

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Teil I: Kurzbericht

Verbundprojekt

„Patientenspezifische Vor-Ort-Funktionalisierung von Knochenersatzmaterialien mit antibiotischer Langzeitwirkung (OKEM)“

Teilprojekt

„Erforschung der Grundlagen für die Applikationstechnik: Prozess und Anlagentechnologie“

Förderkennzeichen

13GW0430A

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Laufzeit

01.07.2020 - 30.06.2024

Zuwendungsempfänger

biotrics bioimplants AG
Ullsteinstraße 108
12109 Berlin



Projektleiter

Herr Dr. Drazen Tadic

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 13GW0430A gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

1 Ursprüngliche Aufgabenstellung / wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Knochenersatzmaterialien, die in Orthopädie, Unfallchirurgie sowie Zahn- und Kieferheilkunde eingesetzt werden, bergen ein hohes Risiko für Infektionen (Osteitis). Diese schwer behandelbare Infektion, oft nosokomial, wird derzeit durch Antibiotikagabe oder operative Entfernung behandelt. Beide Ansätze sind begrenzt wirksam, mit Nebenwirkungen und Kosten bis zu 0,5 Mio. € pro Fall. Häufig bleibt nur die Amputation des betroffenen Knochens. Das Projekt OKEM entwickelt eine Antibiotika-Funktionalisierung von Knochenersatzmaterialien für einen lokal wirksamen Infektionsschutz durch gezielte Freisetzung. Grundlage ist eine neuartige Beschichtung, kombiniert mit einer molekularen Kapselung von Antibiotika zur kontrollierten Bindung und Freisetzung. Die Technologie ist vielseitig adaptierbar und ermöglicht eine passgenaue Anpassung an spezifische klinische Anforderungen. Die innovative Zieltechnologie vermeidet Osteitis durch lokal abgestimmte Antibiotika-Kombinationen und reduziert Nebenwirkungen sowie Resistenzrisiken erheblich. Die Vermarktung umfasst vorbeschichtete Knochenersatzmaterialien sowie einen Speed-Coating-Kit für patientenspezifische Anwendungen vor Ort. Umsatzpotenziale für standardisierte Materialien liegen bei ca. 20 Mio. € in den ersten Jahren. Im biotrics-Teilprojekt wird die wissenschaftliche Grundlage für eine Polyelektrolyt-Multilayer-Beschichtung geschaffen, ergänzt durch Prozess- und Anlagentechnologien. Zudem werden patientenspezifische Anwendungen am Point-of-Care erforscht, um die Technologie zur Anwendungsreife weiterzuentwickeln.

2 Ablauf des Vorhabens

Die Planung des Verbundprojektes war ursprünglich auf 3 Jahre ausgelegt. Die Projektaktivitäten waren entsprechend dem Gesamtkonzept des Verbundantrags OKEM in 10 Arbeitspakete eingeteilt, wovon die biotrics an der Bearbeitung von 6 Arbeitspaketen maßgeblich eingebunden war (s. Abbildung 1). Abweichend von der ursprünglichen Planung hatten sich durch die COVID-19-Pandemie bei den Projektpartnern erhebliche organisatorische Zusatzaufwände und logistische Herausforderungen ergeben. Dies betraf sowohl den Bereich der Routine-Aktivitäten als auch Aspekte der Durchführung der FuE-Arbeiten im Rahmen des Projekts. Zwei kostenneutrale Verlängerungen der Projektlaufzeit um jeweils 6 Monate wurden beantragt und bewilligt. Die Projektdurchführung erfolgt wie in Abbildung 2 dargestellt.

PLAN		2020	2021	2022	2023									
Nr.	Arbeitspaket	Projekt quartale												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1.1	Anforderungen/Lösungsansatz aus Anwendungs-/Fertigungsperspektive													
2.1.1	Chemische Grundlagen der KEM-Vorbehandlung													
2.1.2	KEM-Vorbehandlung: prozesstechnische Umsetzung													
3.1	Polyelektrolyt-Multilayer-Beschichtung und funktionale Bewertung													
6.1.1	Anlagentechnik für Polyelektrolyt-Multilayer-Beschichtung													
6.1.2	Polyelektrolyt-Multilayer-Beschichtung: Integration und Validierung													
6.1.3	Sterilitätskonzept und dessen Umsetzung													
7.1.1	Antibiotika-Kapselung und Anwendung als In-Klinik-Applikation													
7.1.2	Applikationsdevice KEM-Funktionalisierung													
10.1	Projektsteuerung und Dissemination													

Abbildung 1: Ursprüngliche Arbeitsplanung des Verbundprojektes OKEM laut Teilvorhabensbeschreibung der biotrics

TATSÄCHLICH		2020	2021	2022	2023	2024											
Nr.	Arbeitspaket	Projekt quartale															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1.1	Anforderungen/Lösungsansatz aus Anwendungs-/Fertigungsperspektive																
2.1.1	Chemische Grundlagen der KEM-Vorbehandlung																
2.1.2	KEM-Vorbehandlung: prozesstechnische Umsetzung																
3.1	Polyelektrolyt-Multilayer-Beschichtung und funktionale Bewertung																
6.1.1	Anlagentechnik für Polyelektrolyt-Multilayer-Beschichtung																
6.1.2	Polyelektrolyt-Multilayer-Beschichtung: Integration und Validierung																
6.1.3	Sterilitätskonzept und dessen Umsetzung																
7.1.1	Antibiotika-Kapselung und Anwendung als In-Klinik-Applikation																
7.1.2	Applikationsdevice KEM-Funktionalisierung																
10.1	Projektsteuerung und Dissemination																

Abbildung 2: Tatsächliche Arbeitsdurchführung seitens biotrics

3 Wesentliche Ergebnisse (sowie ggf. Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen)

Das entwickelte KEM-System zur Vor-Ort-Funktionalisierung beim Anwender ist den jetzigen Verfahren überlegen, da die Freisetzung eines patientenspezifisch-wählbaren Antibiotikums (bzw. einer Kombination) über einen deutlich verlängerten Zeitraum erfolgt. Die Vorbehandlung des KEM ist auf unterschiedliche KEM-Typen (allograft, xenograft, synthetisch) übertragbar, wodurch dem Anwender eine Vielfalt an Anwendungskombinationen für unterschiedliche Indikationen zur Verfügung steht. Die Bereitstellung eines mit Antibiotikum vorbeladenen KEMs ist ebenfalls möglich. Letzteres bietet jedoch einige entscheidende Nachteile bzw. Anforderungen, v.a. an das Antibiotikum, welches in immobilisiertem Zustand wirksam bleiben muss.

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Teil II: Ausführlicher Abschlussbericht

Verbundprojekt

„Patientenspezifische Vor-Ort-Funktionalisierung von Knochenersatzmaterialien mit antibiotischer Langzeitwirkung (OKEM)“

Teilprojekt

„Erforschung der Grundlagen für die Applikationstechnik: Prozess und Anlagentechnologie“

Förderkennzeichen

13GW0430A

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Laufzeit

01.07.2020 - 30.06.2024

Zuwendungsempfänger

biotrics bioimplants AG
Ullsteinstraße 108
12109 Berlin



Projektleiter

Herr Dr. Drazen Tadic

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 13GW0430A gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1 Durchgeführte Arbeiten im Vergleich zur ursprünglichen Planung	1
2 Erzielte Ergebnisse	8
3 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	20
4 Notwendigkeit/Angemessenheit der geleisteten Arbeiten	21
5 Voraussichtlicher Nutzen / Verwertbarkeit der Ergebnisse	21
6 Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	22
7 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses	22

1 Durchgeführte Arbeiten im Vergleich zur ursprünglichen Planung

Aufgabenstellung

Knochenersatzmaterialien werden in der Orthopädie, Unfallchirurgie, Zahn- und Kieferheilkunde verwendet. Bei der Anwendung besteht ein erhebliches Infektionsrisiko des Knochenersatzes im Körper (Osteitis). Die Osteitis ist eine häufige, schwer heilbare Krankenhausinfektionen (nosokomiale Infektion). Therapieansätze beschränken sich bisher auf Antibiotikagabe bzw. operatives Entfernen des infizierten Bereichs. Beide Ansätze wirken nur begrenzt und bedingen schweren Nebenwirkungen sowie Kosten von bis zu 0,5 Mio. € pro Fall. Oft wird die Amputation des gesamten Knochens erforderlich. OKEM zielt auf eine oberflächliche Antibiotika-Funktionalisierung von Knochenersatzmaterialien, um durch Freisetzung im Körper über längere Zeit einen optimalen, lokal wirkenden Infektionsschutz zu erzeugen: Erforscht wird eine Beschichtung des Knochenersatzes sowie eine darauf abgestimmte „molekulare Kapselung“ von Antibiotika zur Bindung an die Beschichtung und kontrollierte Freisetzung im Körper. Die Technologie ist sowohl auf verschiedene Knochenersatzmaterialien als auch für unterschiedliche Antibiotika einsetzbar, was eine genaue Abstimmung auf den einzelnen Anwendungsfall ermöglicht.

Die Zieltechnologie eröffnet eine wirksame Methode zur Vermeidung von Osteitis an Knochenersatz, bei der individuell abstimmbare Antibiotika-Kombinationen eingesetzt werden können und eine maßgeschneiderte Wirkstoffabgabe unmittelbar vor Ort erfolgt. So werden Nebenwirkungen und Risiken der Resistenzbildung massiv reduziert. Die Verwertung erfolgt in Form vorbeschichteten Knochenersatzmaterials zur antibiotischen Funktionalisierung am Einsatzort, ergänzt um einen Speed-Coating-Kit, mit dem die Beschichtung patientenspezifischer Formkörper vor Ort möglich wird. Allein für die Grundversion der vorbeschichteten, standardisierten Knochenersatzmaterialien ergeben sich Umsatzpotenziale von ca. 20 Mio. € in den ersten Verwertungsjahren.

Im Rahmen des Gesamtvorhabens, in dem eine Technologie zur Beschichtung und antibiotischen Funktionalisierung von Knochenersatzmaterialien (KEM) angestrebt wird, zielt das Teilprojekt von biotrics auf die Erforschung der Grundlagen für die Applikationstechnik. Zu lösen sind konzeptionelle, grundlagenorientierte Fragestellungen bezüglich der Umsetzungsmöglichkeiten der im Projekt definierten Polyelektrolyt-Multilayer-Beschichtung in einer Prozesskonfiguration und Anlagentechnologie, die als tragfähiger Ausgangspunkt für die projektnachfolgende anwendungsnahe Entwicklung

dient. Ebenfalls werden Möglichkeiten für die Umsetzung spezifischer Teilprozesse am Point-Of-Care erforscht, um so eine patientenindividuelle Abstimmung der antibiotischen Funktionalisierung zu ermöglichen.

Im Teilprojekt von biotrics werden wesentliche wissenschaftliche Inhalte der Gesamtzielstellung im Sinne der wissenschaftlichen Grundlegung einer projektnachfolgenden zur Anwendungsreife entwickelbaren Technologie erarbeitet.

Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Teilvorhaben „*Erforschung der Grundlagen für die Applikationstechnik: Prozess- und Anlagentechnologie*“, wurde als Bestandteil des Verbundprojekts „*Patientenspezifische Vor-Ort-Funktionalisierung vom Knochenersatzmaterialien mit antibiotischer Langzeitwirkung (OKEM)*“ vom 01.07.2020 bis zum 30.06.2024 durchgeführt.

Das Teilvorhaben der biotrics bioimplants AG wurde unter dem Förderkennzeichen 13GW0430A mit einer Zuwendung von bis zu 478.500 Euro vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert und zum 01.07.2020 vom BMBF bewilligt.

Die drei deutschen Verbundpartner haben bereits vor Projektbeginn zusammen auf dem Gebiet von kollagenbasierten, degradierbaren Lösungen für Knochenersatzmaterialien (KEM) zusammengearbeitet.

biotrics bioimplants AG, Ullsteinstraße 108, 12109 Berlin

NMI Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut an der Universität Tübingen, Markwiesenstraße 55, 72770 Reutlingen

Universitätsmedizin Rostock (UMR) – Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Strepelstraße 13, 18057 Rostock

Anliegen der Förderrichtlinie ist die Förderung der Zusammenarbeit von Wirtschaft, Wissenschaft und Anwendern in industriegeführten FuE-Verbundprojekten zur schnellen Überführung von innovativen medizintechnischen Lösungen in die Versorgung, basierend auf einem bedarfs- und patientenorientierten Ansatz. Die Ergebnisse der FuE-Projekte sollen dazu beitragen, die Prävention und Versorgung nosokomialer Infektionen deutlich zu verbessern. Bezüglich der Konsortialpartner stehen insbesondere KMU im Fokus der Förderrichtlinie. Bezüglich der inhaltlichen Ausrichtung förderwürdiger Projekte werden u. a. „innovative medizintechnische Lösungen, die durch spezielle Konstruktionen bzw. Funktionalitäten, den Einsatz neuer oder verbesserter Materialien, Oberflächen, Herstellungs- und Beschichtungsverfahren die Häufigkeit nosokomialer Infektionen

deutlich reduzieren“ genannt. Diese Punkte werden von OKEM vollständig abgebildet, insofern:

- a) ein industriegeführtes Konsortium gegeben ist bestehend aus biotrics (konsortialführender Industriepartner), NMI und UMR,
- b) ein unmittelbar bedarfsorientierter Ansatz verfolgt wird mit der angezielten wissenschaftlichen Grundlegung einer antibiotischen Funktionalisierung von KEM bei flexibler Abstimmbarkeit auf die jeweiligen individuellen Anwendungsanforderungen,
- c) die Ergebnisse bei Bewältigung der anspruchsvollen wissenschaftlichen Herausforderungen des Lösungswegs eine gute Ausgangsbasis bieten für die Entwicklung einer medizintechnischen Anwendungstechnik im Wege der experimentellen Entwicklung, zur Generierung antibiotisch funktionalisierter KEM-Blöcke und individualisierter KEM-Formkörper, womit eine deutlich verbesserte Prävention und Versorgung nosokomialer Infektionen ermöglicht wird,
- d) die inhaltliche Ausrichtung von OKEM entsprechend dem Charakter von Zielstellung und Lösungsansatz spezielle Funktionalitäten (Antibiotika-Release) und den Einsatz
- e) verbesserter Oberflächen und Beschichtungsverfahren (Polyelektrolyt-Multilayer) zum Gegenstand hat.

Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Planung des Verbundprojektes war ursprünglich auf 3 Jahre ausgelegt. Die Projektaktivitäten waren entsprechend dem Gesamtkonzept des Verbundantrags OKEM in 10 Arbeitspakete eingeteilt, wovon die biotrics an der Bearbeitung von 6 Arbeitspaketen maßgeblich eingebunden war (s. Abbildung 1).

Abweichend von der ursprünglichen Planung hatten sich durch die COVID-19-Pandemie bei den Projektpartnern erhebliche organisatorische Zusatzaufwände und logistische Herausforderungen ergeben. Dies betraf sowohl den Bereich der Routine-Aktivitäten als auch Aspekte der Durchführung der FuE-Arbeiten im Rahmen des Projekts. Zwei kostenneutrale Verlängerungen der Projektlaufzeit um jeweils 6 Monate wurden beantragt und bewilligt. Die Projektdurchführung erfolgt wie in Abbildung 2 dargestellt.

PLAN		2020	2021	2022	2023									
Nr.	Arbeitspaket	Projektquartale												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1.1	Anforderungen/Lösungsansatz aus Anwendungs-/Fertigungsperspektive													
2.1.1	Chemische Grundlagen der KEM-Vorbehandlung													
2.1.2	KEM-Vorbehandlung: prozesstechnische Umsetzung													
3.1	Polyelektrolyt-Multilayer-Beschichtung und funktionale Bewertung													
6.1.1	Anlagentechnik für Polyelektrolyt-Multilayer-Beschichtung													
6.1.2	Polyelektrolyt-Multilayer-Beschichtung: Integration und Validierung													
6.1.3	Sterilitätskonzept und dessen Umsetzung													
7.1.1	Antibiotika-Kapselung und Anwendung als In-Klinik-Applikation													
7.1.2	Applikationsdevice KEM-Funktionalisierung													
10.1	Projektsteuerung und Dissemination													

Abbildung 1: Ursprüngliche Arbeitsplanung des Verbundprojektes OKEM laut Teilvorhabensbeschreibung der biotrics

TATSÄCHLICH		2020	2021	2022	2023	2024											
Nr.	Arbeitspaket	Projektquartale															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1.1	Anforderungen/Lösungsansatz aus Anwendungs-/Fertigungsperspektive																
2.1.1	Chemische Grundlagen der KEM-Vorbehandlung																
2.1.2	KEM-Vorbehandlung: prozesstechnische Umsetzung																
3.1	Polyelektrolyt-Multilayer-Beschichtung und funktionale Bewertung																
6.1.1	Anlagentechnik für Polyelektrolyt-Multilayer-Beschichtung																
6.1.2	Polyelektrolyt-Multilayer-Beschichtung: Integration und Validierung																
6.1.3	Sterilitätskonzept und dessen Umsetzung																
7.1.1	Antibiotika-Kapselung und Anwendung als In-Klinik-Applikation																
7.1.2	Applikationsdevice KEM-Funktionalisierung																
10.1	Projektsteuerung und Dissemination																

Abbildung 2: Tatsächliche Arbeitsdurchführung seitens biotrics

Meilensteine

MSI (03/2021): Konkretisierte Lösungskonzepte und Bestätigung der grundsätzlichen Umsetzbarkeit

- Produkt-/Prozessanforderungen ausdifferenziert, auch entspr. MDR 2017/745 und Verordnung 2001/83/EG
- In ersten Laborarbeiten wurde die Beschichtbarkeit der KEM-Typen nachgewiesen

MSII (12/2021): PEM-Beschichtung etabliert, Antibiotika-Immobilisierung exemplarisch bestätigt

- Geeignete Polyelektrolyte für den Multilayer-Aufbau erfolgreich erforscht
- Beschichtungsstabilität entspricht ISO 13781
- Kapselung in ersten Laborversuchen erreicht (mindestens Rifampicin/Gentamicin)

- Erfolgreiche Etablierung der Analytik entsprechend den Teilprojektzielstellungen
- Erfolgreiche Grundlegung der Anlagentechnik

MSIII (09/2023): Technologie erfolgreich realisiert

- die Beschichtung und Kapselung, wie angestrebt durchgeführt und die damit verbundenen Projektziele erreicht wurde
- die entsprechenden Teilprozesse in den Technikumsmaßstab übertragen wurden und (mit Ausnahmen der Antibiotika-Kapselung => NMI) auch schon bei der biotrics umgesetzt wurden.
- die Auswahl der finalen Produkt-Kombination für einen Kleinterversuch abgeschlossen ist, nachdem 3 *in vivo*-Versuche zur Bewertung der Knochenregeneration/Antibiotikawirkung beim UMR durchgeführt wurden. Dieser Kleinterversuch ist somit geplant, aber kann erst mit den Materialien aus einer 0-Serie im Produktionsmaßstab durchgeführt werden

MSIV (03/2024): Projektabschluss erfolgreich

- Erreichen der ursprünglichen Zielstellungen.
- Eine verlässliche Aussage zur Verwertbarkeit (v.a. bzgl. Amortisierung) kann man erst abschließend nach Übertragung in den Produktionsmaßstab vornehmen (s. Teil III: Erfolgskontrollbericht)

Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Die Beschichtungstechnologie mittels *Polyelektrolyt-Multilayer* ist in unterschiedlichen Anwendungen wie Drug-Delivery-Systeme und Reibungsreduktion grundsätzlich etabliert. Die grundsätzliche Eignung für eine Wirkstoffimmobilisierung konnte im Labor bereits nachgewiesen werden [1-4]. Das Beschichtungsverfahren basiert auf der alternierenden Adsorption von Polykationen und Polyanionen auf geladenen Oberflächen [5]. Da das Verfahren auf molekularer Adsorption basiert, können Oberflächen mit unterschiedlichen Eigenschaften unter Einsatz von wässrigen Lösungen bei milden Bedingungen exakt beschichtet werden. Die Vielzahl verfügbarer Polyelektrolyten bietet umfassende Möglichkeiten zur genauen Eigenschaftsbestimmung.

Aus anwendungstechnischer Perspektive ist folgende Situation gegeben: Polyelektrolyt-Multilayer-Schichten wurden bereits für medizintechnische Ansätze konzipiert und es gibt erste medizintechnisch zugelassene Produkte [6]. Auch seitens der Antragsteller liegen entsprechende Erfahrungen vor [7]. PEM werden darüber hinaus z. B. zur Modifizierung von mikroporösen Membranen für Anwendung in der Pharma-, Wasser- und Getränkeindustrie eingesetzt, um ein Membran-Fouling zu inhibieren.

Hinsichtlich der eingesetzten Fertigungstechnologie ist vor allem das Verfahren der alternierenden Benetzung mit Polyanionen und Polykationen durch Verwendung von Tauchbädern erfolgsversprechend. Seit dem ersten Nachweis der Eignung von Sprühverfahren [8] für die industrielle Polyelektrolyt-Multilayer-Applikation hat auch diese Variante großes anwendungstechnisches Interesse erfahren. Funktional überzeugende und wirtschaftlich konkurrenzfähige Umsetzungen beschränken sich allerdings nach wie vor auf Einzelfälle, sodass eine Zielstellung wie die in OKEM verfolgte trotz des Vorliegens grundsätzlicher Verfahrensansätze mit einem ausgeprägten Innovationsanspruch verbunden ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wissenschaftliche und vereinzelte anwendungstechnische Grundlagen gegeben sind, auf die die Forschung von OKEM aufsetzen kann. Zugleich sind aber anspruchsvolle wissenschaftliche und technisch-methodische Aufgaben zu lösen, für die erfolgreiche Spezifikation eines Multilayers entsprechend dem komplexen Anforderungsprofil des vorliegenden Anwendungskontextes (KEM-Substrate, Antibiotika-Immobilisierung). Als besondere Herausforderung ist dabei die zuverlässige Schichthaftung auf den KEM sowie die Umsetzung einer Produktionstechnologie ausreichender *Prozessstabilität* bei wirtschaftlich attraktivem *Durchsatz* gegeben.

In Abgrenzung vom Stand der Technik und hinsichtlich der Innovationssprünge, die sich entsprechend Zielstellung und Lösungsansatz von OKEM ergeben, sind folgende Charakteristika hervorzuheben:

Erhebliche technische Anwendungsvorteile ergeben sich aus der angezielten modularen Strukturierung der Zieltechnologie, wodurch sowohl eine patientenspezifische Abstimmung der KEM-Funktionalisierung möglich wird, als auch eine Nutzung der Technologie in einfacher Variante durch eine breite Anzahl an Kliniken, sowie in einer technisch anspruchsvolleren und im Funktionsumfang erweiterten Variante durch z. B. entsprechende Schwerpunktkliniken (Vor-Ort-Beschichtung von spezifisch angepassten KEM-Formkörpern). Eine derartige Ausführung wird vor allem durch den speziellen Beschichtungsansatz ermöglicht, der als wasserbasiertes Tauchverfahren auch in einer apparativ wenig aufwändigen Variante beim Anwender vor Ort umgesetzt werden kann. Für die antibiotische Funktionalisierung von Knochenersatzmaterialien verfolgt OKEM einen hochgradig modularen Lösungsansatz der nicht nur überhaupt eine antibiotische Funktionalisierung von Blöcken eines KEM-Werkstoffs erstmals ermöglicht, sondern direkt eine Anwendung auf eine Vielzahl gängiger KEM-Typen und mit einem breiten

Spektrum an Antibiotika erreicht. Durch diese Flexibilität wird eine große Anwendungsbreite und eine fallspezifische (personalisierte) Abstimmbarkeit auf die jeweilige Patientensituation und das einrichtungsspezifische nosokomiale Risikoprofil erreicht.

Die im Projekt zu erforschende Verkapselung von Antibiotika erlaubt eine definierte Abstimmung von Immobilisierung und Release, und zugleich können Antibiotika mit stark unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften (insbes. lipophil / hydrophil) genutzt, ja sogar unmittelbar kombiniert werden.

Die angestrebte Kapselung erfolgt ohne chemische Modifikation der Antibiotika und verwendet nur bereits für Medikamente zugelassene Hilfsstoffe. Dadurch ist keine gesonderte Zulassung als Arzneistoff notwendig, was eine schnelle und wirtschaftliche Überführung der Forschungsergebnisse in die Anwendung sicherstellt.

Die im Projekt zu erforschende Gesamttechnologie baut geschickt auf bereits bestehende Teillösungen und medizintechnisch bewährte Grundlagen auf, sodass bei Bewältigung der technisch-wissenschaftlichen Risiken eine Lösung von umfassendem medizinischem Nutzen mit überschaubarem Aufwand erreicht werden kann: Für Beschichtung und Kapselung kommen Polyelektrolyt-Multilayer zum Einsatz, die entsprechend der Vielfalt medizintechnisch zugelassener Polyelektrolyte und angesichts existierender methodischer Ansätze für Oberflächenfunktionalisierung und Ultrastrukturabstimmung der Multilayer ein hervorragendes Instrumentarium für die Bewältigung der mit dem Lösungsansatz von OKEM verbundenen Herausforderungen bereitstellen.

Durch die im Teilprojekt von biotrics geplante differenzierte Abstimmung der Oberflächencharakteristik (oberflächenstrukturierender Vorbehandlungsschritt und Auslegung des Polyelektrolyt-Multilayers) kann neben der Antibiotika-Immobilisierung zugleich eine Optimierung im Hinblick auf die Besiedlung der Oberfläche nach Implantation des beschichteten KEM-Blocks im Körper erreicht werden („Race for the Surface“ zwischen Proteinen, Gewebszellen wie Fibroblasten, Osteoblasten, Endothelzellen und Bakterien).

Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Zu Beginn des Projektes stellt die biotrics den Projektpartnern (behandelte) Knochenersatzmaterialien mit entsprechenden Einsatz- und Arbeitsanweisungen für die Prototypenentwicklung zur Verfügung. In Zusammenarbeit mit dem NMI wurden entsprechende Beschichtungsverfahren auf die Umsetzung im Technikums- und Produktionsmaßstabes entwickelt und auf Ihre Prozesstauglichkeit hin geprüft. Weiterhin

werden auch eigene Prototypen für die abschließende Zellbesiedelung hergestellt und auf Ihre Gebrauchstauglichkeit hin getestet. Diese können beim NMI auf die Freisetzung der eingebrachten Komponenten hin untersucht werden. Die *in vitro*-Zytokompatibilitätstestungen der einzelnen Bestandteile und der entwickelten Prototypen werden anschließend durch die UMR durchgeführt. Die Übertragung der einzelnen Behandlungsschritte in den Technikums- bzw. Produktionsmaßstab erfolgt dann in den Produktionsräumen der biotrics.

2 Erzielte Ergebnisse

Es folgt eine detaillierte Darstellung der im Rahmen der Projektdurchführung in den einzelnen Arbeitspaketen erzielten Ergebnisse und gewonnenen Erkenntnisse

Arbeitspaket 1.1 - Feindefinition von Anforderungsprofil und Lösungsansatz aus Anwendungs- und Fertigungsperspektive

Zur Definition des Anforderungsprofils wurde ein Katalog in Form eines Lastenhefts angelegt. Durch die enorme Bedeutung des Gebrauchstauglichkeitsfaktors wurde neben risikobasierten Maßnahmen besonderes Augenmerk auf ausgeprägte Usability-Studien gelegt. Diese begründen sich durch die Anwendung als *Ready-to-Use-Lösung* des antibiotisch-funktionalisierten Knochenersatzmaterials (KEM). Die praxisgeeignete Durchführbarkeit der Antibiotika-Verkapselung und der Polyelektrolyt-Multilayer-Beschichtung (PEM) des KEMs waren demzufolge von großer Bedeutung.

Vor dem Hintergrund dieser Vorgaben und der daraus resultierenden technischen Anforderungen wurden für die Beschichtung die Methoden Spray-, Dip- und Spin-Coating näher betrachtet. Relevant waren dabei z. B.:

- kurze Prozessdauer des Beschichtungsaufbaus
- geringe Prozesskomplexität und hohe -stabilität (Vermeidung bzw. Minimierung potenzieller Fehlerquellen)

Mit der Dip-Coating-Technik werden im vorliegenden Anwendungskontext der Beschichtung von KEM, die eine sehr poröse Materialstruktur aufweisen sehr homogene Ergebnisse erzielt. Darüber hinaus ist dieser Verfahrensansatz leicht auf unterschiedliche Chargengrößen skalierbar und lässt sich mit wenig Aufwand individuell planen und umsetzen. Dementsprechend wird das Dip-Coating als schwerpunktmäßiger Ansatz den weiteren FuE-Arbeiten zugrunde gelegt. Für die Produktion großer Chargen kann Spray-Coating zeit-, material- und damit auch kosteneffizienter sein, dieses Potenzial soll im weiteren Projektverlauf auf grundsätzlicher Ebene mitverfolgt werden. Die Spin-Coating-

Methode ist hingegen eher für planare und geschlossene Oberflächen geeignet und spielt für den vorliegenden Kontext damit keine Rolle.

Um die gezielte Freisetzung des Antibiotikums über 30 Tage zu ermöglichen, wurden in weiteren experimentellen Untersuchungen die geeignete Anzahl der PEM-Schichten und die Einbringungsart der gekapselten Antibiotika erforscht. Die Technologie wird so konzipiert, dass alle zur Therapie der Osteitis gebräuchlichen Antibiotika verwendet (=gekapselt) werden können und eine individuelle Wirkstoff-Dosierung möglich ist.

Untersucht wurden drei verschiedene Einbringungsarten (Abbildung 3), mit denen unterschiedliche Antibiotika-Release-Dynamiken erzeugt werden können:

- a) Die Antibiotikum-Kapseln können direkt in das KEM eingebracht werden, die PEM-Beschichtung erfolgt dann im Anschluss.
- b) Das gekapselte Antibiotikum wird einer der beiden Polyelektrolytlösungen zugegeben, sodass es beim Aufbau der PEM-Beschichtung in jeden zweiten Layer integriert ist.
- c) Eine weitere Möglichkeit ist die Aufbringung der Antibiotikum-Kapseln nach der Beschichtung.

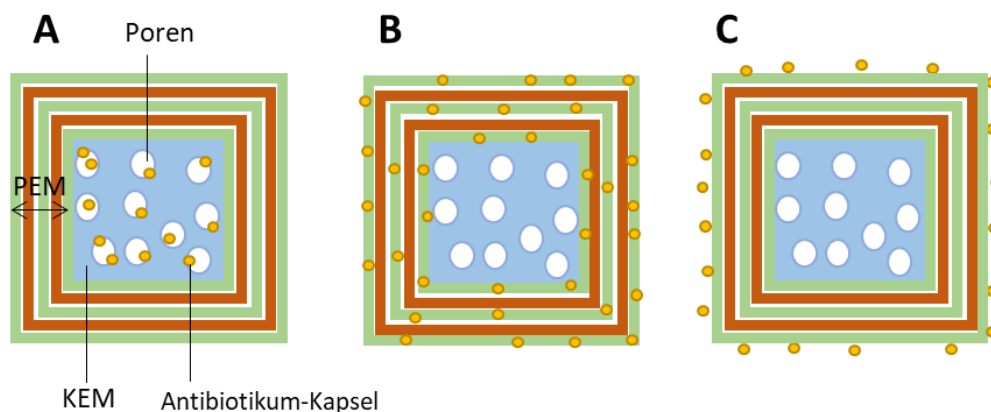


Abbildung 3: Gegenüberstellung der verschiedenen Einbringungsmethoden des verkapselten Antibiotikums. In A wurden die Antibiotikum-Kapseln (gelb) direkt in das Knochenersatzmaterial (KEM, blau) eingebracht, anschließend erfolgte die PEM-Beschichtung. Dagegen wurden in B die Kapseln in einer der beiden Polyelektrolytlösungen hinzugefügt und das KEM damit beschichtet. In jedem zweiten Layer befinden sich somit die Antibiotikum-Kapseln. Bei C wurde das KEM zunächst beschichtet und die Antibiotikum-Kapseln danach auf die Beschichtung aufgebracht.

Es wird erwartet, dass das Antibiotikum auf der PEM-Beschichtung am schnellsten freigesetzt wird und der Release zunächst sehr hoch ist und anschließend schnell abflacht bzw. stoppt. Dagegen wird das verkapselte Antibiotikum in jedem zweiten Layer der PEM-Beschichtung kontinuierlich und längerfristig freigesetzt. Bei der Einbringung der Kapseln direkt in das KEM erfolgt die Freisetzung erst, wenn die PEM-Beschichtung abgebaut ist, sodass das Antibiotikum aus dem KEM austreten kann. Hierbei wird ein verzögerter, dann jedoch intensiver Antibiotikum-Release erwartet.

In durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Porengröße der maxresorb® KEM-Blöcke ausreichend ist, um die vom Projektpartner NMI hergestellten Wirkstoffkapseln darin einzubringen.

Arbeitspakete 2.1.1 - Erforschung der chemischen Grundlagen für die KEM-Vorbehandlung

Die Erforschung der Oberflächenreinigung und der Oberflächenvergrößerung durch chemisches Ätzen, um die Polyelektrolyt-Multilayer-Haftung am KEM zu verbessern, erfolgte mit den folgenden Säuren:

- Phosphorsäure (4 N),
- Salzsäure (1 N),
- Essigsäure (1 N),
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; 1 N)

Bei den experimentellen Untersuchungen zeigten sich bei den mit Phosphor-, Salz- und Essigsäure behandelten KEM-Blöcke auf der Oberfläche glänzende Bereiche (besonders ausgeprägt war der Effekt bei Einsatz von Phosphorsäure). Es wird vermutet, dass sich durch die Säurebehandlung Salze bilden, die sich an der Oberfläche ablagern und dadurch ein glänzendes Erscheinungsbild hervorrufen. Zusätzliche Waschschrte reduzierten zwar die Glanzbildung, jedoch konnte sie nicht vollständig entfernt werden. Nach der Behandlung mit EDTA bzw. Wasser (als Kontrolle) wurde keine glänzende Oberfläche festgestellt.

Alle behandelten Oberflächen wurden mikroskopisch analysiert und die Poren mittels Image J vermessen. Dabei konnte bei keiner Säure-Behandlung eine klare Aussage bezüglich der Oberflächenveränderung bzw. Porenvergrößerung gemacht werden: Es wurden zwar Poren gefunden, die nach der Behandlung größer waren, genauso gab es jedoch Poren, die kleiner wurden bzw. gleich groß geblieben sind. Festgestellt wurde jedoch ein Massenverlust – der bei Salzsäure-Behandlung am ausgeprägtesten war. Ein sehr geringer Massenverlust von ca. 1 mg wurde bei Behandlung mit Essigsäure und EDTA festgestellt. (Bei Behandlung mit Wasser als Kontrolle lag der Gewichtsverlust nahe Null.)

Bei Analyse der Zytotoxizität wurde mit EDTA behandeltes KEM als ungeeignet bewertet. Daher wird die EDTA-Behandlung nicht weiterverfolgt.

Aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse wurden weitere Reagenzien ermittelt, die für eine Oberflächenoptimierung in Frage kommen und geeignetere Eigenschaften aufweisen.

Die Vorversuche der Oberflächenbehandlung durch chemisches Ätzen haben Salzsäure mit einer Konzentration von 1 mol/L als vielversprechendste Lösung ergeben, um die anschließende Polyelektrolyt-Multilayer-Haftung am KEM zu verbessern. Dies wurde neben gravimetrischen Messungen auch durch die Anfärbung der aminhaltigen Polyelektrolyte mit Ninhydrinlösung bestätigt (Abb. 3, AP 3.1).

Arbeitspakete 2.1.2 - Ausdifferenzierung der KEM-Vorbehandlung und Erforschung der prozesstechnischen Umsetzung

Die prozesstechnische Umsetzung ist mittels Tauchbeschichtung (Dip Coating) schon derzeit in den Produktionsräumen der biotrics möglich. Eine Apparatur in Technikumsgröße für die Sprühbeschichtung steht für die Herstellung von ausreichend großen Prototypenchargen nicht zur Verfügung. Eine Anschaffung ist derzeit nicht geplant, da der Hauptvorteil einer materialschonenderen Beschichtung nicht benötigt wird.

Tabelle 2: Vergleich der Beschichtungsmethoden Dip- und Spray-Coating

	Tauchbeschichtung (Dip-Coating)	Sprühbeschichtung (Spray-Coating)
Prinzip	KEM jeglicher Form wird in einen Sieb- bzw. Netzbehälter gegeben und in die entsprechende Lösung eingetaucht. Das Entfernen der KEM aus der Lösung muss unter gleichen Bedingungen stattfinden. Während der Behandlung sollte eine leichte Bewegung erfolgen, um zu verhindern, dass das KEM zusammenklebt und ungleichmäßig beschichtet wird. Nach dem abschließenden Waschschrift erfolgt eine Konvektionstrocknung	Granulat oder Blöcke werden in eine große Box/Wanne gelegt, um die umliegende Umgebung zu schützen. Elektrolyt-Lösungen werden in eine Sprühflasche eingefüllt. Die Lösungen werden auf das KEM aufgesprüht. Bei Granulat wird die Platte währenddessen bewegt, um eine gleichmäßige Beschichtung von allen Seiten zu erreichen. Bei der Beschichtung von Blöcken werden diese nach einem Sprühvorgang gedreht, bis alle Seiten beschichtet wurden. Zum Abschluss wird das KEM per Konvektionstrocknung getrocknet.
Durchsatz	Je nach Größe des Behälters und der Menge an Lösungen, können große Mengen gleichzeitig beschichtet werden. Hier ist eine großtechnische Umsetzung im Batch-Prozess und im kontinuierlichen Prozess möglich.	Geringerer Durchsatz als bei Dip-Coating, da auf eine homogene Verteilung der Beschichtung geachtet werden muss. Ggf. muss ein Wenden des KEM-Materials erfolgen, um vollständige Beschichtung zu erreichen. Durchlaufprozess (mittels Fließbandes) vorstellbar, aber Batch-Prozess bevorzugt.

	Tauchbeschichtung (Dip-Coating)	Sprühbeschichtung (Spray-Coating)
Regulatorische Anforderungen	- Eignung für Reinraum - Reproduzierbare Bedingungen für eine Prozessvalidierung vorteilhaft	- mit Einschränkungen auch für Reinraum geeignet - reproduzierbare Bedingungen
Vorteile	Auch Granulat kann einfach beschichtet werden, da dies ebenso in Siebbehälter mit geeigneter Porengröße erfolgen kann. Große Mengen können schnell und kontrolliert beschichtet werden. Kompatibel mit Vorbehandlungsschritt durch Verfahrensgleichheit. Leicht automatisierbar Schnelle Beschichtung Für alle Geometrien geeignet	Geringere Lösungsvolumina notwendig (geringer Materialverlust) Frage der Haltbarkeit der Lösungen muss nicht geklärt werden Die hergestellten Schichten sind dünner und rauer als bei Dip-Coating ^[9] Für alle Geometrien (mit Einschränkung durch notwendiges Drehen) geeignet
Nachteile	Hoher Materialeinsatz an Lösungen nötig. Klärung über Wiederverwendbarkeit der PEM-Lösungen notwendig (z.B. über Konzentrationsbestimmung). Die Dicke der Beschichtung kann durch die Viskosität und Einwirkungszeit beeinflusst werden. Auswaschungen vom KEM (Ionen) können in die Lösung abgegeben und können so auf die anderen KEMs übertragen werden (line clearance). Konstante Temperatur muss gewährleistet werden, um reproduzierbar homogene Schichten zu schaffen	Granulat kann nicht ohne Wenden homogen beschichtet werden => Ein Mehrmaliges Aufsprühen ist notwendig, Validierungsnachweis schwierig Die Beschichtungszeit ^[9] muss experimentell ermittelt und verifiziert werden. Eine maschinelle Beschichtung ist komplexer und Kompatibilität zum Vorbehandlungsschritt schwer validierbar. Weniger stabil gegenüber Umgebungsbedingungen wie pH-Änderungen ^[9] Aerosol-Bildung muss beachtet werden (Arbeitsschutz, Reinigung). Ungleichmäßige Auftragung der PEMs auf der Oberfläche. Das Granulat muss nach der Beschichtung wieder von der Beschichtungsfläche entfernt werden

Arbeitspaket 3.1 - Umsetzung der Polyelektrolyt-Multilayer-Beschichtung für vorbehandelte KEM und funktionale Bewertung der Beschichtung

Eine differenziertere Bewertung der Beschichtungsergebnisse erfolgte mit den folgenden Methoden: Zum einen wurden Freisetzungsversuche in Verbindung mit pH- und Leitfähigkeitsmessungen als qualitative Methode zur Bestimmung des Beschichtungserfolgs genutzt.

Eine semiquantitative Methode ist die Dünnschichtchromatographie, bei der ein Vergleich mit einer Referenzprobe bekannter Konzentration möglich ist. Zur Etablierung der Methode für den vorliegenden Kontext wurden einleitend unterschiedliche mobile Phasen spezifiziert und experimentell bewertet.

Die genutzten Mischungen waren insbesondere:

- Acetonitril-Wasser
- Acetonitril-Wasser, essigsauer
- Ethanol-Wasser
- Ethylacetat, Ethanol und Wasser

Als geeignet hat sich eine Mischung aus Ethylacetat, Ethanol und Wasser im Mischungsverhältnis 9:1:1 erwiesen.

Weiterhin konnte die Beschichtung mit aminhaltigen Polyelektrolyten Polyethylenimin (PEI) und Polyallylamin (PAH) auch direkt mittels Sprühreagenz Ninhydrin qualitativ nachgewiesen werden. Hierbei wurde deutlich, dass nur die KEM, die mit Salzsäure bzw. Essigsäure vorbehandelt wurden, auch eine deutliche Einfärbung aufzeigten, was die Beschichtung mit dem Polyelektrolyt belegt (Abb. 4).



Abbildung 4: Nachweis der Beschichtung an unterschiedlich vorbehandelten Proben bei Verwendung aminhaltiger Polyelektrolyte anhand der mit Ninhydrin entstehenden Verfärbung. Die Verfärbung ist hier bei den mit HCl (Salzsäure) und CH₃COOH (Essigsäure) vorbehandelten Proben zu erkennen.

Als quantitative Methode wurden HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) und QCM (Quarzkristall-Mikrowaage) verwendet. Bei letzterer kann der Gehalt des immobilisierten Polyelektrolyten *in situ* ohne Freisetzung ermittelt werden. Diese Methode wurde vom Projektpartner NMI auch zur Bestätigung der Stabilität der aufgetragenen Multischichten verwendet.

Mit den ausdifferenzierten messtechnisch-analytischen Methoden wurde ein leistungsfähiges Instrumentarium zur Bewertung unterschiedlicher Schichtcharakteristika etabliert. Die Methoden wurden für die Bewertung unterschiedlicher Polyelektrolyt-Multilayer-Ausführungen eingesetzt, ebenso wie für die Bewertung von Ausführungsvarianten der Vorbehandlung (vgl. AP 2.1.2). Eine umfassende, vollständige Analyse und funktionale Bewertung der PEM-Beschichtung wird in den abschließenden Arbeiten dieses Arbeitspakets durchgeführt werden, sobald in Abstimmung mit dem NMI und den dort dortigen Untersuchungen zur Eignung unterschiedlicher Schichtvarianten hinsichtlich der Adsorption gekapselter Antibiotika, die zielführendste Polyionen-Kombination für einen optimalen Schichtaufbau im Sinne der vorliegenden Anforderungen bestimmt worden ist.

Dabei wurde insbesondere die ausreichende Beschichtungsstabilität gegenüber pH-Wert-Verschiebung, wie diese bei in unterschiedlichen Stadien der Wundheilung auftritt, berücksichtigt.

Als abschließende Arbeiten in diesem Arbeitspaket wurde die umfassende, vollständige Analyse und funktionale Bewertung der zielführend in Frage kommenden Varianten von Polyelektrolytmultischichten (PEM) mit den zuvor ausdifferenzierten messtechnisch-analytischen Methoden (vgl. vorheriger Zwischenbericht) umgesetzt.

Mit Hilfe der Verwendung von Fluorescein-gelabelten Polyelektrolyten konnte die Effizienz der Beschichtung mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden. In Abhängigkeit von Konzentration und Identität der ausgewählten Polyelektrolyte (PE) ist eine unterschiedliche Intensität der Immobilisierung auf dem Knochenersatzmaterial (KEM) zu erkennen. Auch die Verwendung einer aktivierenden Basisschicht aus Polyethylenimin (PEI) hat einen Einfluss auf die Adsorption der Polyelektrolytmultischichten (PEM) (Abbildung 5). In Zusammenarbeit mit dem Projektpartner NMI konnten die Multischicht-Varianten aus Polystyren-sulfonate (PSS)/Polyallylamin-hydrochlorid (PAH) - (PSS/PAH)₅ und PSS/PAH)₅PSS als vielversprechendste PEM ausgewählt werden.

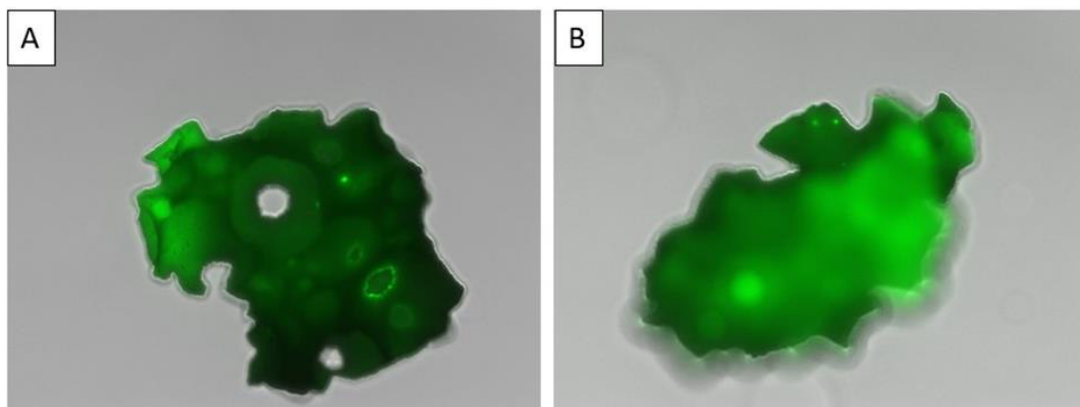


Abbildung 5: Visualisierung der Unterschiede in der Adsorption von Fluorescein-gelabelter Polyelektrolyte: ohne aktivierende Basisschicht aus PEI (A); mit PEI als Basisschicht (B)

Arbeitspaket 6.1.1 - Erforschung der Grundlagen zur anlagentechnischen Abbildung des Polyelektrolyt-Multilayer-Beschichtungsprozesses

In diesem AP wurden die unterschiedlichen Möglichkeiten einer prozesstaughichen Skalierung des Beschichtungsprozesses erarbeitet.

Für die anlagentechnische Umsetzung des Beschichtungsprozesses war zuerst die Frage der Beschichtungsführung zu klären. Hierzu wurden die beiden, für eine großtechnische Umsetzung, vielversprechendsten Verfahren gegenübergestellt und

bewertet (Tab. 2, Abs. 2.1.2). Im Vorhinein wurden beide Verfahren im Labormaßstab getestet.

Neben den verfahrenstechnischen Unterschieden der beiden Beschichtungsmethoden sind bei einer Herstellung im Technikums- und Produktionsmaßstab v.a. die Reproduzierbarkeit und die Integration in den Gesamtprozess von erheblicher Bedeutung. Hier liefern die beiden Verfahren auch spezifische Unterschiede. Neben der Frage ob bei Sprühbeschichtung auch eine ausreichend reproduzierbare, homogene Beschichtung aller Seiten des KEMs möglich ist, stellt auch die Integration in der Prozessfolge nach der Vorbehandlung eine neue Anforderung an die Anlage. Diese ist bei einer Tauchbeschichtung nicht vorhanden, da die Vorbehandlung auch durch ein Eintauchen des KEMs in die Lösung erfolgt. Auch die anschließenden Waschschriffe sind durch ein Eintauchen reproduzierbarer als eine potenzielle Reinigungsabfolge mittels Sprühens.

Die Beschichtung des KEMs kann damit bestens in den späteren Herstellprozess eingegliedert werden. Hier wird der Vorteil einer PEM-Beschichtung mittels Dip Coatings besonders deutlich, da dieser Schritt mit einem ähnlichen Verfahren wie die Vorbehandlung durchgeführt werden kann. Eine Sprühbeschichtung würde eine andere Anlage voraussetzen als die Tauchbeschichtung, bei der das KEM als Ganzes in die Prozesslösung eingetaucht wird. Somit ist es möglich beide Prozessschritte aufeinanderfolgend in derselben Anlage unter Austausch der Prozesslösung durchzuführen. Als weiteren Vorteil hat sich das Ausbleiben eines Transferschrittes zwischen zwei Geräten bzw. Anlagen gezeigt. Damit sollte auch die Gesamtprozessdauer minimiert werden.

Für die Umsetzung im Technikumsmaßstabs kann die Reproduzierbarkeit und Homogenität der Beschichtung mit einfachen Färbelösungen getestet werden. Diese Fragestellung ist besonders im Hinblick auf die unterschiedlichen Dimensionen der zu beschichtenden Materialien notwendig. Eine Übertragbarkeit auf andere Arten von KEM kann somit ebenfalls erfolgen. Durch festgelegte Prüf- und Messkriterien ist somit eine unmittelbare Erfolgskontrolle möglich.

Die Skalierbarkeit der Prozessschritte (Abbildung 6) und die materialschonende Handhabung der Knochenersatzmaterialien (KEM) wurde durch eine Verifizierung der Zielspezifikationen sichergestellt.

Die folgenden Versuchsbedingungen wurden in den Technikumsmaßstab übertragen, um die Vorbehandlung, die Beschichtung und das Waschen in einem Gerät ermöglichen:

- Rotierende Versuchstrommel (Tauchbeschichtung mit homogener Benetzung)
- Vakuumfähig (homogenes Eindringen und Beschichten der KEM)
- Innenliegende Schikanen (Durchmischung)

Unter den vorliegenden Bedingungen ist die Beschichtung von unterschiedlichen Materialformen (Größe, Porosität, Werkstoff) möglich.

Eine Anpassung der Konzentration der Beschichtungslösungen kann durch Einsatz unterschiedlicher KEM-Basismaterialien (synthetisch, xenogen) notwendig werden und zieht eine entsprechende Verifizierung des Beschichtungserfolg nach sich.

Die Beschichtung im Technikumsmaßstab ist zeitaufwendig, da die eingesetzten Beschichtungs- und Spüllösungen manuell entfernt werden müssen. Für eine prozesstechnische Umsetzung muss ein Siebeinsatz in der rotierenden Trommel und ein automatisches Entflotten etabliert werden, um den Personaleinsatz – und damit die Kosten – zu minimieren. Dies ist Teil des Design-Transfers.

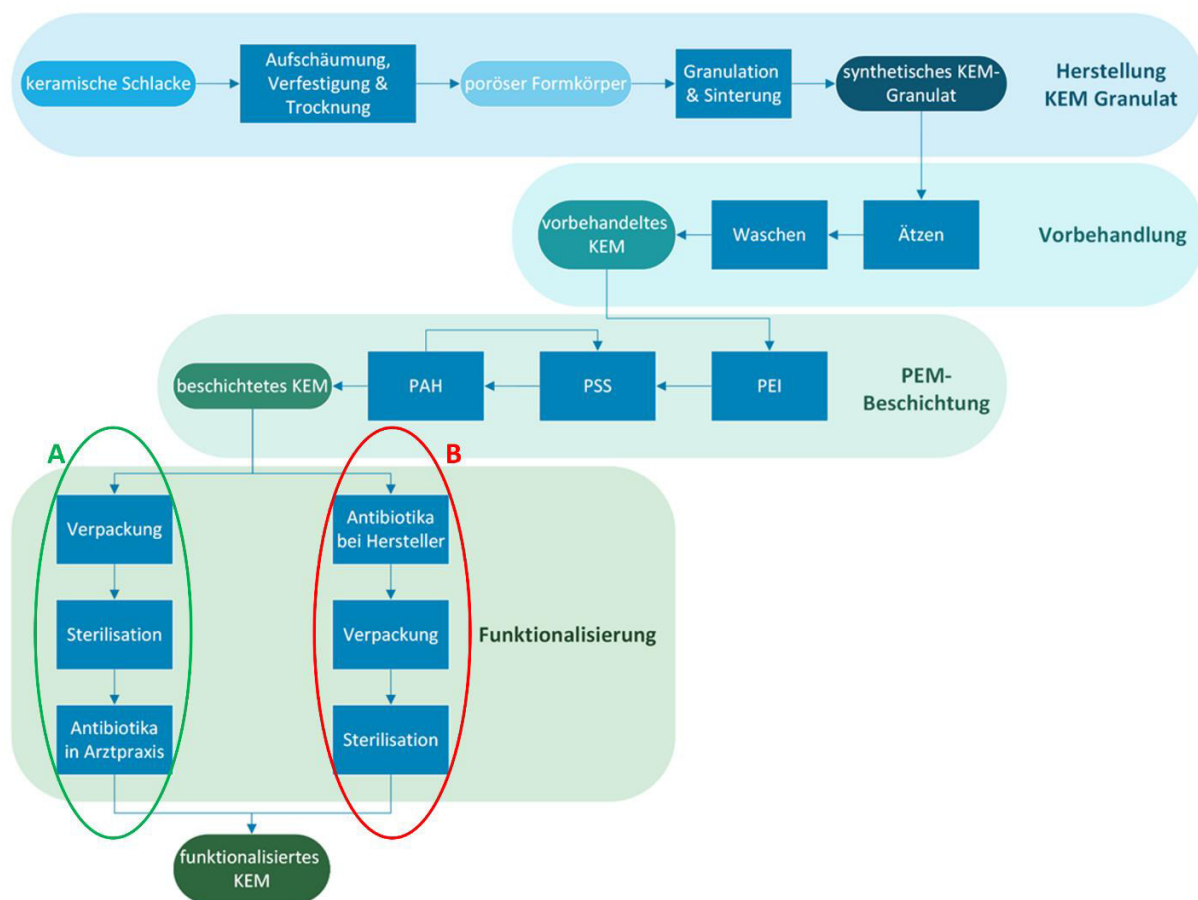


Abbildung 6: Prozesskettenkonzept zur Herstellung des funktionalisierten KEM. Integrationsfähiger Verfahrensansatz durch einheitliche Umsetzung der wesentlichen Prozessschritte für A) das favorisierte Tauchbeschichtungsverfahren mit abschließender Vor-Ort-Funktionalisierung beim Anwender und B) die abschließende Funktionalisierung der beschichteten KEM mit antibiotika-beladenen PLLA-Partikeln als Herstellschritt

Eine Durchführung der Antibiotika-Funktionalisierung beim Anwender (Abb. 5, Variante A) hat den Vorteil, dass der behandelnde Arzt selbst das Antibiotikum auswählen kann, welches im spezifischen Fall eingesetzt werden soll. Andererseits würde eine Vermarktung eines antibiotika-haltigen KEM höhere regulatorische Anforderungen mit sich bringen.

Arbeitspaket 6.1.2 - Erforschung der Polyelektrolyt-Multilayer-Beschichtung als Gesamtprozess mit kontrollierter Ergebnisqualität

Die Umsetzung des entwickelten Herstellprozesses (Abbildung 5) kann nach derzeitigem Stand im Produktionsmaßstab in aufeinanderfolgenden Prozessschritten erfolgen. Im Rahmen des Projektvorhabens wurden mehrere Kombinationen von Beschichtungsagenzien getestet.

Die Steuerung der Schichtdicken kann durch Anpassung der Inkubationszeit des KEM in den Polymerlösungen gesteuert werden. Für eine anschließende Vor-Ort-Funktionalisierung des PEM-beschichteten KEM mittels Tauchbeschichtung sind mit dem Modellsystemen Chitosan/Hyaluronsäure und Polyallylamin/Polystyrenulfonat bereits erfolgreich die Ergebnisse aus Laborversuchen reproduziert worden. Somit sind die Voraussetzungen für eine Validierung der Polyelektrolytbeschichtung erfüllt.

Die uniforme Beschichtung des KEM mit PEM konnte bereits durch Fluoreszenzmikroskopie qualitativ nachgewiesen werden. Weiterhin konnten die Fluorescein-gelabelten PE durch Extraktion in wässrigem Medium nachgewiesen werden. Eine in-situ Analyse des Beschichtungs- und Ablösungsprozesses der PEM konnte bereits beim Projektpartner NMI für unterschiedliche Multischichtsysteme (z.B. mittels Quarzkristall-Mikrowaage) nachgewiesen werden. Da diese Nachweise nur eine Verifizierung der erfolgreichen Beschichtung ermöglichen und somit bei jeder Charge an einer repräsentativen Stichprobenzahl durchgeführt werden müssen, ist die Validierung des gesamten Herstellprozesses das anvisierte Ziel der Produktentwicklung.

Eine Funktionalisierung der beschichteten KEM mit antibiotika-beladenen PLLA-Partikeln ist auch innerhalb der biotrics Herstellprozesskette abbildbar. Nach Analyse und Bewertung der alternativen Ansätze der herstellerseitigen KEM-Beladung mit Antibiotika vs. Beladung vor Ort durch den Anwender, ist die letztgenannte Variante aber deutlich vorteilhafter (geringere regulatorische Anforderungen, größere Flexibilität bzgl. des im Einzelfall geeigneteren Antibiotikums) und technisch ebenfalls gut umsetzbar. Dementsprechend wird die Anwendungsperspektive primär auf die Vor-Ort-Funktionalisierung ausgerichtet.

Arbeitspaket 6.1.3 - Erforschung des Sterilitätskonzepts und anwendungsgerechter technischer Ansätze zu dessen Umsetzung

Grundlegend für die Ermittlung des Sterilisationskonzepts ist die Verpackung und Konfektionierung des Zielproduktes. Die Verpackung des PEM-beschichteten KEM sollte im besten Fall in einem Polymer-Blister mit Tyvek-Siegeldeckel erfolgen, da diese Materialien im Vergleich zu Gefäßen aus Glas flexibler und weicher sind, wodurch beim Transport auftretende Erschütterungen weniger stark auf das KEM übertragen werden (Abb.7, links). Zur Übertragung des sterilen Produktes in die Operationsumgebung ist eine Doppelblisterung wünschenswert. So kann das innenliegende Produkte aus der äußeren Schutzverpackung unter Aufrechterhaltung der Sterilität an den Operateur übergeben werden. Eine Sterilisation mittels Ethylenoxid-Begasung (EO) wurde erfolgreich durchgeführt.



Abbildung 7: links: Knochenersatzmaterial im Blister; rechts: Befüllte Applikationshilfe mit hydriertem KEM

Auch die Sterilisation der entwickelten Applikationshilfe ist erfolgreich mit EO durchgeführt worden und kann als solche ebenfalls validiert werden. Durch die Notwendigkeit der Sterilisation des finalen Medizinproduktes, ist ebenfalls eine Vor-Ort-Funktionalisierung mit Antibiotika beim Anwender erstrebenswert, da Sterilisationsmethoden wie EO als auch Autoklavieren oder eine Bestrahlung einen Einfluss auf die Freisetzung und Aktivität bestimmter Antibiotika gezeigt haben [10].

Arbeitspaket 7.1.1 - Erforschung der Grundlagen für die reproduzierbare Kapselung der Antibiotika und Absorption an das KEM als In-Klinik-Applikation

Für die Verkapselung konnten unterschiedliche Polyelektrolyte erfolgreich umgesetzt werden, so dass durchaus unterschiedliche Kombinationen für die Kapselung spezifischer Antibiotika möglich sind.

In Relation zur KEM-Masse sind für die Anwendung verhältnismäßig geringe Mengen an verkapselten Antibiotika erforderlich, so dass das beim Projektpartner NMI entwickelte Herstellverfahren für eine spätere Bereitstellung genutzt werden kann.

Eine Vor-Ort-Dosierung der verkapselten Antibiotika kann durch gezieltes Anpassen der Konzentration an Kapseln bei gleichbleibender Einwirkzeit gesteuert werden. Hierzu bietet sich die Lagerung und Transport der verkapselten Antibiotika in einer gepufferten

Kollagenlösung. Hier ist eine Haltbarkeitsstudie zwingend notwendig, um die Lagerbedingungen zu ermitteln und eine Änderung der Antibiotikaaktivität über die Zeit zu verhindern.

Arbeitspaket 7.1.2 - Erforschung der Grundlagen für die Umsetzung der KEM-Funktionalisierung als In-Klinik-Applikation

Die in-house-Testung des angefertigten Applikators mit einer Siebkappe zur Beladung des KEMs mit der gekapselten Antibiotika-Komponente wurde erfolgreich durchgeführt. Hier ist das Befüllen über den Teil des Applikators möglich, welcher mit dem Stößel verschlossen wird. Im Anschluss erfolgt die Hydrierung und Benetzung mit dem Antibiotikum (in Lösung) über die Siebkappe auf der gegenüberliegenden Seite der Applikationshilfe (Abb. 6, rechts). Auch das anschließende Austragen des funktionalisierten KEM in den Modelldefekt war in ersten Anwendungsversuchen volumengetreu möglich.

Zur Gewährleistung eines reproduzierbaren Anwendererfolgs muss die Beladungszeit sollte möglichst geringgehalten werden.

Der Vergleich mit einer direkten Funktionalisierung des KEM mit ungekapselten Antibiotika zeigt ein deutlich beschleunigtes Freisetzungsverhalten, so dass hier keine mittel- bzw. langfristige Wirkung des Antibiotikums erzielt werden kann.

Arbeitspaket 10.1 - Sicherstellung einer effektiven und effizienten FuE-Arbeit mit hoher Ergebnisqualität und Anwendungsrelevanz

Die regulatorischen Anforderungen an das spätere Produkt resultieren aus dem Indikationsgebiet, der Produktzusammensetzung sowie der Anwendungsdauer bzw. dem Verbleib im Patienten. Das Indikationsgebiet und die Anwendungsdauer sind bei beiden Prozessvarianten gleich. Die Produktkomponenten sind dagegen verschieden. Beim Zusatz eines Antibiotikums handelt es sich nicht mehr um ein klassische Medizinprodukt der Klasse III, sondern um ein Medizinprodukt mit einer Arzneimittelkomponente, welche eine biologische Wirkung entfalten soll. Wie auch bei der Zulassung eines Arzneimittels sind in diesem Fall eine Vielzahl zusätzlicher regulatorischer Anforderungen zu berücksichtigen. Beispielweise müssen alle Abbauprodukte der Arzneimittelkomponente auf ihre Toxizität hin untersucht werden. Zusätzlich ist eine Risikobewertung für die Wechselwirkung des Antibiotikums und der KEM-Komponente ebenfalls unumgänglich. Die in Abb. 5 dargestellte Prozessfolge kann innerhalb der Herstellung bei der biotrics umgesetzt werden. Für die anwendungsorientierte Variante A ist eine Zulassung des

sterilen KEMs als Medizinprodukt aussichtsreich. Die Antibiotikabeladung erfolgt im Anschluss beim Anwender. Hierbei steht es dem Anwender frei direkt ein Antibiotikum seiner Wahl auf dem KEM zu immobilisieren oder ein gekapseltes Antibiotikum zu verwenden. Für Letzteres müsste ebenfalls eine gesonderte Zulassung erfolgen. Die Zulassung als Arzneimittel ist dabei aus regulatorischer Sicht deutlich aufwendiger und zeitintensiver.

Eine Beeinträchtigung des Beladungs- und Freisetzungsverhalten des KEM durch Sterilisation des finalen Medizinproduktes konnte bisher noch ausgeschlossen werden. Hier muss der Einfluss der Sterilisationsmethode aber ohnehin innerhalb einer Haltbarkeitsstudie mit dem finalen Produkt erfolgen.

Für die Erstzulassung des beschichteten KEMs als Medizinproduktes ist nach jetzigem Stand eine FDA-Registrierung ebenfalls aussichtsreich, da durch Einführung der Medical Device Regulation (2017/745, MDR) eine Einführung eines Produktes durch Vergleich mit einem (bzw. mehreren) bereits zugelassenen Medizinprodukt(en) deutlich erschwert wurde. Durch eine sogenannte 510(k)-premarket notification ist dies im US-regulierten Markt weiterhin möglich. In diesem Fall ist eine langwierige klinische (Human-)Studie nicht unbedingt notwendig, wenn die Äquivalenz zu existierenden Medizinprodukten nachgewiesen werden kann. Dieses Vorgehen würde die Auswahl an Beschichtungspolymeren auf die bereits registrierten Materialien (z.B. Hyaluronsäure, Chitosan, PLLA, ...) vorerst beschränken. Die Erstellung einer entsprechenden Registrierungsstrategie kann erst mit vollständigem Abschluss des Design-Transfers erfolgen.

3 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Entsprechend dem zahlenmäßigen Nachweis kann festgestellt werden, dass die Projektkosten leicht unter den geplanten Kosten blieben (90,06%). Die wesentlichen Abweichungen ergeben sich aus den im Folgenden aufgelisteten Positionen:

Materialkosten: Die tatsächlichen Materialkosten blieben deutlich unter den Plankosten.

Personalkosten: Hier ergaben sich Mehrkosten in vertretbarem Rahmen in Höhe von 11,86% bei den Personalkosten.

Reisekosten: Auf die geplanten Reisekosten konnte verzichtet werden bzw. wurde Corona-bedingt verzichtet.

Vorhabenspezifische Afa: Auch bei den geplanten Investitionen ergaben sich gewisse Minderausgaben. Hier sind 86,10% der ursprünglich geplanten Kosten angefallen.

Sonstige unmittelbare Vorhabenskosten: Massive Einsparungen konnten bei den sonstigen unmittelbaren Vorhabenskosten erzielt werden. Von den hier geplanten Ausgaben für Aufträge waren lediglich 2,46% erforderlich. Ein Großteil der ursprünglich geplanten Tätigkeiten konnte internalisiert werden bzw. war nicht notwendig.

Die Kostenabweichungen resultierten insbesondere aus den beschriebenen Lösungsweganpassungen.

4 Notwendigkeit/Angemessenheit der geleisteten Arbeiten

Das Ziel des Verbundprojektes war die Entwicklung einer Technologie zur Funktionalisierung von Knochenersatzmaterialien (KEM), die eine kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen im Körper unmittelbar am implantierten KEM ermöglicht und so der nosokomialen Infektion in Form der Osteitis zuverlässig und effizient entgegenwirkt.

Abschließend muss festgehalten werden, dass die umfangreichen Arbeiten und das hohe Risiko des Vorhabens finanziell für ein kleines Unternehmen wie die biotrics bioimplants AG nicht ohne eine Förderung durchführbar gewesen wären.

5 Voraussichtlicher Nutzen / Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass die Herstellung des, durch den Anwender zu beschichtenden KEMs, stellt ein vielversprechendes Produkt für eine weiterführende Zulassung bzw. Zertifizierung als Medizinprodukt darstellt. Die *in vivo*-Ergebnisse sind erfolgversprechend, so dass die Voraussetzungen für eine vollständige Produktvalidierung und weiterführende Untersuchungen im geeigneten Tiermodell (z.B. Minipig) erfüllt sind.

Die Planung der klinischen Studie muss auch Aspekte der späteren Indikationsgebiete des angestrebten Medizinproduktes berücksichtigen.

Für die Zulassung und Vermarktung des bereits mit Antibiotikum beschichteten KEMs sind die regulatorischen Hürden durch Einführung der Medical Device Regulation (2017/745, MDR) noch einmal deutlich gestiegen, da es sich hierbei, um ein Medizinprodukt mit Arzneimittelkomponente (Antibiotikum) handelt. Der Einsatz des

entwickelten Materials ist auch im Bereich der Veterinärmedizin aussichtsreich. Hier gelten nach § 3 Abs. 3 Nr. 1 TAMG (Tierarzneimittelgesetz) andere Zulassungsvoraussetzungen als in der Humanmedizin.

Ein entscheidender Vorteil des anwender-beschichteten KEMs liegt in der Freiheit des Anwenders ein passendes Antibiotikum und die patientenspezifische Dosis wählen zu können. Dies ist v.a. in Zeiten der zunehmenden Antibiotika-Resistenzen von großer Bedeutung.

6 Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während der Durchführung des Vorhabens sind keine anderen Ergebnisse bekannt geworden, die die ursprüngliche Zielstellung des Projektvorhabens eingeschränkt oder maßgeblich geändert hätten.

7 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

Bereits während der Projektlaufzeit konnten Ergebnisse des Vorhabens erfolgreich publiziert werden:

- Fan, L.; Ren, Y.; Emmert, S.; Vuckovic, I.; Stojanovic, S.; Najman, S.; Schnettler, R.; Barbeck, M.; Schenke-Layland, K.; Xiong, X. The Use of Collagen-Based Materials in Bone Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 3744. <https://doi.org/10.3390/ijms24043744>
- Fan L, Ren Y, Burkhardt C, Jung O, Schnettler R, Barbeck M, Xiong X. (2023). Evaluation of Injectable Composite Material Comprising Biphasic Bone Substitutes and Crosslinked Collagen. *Advanced Engineering Materials.* 25. 10.1002/adem.202300508.
- Fan L, Jung O, Herrmann M, Shirokikh M, Stojanovic S, Najman S, Koerte F, Xiong X, Schenke-Layland K, Barbeck M. (2024). Deciphering UVA/Riboflavin Collagen Crosslinking: A Pathway to Improve Biomedical Materials. *Advanced Functional Materials.* 34. 10.1002/adfm.202401742.
- A. Rudt, J. Sun, M. Qin et al., Controlled adhesion of HUVEC on polyelectrolyte multilayers by regulation of coating conditions. *ACS Applied Biomaterials*, 2021 (4)2: 1441-1449.

- Fan L, Körte F, Rudt A, Jung O, Burkhardt C, Barbeck M and Xiong X (2022) Encapsulated vaterite-calcite CaCO_3 particles loaded with Mg^{2+} and Cu^{2+} ions with sustained release promoting osteogenesis and angiogenesis. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10:983988. doi: 10.3389/fbioe.2022.983988

Weitere Referenzen:

- [1] Sun LL, Xiong X. et. al. (2017) Design of intelligent chitosan / heparin hollow microcapsules for drug delivery. *J Appl Poly Sci* 134: 44425
- [2] Sun LL, Xiong X. et. al. (2017) Controlled heparinase catalyzed degradation of polyelectrolyte multilayer capsules with heparin as responsive layer. *J Appl Poly Sci.* 134:44916
- [3] Andreeva TD, Krastev R et al. (2016) Regulation of the growth, morphology, mechanical properties and biocompatibility of natural polysaccharide-based multilayers by Hofmeister anions. *J Mat Chem B* 4(44): 7092 - 7100
- [4] Hartmann H, Krastev R et al. (2013) Hyaluronic acid / chitosan multilayer coatings on neuronal implants for localized delivery of siRNA nanoplexes, *J Control Release* 168(3):289-297
- [5] Decher G, Schlenoff JB (2012) *Multilayer Thin Films*. Wiley-VCH Verlag, 2. Auflage. ISBN:978-3-527-31648-9, pp 1-22
- [6] Decher und Schlenoff (2006) *Multilayer Thin Films*, 1st Edition, Wiley, ISBN: 978-3-527-60541-5, p 30
- [7] Krastev R, Rudt A, Xiong X, Hartmann H (2018) Polyelectrolyte Coatings for Surface Modification of Medical Implants. *Curr Dir Biomed Eng* 4(1): 217-220
- [8] Schlenoff JB, Dubas ST, Farhat T (2000) Sprayed Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir*, 16(26), 9968 - 9969
- [9] Kolasinska M. et al. Layer-by-Layer Deposition of Polyelectrolytes. Dipping versus Spraying, *Langmuir*. 2009 Jan 20;25(2):1224-32. doi: 10.1021/la803428f.
- [10] Halpern et al. Thermomechanical properties, antibiotic release, and bioactivity of a sterilized cyclodextrin drug delivery system, *J. Mater. Chem. B*, 2014,2, 2764-2772 10.1039/C4TB00083H