

Verbundprojekt

**Biofunktionale nanostrukturierbare Implantate zur Stimulation
der Osteo- und Chondrogenese bei der Behandlung skeletaler
Defekte (Bionanoplant)**

Teilvorhaben

**Erforschung und Funktionsnachweis nanostrukturierbarer Biomaterialien
zur Generierung von biphasischen Systemen mittels 2-PP-Prozess**

FKZ: 13N10034

**Schlussbericht
erstellt durch**

**INNOVENT e.V. Technologieentwicklung
Prüssingstr. 27B
07745 Jena**

Erforschung und Funktionsnachweis nanostrukturierbarer Biomaterialien zur Generierung von biphasischen Systemen mittels 2-PP-Prozess

- Schlussbericht-

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung

Das Ziel der Arbeiten im Teilvorhaben bestand in der Entwicklung funktionalisierter, mittels lasergestützter Verfahren (2-Photonen-Polymerisation, 2-PP) vernetzbarer und nanostrukturierbarer Biomaterialien für das Tissue Engineering von Knochen- (Osteophase) bzw. Knorpeldefekten (Chondrophase). Im weiteren waren Kupplungsstrategien auszuarbeiten, um die mittels 2-PP generierte Osteo- und Chondrophase zu verbinden. Um die Zelladhäsion innerhalb des Scaffolds für die Osteo- bzw. Chondrophase zu stimulieren war zusätzlich vorgesehen, bioaktive Liganden, die eine zelladhäsionsfördernde Wirkung besitzen, an die polymerisationsfähigen Edukte zu binden und mehrschalige, biodegradierbare CaP-Nanopartikel für die gezielte Freisetzung von Wachstumsfaktoren und kurzen Oligonukleotiden in die polymere Osteophase zu integrieren. Die hergestellten Substanzen/Gele wurden hinsichtlich ihrer mechanischen Festigkeit und Belastbarkeit charakterisiert werden. Des Weiteren waren die hydrolytische Degradation und die Entwicklung geeigneter Reinigungsmethoden sowie grundlegende Untersuchungen zur Zytotoxizität Gegenstand der Projektarbeiten.

Wieterhin sollten wasserlösliche Photoinitiatoren für die 2-PP synthetisiert werden und ihre Eignung für die Vernetzung wasserlöslicher Monomere überprüft werden.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Eine wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Umsetzung der angestrebten Projektziele bildete das innovative Netzwerk bestehend aus zwei Forschungseinrichtungen (*Iba, INNOVENT*) und zwei KMU (*co.don AG, aap Biomaterials GmbH & Co. KG*), die entsprechend ihren bisherigen Arbeiten über umfassende Qualifikationen und Kompetenzen sowie die notwendige technische Labor/Geräte-Ausstattung verfügten (siehe Antrag).

Unter diesen Voraussetzungen wurden für alle Partner des Verbundvorhabens entsprechende Teilvorhaben mit detaillierter Vorhabensbeschreibung und Arbeitsplanung erarbeitet, die sich in einem Gesamtarbeits- und Zeitplan zusammenfügen und die Rahmenbedingungen sowie die grundsätzliche Aufteilung im Projekt beschrieben.

Entsprechend dem zu Projektbeginn bestehenden Stand von Wissenschaft und Technik sowie der am Markt existierenden Produkte stellte das Vorhaben eine wissenschaftlich sehr anspruchsvolle Forschungsaufgabe dar, die mit hohen Anforderungen an die Scaffold-Generierung und die dafür zugrundeliegende komplexe Materialentwicklung verbunden war.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Der erstellte Arbeitsplan für das Teilprojekt ist in Tabelle 1 gezeigt. Die einzelnen Arbeitspakete konnten fristgerecht bearbeitet werden.

APs	Jahr 2008					Jahr 2009												Jahr 2010												Jahr 2011							PM/AP
	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	
AP1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5																										6	
AP2						0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75																							6	
AP3								0,5	0,5	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	0,5																					6	
AP4														0,75	1,25	1,25	1,75	M																		6	
AP5																	0,75	1,75	1,75	1,75																6	
AP6																																				5,5	
AP7																																				5,5	
AP8																																				5,5	
AP9																																				5,25	
AP10																																				5,75	
AP11													0,5																						1,75		
PM	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	59,25		

Tabelle 1: Arbeitsplan für das Teilprojekt von INNOVENT

Darüber hinaus wurden Scaffolds für die Chondrophase über das Electrospinning-Verfahren, das bei INNOVENT etabliert ist, generiert und zur Testung an die co.don AG übergeben, wo die Eignung elektrogespinnener Konstrukte für die Chondrophase gezeigt werden konnte.

Zusätzlich wurde auch ein Verfahren entwickelt, mit dem das vom Projektpartner aap entwickelte kollagenbasierte Knochenkonstrukt mit den von INNOVENT entwickelten Materialien verbunden werden kann.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Mit neuen Untersuchungsmethoden konnten in den letzten Jahren große Fortschritte bei der Aufklärung der Funktion extrazellulärer Matrixstrukturen erzielt werden. Neben dem Einfluss der chemischen Zusammensetzung konnte gezeigt werden, dass auch die Struktur der Matrix

einen wesentlichen Beitrag auf die Entwicklung von Zellen hinsichtlich Zelldifferenzierung, -proliferation und -migration leistet. Diese Erkenntnisse haben zu intensiven Bemühungen geführt, derartige Strukturen in Form artifizieller Matrices strukturell und unter Verwendung ECM-analoger Materialien nachzubilden und diese z. B. für eine Optimierung von Implantaten oder Zellkulturmaterialien einzusetzen [1,2].

Zur Generierung artifizieller Matrices wurden auch verstärkt Fabrikationsverfahren des Rapid Engineering getestet, die es ermöglichen, aus einer Computer-generierten Modellstruktur direkt ein reales dreidimensionales Objekt zu erzeugen [3]. Die bisher eingesetzten Verfahren umfassen vor allem lithographische Techniken wie beispielsweise Photolithographie oder Mikro-Kontakt-Printing [4,5] und spezielle Plotting- und Inkjet-Techniken [6,7]. Bei diesen Verfahren werden in den meisten Fällen in einem Verfahrensschritt zweidimensionale Strukturen generiert. Durch beliebige Wiederholung des strukturbildenden Verfahrensschritts können auch dreidimensionale Objekte generiert werden. Demgegenüber stellt die 2-Photonen-Polymerisation ein Verfahren dar, das es gestattet, dreidimensionale Mikro- und Nanostrukturen direkt vom Computermodell in photosensitive Materialien zu schreiben. Ein besonderer Vorteil dieser Methode im Vergleich zu den oben genannten Inkjet- und Plotting-Techniken besteht in der hohen Auflösung der erzeugten Strukturen bis in den Bereich kleiner 100 nm [8]. Somit bietet das Verfahren eine vielversprechende Option für die computergestützte Generierung mikro- und nanostrukturierter 3D-Strukturen. Für eine Anwendung dieser Technologie zur Fabrikation artifizieller ECM ist die Bereitstellung geeigneter Substanzen eine wesentliche Voraussetzung. Besonders geeignet erscheinen Derivate ECM-analoge Substanzen, die photovernetzbar sind und gleichzeitig zu biokompatiblen Materialien führen.

Während für technische Applikationen bereits eine Vielzahl an photovernetzbaaren Monomeren bekannt ist, die sich jedoch nicht für die Generierung artifizieller ECM eignen, beschränkt sich die Anzahl der im Biomaterialbereich bisher untersuchten photovernetzbaaren Monomere auf Grund der speziellen Anforderungen auf nur wenige Vertreter. Wesentliche Faktoren, die eine Materialauswahl limitieren, sind insbesondere die notwendige Zytokompatibilität und Resorbierbarkeit. Polyethylenglykoldiacrylate [9] oder Makromere auf der Basis unterschiedlicher Acrylat-terminierter Oligolactone [5,10] wurden bisher als photovernetzbaare Substanzen getestet. Auch in Rapid Engineering-Verfahren zur Herstellung artifizieller ECM ist die Anzahl an Komponenten oder Strukturanaloga der ECM bis auf wenige Ausnahmen (Gelatine [7], Hyaluronsäure [11]) begrenzt.

In der 2-PP wurden bisher unterschiedliche Acrylatsysteme als Ausgangsmaterialien eingesetzt [12-15]. Zur Herstellung von Biomaterialien wurde allerdings bisher nur der Einsatz von anorganisch-organischen Hybridmaterialien auf ORMOCERE-Basis beschrieben [14]. Zwar erwiesen sich die Materialien in ersten In-vitro-Untersuchungen als zytokompatibel [16], erscheinen aber zur Fabrikation von ECM-analogen Strukturen mit Hydrogeleigenschaften auf Grund der chemischen Zusammensetzung nur als bedingt geeignet. Für die breite Nutzung der 2-PP im Biomaterialbereich einschließlich der Herstellung artifizierender ECM besonders für die Osteo- und Chondrophase ist zwingend eine entsprechende Materialentwicklung erforderlich, welche die Fabrikation entsprechender Hydrogelstrukturen erlaubt. Neben den Anforderungen, die an Biomaterialien hinsichtlich Bioverträglichkeit und Resorbierbarkeit gestellt werden, müssen auch die Parameter Berücksichtigung finden, welche durch das 2-PP-Verfahren determiniert sind. Dazu zählen besonders die optische Transparenz im Wellenlängenbereich des Verfahrens (nahes Infrarot-Licht) und die Vernetzbarkeit bei geringer Laserenergie, wodurch die erzeugten Strukturen bzw. zusätzlich eingebrachte Wirksubstanzen nicht zerstört werden sowie die Wahl geeigneter, nicht-toxischer Photoinitiatoren [17].

Mit der Entwicklung neuer Ausgangsmaterialien für das 2-PP-Verfahren ergeben sich zusätzlich weitreichende Möglichkeiten zur Oberflächenstrukturierung von Biomaterialien, nicht nur ausschließlich mittels 2-PP, sondern auch für weitere auf dem Prinzip der photochemischen Vernetzung beruhenden Strukturierungsmethoden.

Literatur

- [1] B. D. Ratner, S. J. Bryant: Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 6 (2004), 41-75.
- [2] M. M. Stevens, J. M. George: Exploring and Engineering the Cell Surface Interface. *Science* 310 (2005), 1135-1138.
- [3] V. L. Tsang, S. N. Bhatia: Three-dimensional tissue fabrication. *Adv. Drug Delivery Rev.* 56 (2004), 1635–1647.
- [4] Z. Ademovic, P. Kingshott: Micro- and nanoscale surface patterning techniques for localising biomolecules and cells: the essence of nanobiotechnology. In: *Surfaces and interfaces for biomaterials* (Hrsg.: P. Vadgama), CRC Press, Boca Raton, 2005, 150-180.
- [5] E. Leclerc, K.S. Furukawa, F. Miyata, Y. Sakai, T. Ushida, T. Fujii: Fabrication of microstructures in photosensitive biodegradable polymers for tissue engineering applications. *Biomaterials* 25 (2004), 4683-4690.
- [6] D. W. Hutmacher, M. Sittlinger, M. V. Risbud: Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends Biotechnol.* 22 (2004), 354-362.