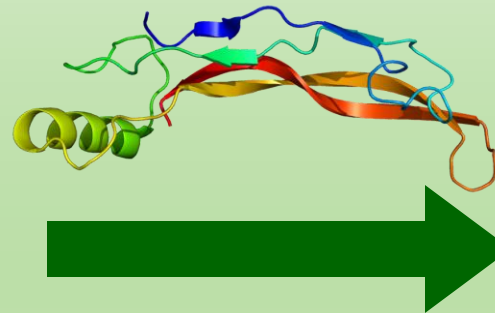


Hyaluronan (Hya) - Derivate

- Carboxymethyl(CM)-Hya (X = CH₂COONa, H)
DS = 1,2 – 1,4
- Hya-sulfat (X = SO₃Na, H)
DS = 1,5 – 3,0
- CMI-Hya-sulfat (X = CH₂COONa, SO₃Na, H)
DS = 1,4 / 2,6
- Diethylaminoethyl-Hya (X = CH₂CH₂N(C₂H₅)₂, H)
DS = 0,52

WACHSTUMSFAKTOREN

- Bone morphogenetic proteins
(z. B. rh-BMP-2, rh-BMP-4)

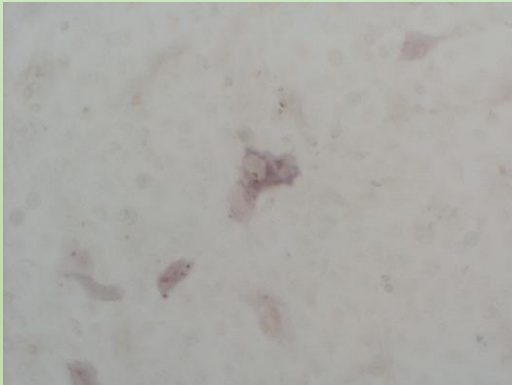


**POLYMERE
WACHSTUMSFAKTOR-
KOMPLEXE**

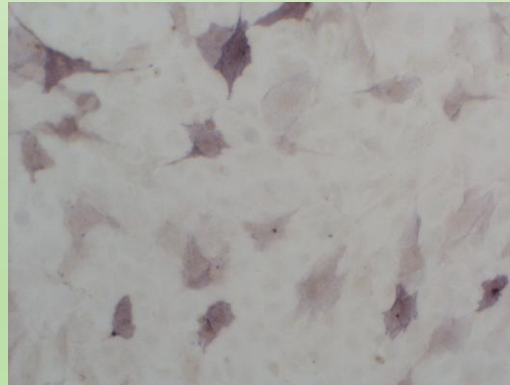
- Wasserunlöslich
- Biologisch aktiv

NACHWEIS DER INDUKTION VON AP-AKTIVITÄT DURCH BMP-2 (BIOASSAY)

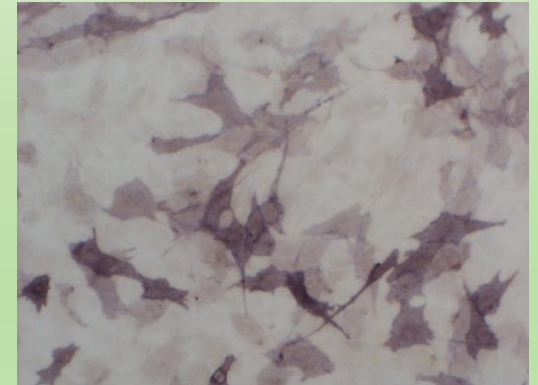
- MC3T3-Zellen, 3d, 37 °C, Nachweis der AP-Bildung mittels BCIP/NBT-Färbung



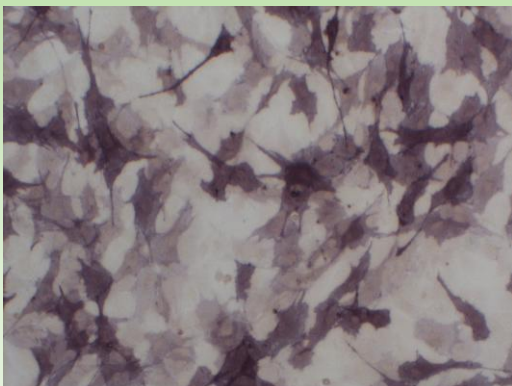
Ohne BMP-2



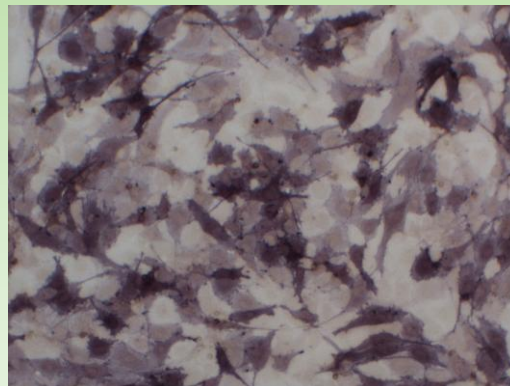
0,1 µg/ml BMP-2



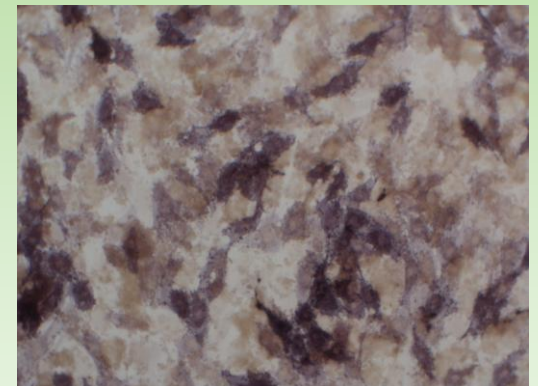
0,25 µg/ml BMP-2



1 µg/ml BMP-2



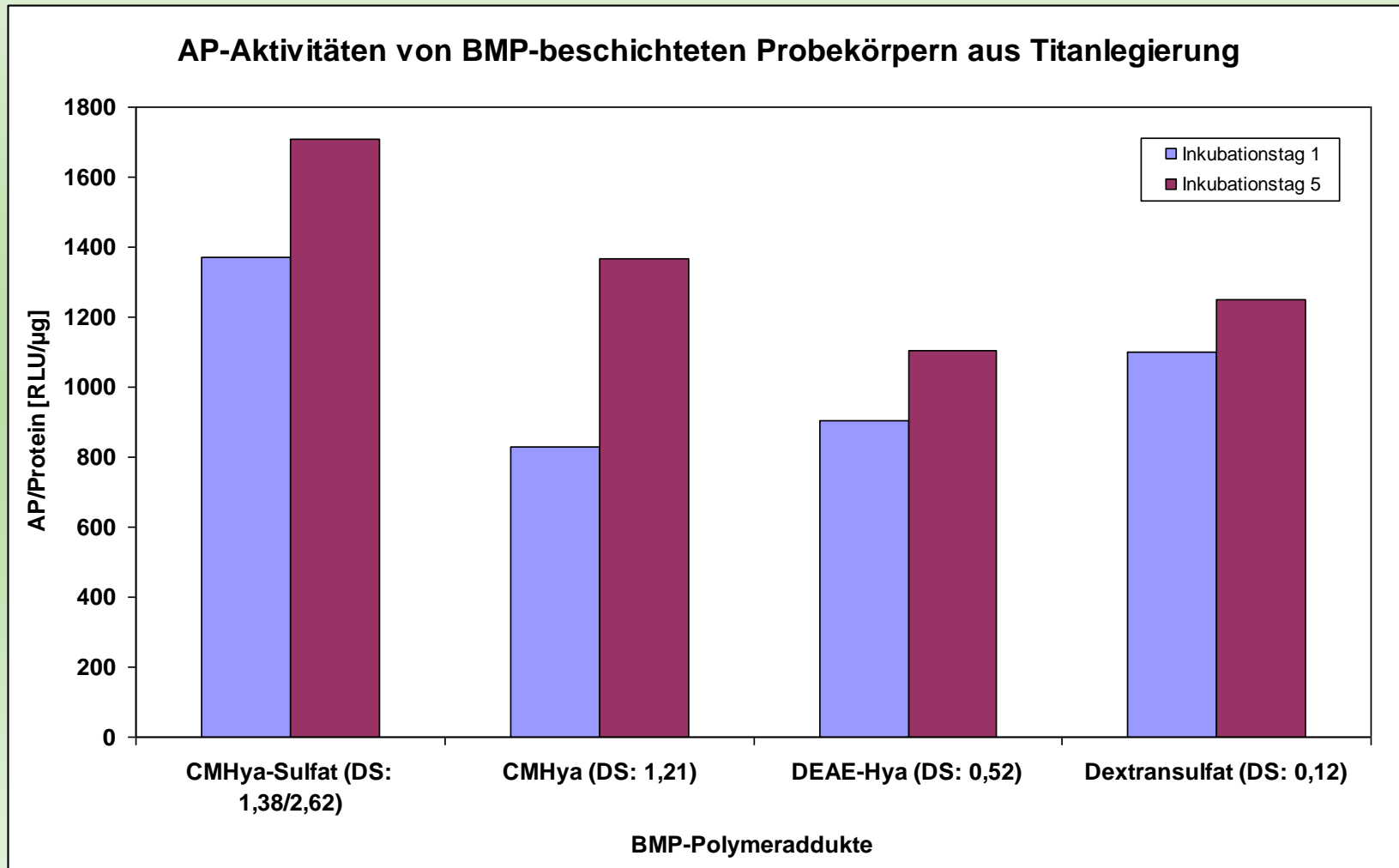
10 µg/ml BMP-2



100 µg/ml BMP-2



BESCHICHTUNGEN VON BMP-2-KOMPLEXEN AUF TITANOBERFLÄCHEN



ZUSAMMENFASSUNG

RGD-BESCHICHTUNGEN AUF DEXTRANBASIS

- Funktionelle Dextranderivate mit Carboxyl- oder Aminogruppen lassen sich in einfacher Weise über geeignete Haftvermittler an Titanoberflächen anbinden und erlauben die selektive Immobilisierung zelladhäsionsfördernder Peptide
- An Dextranschicht immobilisiertes RGD zeigt unter in vitro-Bedingungen deutlichen Einfluß auf Zelladhäsion

GERING WASSERLÖSLICHE WIRKSTOFFSALZE

- Gering wasserlösliche Salze osteogener Wirkstoffe (Bisphosphonate, Statine) bilden gut haftende und vollständig degradierende Implantatbeschichtungen
- Beschichtungen sind durch eine verzögerte Wirkstofffreisetzung und im Falle von BMP-2 durch den Erhalt der biologischen Aktivität charakterisiert
- Erste in vivo-Untersuchungen mit Bisphosphonat-beschichteten Dentalimplantaten zeigen ein verbessertes initiales Einwachsverhalten
- Präzipitierenden Ionenpaar-Bildung stellt ein universell anwendbares Prinzip zur Herstellung von retardierend freisetzenden Wirkstoffbeschichtungen dar.



DANKSAGUNG



Dr. Falko Schlottig
Dr. Thomas Hefti



PD Dr. Stephen J. Ferguson



Dr. Vera Hintze
Prof. Dieter Scharnweber
Dr. Susanne Bierbaum
Prof. Hartmut Worch



Prof. Dr. Diana Imhof



Dr. Jens D. Langhoff
Dr. Katrin Voelter
Prof. Dr. Brigitte von Rechenberg
Dr. Karin Kalchofner
Dr. Katja Nuss



Thomas L. Mueller
Dr. Harry van Lenthe



Thüringer Schwerpunkt
Grenzflächenfunktionalisierung
(2007 WF 0099)



PAK 105



S 732



DANKSAGUNG



Dr. Armin R. Kautz
Dr. Ralf Wyrwa
Dr. Jürgen Weisser
Dr. Stephanie Möller
Dr. Jana Becher
DC Manuela Dubs
DC Birgitt Beer
Dr. Ralf Linke (Bereich OFT)
Dr. Andreas Pfuch (Bereich OFT)

