

Projektvorhaben

Inexpensive production of no endotoxin biopolymers to develop essential medical aids

Abschlussbericht

Erstellt durch:

Aap Biomaterials GmbH

Industrie Center Obernburg

63784 Obernburg

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen

FKZ 0315287 gefördert.

Die Verantwortung für die Veröffentlichung liegt beim Autor.

I Kurze Übersicht

1. Aufgabenstellung

Natürlich vorkommende Biopolymere können einen hohen Grad an Verunreinigungen aufweisen oder unerwünschte Beimengungen enthalten, die eine medizinische Anwendung nur nach einer gründlichen Aufreinigung ermöglichen. Das gilt sowohl für Materialien tierischer als auch pflanzlicher Herkunft. *aap* befasst sich mit der Entwicklung von Biomaterialien, die als Medizinprodukte zugelassen werden und ihren Einsatz in Orthopädie und Traumatologie sowie Wirbelsäulen Chirurgie finden. In diese Entwicklungen fallen auch Kollagen und Alginat.

Für die Kollagenherstellung dient uns Dermis porciner Herkunft als Ausgangsmaterial, aus dem nicht nur das Kollagen gewonnen wird, sondern das auch einem Herstellungsschritt unterworfen werden muss, um den erheblichen Fettanteil in diesem Gewebe zu reduzieren.

Alginat bestehen aus einem variablen Gemisch aus Guluron-(G) und Manuronsäure (M), sie kommen als niedrig- und hochmolekulare Verbindungen vor, durch Vernetzen mit z. B. Calcium kann die Viskosität von flüssig bis Gelatine-artig eingestellt werden. Alginat werden vorwiegend aus Braunalgen gewonnen und in verschiedenen Prozessschritten von den natürlich vorkommenden Verunreinigungen befreit. Besonders wichtig ist die weitestgehende Entfernung der üblicherweise in dem natürlich vorkommenden Rohstoff vorhandenen Pyrogene.

Ein kostengünstiges Aufreinigungsverfahren, das zu hochreinen Alginaten führte, wurde bei unserem Projektpartner in den Niederlanden entwickelt. Das Verfahren wurde anschließend mit verschiedenen Alginaten, die sich in ihren Molekulargewichten, dem Verhältnis von Guluron- zu Manuronsäure, und in der Viskosität unterschieden, überprüft. Dabei konnte der Endotoxingehalt auf Werte reduziert werden, die um ein Vielfaches unter den Ausgangswerten lagen.

Die Aufgabe von *aap* Biomaterials war es, mit den gereinigten Alginaten Wirkstoffe zu verkapseln und diese in unterschiedliche Trägermaterialien für die lokale Therapie einzuarbeiten sowie in einem anderen Biopolymer „Kollagen“, den Fettgehalt zu reduzieren. Im Weiteren wird ausschließlich auf die Arbeiten Bezug genommen, die sich mit der Verkapselung von Wirkstoffen, der angestrebten protrahierten Freisetzung aus den ausgewählten Trägermaterialien und den Untersuchungen zur Sterilisation und Biokompatibilität sowie der Fettreduktion im Kollagen befassen. Die im Rahmen der zweijährigen Projektlaufzeit durchgeführten Arbeiten bilden die Grundlage für die Entwicklung zulassungsfähiger Medizinprodukte, die zur Ausweitung und Vervollständigung der Produktpalette bei *aap* Biomaterials führen. Die durchgeführten Untersuchungen bestätigten die Realisierbarkeit der Entwicklungsziele.

2. Planung und Ablauf des Auftrags

Die Aufgaben gliederten sich in 5 Arbeitspakete

Arbeitspaket 1:

- Auswahl geeigneter Wirkstoffe und deren Verkapselung
- Untersuchung zur Stabilität der Verkapselung in Gegenwart von physiologischen Salzlösungen

- Erarbeitung von Nachweismethoden für die Wirkstoffe

Arbeitspaket 2:

- Aufreinigung von porcinem Kollagen
- Kombinationsmöglichkeiten von Kollagen und mit Alginat verkapseltem Wirkstoff

Arbeitspaket 3:

- Auswahl geeigneter Alginattypen, die sich in molekularer Zusammensetzung und dem Vernetzungsgrad unterscheiden
- Freisetzungsversuche in Abhängigkeit von Konzentration, Elutionsvolumina und Eliminationshalbwertszeit

Arbeitspaket 4:

- Herstellung von Trägermaterialien auf der Basis von Kollagen und anderen Biopolymeren und die Einarbeitung von verkapselten Wirkstoffen
- Charakterisierung der Wirkstoff-beladenen Trägermaterialien
- Freisetzungskinetik

Arbeitspaket 5:

- Sterilisierbarkeit von Alginat verkapselten Wirkstoffen und deren Haltbarkeit
- Sterilisierbarkeit der Trägermaterialien mit den eingearbeiteten Wirkstoffen
- Untersuchungen zur Biokompatibilität

Vier Meilensteine waren während der Entwicklungsdurchführung vorgesehen:

1. Meilenstein:

- Entwicklung von Verkapselungstechniken für Antibiotika, Antiphlogistika und ggf. Schmerzmitteln
- partiell auch in Kombination mit gereinigtem Kollagen

2. Meilenstein:

- Herstellung von implantierbaren Trägermaterialien mit verkapseltem Gentamicin, die auch in Gegenwart von physiologischen Lösungen stabil bleiben und die eine protrahierte Freisetzung von Gentamicin aufweisen.

3. Meilenstein:

- Herstellung von implantierbaren Materialien mit verkapselten Antiphlogistika, die stabil sind und eine protrahierte Freisetzung zeigen.
- Charakterisierung der Freisetzungseigenschaften in Abhängigkeit von Einflussfaktoren.

4. Meilenstein:

- Nachweis der Sterilisierbarkeit, der mit verkapselten, Wirkstoff-beladenen Trägermaterialien und orientierende Untersuchungen zur Biokompatibilität.

3. Erzielte Ergebnisse

3.1 Verkapselung von Wirkstoffen

Für die Verkapselung von Wirkstoffen wurden zwei Modellsubstanzen ausgewählt.

- a) Antibiotikum Gentamicin
- b) Antiphlogistisch wirkendes Corticoid Dexamethason

Gentamicin hat sich in Verbindung mit einem geeigneten Trägermaterial als wirksames Antibiotikum für die Prophylaxe und Therapie von Knochen- und Weichgewebeeinfektionen erwiesen. Es ist relativ stabil gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen und kann einer EtO- und Strahlensterilisation unterzogen werden.

Corticosteroide werden sowohl bei der Schmerz- und Entzündungstherapie im Bereich der Wirbelsäule eingesetzt als auch bei subakuten und chronischen Gelenkerkrankungen. Dexamethason wirkt in sehr niedrigen Konzentrationen. Mit der lokalen Gabe kann die zu verabreichende Dosis erheblich reduziert werden. Dadurch wird die Verträglichkeit deutlich erhöht.

Als Trägermaterialien wurde für Gentamicin ein Kollagenvlies ausgewählt, das gleichzeitig eine hämostatische Wirkung entfaltet und das als Medizinprodukt zugelassen ist.

Als Trägermaterial für Dexamethason wurde Alginat gewählt, das als Antiadhäsivum wirkt und gleichzeitig als entzündungshemmender Wirkstoff, z. B. bei Radiculitis, in der Wirbelsäulen Chirurgie eingesetzt werden kann. Für die Behandlung von Entzündungen im Gelenkbereich bietet sich Hyaluronsäure als Trägermaterial an.

Für beide Wirkstoffe wurden zunächst die Nachweismethoden mittels UPLC erarbeitet und diese anhand von Freisetzungsuntersuchungen in Kombination mit verschiedenen Medien auf ihre Eignung untersucht. Für Gentamicin wurde zudem der quantitative Nachweis der Einzelkomponenten erarbeitet. Diese Ergebnisse werden in Verbindung mit den durchgeführten Freisetzungsuntersuchungen und den Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Sterilisationsverfahren dargestellt.

3.1.1 Verkapselung von Gentamicin

Über die Einarbeitung von Gentamicin in Alginate berichtete Lannuccelli 1996. Er stellte mit Gentamicin beladene und mit Kalzium gehärtete Alginatkugeln mit einem Durchmesser von 3 mm her, die einen Gentamicingehalt von etwa 5 % aufwiesen. Die von Lannicelli publizierte Methode sollte in zwei Richtungen abgewandelt werden:

- a) signifikante Erhöhung des Gentamicingehalts
- b) deutliche Verringerung der Partikelgröße.

Im Rahmen der Entwicklung wurde ein Prozess erarbeitet und optimiert, mit dem es möglich war, Partikel mit einer Größe unter 1 mm herzustellen, die einen Gentamicingehalt über 50 % enthielten.

Mit diesem ausgewählten Prozess erfolgten alle weiteren Herstellungen.

Neun verschiedene Alginate mit unterschiedlicher Viskosität, unterschiedlichem Guron-Manuron-Verhältnis und unterschiedlicher Ausgangspartikelgröße wurden nach der ausgewählten Rezeptur mit Gentamicin beladen, anschließend wurde das Ergebnis beurteilt.

Drei der neun verschiedenen, kommerziell erhältlichen Alginate waren schwieriger in der Handhabung, da sie eine Tendenz zum Zusammenklumpen zeigten. Sie wurden deshalb nicht in die weiteren Bewertungen einbezogen.

Der ausgewählte Beladungsprozess zeigte bei 9 ausgewählten, kommerziell erhältlichen Alginaten ein gutes Beladungsergebnis, das zwischen 49 und 63 % lag. Der Prozess war weitgehend unabhängig von der Partikelgröße des Ausgangsmaterials, der Viskosität und dem Verhältnis von Guluron- zu Manuronsäure. Aus diesen Ergebnissen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass kommerziell erhältliche Alginat für die Beladung mit Gentamicin geeignet sind, soweit sie den Reinheitsanforderungen entsprechen. Manche Alginat tendieren allerdings zum Verklumpen und stellen während der Herstellung höhere Anforderungen an den anschließenden Trocknungsprozess. Sie sollten daher von vorne herein ausgeschlossen werden.

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der Gentamicinbeladung bei 9 verschiedenen, kommerziell erhältlichen Alginaten

Type alginate	Particle size volume				gentamicin- percentage		Viscosity	Guluronic/mannuronic ratio
	d0,1	d0,5	d0,9	µm				
Keltone	37	65	136	µm	48,92	%	low	
PHG 155	11	17	52	µm	61,20	%	high	
PHU 156	11	16	46	µm	63,12	%	high	
PHI 155	13	18	61	µm	62,12	%	high	
Manugel DMB	11	16	43	µm	58,61	%	medium	63% G
Manugel LBA	11	16	80	µm	59,49	%	low	63% G
Manucol DMF	13	18	57	µm	58,59	%	medium	39% G
Manucol LD	11	20	59	µm	57,04	%	low	39% G
R03008	27	43	199	µm	58,96	%	low	66% G

Abbildung 1 zeigt den Anteil von Gentamicin im Alginat (%) in Abhängigkeit von der Beladung des Ausgangsmaterials.

