

Doctoral Thesis ETH No. 16914

Multifunctional Titanium Dental Implant Surface Based on Biochemically Modified Molecular Assembly Systems

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
Martin Schuler
Dipl.Werkstoff-Ing. ETH
born May 18th, 1973
citizen of Davos GR, Switzerland

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Marcus Textor, examiner
Prof. Dr. Donald M. Brunette, co-examiner
Prof. Dr. Viola Vogel, co-examiner
Dr. Marco Wieland, co-examiner
Dr. Samuele Tosatti, co-examiner

Zürich, November 1st, 2006

Abstract

The success of a titanium dental implant depends on its strong anchorage to the surrounding bone to withstand the continuous cyclic loading that occurs during mastication. Several factors, such as surgical technique, implant design, surface topography and surface (bio)chemistry are known to influence cellular processes and tissue formation at the implant-body interface during healing. In particular, surface topography and surface (bio)chemistry may exert significant effects on these processes. Thus, an improved osseointegration capacity of the implant is envisaged through topographical and/or (bio)chemical surface modification.

We modified the surface (bio)chemistry of smooth and rough (SLA; particle-blasted and acid-etched) titanium surfaces using the non-fouling polycationic co-polymer poly(L-lysine)-*graft*-poly(ethylene glycol) (PLL-*g*-PEG) known to impart protein resistance to negatively charged surfaces (e.g., titanium dioxide). Cell-interactive peptides with the RGD, KRSR and FHRRIKA motives were covalently grafted to a fraction of the PEG-chains. The functional co-polymers with and without peptide functionalities were assembled in a one-step assembly process in aqueous solution on negatively charged titanium oxide surfaces. The rationale behind this approach was to be able to study the interaction of single or multiple types of bioligands at quantitatively controlled surface densities with cells *in vitro*, without the interference produced by non-specific protein (serum) adsorption.

We investigated cell adhesion and spreading patterns of porcine epithelial cells, 3T3 fibroblasts and rat calvarial osteoblasts on RGD-modified smooth and SLA titanium surfaces. Our findings demonstrated that surface topography and (bio)chemistry directly influenced the attachment and morphology of all cell types tested after 24 hours in culture. In general, an increase in cell number and fraction of spread cells was observed on bioactive substrates (containing the cell-adhesive RGD-peptide sequence) when compared to bio-inactive surfaces, i.e., unfunctionalized PLL-*g*-PEG and RDG-functionalized (scrambled peptide) surfaces. More 3T3 fibroblasts were present on smooth than on rough topographies, whereas more rat calvarial osteoblasts attached to rough than to smooth surfaces. Porcine epithelial cell attachment did not follow any regular pattern. Footprint areas for all cell types were significantly reduced on rough compared to smooth surfaces. Rat calvarial

osteoblast attachment and footprint areas increased with increasing RGD-peptide surface density. However, no synergy between RGD-peptide surface density and surface topography was observed for either the attachment or footprint area of rat calvarial osteoblasts.

The novel consensus heparin-binding peptides sequences KRSR and FHRIKKA were also immobilized via PLL-*g*-PEG chemistry to SLA titanium surfaces and tested for their ability to support rat calvarial osteoblast and human gingival fibroblast proliferation after 7 days in culture. Cell-binding peptide sequence RGD in combination with KRSR or FHRIKKA was used to examine a possible enhanced effect on rat calvarial osteoblast attachment and proliferation. In addition, freshly harvested bone chips from newborn rat calvariae were placed onto similar functionally modified rough titanium substrates and the size and pattern of osteoblast outgrowths were studied. Our findings demonstrated that the difference in rat calvarial osteoblast and human gingival fibroblast attachment was influenced mostly by surface topography rather than by the presence of the KRSR- and FHRIKKA-peptides. In contrast to rat calvarial osteoblast cell lines, outgrowths of osteoblasts from fragments of rat calvariae attached to pure heparin-binding peptides KRSR and FHRIKKA coated surfaces. In comparison with the control surfaces KSSR, RFHARIK and PEG, osteoblast outgrowths from rat calvarial bone chips covered a significantly larger area on RGD-, KRSR- and FHRIKKA-containing surfaces after 8 days and also migrated in an isotropic way unlike cells on the bio-inactive substrates. Furthermore, the stimulatory effect of RGD on both rat calvarial osteoblast attachment and migration pattern could be enhanced when applied in combination with KRSR.

MG63 osteoblast-like cells on PLL-*g*-PEG coatings showed increased ALP activity as well as increased osteocalcin, total TGF- β 1 and prostaglandin E₂ production compared to cells on unmodified SLA titanium after 8 days in culture. However, the introduction of the KRSR-peptide at different concentrations did not show any further up (or down) regulation of these markers. Additionally, MG63 osteoblast-like cells did not show any increased attachment or synergistic effect on osteoblast markers on RGD/KRSR surfaces in comparison to PEGylated control surfaces (e.g., RGD/KSSR).

For designing a dental implant surface to serve patients that have an impaired bone forming or wound healing capacity, as those suffering from osteoporosis or diabetes, a surface modification using peptides only, is probably not sufficient. A surface with a therapeutic effect by additional functionalities such as growth factors might

be required to rapidly stimulate the formation of the desired tissue at the interface. Therefore, two new surface modification strategies using PLL-*g*-PEG chemistry were developed within this thesis: first, TG-modified (Transglutaminase substrate site) vascular endothelial growth factor (VEGF) was coupled to PLL-*g*-PEG coated titanium surfaces through the transglutaminase factor XIII. Coupling of VEGF to the PEG was demonstrated by SDS-page gel and Western blot analysis as well as by the optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS) technique. Second, model drug delivery carriers (polystyrene microspheres) were coated with PLL-*g*-PEG/PEG-TG and coupled to PLL-*g*-PEG/PEG-Lyspep (cleavable Lys-containing peptide sequence) modified titanium surfaces. Successful coupling and immobilization of drug delivery carriers was shown on patterned surfaces produced by the molecular assembly patterning by lift-off (MAPL) technique.

In conclusion, the results of this thesis demonstrate that cell attachment to titanium surfaces can be facilitated through incorporation of cell binding peptide, such as RGD onto a PLL-*g*-PEG system that resists non-specific protein adsorption. Moreover, other peptides, such as KRSR and FHRRIKA, can be grafted onto the PLL-*g*-PEG system and modify cell migration and attachment for primary rat osteoblasts. Preliminary results have also shown that growth factors or drug delivery carriers can also be attached to PLL-*g*-PEG, thus demonstrating that in principle it should be possible to provide cells on the titanium surface with suitable attachment factors, growth factors, and other components to enhance osseointegration.

Kurzfassung

Der Erfolg eines Zahnimplantates aus Titan ist abhängig von einer starken Verankerung im umgebenden Knochengewebe, um den während des Kauvorgangs kontinuierlichen zyklischen Belastungen zu widerstehen. Viele Faktoren beeinflussen die zellulären Prozesse und die Gewebeentwicklung an der Grenzfläche zwischen Implantat und Körper während des Einheilens: Operationstechnik, Implantatdesign, Oberflächentopographie und Oberflächen(bio)chemie sind die wichtigsten davon. Vor allem Oberflächentopographie und Oberflächen(bio)chemie haben einen grossen Einfluss, und deshalb kann eine verbesserte Osseointegrationskapazität des Implantats durch topographische und/oder (bio)chemische Oberflächenmodifikation erreicht werden.

Wir modifizierten die (Bio)chemie von glatten und rauhen (SLA; partikel-gestrahlt und säure-geätzt) Titanoberflächen mittels des “non-fouling” polykationischen Copolymers Poly(L-Lysin)-*pfropf*-Poly(Ethylen) Glykol. Dieses Polymer adsorbiert spontan auf negativ geladenen Oberflächen wie Titandioxid und verleiht dadurch einen hohen Grad an Resistenz gegen unspezifische Proteinadsorption. Zellinteraktive Peptidsequenzen wie RGD, KR₂SR und FHRRIKA wurden kovalent an einen Bruchteil der PEG-Ketten gebunden. Die funktionsfähigen Copolymere mit und ohne Peptidfunktionalisierung wurden in einem Schritt in wässriger Lösung auf negativ geladenen Titandioxidoberflächen adsorbiert. Das Grundprinzip dieses Ansatzes liegt in der Möglichkeit, die Interaktion von einzelnen oder mehreren Bioligandtypen (mit quantitativ kontrollierter Oberflächendichte) mit Zellen *in vitro* zu studieren und das ohne störenden Einfluss von unspezifisch adsorbierten (Serum)proteinen.

Wir untersuchten Zelladhäsion und -ausbreitungsmuster von Schweineepithelzellen, 3T3 Fibroblasten und Rattenkalvarialosteoblasten auf RGD-modifizierten glatten und SLA Titanoberflächen. Unsere Ergebnisse demonstrierten, dass die Oberflächentopographie und die Oberflächen(bio)chemie das Anhaften und die Morphologie aller getesteten Zelltypen nach 24 h in Kultur beeinflussten. Allgemein wurde eine Erhöhung der Zellanzahl und mehr ausgespreizte Zellen auf bioaktiven (mit zell-adhäsivem RGD-Peptid) im Vergleich zu bio-inaktiven (i.e., unfunktionalisierten PLL-*g*-PEG und R₂DG-funktionalisierten) Oberflächen gefunden. Mehr 3T3 Fibroblasten waren präsent auf glatten als auf rauhen Topographien, während mehr Rat-

tenkalvarialosteoblasten auf rauhen als auf glatten Oberflächen gefunden wurden. Schweineepithelzellen zeigten kein reguläres Muster. Die Fläche der Fussabdrücke aller Zelltypen war auf rauhen Oberflächen signifikant kleiner als auf glatten Oberflächen. Die Zellanzahl und die Fläche der Fussabdrücke von Rattenkalvarialosteoblasten nahm mit steigender RGD-Peptidoberflächendichte zu. Jedoch wurde keine Synergie zwischen RGD-Peptidoberflächendichte und Oberflächentopographie beobachtet, weder für die Zellanhaftung noch für die Grösse der Fussabdrücke von Rattenkalvarialosteoblasten.

Die neuartigen, mutmasslichen heparin-bindenden Peptidsequenzen KR₂SR und FHRRIKA wurden auch mittels PLL-*g*-PEG-Chemie auf SLA Titanoberflächen immobilisiert. Die Proliferation von Rattenkalvarialosteoblasten und menschlichen Zahnfleischfibroblasten nach 7 Tagen in Kultur wurde getestet. Die zell-bindende RGD-Peptidsequenz wurde in Kombination mit KR₂SR und FHRRIKA benützt, um einen möglichen synergetischen Effekt auf Rattenkalvarialosteoblastproliferation zu untersuchen. Zusätzlich wurden frisch geerntete Knochenchips aus Kalvariaknochen von neugeborenen Ratten auf gleich modifizierte rauhe Titanoberflächen gelegt und die Grösse und das Muster der ausgewachsenen Osteoblasten studiert. Unsere Resultate demonstrierten, dass der Unterschied im Anhaften von Rattenkalvarialosteoblasten und menschlichen Zahnfleischfibroblasten stärker durch die Oberflächenrauigkeit als durch die Präsenz von KR₂SR- und FHRRIKA-Peptiden beeinflusst wurde.

Im Gegensatz zu Osteoblasten aus Zelllinien hafteten Osteoblasten, welche aus Kalvariaknochenfragmenten auswuchsen, auf reinen mit heparin-bindenden KR₂SR- und FHRRIKA-Peptiden beschichteten Oberflächen. Im Vergleich zu den mit KR₂SR, RFHARIK und PEG beschichteten Kontrolloberflächen bedeckten Osteoblastauswüchse von Rattenkalvariaknochen auf RGD-, KR₂SR- und FHRRIKA-Oberflächen eine signifikant grössere Fläche nach 8 Tagen und migrierten isotropisch im Gegensatz zu Zellen auf bio-inaktiven Substraten. Ausserdem konnte der stimulierende Effekt von RGD in Kombination mit KR₂SR erhöht werden, was durch erhöhte Rattenkalvarialosteoblastanhaftung und ausgedehntere Migrationsmuster demonstriert wurde.

MG63 osteoblast-ähnliche Zellen zeigten erhöhte ALP-Aktivität als auch erhöhte Osteokalzin-, totale TGF- β 1- und Prostaglandin E₂-werte auf PLL-*g*-PEG-Beschichtungen im Vergleich mit Zellen auf unmodifizierten SLA Titanoberflächen nach 8 Tagen in Kultur. Allerdings konnte keine Auf- oder Abregulierung dieser

Zellmarker durch die Immobilisation von KRSR-Peptiden in verschiedenen Konzentrationen festgestellt werden. Auch wurde durch die Präsentation von gemischten RGD/KRSR-Oberflächen im Vergleich zu PEGylierten Kontrolloberflächen (e.g., RGD/KSSR) weder eine erhöhte Zellanhaftung von MG63 Zellen, noch ein etwaiger synergetischer Effekt auf Osteoblastmarker gefunden.

Für das Design einer neuartigen Zahnimplantatoberfläche, um Patienten mit beeinträchtiger Knochenausprägung oder Wundheilungskapazität zu bedienen, ist eine Oberflächenmodifikation durch Peptide möglicherweise nicht ausreichend. Eine Oberfläche mit einem therapeutischen Effekt, der durch zusätzliche Funktionalisierung wie beispielsweise Wachstumsfaktoren erreicht werden könnte, dürfte notwendig sein, um eine rasche Ausbildung des gewünschten Gewebes an der Grenzfläche zu gewährleisten. Daher wurden zwei neue Oberflächenmodifikationsstrategien durch PLL-*g*-PEG-Chemie innerhalb dieser Arbeit entwickelt: erstens wurde TG-modifizierter (Transglutaminase) vaskulärer Endothelialwachstumsfaktor (VEGF) an PLL-*g*-PEG beschichtete Titanoberflächen durch den Transglutaminasefaktor XIII gebunden. Die Kopplung von VEGF zu PEG wurde durch SDS-page Gel und Western Blot Analyse sowie durch Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy (OWLS) Technik demonstriert. Zweitens, wurden Testträger für Medikamenttransport (engl.: drug delivery carrier) mit PLL-*g*-PEG/PEG-TG beschichtet und an PLL-*g*-PEG/PEG-Lyspeptid (spaltbare Lysin-enthaltende Peptidsequenz) modifizierte Titanoberflächen gekoppelt. Eine erfolgreiche Kopplung und die Immobilisierung von den drug delivery carriern wurde mittels gerasterten Oberflächen, welche durch die Molecular Assembly Patterning by Lift-off Technik (MAPL) produziert wurden, gezeigt.

Zusammengefasst demonstrierten die Resultate dieser Arbeit, dass durch zellbindende RGD-Peptide mittels PLL-*g*-PEG-Chemie eine Zellanhaftung an Titanoberflächen vereinfacht werden kann und zugleich die Oberfläche resistant gegen unspezifische Proteinadsorption ist. Ausserdem können auch andere Peptidsequenzen wie KRSR und FHRRKA an PLL-*g*-PEG-Polymere gebunden werden und dadurch Zellmigration und Zellanhaftung für primäre Rattenosteoblasten modifiziert werden. Vorläufige Resultate haben ausserdem gezeigt, dass Wachstumsfaktoren oder drug delivery carrier auch an PLL-*g*-PEG gekoppelt werden können und es dadurch prinzipiell möglich sein wird, geeignete Faktoren, Wachstumsfaktoren und andere Komponenten auf einer Titanoberfläche den Zellen anzubieten, und damit die Osseointegration zu verbessern.