

Reihe 17

Biotechnik/
Medizintechnik

Nr. 294

Dipl.-Min. Berit Müller,
Bad Säckingen

Near-net-shape fabrication of open-porous bone replacement materials of calcium phosphate and protein

ENDKONTURNAHE HERSTELLUNG EINES OFFENPORIGEN KNOCHENERSATZMATERIALS AUS CALCIUMPHOSPHAT UND PROTEINEN

NEAR-NET-SHAPE FABRICATION OF OPEN-POROUS BONE REPLACEMENT MATERIALS OF CALCIUM PHOSPHATE AND PROTEIN

Dem Fachbereich Produktionstechnik

der

Universität Bremen

zur Erlangung des Grades

Doktor-Ingenieur

genehmigte

Dissertation

von

Dipl.-Min. Berit Müller

Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Kurosch Rezwan

Prof. Dr.-Ing. Lucio Colombi Ciacchi

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2017

Fortschritt-Berichte VDI

Reihe 17

Biotechnik/
Medizintechnik

Dipl.-Min. Berit Müller,
Bad Säckingen

Nr. 294

Near-net-shape
fabrication of
open-porous bone
replacement materials
of calcium phosphate
and protein

Müller, Berit

Near-net-shape fabrication of open-porous bone replacement materials of calcium phosphate and protein

Fortschr.-Ber. VDI Reihe 17 Nr. 294. Düsseldorf: VDI Verlag 2017.

104 Seiten, 35 Bilder, 4 Tabellen.

ISBN 978-3-18-329417-6, ISSN 0178-9600,

€ 43,00/VDI-Mitgliederpreis € 38,70.

Für die Dokumentation: Biocompatibility – Bioresorbability – Bone Replacement – Calcium Phosphate – Freeze Gelation – Local Drug Release – Lysozyme – Serum Albumin – Zeta Potential

As today's synthetic bone implants fulfil the requirements for the repair of bone defects only in part continuous research for their improvement is ongoing. This work aims at the fabrication of bone replacement materials with bone-like properties regarding composition, structure, mechanical stability, and resorbability. As appropriate fabrication method, the slurry-based freeze gelation process was chosen. It allows the direct incorporation of active bio-relevant compounds, such as proteins, during scaffold processing. Moreover, the process enables the fabrication of complex-shaped and open-porous scaffolds. As principal components for the scaffolds calcium phosphate and protein were selected as they are biocompatible and resorbable. This work analyses the interaction between calcium phosphate and protein in suspension and investigates the suitability of the fabricated calcium phosphate/protein scaffolds as bone replacement material and drug release depot.

Bibliographische Information der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliographie; detaillierte bibliographische Daten sind im Internet unter <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Bibliographic information published by the Deutsche Bibliothek

(German National Library)

The Deutsche Bibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliographie (German National Bibliography); detailed bibliographic data is available via Internet at <http://dnb.ddb.de>.

Dissertation Universität Bremen

© VDI Verlag GmbH · Düsseldorf 2017

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe (Fotokopie, Mikrokopie), der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, im Internet und das der Übersetzung, vorbehalten.

Als Manuskript gedruckt. Printed in Germany.

ISSN 0178-9600

ISBN 978-3-18-329417-6

Acknowledgement

I would like to thank Prof. Dr.-Ing. Kurosch Rezwan for the opportunity of developing this work and his support and overall his patience during the long process of finishing this work accompanying to my job.

I want to thank Prof. Dr.-Ing. Lucio Colombi Ciacchi for agreeing to be my co-examiner. Many thanks go to Dr. Laura Treccani for co-advising and supporting me in my work and above all for her friendship.

I would like to thank all my colleagues during my time in Bremen for the good working atmosphere and all their help. I especially thank Cristian Nuortila, Christian Ellenberg and Tina Kühn for their support in lab-related problems.

I would like to thank Dr. Armin Kirsten for proof-reading part of this work.

I am grateful to all my friends and family who constantly motivated me to finish this work.

I want to thank Michael Gödiker for proof-reading part of this work, his support and patience in the last months, and for calming me down in stressful moments.

I thank my father Uwe Müller for his support during my whole career.

I want to dedicate this work to my late mother Bettina Müller who always encouraged me in my scientific work.

Table of Contents

SUMMARY	VIII
ZUSAMMENFASSUNG	IX
1 INTRODUCTION	1
1.1 MOTIVATION	1
1.2 AIMS OF THIS THESIS	2
2 BASICS	4
2.1 BONE.....	4
2.2 BONE REPLACEMENT	5
2.2.1 <i>Natural bone replacement materials</i>	6
2.2.2 <i>Synthetic bone replacement materials</i>	7
2.3 BIOFUNCTIONALISATION OF BONE REPLACEMENTS.....	9
2.4. CALCIUM PHOSPHATES	10
2.4.1 <i>Hydroxyapatite (Ca₅(PO₄)₃OH)</i>	10
2.4.2 <i>β-Tricalcium phosphate (β-Ca₃(PO₄)₂)</i>	11
2.5 PROTEINS	12
2.5.1 <i>Bovine serum albumin (BSA)</i>	13
2.5.2 <i>Lysozyme (LSZ)</i>	14
3 METHODS	15
3.1 POWDER CHARACTERISATION.....	15
3.1.1 <i>Zeta potential</i>	15
3.1.2 <i>Particle size measurement</i>	18
3.1.3 <i>Density</i>	18
3.2 SCAFFOLD FABRICATION	19
3.2.1 <i>State of the art</i>	19
3.2.2 <i>Freeze gelation process</i>	19
3.3 SCAFFOLD CHARACTERISATION	20
3.3.1 <i>Scaffold material properties</i>	20
3.3.1.1 Porosity	20
3.3.1.2 Mechanical stability	21
3.3.2 <i>Scaffolds' biocompatibility</i>	23
3.3.2.1 Ultraviolet-visible spectroscopy (UV/VIS)	23
3.3.2.2 In vivo experiments	24

3.3.2.3 Antibacterial properties.....	25
4 EXPERIMENTAL	27
4.1 CHARACTERISATION OF CALCIUM PHOSPHATE POWDERS	27
4.2 COMBINED ZETA POTENTIAL / VIS SPECTROSCOPY MEASUREMENTS	28
4.2.1 <i>Material</i>	28
4.2.2 <i>Methods</i>	28
4.3 SCAFFOLD FABRICATION BY FREEZE GELATION (FG).....	29
4.3.1 <i>Materials</i>	29
4.3.2 <i>Methods</i>	30
4.4 CHARACTERISATION OF HAP/PROTEIN COMPOSITE STRUCTURE.....	32
4.5 BIAXIAL FLEXURE STRENGTH TESTING.....	33
4.6 PROTEIN AND Ca ²⁺ RELEASE MEASUREMENTS.....	35
4.6.1 <i>Quantification of release of HAp/protein scaffolds</i>	35
4.6.2 <i>Release reference measurements under bacterial testing conditions</i>	35
4.7 IN VIVO ASSESSMENT	36
4.8. BACTERIAL TESTS.....	37
4.8.1 <i>Materials</i>	37
4.8.2 <i>Methods</i>	37
5 RESULTS	39
5.1 PROTEIN ADSORPTION ON CALCIUM PHOSPHATE	39
5.1.1 <i>Physical properties of calcium phosphate powders</i>	39
5.1.2 <i>Combined zeta potential / VIS spectroscopy measurements</i>	41
5.2 FABRICATION AND CHARACTERISATION OF HYDROXYAPATITE/PROTEIN SCAFFOLDS.....	47
5.2.1 <i>Fabrication process and composite structure</i>	48
5.2.2. <i>Mechanical strength</i>	49
5.2.3 <i>Protein release</i>	52
5.2.4 <i>In vivo assessment</i>	53
5.3 FUNCTIONALISATION OF SCAFFOLDS WITH ACTIVE BIOMOLECULES.....	56
5.3.1 <i>Scaffold characterisation</i>	56
5.3.2 <i>Bacterial tests</i>	59
6 DISCUSSION	64
6.1 PROTEIN ADSORPTION ON CALCIUM PHOSPHATE	64
6.2 FABRICATION AND CHARACTERISATION OF HYDROXYAPATITE/PROTEIN SCAFFOLDS	69
6.3 FUNCTIONALISATION OF SCAFFOLDS WITH ACTIVE BIOMOLECULES.....	72

CONCLUSIONS	76
OUTLOOK	78
APPENDICES	79
APPENDIX A	79
APPENDIX B	80
REFERENCES	81
AUTHOR'S PUBLICATIONS	93

Summary

As today's synthetic bone implants fulfil the requirements for the repair of bone defects only in part, this work aims at the fabrication of bone replacement materials with bone-like properties regarding composition, structure, mechanical stability, and resorbability. As appropriate fabrication method, the slurry-based freeze gelation process was chosen. It allows the direct incorporation of active bio-relevant compounds, such as proteins, during scaffold processing. The process, moreover, enables the fabrication of complex-shaped and open-porous scaffolds. As they are biocompatible and resorbable calcium phosphate and protein were selected as principal components for the scaffolds.

In the first part of this work the interaction of calcium phosphate and protein in suspension was investigated by combining zeta potential and VIS spectroscopy measurements. Two at neutral pH oppositely charged model proteins, bovine serum albumin with an acidic and lysozyme with an alkaline isoelectric point, were employed to investigate the protein adsorption behaviour of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate, the most relevant calcium phosphates for the fabrication of bone implants. Both calcium phosphate powders could bind sufficient amounts of acidic and alkaline protein.

Based on this knowledge calcium phosphate/protein scaffolds were fabricated by freeze gelation process and their suitability as bone replacement material investigated by different methods. It is shown that the hydroxyapatite/protein composites feature porosities from 50% to 70% and a mechanical strength ranging from 2 to 6 MPa comparable to that of human spongy bone. Scaffold biocompatibility and resorption behaviour were assessed by *in vivo* tests with adult domestic pigs. After implantation, composites were resorbed up to 50 % after only 4 weeks and up to 65 % after 8 weeks. In addition, 14 % new bone formation after 4 weeks and 37 % after 8 weeks were detected.

Finally, to verify that the processing does not impair biomolecule activity, the antibacterial effectiveness of hydroxyapatite/lysozyme scaffolds was tested. Therefore different amounts of lysozyme from 0.5 to 2.5 wt.% were incorporated into HAp scaffolds. A complete dieback of *M. luteus* bacteria when in contact with the scaffolds was observed, higher lysozyme content leading to faster dieback. The lysozyme

release from the scaffolds by degrees over a time period of at least 9 days proofs the scaffolds attractiveness as depot for localised drug delivery of antibacterial-effective and bone-growth-enhancing drugs.

Zusammenfassung

Da heutige synthetische Knochenimplantate die Anforderungen für die Heilung von Knochendefekten nur teilweise erfüllen, ist das Ziel dieser Arbeit, Knochenersatzmaterialien mit knochenähnlichen Eigenschaften, in Bezug auf Materialzusammensetzung, Aufbau, Festigkeit und Resorbierbarkeit, herzustellen. Als geeignete Herstellungsmethode wurde das Gefriergelieren ausgewählt, ein auf Schlickertechnik basierender Prozess. Beim Gefriergelierprozess können aktive Biomoleküle, wie zum Beispiel Proteine, in das Keramikgerüst eingelagert werden. Darüber hinaus ermöglicht der Prozess die endkonturnahe Herstellung komplex geformter und offenporöser Komposite. Wegen ihrer Biokompatibilität und Resorbierbarkeit wurden Calciumphosphate und Proteine als Hauptbestandteile für die Komposite ausgewählt.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Wechselwirkungen von Calciumphosphat und Proteinen in Suspension mit Zetapotential- und VIS-Spektrometriemessungen untersucht. Dafür wurden zwei bei pH 7 entgegengesetzt geladene Modell-Proteine, bovines Serumalbumin mit isoelektrischem Punkt im Sauren und Lysozym mit isoelektrischem Punkt im Basischen, und zwei Calciumphosphate, Hydroxyapatit und β -Tricalciumphosphat, die größte Bedeutung für die Herstellung von Knochenimplantaten haben, ausgewählt. Beide Calciumphosphatpulver konnten in ausreichendem Maße saures und alkalines Protein binden.

Basierend auf diesen Voruntersuchungen wurden Calciumphosphat/Protein-Komposite mittels Gefriergelierprozess hergestellt und ihre Eignung für die Anwendung als Knochenersatzmaterial geprüft. Es zeigte sich, dass die Komposite mit ihrer Porosität von 50% bis 70% und ihrer Biegefestigkeit von 2 bis 6 MPa vergleichbar mit humaner *Spongiosa* sind. Die Biokompatibilität und Degradierbarkeit wurde durch

in vivo Untersuchungen mit Hausschweinen getestet. Nach Implementierung wurden die Komposite bis zu 50 % nach 4 Wochen und bis zu 65 % nach 8 Wochen resorbiert. Zusätzlich konnte im Wundbereich nach 4 Wochen bis zu 14 % und nach 8 Wochen bis zu 37 % neue Knochenbildung nachgewiesen werden.

Abschließend wurden die antibakteriellen Eigenschaften von Hydroxyapatit/Lysozym-Kompositen geprüft, um sicherstellen zu können, dass der Gefrierelieprozess die Biomolekül-Aktivität nicht beeinträchtigt. Dafür wurden Komposite mit 0,5 bis 2,5 Gew.% Lysozym hergestellt und in Kontakt mit Bakterien gebracht. Bei *M. luteus* Bakterien führte der Kontakt mit den Kompositen zu einem vollständigen Absterben, welches umso schneller von statten ging je höher die Lysozym-Konzentration in den Kompositen war. Da gezeigt werden konnte, dass Lysozym nur allmählich von den Kompositen über einen Zeitraum von bis zu 9 Tagen abgegeben wird, sind die Komposite interessant als Depots für die direkte Abgabe von antibakteriellen und knochenwachstumsanregenden Wirkstoffen im Wundbereich.