



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 18 600 T2 2005.07.28**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 233 721 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 18 600.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/30947**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 991 390.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 01/034060**

(86) PCT-Anmeldetag: **10.11.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **17.05.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.08.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **09.03.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.07.2005**

(51) Int Cl.⁷: **A61F 2/02**

**A61F 13/00, A61F 2/00, A61K 9/14,
A61K 9/16, A61K 9/50, A61L 27/18,
A61L 31/06, A61L 27/46, A61L 31/12,
A61F 2/28**

(30) Unionspriorität:

439183 12.11.1999 US

(73) Patentinhaber:

**The Trustees of the University of Pennsylvania,
Philadelphia, Pennsylvania, US**

(74) Vertreter:

Berendt und Kollegen, 81667 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

**DUCHEYNE, Paul, Rosemont, US; AYYASWAMY,
S., Portonovo, Broomall, US; QUI, Qing-Qing, Bryn
Mawr, US**

(54) Bezeichnung: **BIOAKTIVER, ABBAUBARER VERBUNDWERKSTOFF**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Diese Erfindung wurde im Rahmen einer Forschung gemacht, die von National Aeronautics und der Space Administration gefördert wurde. Die US-Regierung kann bestimmte Rechte an dieser Erfindung haben.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Seit 1967, als van Wezel die Verwendung von kleinen, kugelförmigen Teilchen als Träger für das Wachstum von verankerungsabhängigen Zellen in suspendierten Kulturen einführte und aufzeigte, wurde eine Vielzahl von Verbundmaterialien und Mikrokügelchen in dreidimensionalen (3D) Zellkulturen verwendet. Diese umfassen Dextran-Mikrokügelchen, Polystyrol-Mikrokügelchen, Polyacrylamid-Mikrokügelchen und Quarzglasperlen, um nur einige zu nennen. Mikroträger werden aus abbaubaren Polymeren hergestellt, welche bei der verzögerten Freisetzung von Medikamenten oder anderen biologisch aktiven Verbindungen Verwendung gefunden haben (Uchida et al. 1997. Chem. Pharm. Bull. 45:1539–1543; Wakiyama et al. 1982. Chem. Pharm. Bull. 30:3719–3727; Mathiowitz et al. 1988. J. Appl. Polym. Sci. 35:755–774; Mathiowitz et al. 1990. Polymer 31:547–555; Albertson et al. 1996. J. Appl. Polym. Sci. 62:695–705).

[0003] Keramiken und Gläser auf der Basis von Calciumphosphat haben die Fähigkeit, an Knochengewebe zu binden, und sie finden breite Verwendung bei der Wiederherstellung von Knochen (Ducheyne, P. und J. Lemons. 1988. Ann. NY Acad. Sci. 523). Auf der Grundlage eines Vergleichs von Literaturdaten wurde gezeigt, dass das "bioaktive" Glas 45S5 (45% SiO₂, 24,5% Na₂O, 24,5% CaO und 6% P₂O₅) die höchste Rate der Bindung an Knochen hatte (Hench, L.L. 1988. Ann. NY Acad. Sci. 523:54–71), wobei "bioaktiv" bedeutet, dass das Material die Fähigkeit hat, mit lebendem Gewebe zu wechselwirken oder daran zu binden. Kürzlich wurde in Erwägung gezogen, das bioaktive Glas 45S5 als bioaktive keramische Mikrokügelchen in 3D-Knochenzellkulturen in rotierenden Bioreaktoren zu verwenden (Qiu et al. 1998. Tissue Engineer. 4:19–34). Die Verwendung von Knochen-bioaktiven Materialien ist von großem Interesse bei der Knochensynthese in vitro, aufgrund ihrer Fähigkeit, die Bindung Zelle-Material zu fördern, und ihres Potentials, die Knochenbildung zu verstärken.

[0004] Man nimmt an, dass das Vorliegen und die Bildung von Calciumhydroxylapatit an der Implantat-Knochen-Grenzfläche für die Knochenbindung kritisch ist, und eines der Schlüsselmerkmale ist, die für erfolgreiche bioaktive Knochenimplantate erforderlich sind. Schichten aus Calciumhydroxylapatit auf Implantaten oder Calciumhydroxylapatitblöcke wurden verwendet, um Implantate mit knochenbin-

denden Fähigkeiten herzustellen. Durch Verwendung eines in vitro-Eintauchverfahrens mit einer simulierten physiologischen Lösung, d.h. einer Lösung, die die Ionenkonzentration in Körperflüssigkeiten imitiert, wurde die Bildung der Schichten aus Calciumhydroxylapatit auf bioaktiven Gläsern, bioaktiven Glaskeramiken und Polymeren erzeugt, und dieses Verfahren des "in vitro-Eintauchens" wurde verwendet, um das Knochenbindungspotential von Knochenimplantatmaterialien vorherzusagen (Kokubo et al. 1990. J. Biomed. Mater. Res. 24:721–734; Li et al. 1997. J. Biomed. Mater. Res. 34:79–86). Im Stand der Technik findet sich auch ein Verfahren zur Herstellung von bioaktiven, bioabsorbierbaren Stäben unter Verwendung von Polylactid oder bioaktivem Glas (Niiranen et al. 1999. Mat. Res. Soc. Symp. Proc. 550:267–272), eines modifizierten, porösen, bioaktiven Glasgerüsts, das aus Glasgranulat hergestellt wurde (Livingstone et al. 1999. Proceedings of the International Symposium on Ceramics in Medicine 12:245–248), und eine poröse Calciumphosphat-Oberflächenschicht auf einem bioaktiven Glas, die durchgehend mit Serumproteinartigen organischen Molekülen vermischt ist (Internationale Patentveröffentlichung Nr. WO 99/26605).

[0005] Feste, biokeramische Mikrokügelchen haben normalerweise eine Dichte von mehr als 2 g/cm³. Wenn sie in Bioreaktoren verwendet werden, erleiden die festen, keramischen Mikrokügelchen eine hohe Scherspannung, welche die Ablösung und Schädigung von Zellen hervorruft (Qiu et al. 1998. Tissue Engineer. 4:19–34). Dieses Problem wurde gelöst, indem die scheinbare Dichte der Mikrokügelchen durch eine Hohlstruktur reduziert wurde (Qiu et al. 1999. Biomaterials 20:989–1001). Zellkulturuntersuchungen haben bestätigt, dass die hohlen, biokeramischen Mikrokügelchen (SiO₂/Al₂O₃/CaP) eine niedrige Scherspannung erleiden und 3D-Knochenzellkulturen in rotierenden Bioreaktoren tragen können. Wegen ihrer nicht-abbaubaren Komponente Al₂O₃ können die hohlen, biokeramischen Mikrokügelchen jedoch nicht vollständig durch Knochengewebe ersetzt werden. Es besteht ein Bedarf an neuen Mikroträgern, welche bioaktiv sind, abbaubar sind und eine Dichte haben, die niedrig genug ist, um eine niedrige Scherspannung zu erzeugen.

[0006] Es wurde ein neues bioaktives und abbaubares Verbundmaterial zur Verwendung beim dreidimensionalen Knochen-Tissue-Engineering und in Knochenimplantatmaterialien entwickelt.

Zusammenfassung der Erfindung

[0007] Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein bioaktives, abbaubares Verbundmaterial, wobei der Verbund hergestellt wird durch Vermischen eines modifizierten bioaktiven Glaspulvers mit einer Poly(milchsäure-co-glycolsäure)-Polymermatrix. Der

Verbundwerkstoff kann beim Tissue Engineering zur Implantation oder als Mikroträger zur Abgabe von Medikamenten verwendet werden.

[0008] Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Feststoff-in-Öl-in-Wasser-Verfahren zum Abtrennen von Lösungsmittel zur Herstellung von bioaktiven, abbaubaren Verbundwerkstoffmaterialien, einschließlich Mikrokügelchen.

[0009] Ein noch anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum Induzieren von Knochenregeneration in einem Tier und ein Verfahren zur Medikamentenabgabe in einem Tier.

[0010] Ein noch anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von bioaktiven und abbaubaren Gerüsten für 3-dimensionales Knochen-Tissue-Engineering.

[0011] Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein bioaktives, abbaubares Verbundwerkstoffmaterial zur Verfügung gestellt, das ein modifiziertes, bioaktives Glaspulver mit einer kristallinen Calciumkeramikphase umfasst, eingeschlossen in einer Poly(milchsäure-co-glycolsäure)-Polymermatrix.

[0012] Das bioaktive, abbaubare Verbundwerkstoffmaterial kann mit einem siliciumhaltigen Calciumphosphatfilm beschichtet sein.

[0013] Vorzugsweise liegt das Verbundwerkstoffmaterial in Form von Mikrokügelchen vor.

[0014] Noch bevorzugter liegt das Verbundwerkstoffmaterial in Form von hohlen Mikrokügelchen vor.

[0015] Das Verbundwerkstoffmaterial kann weiterhin ein Medikament umfassen. Wenn das Verbundwerkstoffmaterial ein Medikament umfasst, ist das Material vorzugsweise zur Medikamentenabgabe und Verabreichung an ein Tier konfiguriert.

[0016] Vorzugsweise ist das Verbundwerkstoffmaterial zur Implantation in ein Tier zum Induzieren von Knochenregeneration konfiguriert.

[0017] Gemäß einem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Feststoff-in-Öl-in-Wasser-Verfahren zum Abtrennen von Lösungsmittel zur Herstellung eines bioaktiven, abbaubaren Verbundwerkstoffmaterials für Tissue Engineering zur Verfügung gestellt, umfassend:

- (a) Auflösen eines Poly(milchsäure-co-glycolsäure)-Polymers in Methylenchlorid, um eine Lösung des Poly(milchsäure-co-glycolsäure)-Polymers herzustellen;
- (b) Vermischen eines modifizierten, bioaktiven Glaspulvers mit der Lösung des Poly(milchsäure-co-glycolsäure)-Polymers, um eine Lösung von

Poly(milchsäure-co-glycolsäure)-Polymer und bioaktivem Glaspulver herzustellen; und
(c) tropfenweise Zugabe der Lösung von Poly(milchsäure-co-glycolsäure)-Polymer und bioaktivem Glaspulver zu einer Lösung von Polyvinylalkohol, um ein Verbundwerkstoffmaterial für Tissue Engineering herzustellen.

[0018] Weiterhin wird ein bioaktives, abbaubares Verbundwerkstoffmaterial zur Verfügung gestellt, das nach dem oben genannten Verfahren erhältlich ist.

Genaue Beschreibung der Erfindung

[0019] Es besteht ein Bedarf an Verbundwerkstoffmaterialien, einschließlich Mikrokügelchen, für Tissue Engineering, wie beispielsweise für Knochenimplantate, welche bioaktiv sind (d.h., an lebendes Gewebe, wie beispielsweise Knochen, binden können) und resorbierbar oder abbaubar sind (d.h., nach einem Zeitraum der Implantation durch Gewebe ersetzt werden können). Zusätzlich zu ihrer Funktion als Implantatmaterial sollten solche Verbundwerkstoffe als Medikamentenabgabevorrichtungen zur Geweberegeneration verwendbar sein.

[0020] Es wurde ein Feststoff-in-Öl-in-Wasser-Verfahren (S/O/W) zum Abtrennen von Lösungsmittel zur Herstellung eines bioaktiven und abbaubaren Verbundwerkstoffmaterials entwickelt. Dieses Verfahren unterscheidet sich von früheren Verfahren (Uchida et al. 1997. Chem. Pharm. Bull. 45:1539–1543), wo ein Wasser-in-Öl-in-Wasser-Verfahren (W/O/W) zur Abtrennung verwendet wurde. In diesem neuen Verfahren werden modifizierte, bioaktive 45S5-Glaspulver als feste Füllstoffphase verwendet. Unter den erhältlichen abbaubaren Polymeren sind Poly(milchsäure-co-glycolsäure)-Polymere (PLGA) dafür bekannt, dass sie einen weiten Bereich von physikalischen, thermischen, mechanischen und biologischen Eigenschaften haben, und erfolgreich in Implantaten und Medikamentenabgabesystemen zur Knochenregeneration verwendet wurden (Vert et al. 1984. in: Macromolecular Biomaterials, Hastings, G.W. und P. Ducheyne (Herausg.), CRC Press: Boca Raton, S. 120–142). Jeder Monomerbestandteil kann in Konzentrationen vorliegen, die von 0 bis 100% reichen. Daher wurde PLGA als Polymermatrix des Verbundwerkstoffmaterials der vorliegenden Erfindung ausgewählt.

[0021] Es werden Glaspulver mit einer Größe von <20 µm und einer Zusammensetzung von 45% SiO₂, 24,5% CaO, 24,5% Na₂O und 6% P₂O₅ (in Gewichtsprozent) verwendet. Die Glaspulver werden modifiziert durch Eintauchen in einen 0,05 M Tris-Puffer (pH 7,3), der mit Plasmaelektrolyt ergänzt war (eine simulierte physiologische Lösung; Ionenkonzentrationen wie in Radin, S.R., und P. Ducheyne 1993. J. Biomed. Mater. Res. 27:35–45, angegeben) bei 37°C.

Die eingetauchten Partikel wurden geschüttelt und 1 Stunde bis 3 Tage lang inkubiert. Die simulierte physiologische Lösung wurde in den ersten 6 Stunden alle 2 Stunden und dann nach 24, 48 und 72 Stunden gewechselt. Um die FTIR-Spektren der Glaspulver nach Eintauchen bei 1 Stunde, 6 Stunden, 1 Tag und 3 Tagen zu bestimmen, wurde Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) verwendet.

[0022] Nach 6-stündigem Eintauchen in simulierte physiologische Lösung hatte sich amorphes Calciumphosphat gebildet, angezeigt durch das Vorliegen einer Bending-Schwingungsbande der PO_4 -Gruppen (P-O-Bending). Nach Eintauchen über 1 Tag spaltete die P-O-Bending-Bande auf, was das Vorliegen einer kristallinen Calciumphosphatkeramikphase anzeigte. Das Auftreten von Banden bei 870 cm^{-1} (C-O-Bindungen) und 960 cm^{-1} (symmetrische P-O-Streckschwingung, charakteristisch für Hydroxylapatit) zeigte, dass die kristalline Phase als carbonisierter Calciumhydroxylapatit identifiziert werden konnte. Eine Messung der pH-Veränderungen mit der Zeit zeigte, dass der pH-Wert mit der Zeit anstieg, wenn die bioaktiven Glaspulver in die simulierte physiologische Lösung eingetaucht wurden. Nach 3-tägigem Eintauchen veränderte sich der pH-Wert nur noch wenig. Wenn bioaktive Glasteilchen ohne Modifikation bei der Herstellung der Verbundwerkstoffe verwendet wurden, war die Oberfläche des Verbundmaterials stark rissig. Es wurde unerwarteterweise festgestellt, dass dieses Problem durch Vor-Eintauchen der Glaspulver vermieden werden konnte. Beispielsweise wurden bioaktive Glasteilchen, die 3 Tage lang eingetaucht wurden, bei der Herstellung von Mikrokügelchen aus dem Verbundmaterial der vorliegenden Erfindung verwendet.

[0023] Polymilchsäure(PLA (polylactic acid))-Mikrokügelchen (100% Milchsäure, keine Glycolsäure im Polymer verwendet) wurden bei PLA-Konzentrationen von 0,2, 0,4, 0,6 und 0,8 g in 5 ml Methylenchlorid hergestellt. Die quantitative Analyse der Teilchengrößenverteilung zeigte, dass die Verteilung der Mikrokügelchengröße durch die Konzentration des PLA in Methylenchlorid beeinflusst wurde. Eine Erhöhung der PLA-Konzentration in Methylenchlorid führte zu einem Anstieg der mittleren Teilchengröße der Mikrokügelchen. Da für die Zellkulturuntersuchungen Mikroträger mit einem Größenbereich von 100–200 μm wünschenswert waren, wurden PLA-Konzentrationen von 0,6 g in 5 ml Methylenchlorid für die Herstellung der PLA-bioaktiven Glasmikrokügelchen ausgewählt.

[0024] Ein S/O/W-Emulsions-Lösungsmittelverdampfungsverfahren wurde entwickelt. Zu Beginn wurden 600 mg PLA (Alkermes, OH) in 5 ml Methylenchlorid gelöst. Anschließend wurden 600 mg modifiziertes, bioaktives Glaspulver mit der PLA-Lösung vermischt und 15 Minuten lang mit Ultraschall behan-

delt. Das Gemisch wurde dann tropfenweise in 200 ml einer 0,5%-igen (Gew./Vol.) Lösung von Polyvinylalkohol-in Wasser gegeben. Dieses Gemisch wurde 4 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt und die Mikrokügelchen anschließend durch Zentrifugieren gesammelt. Die Mikrokügelchen wurden abfiltriert, mit Wasser gewaschen und dann bei Raumtemperatur in einem Exsikkator getrocknet.

[0025] Der Einbau der modifizierten, bioaktiven Glaspulver in die Mikrokügelchen wurde mittels Lichtmikroskopie- und Rasterelektronenmikroskopie-Analysen gezeigt.

[0026] Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) zeigte, dass die Mikrokügelchen hauptsächlich mit PLA bedeckt waren, und dass es Poren von Mikrometergröße in der Mikrokügelchenoberfläche gab. Eine Querschnittsanalyse zeigte, dass die Glaspulver in der äußeren Polymerschale der Mikrokügelchen verteilt waren. Die Mikrokügelchen hatten im Inneren eine hohle Struktur, und die modifizierten Glasteilchen waren in die poröse Polymermatrix eingebettet. Die Mikrokügelchen waren geschlossen, und eine energiedispersive Röntgenanalyse (EDX (energy dispersive x-ray analysis)) des Mikrokügelchenquerschnitts bestätigte weiterhin das Vorhandensein von Silicium, Calcium und Phosphor. Nach 2-wöchigem Eintauchen in simulierte physiologische Lösung waren die Mikrokügelchen vollständig von einer calcifizierten Schicht bedeckt, die aus Kügelchen von 2 bis 3 μm bestand. Calcium und Phosphat wurden in der calcifizierten Oberfläche der Verbundwerkstoffmikrokügelchen mittels REM in Kombination mit energiedispersiver Röntgenanalyse (EDX) nachgewiesen. Eine FTIR-Analyse der Mikrokügelchen nach 3-wöchigem Eintauchen bewies das Vorliegen von carbonisiertem, kristallinem Calciumhydroxylapatit, was sich durch das Vorliegen von Orthophosphat-Banden (P-O bei 560, 606, 950 und 1044 cm^{-1}) und C-O-Banden (C-O bei 1410 und 874 cm^{-1}) zeigte.

[0027] Diese Ergebnisse zeigten die erfolgreiche Herstellung des bioaktiven und bioabbaubaren Verbundmaterials und der Mikrokügelchen aus dem Verbundmaterial zur Verwendung beim Tissue Engineering und der Regeneration. Das Verbundmaterial hatte einen Vorteil gegenüber Verbundwerkstoffen aus dem Stand der Technik hinsichtlich der Bioaktivität, die ihm durch die Verwendung von modifiziertem, bioaktivem Glas verliehen wurde, und hinsichtlich der Bioabbaubarkeit, die ihm durch die Verwendung sowohl von Polyesterpolymer als auch Glas verliehen wurde. Hydroxylapatit und andere Calciumphosphate, die vorher verwendet worden waren, waren nicht in der Lage, resorbiert zu werden. Die Größe der Verbundwerkstoff-Mikrokügelchen wurde mit diesem Verfahren kontrolliert, was einen anderen Vorteil gegenüber früheren Verfahren darstellt. Da das Abbauprodukt von PLA durch den Körper metabolisiert wer-

den kann, bildet PLA ein hervorragendes Implantatmaterial und einen hervorragenden Träger für die kontrollierte Medikamentenabgabe einer Vielzahl von bioaktiven Mitteln in Tieren, einschließlich Menschen. Die Verwendung von bioaktivem Glas zusammen mit PLA erzeugt eine alkalische Umgebung, die bei Kontakt mit Körperflüssigkeit die Milchsäure neutralisieren kann, die beim biologischen Abbau gebildet wird, und mögliche lokale Entzündungsreaktionen eingrenzen kann, die man oft bei implantiertem PLA beobachtet.

[0028] Die Verwendung von simulierter physiologischer Flüssigkeit als eine Möglichkeit, um die Knochenbildungsfähigkeit von implantierten Materialien vorherzusagen, zeigte, dass das Verbundmaterial und die Mikrokügelchen der vorliegenden Erfindung das Potential haben, an Gewebe zu binden, und dass eine Bindung an Knochen in vivo zu erwarten sein würde. Die Aufnahme von Calciumhydroxylapatit auf der gesamten Oberfläche der Mikrokügelchen aus Verbundmaterial liefert einen Träger für die Knochenneubildung und verbindet den Knochen oder das Gewebe mit dem Implantat.

[0029] Die Reaktivität der Mikrokügelchen aus Verbundmaterial wurde genauer untersucht, indem die Bildung der Mineralschicht auf der Oberfläche der Mikrokügelchen mit Hilfe des in-vitro-Eintauchverfahrens (in simulierter physiologischer Lösung) untersucht wurde. Die Veränderungen der Konzentrationen von Calcium (Ca), Phosphat (PO_4) und Silicium (Si) in den Eintauchlösungen als Funktion der Inkubationszeit wurden auch mit nasschemischen Standardverfahren analysiert.

[0030] Mikrokügelchen aus Verbundwerkstoff, die nach den hier beschriebenen Verfahren hergestellt waren, wurden bei 37°C 1 Stunde bis 3 Wochen lang bei einem Partikel-zu-Lösungs-Verhältnis von 5 mg auf 10 ml eingetaucht. Mikrokügelchen- und Lösungsproben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während des Eintauchzeitraums gesammelt. Die lösungschemische Analyse zeigte, dass die Veränderungen der Ca- und PO_4 -Konzentration in den Lösungen, die die Verbundwerkstoff-Mikrokügelchen enthielten, mit der Inkubationszeit abnahmen, während es in der Lösung, in der PLA-Mikrokügelchen ohne Verbundwerkstoff (Kontroll-Mikrokügelchen) inkubiert wurden, über den 3-Wochen-Zeitraum keine nachweisbare Veränderung gab. Die Rate der Ca- und PO_4 -Aufnahme nahm nach 2 Tagen Eintauchen der Verbundwerkstoff-Mikrokügelchen ab, und nach 2 Wochen betrug das Verhältnis der Ca- und PO_4 -Aufnahme etwa 1,3. Die Freisetzung von Si aus den Verbundwerkstoff-Mikrokügelchen war über die Zeit kontinuierlich, wobei die Freisetzungsrates nach 2 Tagen Eintauchen abnahm. Diese Abnahme der Si-Freisetzungsrates fiel mit der abnehmenden Aufnahme von Ca und PO_4 zusammen. Diese Daten

zeigten, dass die Silikationen aus dem bioaktiven Glas, das an der polymeren Oberfläche befestigt war, ausgelaugt wurden und als Keimbildungsstellen wirkten. Da die bioaktiven Glaspulver im Inneren der Mikrokügelchen eingekapselt waren, war das Auslaugen von Si ein zeitabhängiger und dynamischer Prozess, der die Oberfläche der Mikrokügelchen während des Eintauchzeitraums reaktiv hielt.

[0031] Für die REM- und EDX-Analyse dienten wiederum PLA-Mikrokügelchen als Kontrollproben. Nach einer Woche Eintauchen war auf der Oberfläche der PLA-Mikrokügelchen keine Mineralabscheidung zu sehen, und nach 3 Wochen erschienen Risse auf ihrer Oberfläche, was einen Abbau des PLA-Polymers anzeigte. Im Gegensatz dazu bildeten Verbundwerkstoff-Mikrokügelchen nach 1 Woche Eintauchen eine große Zahl von Mikropartikeln auf ihrer Oberfläche. Die meisten Mikropartikel schienen aus Poren heraus und entlang von Rissen in der polymeren Oberfläche zu wachsen. Nach 2 Wochen Eintauchen waren die Oberflächen der Verbundwerkstoff-Mikrokügelchen überwiegend mit Mikropartikeln mit einem Durchmesser von bis zu 3 μm bedeckt. Die Kügelchen hatten sich zu kleinen, flockenartigen Teilchen angesammelt. Die Oberflächen der Verbundwerkstoff-Mikrokügelchen waren nach 3 Wochen Inkubation vollständig mit einer Mineralschicht bedeckt. In der Mineralschicht wurden Risse beobachtet.

[0032] Eine EDX-Analyse zeigte, dass nach 3 Wochen Eintauchen nur Kohlenstoff- und Sauerstoff-Peaks auf den Oberflächen der PLA-Mikrokügelchen nachgewiesen wurden. Im Gegensatz dazu wurden nach 4, 7 und 21 Tagen Eintauchen Si, Ca und Phosphor (P) auf den Oberflächen der Verbundwerkstoff-Mikrokügelchen nachgewiesen. Die Calcium-zu-Phosphat-Verhältnisse der Oberflächenschichten variierten von 1,1 bis 1,4 auf den Verbundwerkstoff-Mikrokügelchen, die zwischen 4 Tagen und 3 Wochen in simulierte, physiologische Flüssigkeit eingetaucht waren. Nach 1 und 3 Wochen Eintauchen wurden auch Spuren von Chlorid, Natrium und Magnesium in den Calciumphosphat-reichen Schichten nachgewiesen.

[0033] FTIR-Spektren von Verbundwerkstoff-Mikrokügelchen, die 2 und 3 Wochen lang eingetaucht waren, zeigten (PO_4)³⁻-Banden bei 1098, 1046, 60 und 561 cm^{-1} . Diese Banden waren charakteristisch für kristallinen Calciumhydroxylapatit. Die Intensität der Phosphatbanden nahm mit der Eintauchzeit zu. In den Spektren der 3 Wochen lang eingetauchten Verbundwerkstoff-Mikrokügelchen zeigten sich Carbonat-Banden bei 1410 und 874 cm^{-1} , was die Bildung von carbonisiertem Calciumhydroxylapatit anzeigte.

[0034] Diese Ergebnisse zeigten, dass die Mikrokügelchen aus PLA und bioaktivem Glas, die nach dem

S/O/W-Verfahren hergestellt wurden, die Bildung von carbonisiertem Calciumhydroxylapatit induzierten und die Polymeroberfläche nach 3-wöchigem Eintauchen in simulierter physiologischer Flüssigkeit vollständig in carbonisiertem Calciumhydroxylapatit umwandelten. Die Bildung einer Schicht aus einem biologisch aktiven Apatit, wie beispielsweise carbonisiertem Calciumhydroxylapatit, an der Implantat-Knochen-Oberfläche während der Implantation ist entscheidend für die Bindung des Implantats an lebendes Knochengewebe. Somit wurde gezeigt, dass die Verbundwerkstoff-Mikrokügelchen der vorliegenden Erfindung in der Lage sind, mit lebendem Gewebe zu wechselwirken, um eine Bindung zu bilden.

[0035] Die Verbundmaterial-Mikrokügelchen der vorliegenden Erfindung waren nach nur 2 Wochen Eintauchen praktisch vollständig mit einer Calciumphosphat-reichen Schicht bedeckt; im Gegensatz dazu wurde auf den Oberflächen der PLA-Mikrokügelchen keine Mineralabscheidung beobachtet. Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass Poly(L-milchsäure)-Gerüste wesentlich länger brauchen, um die Bildung einer Oberflächenschicht zu induzieren (bei der es sich um Hydroxylapatit handelte), selbst in einer Lösung, die mit Ca und P stark übersättigt war (Zhang, R. und P.X. Ma. 1999. J. Biomed. Mater. Res. 45:285–293). Weiterhin wurde gezeigt, dass Oberflächenreaktionsschichten aus bioaktivem Glas einen viel größeren Effekt auf die Knochenzellfunktion haben, als regulärerer Hydroxylapatit (Garcia A. et al. 1998. J. Biomed. Mater. Res. 40:48–56).

[0036] Die Bildung der Calciumphosphatschicht auf den Verbundwerkstoff-Mikrokügelchen unterdrückte deutlich den Abbau, da sich in den gegenwärtigen Untersuchungen ein Abbau von PLA-Mikrokügelchen nach 3 Wochen zeigte. Es scheint, dass das modifizierte, bioaktive Glaspulver der Verbundwerkstoff-Mikrokügelchen die angesammelte Säure neutralisiert und den Abbau verlangsamt. Auch die sich bildende Oberflächenreaktionsschicht schützt das Polymer vor dem Abbau. Der verlangsamte Abbau der Verbundwerkstoff-Mikrokügelchen würde der Knochenheilung entlang einer Implantatoberfläche zusätzliche Zeit lassen, bevor der Abbau der Verbundwerkstoff-Mikrokügelchen beendet ist.

[0037] Mit Hilfe eines neuen Herstellungsverfahrens für Verbundmaterialien wurden bioaktives und abbaubares Material und Mikrokügelchen aus diesem Verbundmaterial hergestellt. Das Verbundmaterial setzt sich zusammen aus einem modifizierten, bioaktiven Glaspulver, das in eine Poly-alpha-hydroxysäure-Substanz eingebracht ist, einschließlich, aber nicht eingeschränkt auf Polymilchsäure, Polyglycolsäure und deren Copolymere. Die Fähigkeit des Verbundmaterials, auf seiner Oberfläche die Bildung von carbonisiertem Calciumhydroxylapatit, der haupt-

sächlichen anorganischen Komponente des Knochens, zu bilden, zeigt die Knochenbindungsfähigkeit dieses Verbundmaterials und der Mikrokügelchen aus diesem Verbundmaterial in vivo. Wegen der runden Form der Mikrokügelchen und einer Dichte, die nahe der des Kulturmediums liegt, können diese Mikrokügelchen auch als Mikroträger für 3-dimensionales Tissue Engineering in Bioreaktoren oder anderen Gewebekulturvorrichtungen fungieren. Aufgrund ihrer Bioabbaubarkeit könnten diese Verbundwerkstoff-Mikrokügelchen auch als Medikamentenabgabevorrichtungen verwendet werden. In Abhängigkeit vom Zustand, der behandelt werden soll, würde man das Verbundmaterial und die Verbundmaterial-Mikrokügelchen der vorliegenden Erfindung sowohl als Implantatmaterial bei 3-dimensionalem Tissue Engineering und als Mikroträger in einem Tier, einschließlich Menschen, verwenden.

Patentansprüche

1. Bioaktiver, abbaubarer Verbundwerkstoff, umfassend ein modifiziertes, bioaktives Glaspulver mit einer kristallinen Calciumkeramikphase, eingeschlossen in einer Poly(milchsäure-co-glycolsäure)-Polymermatrix.
2. Bioaktiver, abbaubarer Verbundwerkstoff nach Anspruch 1, worin der Verbundwerkstoff mit einem siliciumhaltigen Calciumphosphatfilm beschichtet ist.
3. Bioaktiver, abbaubarer Verbundwerkstoff nach den Ansprüchen 1 oder 2, worin der Verbundwerkstoff in Form von Mikrokügelchen vorliegt.
4. Bioaktiver, abbaubarer Verbundwerkstoff nach Anspruch 3, worin der Verbundwerkstoff in Form von hohlen Mikrokügelchen vorliegt.
5. Bioaktiver, abbaubarer Verbundwerkstoff nach den Ansprüchen 3 oder 4, der weiterhin ein Medikament umfasst.
6. Bioaktiver, abbaubarer Verbundwerkstoff nach einem der vorhergehenden Ansprüche, der zur Implantation in ein Tier geeignet ist, um Knochenregeneration zu induzieren.
7. Bioaktiver, abbaubarer Verbundwerkstoff nach Anspruch 5, der zur Medikamentenabgabe und -verabreichung an ein Tier geeignet ist.
8. Feststoff-in-Öl-in-Wasser-Verfahren zum Abtrennen von Lösungsmittel zur Herstellung eines bioaktiven, abbaubaren Verbundwerkstoffs für "Tissue Engineering", umfassend:
 - (a) Auflösen eines Poly(milchsäure-co-glycolsäure)-Polymers in Methylenchlorid, um eine Poly(milchsäure-co-glycolsäure)-Polymerlösung herzustellen;
 - (b) Vermischen eines modifizierten, bioaktiven Glas-

pulvers mit der Poly(milchsäure-co-glycolsäure)-Polymerlösung, um eine Lösung aus Poly(milchsäure-co-glycolsäure)-Polymer und bioaktivem Glaspulver herzustellen; und

(c) tropfenweise Zugabe der Lösung aus Poly(milchsäure-co-glycolsäure)-Polymer und bioaktivem Glaspulver zu einer Polyvinylalkohollösung, um einen Verbundwerkstoff für "Tissue Engineering" herzustellen.

9. Bioaktiver, abbaubarer Verbundwerkstoff, der nach dem Verfahren aus Anspruch 8 erhältlich ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen