



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2007 048 591 A1** 2009.04.09

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2007 048 591.5**

(22) Anmeldetag: **05.10.2007**

(43) Offenlegungstag: **09.04.2009**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61L 27/30** (2006.01)

**A61L 27/12** (2006.01)

**A61L 27/32** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

(71) Anmelder:  
**Epple, Matthias, Prof. Dr., 45529 Hattingen, DE**

(74) Vertreter:  
**Hauck Patent- und Rechtsanwälte, 20354  
Hamburg**

(72) Erfinder:  
**Epple, Matthias, Prof., Dr., 45529 Hattingen, DE;  
Sokolova, Viktoriya, Dr., 40545 Düsseldorf, DE;  
Kovtun, Anna, 45131 Essen, DE; Urch, Henning,  
46395 Bocholt, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:

**DE 101 13 108 A1**

**DE 697 29 647 T2**

**WO 03/0 88 925 A2**

**Sokolova et al.: Mat-wiss. U. Werkstofftech. 37, 4**

**1-445 (2006) Welzel et al.: J. Mater. Chem. 14, 22**

**13-2217 (2004) Sokolova et al.: Biomaterials 27, 3**

**147-3153 (2005);**

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Implantat und Verfahren zu seiner Herstellung**

(57) Zusammenfassung: Implantat, das einen Träger und Nukleinsäure-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel aufweist.

## Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung bezieht sich auf ein Implantat und auf ein Verfahren zur Herstellung des Implantates.

**[0002]** Der nicht-virale Transfer von Nukleinsäuren in Zellen („Transfektion“) ist mit Hilfe Nukleinsäure-funktionalisierter Calciumphosphat-Nanopartikel durchführbar. Dort können die Nukleinsäure-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel beispielsweise die Bildung therapeutisch wirksamer Proteine steuern. Allgemein ist durch die Einführung von DNA die gezielte Anregung der Produktion von Proteinen möglich, während durch die Einführung von small interfering RNA (siRNA) das gezielte Abschalten der Produktion von Proteinen möglich („Antisense“ oder „Gene silencing“). Im Folgenden werden die beiden Alternativen DNA und siRNA zusammenfassend als Nukleinsäuren bezeichnet, wobei auch Kombinationen beider Stoffe nicht ausgeschlossen sind. Weiterhin ist verkürzt von der Induktion der Produktion von Proteinen (durch DNA) die Rede, wenn auch eine gezielte Abschaltung von Proteinen (durch siRNA) möglich ist. Diese Genübertragung könnte beispielsweise für die somatische Gentherapie genutzt werden. Hierzu wird auf folgende wissenschaftliche Veröffentlichungen verwiesen:

Welzel T, Radtke I, Meyer-Zaika W, Heumann R, Epple M. Transfection of cells with custom-made calcium phosphate nanoparticles coated with DNA. *J Mater Chem* 2004; 14: 2213–2217.

Sokolova V, Prymak O, Meyer-Zaika W, Cölfen H, Rehage H, Shukla A, Epple M. Synthetic and characterisation of DNA-functionalised phosphate nanoparticles. *Mat-wiss u Werkstofftech* 2006; 37: 441–445.

Sokolova VV, Radtke I, Heumann R, Epple M. Effective transfection of cells with multi-shell calcium phosphate-DNA nanoparticles. *Biomaterials* 2006; 27: 3147–3153.

**[0003]** Für die Einführung der Nanopartikel in den Körper bietet sich das Einspritzen oder Infundieren an. Hierbei ist nachteilig, dass sich die Nanopartikel im Körper unkontrolliert verteilen, so dass eine Steuerung der Proteinproduktion schwierig und der Erfolg der Therapie in Frage gestellt wäre.

**[0004]** Davon ausgehend liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, eine Technik für eine kontrollierte Zuführung von Nukleinsäure-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln zu dem zu behandelnden Organ zur Verfügung zu stellen.

**[0005]** Die Aufgabe wird durch ein Implantat gelöst, das einen Träger und Nukleinsäure-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel aufweist.

**[0006]** Das erfindungsgemäße Implantat kann gezielt in den Körper eines Menschen oder Tieres ein-

gebracht werden. Die Nukleinsäure-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel („Nanopartikel“) können von dem Träger in Zellen in der Nachbarschaft des Implantates wandern. Somit werden diesen Zellen die Nukleinsäure-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel gezielt zugeführt. Ferner ist es möglich, das Implantat zu entnehmen, um die Zufuhr zu unterbrechen. Es ist aber auch möglich, den Träger so mit Nukleinsäure-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln auszustatten, dass diese erst nach einer bestimmten Zeit abwandern und/oder über einen definierten Zeitraum abwandern und/oder dass in verschiedenen Zeitabschnitten verschiedenen Nukleinsäure-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel abwandern. Das Implantat kann zum Einbringen ausschließlich als Depot für die gezielte Zufuhr der Nanopartikel zum Körper des Patienten dienen. Es ist aber auch möglich, dass das Implantat weitere Körperfunktionen unterstützt oder ersetzt, die zu der Produktion der Proteine hinzukommen, für die die Nukleinsäure codiert. Beispielsweise kann das Implantat ein Implantat zur Behandlung von Knochenbrüchen (Osteosynthese), ein Zahnimplantat, ein Herzschrittmacher oder ein Stent sein. Die Wirkung dieser Implantate kann durch die Nanopartikel unterstützt werden.

**[0007]** Die Nukleinsäure-funktionalisierten Nanopartikel auf Calciumphosphat-Basis haben den Vorteil, im menschlichen oder tierischen Organismus hervorragend biokompatibel zu sein. Dies unterscheidet sie von viralen, liposomalen und kationischen Transfektionsagenzien. Des Weiteren ist bei der Gabe von mehreren therapeutischen Dosen keine Immunantwort wie bei einer viralen Transfektion zu erwarten. Die Nukleinsäure lagert sich um das Calciumphosphat-Nanopartikel und wird immobilisiert, ohne degradiert zu werden. Des Weiteren kann das Nanopartikel zusätzlich mit kationischen, stickstoffhaltigen Polymeren wie Polyethylenimin (PEI) funktionalisiert werden. Die Adsorption der negativ geladenen Nukleinsäure erfolgt dann auf dieser Polymerschicht.

**[0008]** Gemäß einer Ausgestaltung weist das Implantat Mittel zum Halten der Nukleinsäure-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel auf, die ein Wandern der Nanopartikel in benachbarte Zellen zu lassen, wenn das Implantat in den Körper eines Patienten eingesetzt ist. Die Mittel zum Halten können verschieden ausgeführt sein.

**[0009]** Gemäß einer Ausgestaltung weist der Träger mindestens einen Hohlraum auf, in dem die Nanopartikel angeordnet sind. Der mindestens eine Hohlraum kann permanent durch mindestens eine für die Nanopartikel durchlässige Öffnung nach außen geöffnet sein und/oder eine Wand aufweisen, die kurz vor dem Einbringen in den Körper des Patienten geöffnet werden kann oder sich im menschlichen oder tierischen Körper zumindest teilweise öffnet, bei-

spielsweise weil sie vom Körper resorbiert wird. Beispielsweise ist der Träger eine Kapsel mit einem Hohlraum, der von einer porösen oder resorbierbaren Membran teilweise verschlossen ist. Gemäß einem anderen Beispiel ist der Träger ein poröser Körper, dessen Hohlräume zumindest teilweise mit den Nanopartikeln gefüllt sind.

**[0010]** Gemäß einer anderen Ausgestaltung sind Nukleinsäure-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel auf einer Oberfläche des Trägers immobilisiert. Die Immobilisierung ist so beschaffen, dass die Nanopartikel in der Lage sind, vom Körper des Patienten von der Oberfläche des Trägers weg in benachbarte Zellen zu wandern. Die Immobilisierung ist beispielsweise durch Adsorption der Nanopartikel an der Oberfläche des Trägers gegeben.

**[0011]** Die Nanopartikel können auf verschiedene Weise auf die Oberfläche aufgebracht sein. Beispielsweise kann der Träger in eine Lösung aus Nanopartikeln eingetaucht worden sein, so dass diese nach Verdampfen des Lösungsmittels die Oberfläche des Trägers belegen. Ein zusätzliches Bindemittel kann diese Anhaftung bewirken.

**[0012]** Gemäß einer Ausgestaltung besteht der Träger zumindest an der Oberfläche aus einem elektrisch leitfähigen Material und wurden Nukleinsäure-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel elektrophoretisch auf der Oberfläche abgeschieden. Durch elektrophoretische Abscheidung können gezielt Oberflächen von Trägern mit Nanopartikeln beschichtet werden. Die Elektrophorese kann auch in alkoholischer Dispersion durchgeführt werden. Überraschenderweise wird die Nukleinsäure hierbei nicht denaturiert. Die Nanopartikel können durch Adsorption an der Oberfläche immobilisiert werden. Die Transfektion wird hierdurch nicht unterbunden. Die Nanopartikel können direkt in die umgebenden Zellen wandern.

**[0013]** Alle polarisierbaren bzw. elektrisch leitfähigen Substanzen, glatt, rau oder porös, lassen sich elektrophoretisch mit Nanopartikeln belegen. Als elektrisch leitfähige Materialien kommen insbesondere Metalle, Halbleiter und Legierungen in Betracht.

**[0014]** Gemäß einer Ausgestaltung besteht der Träger insgesamt aus elektrisch leitfähigem Material. Der Träger besteht beispielsweise aus Titan. Entsprechend ausgestaltete Titanimplantate können zusätzlich der Versorgung von Knochenbrüchen dienen.

**[0015]** Gemäß einer anderen Ausgestaltung besteht der Träger aus einem keramischen Material mit einer elektrisch leitfähigen Schicht an der Oberfläche. Dieses Implantat kann beispielsweise als Zahnimplantat ausgestaltet sein.

**[0016]** Gemäß einer Ausgestaltung weist das Implantat mindestens eine Schicht umfassend Nukleinsäure-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel auf der Oberfläche des Trägers auf. In der Schicht kann eine große Anzahl Nanopartikel bereitgestellt werden. Die Schicht kann auch andere Substanzen umfassen, die beispielsweise die Immobilisierung und/oder Freisetzung der Nanopartikel im Körper des Patienten steuern. Auch kann die Schicht elektrisch leitfähige Substanzen enthalten, um das Aufbringen einer weiteren Schicht durch elektrophoretische Abscheidung zu fördern.

**[0017]** Gemäß einer Ausgestaltung weist das Implantat verschieden Nukleinsäurefunktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel auf. Mit diesem Implantat kann die Produktion verschiedener Proteine gesteuert werden, die zur Therapie einer oder mehrerer Krankheiten benötigt werden.

**[0018]** Hierfür weist das Implantat gemäß einer weiteren Ausgestaltung ein Gemisch umfassend verschieden Nukleinsäure-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel auf. Der Einsatz dieses Implantates kann die gleichzeitige Produktion verschiedener Proteine bewirken.

**[0019]** Gemäß einer Ausgestaltung weist das Implantat mehrere Schichten auf der Oberfläche des Trägers auf, die sich dadurch unterscheiden, dass sie verschieden Nukleinsäure-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel umfassen. Die mehreren Schichten können Nukleinsäure umfassen, die für verschiedene Proteine codieren. Nach dem Abwandern der Partikel einer oben liegenden Schicht können die Partikel der darunter liegenden Schicht abwandern. Auf diese Weise wird beispielsweise eine Stufentherapie ermöglicht.

**[0020]** Gemäß einer Ausgestaltung weist das Implantat mindestens eine Calciumphosphat-Nanopartikel umfassende Schicht auf der Oberfläche des Trägers auf, die nicht Nukleinsäure-funktionalisiert sind. Beispielsweise wird eine Nukleinsäure-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel enthaltende Schicht mit einer Schicht nicht Nukleinsäure-funktionalisierte Nanopartikel enthaltenden Schicht überdeckt. Die Nanopartikel der „vergrabenen Schicht“ können erst abwandern, wenn die nicht-Nukleinsäure-funktionalisierten Nanopartikel abgewandert sind. Beispielsweise kann das Implantat so ausgestaltet sein, dass im Falle einer Entzündung der im Gewebe ansteigende pH die oberste Schicht abwandern läßt, so dass danach die Nukleinsäure-funktionalisierten Nanopartikel abwandern können.

**[0021]** Gemäß einer Ausgestaltung codiert die Nukleinsäure der Nukleinsäure-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel Proteine, welche den Wundheilungsprozeß oder das Knochenwachstum

fördern und/oder Zellen und/oder das Zellwachstum beeinträchtigen und/oder deren Bereitstellung Ziel einer Gentherapie ist. Die Förderung des Wundheilungsprozesses oder Knochenwachstums ist insbesondere bei einem Implantat von Vorteil, das zusätzlich der Versorgung von Knochenfrakturen dient. Die Beeinträchtigung von Zellen und/oder des Zellwachstums kommt beispielsweise bei Ausführung des Implantats als Stent in Betracht, um ein unerwünschtes Zusammenwachsen des Bindegewebes um den Stent herum ("Restenose") zu verhindern. Ein Implantat für die Gentherapie kann beispielsweise als Plättchen („Chip“) ausgeführt sein.

**[0022]** Gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren wird ein Implantat hergestellt, indem Nukleinsäure-funktionalisierte Nanopartikel elektrophoretisch auf einer Oberfläche eines Trägers abgeschieden werden.

**[0023]** Gemäß einer Ausgestaltung wird mindestens ein Gemisch unterschiedlich Nukleinsäure-funktionalisierter Calciumphosphat-Nanopartikel auf der Oberfläche des Trägers abgeschieden.

**[0024]** Gemäß einer weiteren Ausgestaltung werden in mehreren Schritten verschieden Nukleinsäure-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel und/oder Gemische verschieden Nukleinsäure-funktionalisierter Calciumphosphat-Nanopartikel auf der Oberfläche des Trägers abgeschieden.

**[0025]** Gemäß einer weiteren Ausgestaltung wird eine Schicht nicht Nukleinsäure-funktionalisierter Nanopartikel elektrophoretisch auf der Oberfläche des Trägers abgeschieden.

**[0026]** Es folgen Beispiele für verschiedene denkbare therapeutische Anwendungen: Voraussetzung für eine erfolgreiche Gentherapie ist die Identifizierung des Gens, das die therapeutische Wirkung für die zu therapierende Krankheit hat. Hierbei wird zwischen einem angeborenen, vererbten Gendefekt und einem pathologischen Gendefekt unterschieden. Für eine orthopädische (pathologische) Erkrankung wie der Arthrose ließe sich die Nukleinsäure, welche Faktoren codiert, die die Degeneration des hyalinen Knorpels verlangsamt, auf die Partikel laden und anschließend über ein Implantat in den Organismus bringen. Ebenso ließe sich ein Matrix-Protein codieren, welches den Wiederaufbau des Knorpels stimuliert.

**[0027]** Als weiteres Beispiel sei noch die aseptische Prothesenlockerung genannt. Um bei gefährdeten Patienten eine Explantation des Implantats zu vermeiden, könnte man auf dem Implantat eine Nukleinsäure-Nanopartikelschicht aufbringen, die einen Vektor codiert, der eine Bildung der zellulären Pseudomembran im Zwischenraum von Implantat und Kno-

chen verhindert. Bei einer Frakturheilung ließe sich ein beschichtetes Implantat direkt am Knochen verwenden. Hierbei ließe sich mit der Nukleinsäure ein Knochenwachstumsfaktor (z. B. BMP-2) codieren, der das Knochenwachstum und damit den Heilungsprozeß stimuliert.

**[0028]** Dasselbe Prinzip gilt für ein dauerhaftes Implantat (z. B. Hüftprothese, Zahnimplantat, Kniegelenk). Die Lebensdauer solcher Implantate könnte durch die Expression von Knochenwachstumsfaktoren verbessert werden.

**[0029]** Es folgt ein Ausführungsbeispiel betreffend die Herstellung und die elektrophoretische Abscheidung der Nanopartikel auf dem Träger und den Nachweis der Transfektion von Zellen mittels des beschichteten Trägers.

**[0030]** DNA-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel wurden entsprechend dem in den beiden eingangs erwähnten Veröffentlichungen von Sokolova et al. (2006) beschriebenen Verfahren hergestellt. Die beiden Veröffentlichungen werden hinsichtlich des Herstellungsverfahrens der Nanopartikel in diese Patentanmeldung einbezogen. Die DNA codierte die Bildung von Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP). Die Auftragung auf einem 1 cm<sup>2</sup>-großen Titanplättchen erfolgt durch Elektrophorese aus Isopropanol in Form einer wenige µm-dicken Schicht. Diese Plättchen wurden an Luft getrocknet und in eine Zellkultur mit T-HUVEC-Zellen gebracht. Nach einer Transfektionsdauer von 48 Stunden zeigte sich klar die Bildung des grün fluoreszierenden Proteins EGFP in den Zellen, die das Plättchen besiedelt hatten. Dadurch wurde nachgewiesen, dass die Zellen die DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel aufgenommen hatten. Ein Kontrollexperiment, bei dem DNA direkt auf eine durch Plasmaspritzen auf Titan abgeschiedene Calciumphosphat-Schicht gegeben wurde, gefolgt von einer Zellbesiedlung, ergab keine Transfektion der Zellen.

**ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG**

*Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.*

**Zitierte Nicht-Patentliteratur**

- Welzel T, Radtke I, Meyer-Zaika W, Heumann R, Epple M. Transfection of cells with custom-made calcium phosphate nanoparticles coated with DNA. J Mater Chem 2004; 14: 2213–2217 [\[0002\]](#)
- Sokolova V, Prymak O, Meyer-Zaika W, Cölfen H, Rehage H, Shukla A, Epple M. Synthesis and characterisation of DNA-functionalised phosphate nanoparticles. Mat-wiss u Werkstofftech 2006; 37: 441–445 [\[0002\]](#)
- Sokolova VV, Radtke I, Heumann R, Epple M. Effective transfection of cells with multi-shell calcium phosphate-DNA nanoparticles. Biomaterials 2006; 27: 3147–3153 [\[0002\]](#)
- Sokolova et al. (2006) [\[0030\]](#)

**Patentansprüche**

1. Implantat, das einen Träger und Nukleinsäure-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel aufweist.

2. Implantat nach Anspruch 1 mit Mitteln zum Halten der Nukleinsäure-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel an dem Träger, die ein Wandern der Nanopartikel in benachbarte Zellen zulassen, wenn das Implantat in den Körper eines Patienten eingesetzt ist.

3. Implantat nach Anspruch 1 oder 2 mit auf einer Oberfläche des Trägers immobilisierten, Nukleinsäure-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln.

4. Implantat nach Anspruch 3, bei dem der Träger zumindest an der Oberfläche aus einem elektrisch leitfähigen Material besteht und Nukleinsäure-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel elektrophoretisch auf der Oberfläche abgeschieden sind.

5. Implantat nach Anspruch 4, bei dem der Träger insgesamt aus elektrisch leitfähigem Material besteht.

6. Implantat nach Anspruch 4 oder 5 mit einem Träger aus Titan oder einer Titanlegierung.

7. Implantat nach einem der Ansprüche 4 bis 6 mit einem Träger aus keramischem Material mit einer elektrisch leitfähigen Schicht an der Oberfläche.

8. Implantat nach einem der Ansprüche 1 bis 7 mit verschieden Nukleinsäure-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln.

9. Implantat nach einem der Ansprüche 1 bis 8 mit einem Gemisch aus umfassend verschiedenen Nukleinsäure-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikeln.

10. Implantat nach einem der Ansprüche 1 bis 9 mit mindestens einer Schicht umfassend Nukleinsäure-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel auf der Oberfläche des Trägers.

11. Implantat nach einem der Ansprüche 1 bis 10 mit mehreren Schichten auf der Oberfläche des Trägers, die sich dadurch unterscheiden, dass sie verschieden Nukleinsäure-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel umfassen.

12. Implantat nach einem der Ansprüche 1 bis 11 mit mindestens einer nicht Nukleinsäure-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel umfassenden Schicht auf der Oberfläche des Trägers.

13. Implantat nach einem der Ansprüche 1 bis 12, bei dem die Nukleinsäure der Nukleinsäure-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel Proteine codiert, welche den Wundheilungsprozeß oder das Knochenwachstum fördern und/oder Zellen und/oder das Zellwachstum beeinträchtigen und/oder deren Bereitstellung Ziel einer Gentherapie ist.

14. Verfahren zum Herstellen eines Implantates nach einem der Ansprüche 1 bis 13, bei dem Nukleinsäure-funktionalisierte Nanopartikel elektrophoretisch auf einer Oberfläche eines Trägers abgeschieden werden.

15. Verfahren nach Anspruch 15, bei dem mindestens ein Gemisch unterschiedlich Nukleinsäure-funktionalisierter Calciumphosphat-Nanopartikel auf der Oberfläche des Trägers abgeschieden wird.

16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, bei dem in mehreren Schritten verschieden Nukleinsäure-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel und/oder Gemische verschieden Nukleinsäure-funktionalisierter Nanopartikel auf der Oberfläche des Trägers abgeschieden werden.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16, bei dem eine Schicht nicht Nukleinsäure-funktionalisierter Nanopartikel elektrophoretisch auf der Oberfläche des Trägers abgeschieden wird.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen