



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 34 739 T2** 2007.05.10

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 716 610 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 34 739.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/09330**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 929 728.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/005846**

(86) PCT-Anmeldetag: **19.08.1994**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **02.03.1995**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **19.06.1996**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **17.05.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.05.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61K 38/18** (2006.01)  
**A61L 27/00** (2006.01)

(30) Unionspriorität:  
**112492**                      **26.08.1993**                      **US**

(73) Patentinhaber:  
**Genetics Institute, LLC, Cambridge, Mass., US;**  
**The Board of Trustees of the University of Illinois,**  
**Urbana, Ill., US**

(74) Vertreter:  
**Vossius & Partner, 81675 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,**  
**MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:  
**WANG, A., Elizabeth, Carlisle, MA 01741, US;**  
**D'ALESSANDRO, S., Josephine, Marblehead, MA**  
**01945, US; TORIUMI, Dean, Riverside, IL 60546, US**

(54) Bezeichnung: **Menschliche Knochen-morphogenetische Proteine zur Verwendung bei neuronaler Regeneration**

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]** Die vorliegende Erfindung betrifft das folgende Gebiet:

- (i) ein Verfahren zum Induzieren der Bildung von Astrocyten in vitro, umfassend das Verabreichen eines knochen-morphogenetischen Proteins an geeignete Zellen unter Beimischung eines pharmazeutisch verträglichen Vehikels;
- (ii) Verwendung eines knochen-morphogenetischen Proteins für die Herstellung einer Zusammensetzung zur Induktion des Wachstums oder der Regeneration von Astrocytenzellen;
- (iii) das Verfahren gemäß (i), vorstehend, oder die Verwendung gemäß (ii), vorstehend, wobei das knochen-morphogenetische Protein BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7 oder ein Heterodimer von BMP-2/6 oder BMP-2/7 ist;
- (iv) eine Vorrichtung zum Induzieren der Regeneration von peripheren Nerven in vivo, umfassend ein künstliches Gefäß, das ein knochen-morphogenetisches Protein enthält, ausgewählt aus BMP-2, BMP-4 oder einem Heterodimer von BMP-2/6 oder BMP-2/7, das an eine Matrix adsorbiert ist, die Kollagen, Fibringewebekleber, Laminin, Hyaluronsäure oder Chondroitinsulfat-Proteoglycane umfaßt;
- (v) die Vorrichtung gemäß (iv), vorstehend, wobei die Matrix Kollagen in Form eines Schwamms umfaßt;
- (vi) die Vorrichtung gemäß (iv) oder (v), vorstehend, wobei das künstliche Gefäß einen belüfteten Silasticschlauch umfaßt;
- (vii) Verwendung eines knochen-morphogenetischen Proteins, ausgewählt aus BMP-2, BMP-4 oder einem Heterodimer von BMP-2/6 oder BMP-2/7, in einem belüfteten Silasticschlauch für die Herstellung einer medizinischen Vorrichtung zum Induzieren der Regeneration von peripheren Nerven in vivo;
- (viii) Verwendung gemäß (vii), vorstehend, wobei das knochen-morphogenetische Protein an eine Matrix adsorbiert ist, die Kollagen, Fibringewebekleber, Laminin, Hyaluronsäure oder Chondroitinsulfat-Proteoglycane umfaßt, und die in dem belüfteten Silasticschlauch enthalten ist.

**HINTERGRUND**

**[0002]** Die knochenmorphogenetischen Proteine 2 bis 10 sind Mitglieder der Superfamilie von transformierendem Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Die BMPs wurden ursprünglich als osteogene Proteine entdeckt, die in der Lage waren, die Knochenbildung in vivo zu induzieren. Die transformierenden Wachstumsfaktoren wurden ursprünglich auf der Basis ihrer Fähigkeit identifiziert, die phänotypische Transformation von Säugerzellen zu induzieren, die in Gewebekultur gezüchtet wurden, ein Phänomen, das traditionell mit in-vivo-Veränderungen von normalem zu Tumorzellwachstum assoziiert wurde.

**[0003]** Astrocyten sind ein Typus von Gliazellen, die im Nervensystem gefunden werden und die bei der axonalen Leitung, bei der Stimulierung des Auswachsens von Neuriten, bei der Morphogenese und Migration von Neuronen eine Funktion haben. Die Astrocyten spielen auch bei der Induktion der vaskulären Blut-Hirn-Schranke des Endothels und beim Transport von Blut zu Neuronen eine Rolle. Astrocyten exprimieren ein intermediäres Filament-Protein des Cytoskeletts, das gliale fibrilläre saure Protein (GFAP), ein sehr spezifischer Marker für Astrocyten.

**[0004]** Klassisch wurden durch ihre Lage und Morphologie zwei Arten von Astrocyten beschrieben. Protoplasmische Astrocyten werden üblicherweise in der grauen Substanz gefunden und haben dicke, intensiv verzweigte Fortsätze, während fibröse Astrocyten in der weißen Substanz gefunden werden und lange gerade Fortsätze haben. Astrocyten, die aus dem optischen Nerv isoliert wurden, wurden antigen auf der Basis ihrer Färbung für GFAP und den Oberflächenmarker A2B5 als Typ 1 und Typ 2 beschrieben. Da sie von zwei verschiedenen Entwicklungsstammes zu unterschiedlichen Zeiten stammen, färben sich Astrocyten von Typ 1 nur für GFAP, während sich Astrocyten von Typ 2 für A2B5 und GFAP färben. Astrocyten stellen eine für das Axonwachstum förderliche Umgebung bereit, was ein wichtiger Aspekt der Nervenregeneration ist. Somit sind das Überleben und die Differenzierung von Astrocyten wichtige Faktoren bei der Fähigkeit von neuronalen Zellen und Geweben zum Überleben und Regenerieren. Silver et al., US-Patent 5,202,120 beschreiben ein Verfahren unter Verwendung von aktivierten Astrocyten, um die Regeneration von Axonen zu fördern. Dieses Verfahren ist jedoch insofern von Nachteil, weil es Astrocyten bereit stellen muß, zum Beispiel durch autologe Transplantation.

**ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG**

**[0005]** Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, Zusammensetzungen bereit zu stellen, die in der Lage sind, das Wachstum von neuronalen Zellen zu induzieren. Es ist ein anderes Ziel der vorliegenden Erfindung, Zusammensetzungen bereit zu stellen, die für die Erzeugung von Nervenzellen und Nervengewebe und für die

Reparatur von neuronalen Defekten geeignet sind.

**[0006]** In ihren verschiedenen Ausführungsformen betrifft die vorliegende Erfindung das folgende Fachgebiet:

- (i) ein Verfahren zum Induzieren der Bildung von Astrocyten *in vitro*, umfassen das Verabreichen eines knochen-morphogenetischen Proteins an geeignete Zellen unter Beimischung eines pharmazeutisch verträglichen Vehikels;
- (ii) Verwendung eines knochen-morphogenetischen Proteins für die Herstellung einer Zusammensetzung zur Induktion des Wachstums oder der Regeneration von Astrocytenzellen;
- (iii) das Verfahren gemäß (i), vorstehend, oder die Verwendung gemäß (ii), vorstehend, wobei das knochen-morphogenetische Protein BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7 oder ein Heterodimer von BMP-2/6 oder BMP-2/7 ist;
- (iv) eine Vorrichtung zum Induzieren der Regeneration von peripheren Nerven *in vivo*, umfassend ein künstliches Gefäß, das ein knochen-morphogenetisches Protein enthält, ausgewählt aus BMP-2, BMP-4 oder einem Heterodimer von BMP-2/6 oder BMP-2/7, das an eine Matrix adsorbiert ist, die Kollagen, Fibringewebekleber, Laminin, Hyaluronsäure oder Chondroitinsulfat-Proteoglycane umfaßt;
- (v) die Vorrichtung gemäß (iv), vorstehend, wobei die Matrix Kollagen in Form eines Schwamms umfaßt;
- (vi) die Vorrichtung gemäß (iv) oder (v), vorstehend, wobei das künstliche Gefäß einen belüfteten Silasticschlauch umfaßt;
- (vii) Verwendung eines knochen-morphogenetischen Proteins, ausgewählt aus BMP-2, BMP-4 oder einem Heterodimer von BMP-2/6 oder BMP-2/7, in einem belüfteten Silasticschlauch für die Herstellung einer medizinischen Vorrichtung zum Induzieren der Regeneration von peripheren Nerven *in vivo*;
- (viii) Verwendung gemäß (vii), vorstehend, wobei das knochen-morphogenetische Protein an eine Matrix adsorbiert ist, die Kollagen, Fibringewebekleber, Laminin, Hyaluronsäure oder Chondroitinsulfat-Proteoglycane umfaßt, und die in dem belüfteten Silasticschlauch enthalten ist.

**[0007]** Hinsichtlich der Matrix der Vorrichtung für die Induzierung der Regeneration von peripheren Nerven besteht die besagte Matrix aus einem geeigneten Material, das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Kollagen, Fibringewebekleber, den Komponenten der normalen endoneuronalen Scheide, Laminin, Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat-Proteoglycane, einschließlich Versican. Tona et al., *J. Histochemistry and Cytochemistry*, 41: 593–599 (1993). Bei der am meisten bevorzugten Ausführungsform besteht die Matrix aus vernetztem Kollagen. Das Kollagen kann in jeder geeigneten Form sein, ist aber vorzugsweise in der Form eines Schwamms. Das Kollagen kann in einer für die Regeneration von Nervengewebe geeigneten Form geformt sein. Die Matrix mit adsorbiertem BMP kann in ein künstliches Gefäß für den Ersatz von Nerven gebracht werden, das die Matrix und BMP enthält. Das künstliche Gefäß für den Ersatz von Nerven ist vorzugsweise in der Form eines Schlauchs oder Stents wie einem belüfteten Silasticschlauch.

#### AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0008]** Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben überraschenderweise gefunden, daß die BMPs, insbesondere BMP-2, BMP-4 und Heterodimere von BMP-2/6 und BMP-2/7, zur Verbesserung der Nervenregeneration verwendet werden können. Nervenzellen proliferieren nach einer Verletzung nicht ordnungsgemäß und die physiologische Reparatur unter Verwendung von mikrochirurgischen Techniken resultiert oft in nicht perfekten funktionellen Resultaten, trotz optimaler Pflege. Nervengewebe muß vor der Reparatur neu vaskularisiert werden. Die Neuvaskularisierung tritt bei Nerven viel später auf als bei anderen biologischen Systemen, was die anfängliche axonale Reparatur verlangsamt und oft die irreparable und zeitabhängige Atrophie der motorischen Endplatte ermöglicht. Weiterhin kann das sich schneller bildende fibrotische Narbengewebe den Erfolg der natürlicherweise ablaufenden Nervenregeneration verhindern. Folglich stellt die Verwendung von BMPs zur Erhöhung und Beschleunigung der Nervenreparatur ein Verfahren zur Verbesserung der Nervenreparatur dort bereit, wo sie sonst nicht eintreten würde.

**[0009]** Die DNA-Sequenzen der BMPs sind bekannt und wurden wie folgt beschrieben: BMP-2 (manchmal als BMP-2A bezeichnet) und BMP-4 (manchmal als BMP-2B bezeichnet), US-Patent Nr. 5,013,649; BMP-3, US-Patent Nr. 5,116,738; BMP-5, US-Patent Nr. 5,106,748; BMP-6, US-Patent Nr. 5,187,076; BMP-7, US-Patent Nr. 5,141,905; BMP-8, PCT-Veröffentlichung Nr. WO 93/00432; BMP-9, WO 95/33830. Heterodimere und BMP-10 sind im Stand der Technik ebenfalls bekannt.

**[0010]** Rekombinantes menschliches BMP wie rhBMP-2 kann zur Verwendung bei dem Verfahren der Erfindung durch Expression der DNA-Sequenzen, die BMP codieren, in einer geeigneten, transformierten Wirtszelle hergestellt werden. Zum Beispiel kann unter Verwendung von bekannten Verfahren die DNA, die BMP-2 codiert, mit einem Expressionsvektor wie pED (Kaufmann et al., *Nucleic Acids Res.* 19, 4484–4490 (1991)) ver-

knüpft werden, in eine Wirtszelle transformiert werden und die Expression des Proteins kann induziert und maximiert werden. Natürlich können degenerierte DNA-Sequenzen, die menschliches BMP codieren, ebenfalls verwendet werden, um rhBMP zu produzieren, ebenso wie DNA-Sequenzen, die allelische Varianten von BMP codieren.

**[0011]** Für die Produktion von rhBMP wie rhBMP-2 zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung kann jeder geeignete Expressionsvektor verwendet werden. Für die Expression in Säugern sind zusätzlich zu dem vorstehend erwähnten pED zahlreiche Expressionsvektoren bekannt, wie z.B. pEF-BOS (Mizushima et al., *Nucleic Acids Res.* 18, 5322 (1990)); pXM, pJL3 und pJL4 (Gough et al., *EMBO J.* 4, 645–653 (1985)); und pMT2 (abgeleitet von pMT2-VWF, ATCC #67122; vgl. PCT/US87?00033). Geeignete Expressionsvektoren für die Verwendung in Hefe-, Insekten- und Bakterienzellen sind ebenfalls bekannt. Die Konstruktion und Verwendung von solchen Expressionsvektoren ist im Stand der Technik bekannt. Rekombinantes BMP wie rhBMP-2 kann auch unter Verwendung einer chimären DNA-Sequenz produziert werden, die reifes BMP produziert und die operativ mit einem Propeptid von einem anderen BMP verknüpft ist. Vergleiche zum Beispiel US 5,168,050, deren Offenbarung hier durch Bezugnahme eingeschlossen wird.

**[0012]** Geeignete Wirtszellen für die Produktion von BMPs, die bei der vorliegenden Erfindung von Nutzen sind, umfassen zum Beispiel Säugerzellen wie Eierstockzellen des Chinesischen Hamsters (CHO), COS-Zellen des Affen, 3T3-Zellen der Maus, L-Zellen der Maus, Myelomzellen wie NSO (Galfre und Milstein, *Methods in Enzymology* 73, 3–46 (1981)) und dergleichen. RhBMP kann auch durch Transformation von Hefe-, Insekten- und Bakterienzellen mit DNA-Sequenzen, die BMP codieren, Induktion und Amplifikation der Proteinexpression unter Verwendung bekannter Verfahren produziert werden. Wenn es in Bakterienzellen produziert wird, kann es erforderlich sein, das knochenmorphogenetische Protein zu solubilisieren.

**[0013]** Rekombinant produziertes BMP wie rhBMP-2 muß für die Verwendung bei der vorliegenden Erfindung aus dem Kulturmedium oder den Zellextrakten gereinigt werden. Kulturmedium oder Zellextrakte, die rhBMP enthalten, können unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Proteinkonzentrationsfilters konzentriert werden, zum Beispiel einer Amicon- oder Millipore-Pellicon-Ultrafiltrationseinheit. Nach dem Konzentrationsschritt kann das Konzentrat auf eine Reinigungsmatrix wie ein Gelfiltrationsmedium aufgebracht werden. Alternativ kann ein Anionenaustauscherharz verwendet werden, zum Beispiel eine Matrix oder ein Substrat, das anhängende Diethylamino (DEAE)-Gruppen hat. Die Matrices können Acrylamid, Agarose, Dextran, Cellulose oder andere Arten sein, die üblicherweise bei der Proteinreinigung verwendet werden. Alternativ kann ein Kationenaustauscherschritt verwendet werden. Geeignete Kationenaustauscher umfassen verschiedene unlösliche Matrices, die Sulfopropyl- oder Carboxymethylgruppen enthalten. Die Reinigung von BMP aus dem Kulturüberstand kann auch einen oder mehrer Säulenschritte über solche Affinitätsharze wie Lectin-Agarose, Heparin-Toyopearl® oder Cibacromblau 3GA-Sepharose® umfassen; oder durch hydrophobe Chromatographie unter Verwendung von solchen Harzen wie Phenylether, Butylether oder Propylether; oder mittels Immunitätschromatographie. Letztlich können ein oder mehrere Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (RP-HPLC)-Schritte unter Verwendung von hydrophoben RP-HPLC-Medien, z.B. Silicagel, das anhängende Methyl- oder andere aliphatische Gruppen hat, für die weitere Reinigung von BMP für die Verwendung bei den vorliegenden Verfahren verwendet werden. Einige oder alle der vorstehenden Reinigungsschritte können in verschiedenen Kombinationen angewendet werden, um ein im Wesentlichen homogenes, isoliertes rekombinantes Protein bereitzustellen.

**[0014]** BMPs wie rhBMP-2 können bei der Herstellung der Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung für die in vivo-Behandlung von Säugern durch Ärzte bei einer Vielzahl von Krankheitszuständen verwendet werden. Diese Zustände umfassen Krankheiten des peripheren Nervensystems wie periphere Nervenverletzungen, periphere Neuropathien und lokalisierte Neuropathien und Krankheiten des zentralen Nervensystems wie die Alzheimer-, die Parkinson-Krankheit, die Huntington-Krankheit, die amyotrophe Lateralsklerose und das Shy-Drager-Syndrom. Weitere Zustände, die gemäß der vorliegenden Erfindung behandelt werden können, umfassen mechanische und traumatische Störungen wie Störungen des Rückgrats, Kopftraumata und cerebrovaskuläre Störungen wie Schlaganfall. BMPs können zur Verbesserung der Regeneration von Nervenzellen und Nervengewebe verwendet werden, um die Heilung solcher Störungen zu verbessern oder zu beschleunigen.

**[0015]** Gemäß der Erfindung kann BMP wie rhBMP-2 allein, in Kombination mit anderen BMPs oder in Kombination mit anderen Therapien verabreicht werden. Zum Beispiel kann rhBMP-2 bei der Behandlung von neuronalen Krankheiten effizient mit einem Cytokin, Lymphokin, Wachstumsfaktor oder koloniestimulierenden Faktor kombiniert werden. Beispielhafte Cytokine, Lymphokine, Wachstumsfaktoren und koloniestimulierende Faktoren zur Verwendung in Kombination mit BMP gemäß dem Verfahren der Erfindung umfassen ohne Ein-

schränkung EGF, FGF, die Interleukine 1 bis 12, M-CSF, G-CSF, GM-CSF, Stammzellfaktor, Erythropoietin und dergleichen. Außerdem können die BMPs mit neurotrophen Faktoren wie CNTF, LIF, IL-6 und insulinähnlichen Wachstumsfaktoren [IGFs] kombiniert werden. Außerdem können Proteine, die normalerweise in neuronaler Umgebung gefunden werden, gemäß der vorliegenden Erfindung zu den BMPs zugegeben werden. Diese können Laminin, Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat-Proteoglycane, einschließlich Versican, umfassen.

**[0016]** Das BMP der vorliegenden Erfindung kann unter Verwendung einer Matrix verabreicht werden, die in der Lage ist, das BMP in einer gewünschten Lage und Orientierung zu halten, um die Regeneration des neuronalen Gewebes zu erlauben. Das BMP kann vorzugsweise an die Matrix adsorbiert sein. Die Matrix wird hergestellt aus Kollagen, Fibringewebekleber und Komponenten der normalen endoneuronalen Scheide, einschließlich Laminin, Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat-Proteoglycane, einschließlich Versican. Die Matrix kann vorzugsweise porös sein, um den Einstrom, die Migration, die Differenzierung und Proliferation von Zellen zu erlauben, die für die Regeneration von neuronalem Gewebe gebraucht werden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform besteht die Matrix aus vernetztem Kollagen. Das Kollagen kann in jeder geeigneten Form sein, ist aber vorzugsweise in der Form eines Schwamms. Das Kollagen kann in eine geeigneten Form für die Regeneration von Nervengewebe geformt sein. Die Matrix kann Materialien umfassen, um die Bildung von neuronalem Gewebe wie Fibrin oder Venentransplantat zu fördern.

**[0017]** Die Matrix mit absorbiertem BMP wird dann in ein künstliches Gefäß für den Nervenersatz gegeben, vorzugsweise in der Form eines Schlauchs oder Stents wie ein belüfteter Silasticschlauch. Das künstliche Gefäß für den Nervenersatz kann aus jedem Material bestehen, das die Matrix mit absorbiertem BMP an der Stelle halten und die Regeneration von Nervengewebe zulassen wird. Bei einer Ausführungsform kann ein autologes Venentransplantat als Nervenersatzgefäß verwendet werden. Das künstliche Nervenersatzgefäß kann ein resorbierbares Material wie Polymere enthalten. Bei einigen bevorzugten Ausführungsformen kann auch die Matrix als das künstliche Nervenersatzgefäß dienen.

**[0018]** Die Arzneimittel, die zur Verwendung beim Verfahren der vorliegenden Erfindung geeignet sind, können zusätzlich zu dem BMP pharmazeutisch verträgliche Träger, Verdünnungsmittel, Füllstoffe, Salze, Puffer, Stabilisatoren und/oder andere Materialien enthalten, die im Stand der Technik bekannt sind. Der Ausdruck "pharmazeutisch verträglich" bedeutet ein nicht toxisches Material, das nicht mit der Wirksamkeit der biologischen Aktivität des aktiven Inhaltsstoffs/der aktiven Inhaltsstoffe interferiert. Die Charakteristika des Trägers oder von anderen Materialien wird vom Verabreichungsweg abhängen.

**[0019]** Die Verabreichung von BMP wie rhBMP-2 kann mittels einer Vielzahl von herkömmlichen Wegen erfolgen. Für die Regeneration von Nervengewebe, die Behandlung von neuronalem Defekt oder Nervenschädigung wird die topische Verabreichung von BMP bevorzugt. Bei dem am meisten bevorzugten Verabreichungsweg wird BMP an eine biokompatible Matrix adsorbiert und bei einem künstlichen Gefäß für den Nervenersatz angewendet. Die biokompatible Matrix wird vorzugsweise aus Kollagen hergestellt und kann in der Form eines Schwamms, eines Blatts oder einer Matte oder dicht gepackte Partikeln sein. Das künstliche Gefäß für den Nervenersatz kann in der Form eines Schlauchs oder Stents sein. Andere Materialien, die als künstliches Gefäß für den Nervenersatz geeignet sind, werden dem Durchschnittsfachmann auf dem Fachgebiet offensichtlich sein. Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt das künstliche Gefäß für den Nervenersatz einen belüfteten Silasticschlauch, der die Matrix mit absorbiertem BMP enthält. Bei einer anderen bevorzugten Ausführungsform umfaßt das künstliche Gefäß für den Nervenersatz ein autologes Venentransplantat. Bei einigen bevorzugten Ausführungsformen kann das Material als Matrix und künstliches Gefäß für den Nervenersatz dienen.

**[0020]** Die Menge an BMP, die bei der vorliegenden Erfindung von Nutzen ist, wird von der Natur und der Schwere des behandelten Zustands und von der Natur der vorhergehenden Behandlungen abhängen, denen sich der Patient unterzogen hat. Letztendlich wird der behandelnde Arzt über die Menge an BMP entscheiden, mit der einzelne Patient behandelt werden soll. Es ist anzunehmen, daß die verschiedenen Arzneimittel der vorliegenden Erfindung etwa 0,1 µg bis etwa 100 mg, vorzugsweise etwa 0,1 µg bis 100 µg BMP pro kg Körpergewicht enthalten sollten. Das tatsächliche Dosierungsschema wird durch den behandelnden Arzt unter Berücksichtigung verschiedener Faktoren festgelegt, die die Wirkung der Wirkstoffe beeinflussen, z.B. der Zustand, das Körpergewicht, das Geschlecht und die Ernährung des Patienten, die Schwere des Zustand, die Zeit und der Weg der Verabreichung und andere klinische Faktoren.

**[0021]** Bei der Ausführung der Erfindung wird eine therapeutisch wirksame Menge an BMP einem Säuger verabreicht, der einen solchen Krankheitszustand hat. Der Ausdruck "therapeutisch wirksame Menge" bedeutet die Gesamtmenge jeder aktiven Komponente des Verfahrens, die ausreicht, einen bedeutsamen Nutzen für

den Patienten zu zeigen, z.B. Heilung von chronischen Zuständen oder Verbesserung der Heilungsrate. Zum Beispiel ist eine Nerven regenerierende Menge an knochenmorphogenetischem Protein die Menge an Protein, die, wenn sie an einen geeigneten Träger adsorbiert und an der Stelle des beschädigten, defekten oder fehlenden Nervs implantiert wird, die Regeneration von Nervengewebe und/oder Verbesserung des neuronalen Schadens, Defekts oder Mangels erlauben wird. Wenn er für einen einzelnen aktiven Inhaltsstoff, der allein verabreicht wird, verwendet wird, bezieht sich der Ausdruck auf den Inhaltsstoff allein. Wenn er für eine Kombination verwendet wird, bezieht sich der Ausdruck auf kombinierte Mengen an aktiven Inhaltsstoffen, die in der therapeutischen Wirkung resultieren, wenn sie in Kombination, seriell oder simultan angewendet werden. Eine therapeutisch wirksame Dosis an BMP für die Ausführung des Verfahrens dieser Erfindung wird im Bereich von etwa 0,1 µg bis etwa 100 mg pro kg Körpergewicht pro Anwendung angenommen. Im Allgemeinen wird die Verabreichung anfänglich am unteren Ende des Dosierungsbereichs begonnen und die Dosis wird über einen vorausgewählten Zeitverlauf erhöht, bis eine positive Wirkung beobachtet wird. Anschließend werden steigende Zuwächse bei der Dosierung vorgenommen, wobei die steigenden Zuwächse auf solche Niveaus begrenzt werden, die einen entsprechenden Zuwachs an Wirkung produzieren, unter Berücksichtigung jeglicher nachteiliger Wirkungen, die auftauchen können.

**[0022]** Die Dauer einer intravenösen Therapie unter Verwendung des Verfahrens der vorliegenden Erfindung wird in Abhängigkeit von der Schwere der behandelten Erkrankung und des Zustands und potentieller idiosynkratischer Reaktionen jedes einzelnen Patienten variieren. Es wird angenommen, daß die Dauer jeder Anwendung von BMP im Bereich von 12 bis 24 Stunden kontinuierlicher Verabreichung sein wird. Letztendlich wird der behandelnde Arzt unter Verwendung von Verfahren der vorliegenden Erfindung über die geeignete Dauer der Therapie entscheiden.

**[0023]** Gemäß der Erfindung kann in Säugern eine Nervenregeneration durch Verabreichung einer Nerven regenerierenden Menge eines BMP wie rhBMP-2 unter Zumischung eines pharmazeutisch verträglichen Trägers erreicht werden. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung ist eine Nerven regenerierenden Menge eines BMP wie rhBMP-2 gemäß der vorliegenden Erfindung diejenige Menge an Protein, die notwendig ist, um die Regeneration des Nervs zu bewirken. Die Regeneration des Nervs kann durch das Gewicht oder Volumen des vorhandenen Nervengewebes gemessen werden. Es wird angenommen, daß geeignete Wirtszellen, die für die Expression von BMP transformiert wurden, auch einem Patienten verabreicht werden können, um das Wachstum oder das Überleben von Nervenzellen oder Nervengewebe zu verbessern.

**[0024]** Die folgenden Beispiele sind illustrativ für die vorliegende Erfindung.

**[0025]** Parenterale Formulierungen von BMP werden in der Form von pyrogenfreien, parenteral verträglichen wäßrigen Lösungen sein. Die Herstellung solcher parenteral verträglichen Proteinlösungen, bei denen auf den pH-Wert, die Isotonie, die Stabilität und dergleichen geachtet wird, ist innerhalb des Stands der Technik. Eine bevorzugte parenterale Formulierung sollte außer BMP einen isotonischen Träger wie Natriumchlorid-Injektion, Ringer-Injektion, Dextrose-Injektion, Dextrose- und Natriumchlorid-Injektion, Laktat-Ringer-Injektion oder einen anderen im Stand der Technik bekannten Träger enthalten. Das Arzneimittel gemäß der vorliegenden Erfindung kann auch Stabilisatoren, Konservierungsmittel, Puffer, Antioxidantien und andere im Stand der Technik bekannte Zusätze enthalten.

**[0026]** Wenn das BMP der vorliegenden Erfindung topisch verabreicht wird, kann es auch in der Form einer pyrogenfreien, topisch verträglichen, flüssigen oder halbfesten Formulierung wie einer Salbe, Creme, Lotion, eines Schaums oder Gels sein. Die Herstellung solcher topisch verabreichten Formulierungen ist innerhalb des Stands der Technik.

## BEISPIEL I. WIRKUNGEN VON BMP AUF NERVENZELLEN

### Beispiel IA. ZELLKULTUR

**[0027]** Balb c/SFME (serumfreier Mausembryo)-Zellen wurden von der American Type Culture Collection (CRL 9392) erhalten und wurden, wie zuvor beschrieben, (Sakai et al., PNAS:USA, 87: 8378–8382 (1990)) in DME/F12 (1:1)-Medium gezüchtet, das 10 µg/ml Rinderinsulin (Eli Lilly); 25 µg/ml menschliches Transferrin (Collaborative Research); 20 µg/ml menschliches Lipoprotein hoher Dichte (Sigma); 100 ng/ml menschlichen epidermalen Wachstumsfaktor (PreproTech); 20 µg/ml Plasmafibronektin des Rinds (GIBCO); 10 nM Natriumselenit (GIBCO); Penicillin-Streptomycin (10 U/ml), l-Glutamin (4 mM) und 4-(2-Hydroxyethyl)piperazinethansulfonsäure, pH-Wert 7,4 (15 mM) enthielt.

**[0028]** Die Zellen wurden unter Verwendung von Trypsin/EDTA und Sojabohnen-Trypsininhibitor (1 mg/ml) in einem Volumenverhältnis von 1:2 Passagen unterworfen und zwischen den Passagen 19 und 50 verwendet. Die Zellen wurden mit einem Zählgerät von Coulter Diagnostics gezählt, außer es ist anders angegeben.

#### Beispiel IB. WACHSTUM UND DIFFERENZIERUNGSFAKTOREN:

**[0029]** Alle verwendeten rekombinanten menschlichen Proteine waren von mehr als 90%-iger Reinheit. EGF wurde bei PreproTech (NJ) gekauft; rekombinantes menschliches Activin-A war eine großzügige Gabe von Helen New; TGF- $\beta$ 1 wurde bei R&D Systems gekauft; BMPs wurden aus konditionierten CHO-Medien durch mehrere Reinigungsschritte bei Genetics Institute gereinigt.

#### Beispiel IC. DIFFERENZIERUNGSUNTERSUCHUNGEN:

**[0030]** Für alle Immunfluoreszenz- und FACS-Analysen wurden die Zellen mit  $2,5 - 5 \times 10^4/\text{cm}^2$  ausplattiert und nach 16–20 Std. wurde BMP-2 mit den angegebenen Konzentrationen und der angegebenen Zeitdauer zugegeben, außer es ist anders angegeben.

#### Beispiel ID. ÜBERLEBENSUNTERSUCHUNGEN:

**[0031]** Die Zellen wurden zweimal in Medium ohne EGF gewaschen und dann mit  $0,8 - 1 \times 10^5/\text{cm}^2$  auf dasselbe Medium ausplattiert, das mit verschiedenen Wachstumsfaktoren ergänzt war. Diese umfaßten BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-2/6-Heterodimer, BMP-2/7-Heterodimer und TGF- $\beta$ 1. Die Lebensfähigkeit in Prozent und die Zellzahl wurden nach 44–48 Std. mit einem Hämocytometer zweifach durch Trypanblau-Ausschluß bestimmt, wobei mindestens 400 Zellen pro Probe gezählt wurden. Die Lebensfähigkeit in Prozent wurde als gesamte lebende Zellen geteilt durch Gesamtzahl an Zellen am Endpunkt bestimmt, da bei einigen Bedingungen Zellproliferation gesehen wurde.

#### Beispiel IE. IMMUNFLUORESZENTE ANTIKÖRPERFÄRBUNG:

**[0032]** Von Zellen in Glas- oder Plstikkammer-Objektträgern mit vier Mulden (Lab Tek) wurde das Medium entfernt und sie wurden zweimal mit PBS- Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> frei (CMF) gewaschen. Für die Oberflächenfärbung mit dem Antikörper A2B5 (Boehringer-Mannheim) wurden die Zellen anfänglich mit 4%-igem Paraformaldehyd 10 Minuten fixiert, mit PBS gewaschen und dann mit 1%-igem Kaninchenserum in PBS inkubiert, um die unspezifische Bindung zu blockieren. Der Antikörper wurde mit 1%-igem Kaninchenserum in PBS verdünnt und 1 Stunde inkubiert, dann wurden die Zellen vor dem Nachweis mit einem biotinylierten Kaninchen-anti-Maus-Antikörper, gefolgt von einem Streptavidin-FITC (Zymed)-Konjugat, mit 1%-igem Kaninchenserum in PBS gewaschen. Für weitere Doppelfärbungsexperimente oder einer einzigen internen Färbung auf GFAP wurden die Zellen 10 Minuten bei  $-20^\circ\text{C}$  in Aceton/Methanol (50:50) fixiert. Die Permeabilisierung und Blockierung wurden mit 0,2%-igem Triton X-100 und in Abhängigkeit vom Reagens des zweiten Schritts mit 1%-igem Ziegen- oder Kaninchenserum in PBS durchgeführt. Die primären Antikörper waren entweder polyclonale vom Kaninchen (1:200) oder monoclonale von der Maus (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), wie angegeben, verdünnt mit 1%-igem Ziegen- bzw. Kaninchenserum in PBS, und es wurde eine Stunde inkubiert. Der Nachweis geschah entweder mit einem sekundären biotinylierten Antikörper (Zymed) und Streptavidin-Phycoerythrin (PE) (Zymed) oder einem konjugierten anti-IgG1-PE-Antikörper (Zymed). Die Zellen wurden entweder mit einem Zeiss-Axiophot- oder einem Olympus-BN2-RFC-Mikroskop, ausgestattet mit Epifluoreszenz-Optik, untersucht und mit einem Ektachrom-Film mit 1600 ASA fotografiert.

#### Beispiel IF. FACS-ANALYSE:

**[0033]** Für diese Experimente wurden die Zellen vor der 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur in EDTA/Salze einmal mit PBS und einmal mit EDTA/Salze gewaschen. Die Zellen wurden dann durch vorsichtiges Pipettieren auf die Oberfläche der Platten entfernt. Die Platten wurden mit EDTA/Salze gewaschen und mit den Zellen kombiniert, die dann herunterzentrifugiert, einmal mehr mit PBS gewaschen und dann gezählt wurden.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden für jede Antikörperinkubation verwendet. Für die Oberflächenfärbung mit A2B5 bei  $4^\circ\text{C}$  wurde das Pellet zunächst mit 50  $\mu\text{l}$  hitzeinaktiviertem Kaninchenserum inkubiert, um unspezifische Bindung zu blockieren, und dann mit dem Antikörper A2B5 (Boehringer-Mannheim) oder mit klassenspezifischem Kontroll-IgM zu 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , verdünnt in 1%-igem Kaninchenserum/PBS, für eine Stunde. Der Nachweis erfolgte mit einem direkt konjugierten anti-IgM-PE (Zymed). Für weitere Doppelfärbungsexperimente oder einer einzigen internen Färbung auf GFAP wurden die Zellen eine Stunde bei  $4^\circ\text{C}$  in 0,25%-igem Paraformaldehyd fixiert, herunterzentrifugiert und in 1 ml 0,2%-igem Tween 20 in PBS/Azid resuspendiert und bei  $37^\circ\text{C}$  15 Minuten inku-

biert. 1 ml an 2%-igem hitzeinaktiviertem Kaninchenserum/PBS wurde zugegeben und die Zellen wurden herunterzentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl Kaninchenserum resuspendiert und dann wurden die primären Antikörper und die klassenspezifischen Kontrollen in 100 µl von 1%-igem Kaninchenserum in PBS zu 5 µg/ml verdünnt. Der letzte Nachweis erfolgte mit einem direkt konjugierten anti-IgG1-FITC-Antikörper (Zymed, Fisher Biotech). Die Zellen wurden mit 1%-igem Kaninchenserum, 0,2%-igem Tween 20 in PBS/Azid, dann mit PBS gewaschen und letztlich in 1%-igem Paraformaldehyd resuspendiert. Die FACS-Analyse wurde mit einem FACScan (Becton Dickinson, San Jose, Ka) unter Verwendung eines luftgekühlten 15-mw-Argonionen-Lasers von 488 nm für die Fluorochrom-Anregung durchgeführt. Die Fluoreszenzemission wurde mit der Standard-FACScan-Konfiguration gemessen: 530 nm, FITC-, 585 nm (PE) und > 650 nm (rote Fluoreszenz).

**[0034]** Die Daten wurden gewonnen und mit einem Hewlett Packard 340C-Computersystem unter Verwendung der LYSYS II-Software (Becton Dickinson, San Jose, Ka) analysiert. Die Isotyp-Kontrollen wurden bei jeder Probe durchgeführt und die Durchgänge wurden auf Einzelfärbungsexperimente eingestellt, so daß sie nicht mehr als 3% der Zellen einschlossen.

#### Beispiel IG. WESTERN-ANALYSE:

**[0035]** Zellen wurden doppelt in Mulden eines Gefäßes mit 6 Mulden mit  $2,5 \times 10^4/\text{cm}^2$  ausplattiert und nach 16 Stunden wurde das entsprechende BMP oder TGF- $\beta$ 1 mit 1, 10 und 100 ng/ml zugegeben. Nach 44 Stunden wurden die Zellen geerntet. Zu einer Mulde wurde Trypsin hinzugefügt und sie wurde ausgezählt und die zweite wurde mit PBS gewaschen, die Zellen wurden in eiskaltes PBS geschabt, das 1 mM Pefabloc enthielt (wasserlöslicher Protease-Inhibitor von Boehringer-Mannheim), und bei  $400 \times g$  zentrifugiert. 1–2 Volumina an 0,1%-igem Triton X-100, 1 mM Pefabloc, 0,125 M Tris-Base, pH 6,8, DNase mit 250 U/ml wurden zu den Zellpellets zugegeben und gemischt. Letztlich wurden jeweils 0,5%-iges SDS und 20 mM DTT zugegeben. Basierend auf den Zellzahlen der doppelten Mulden wurde das äquivalente Volumen, das  $5 \times 10^5$  Zellen enthielt, von jeder Kondition auf jeweils eine Spur eines 12%-igen Laemmli-Minigels von 1 mm (Novex) geladen. Ebenfalls geladen wurde Rinder-GFAP mit 10 und 100 ng. Nach dem Lauf wurde das Gel bei  $300 \text{ mAmp} \times 1 \text{ Stunde}$  in der Gegenwart von 0,05%-igem SDS auf Nitrocellulose von  $0,45 \mu$  übertragen. Der Blot wurde an der Luft getrocknet, in 1%-igem KOH fixiert, gewaschen und in 0,5%-igem Tween 20 in TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,5) blockiert, dann über Nacht in einer 1:1000-Verdünnung von GFAP-Antiserum (BIT) inkubiert. Nach Waschen in 0,5%-igem Tween 20 in TBS wurde der Blot in einer 1:3000-Verdünnung von Ziegen-anti-Kaninchen HRP  $\times 1 \text{ Stunde}$  inkubiert und dann mit Enhanced Chemiluminescence (Amersham-Kit) entwickelt. Kurz gesagt wurde der Blot in TBS-Tw20 gewaschen, gefolgt von TBS, in einem 1:1-Gemisch der Reagentien A und B 1 Stunde inkubiert und dann einem Film ausgesetzt, der entwickelt wurde.

#### RESULTATE

**[0036]** Die Behandlung von SFME-Zellen mit TGF- $\beta$ 1 oder Serum resultierte in deutlichen morphologischen Veränderungen, begleitet von der Expression des Astrocyten-spezifischen Differenzierungsmarkers GFAP (Sakai et al., vorstehend). Die Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 resultierte in einem verlängerten bipolaren Zelltyp mit cytoplasmatischen Fortsätzen an beiden Enden, die auf GFAP färbten. Im Gegensatz dazu waren mit fötalem Kälberserum (FCS) behandelte Zellen vom Umfang her größer, mit einem hoch verzweigten Filament-Netzwerk, das sich auf GFAP sehr stark färbte.

**[0037]** Die Behandlung von SFME-Zellen mit BMP-2, 4, 5, 6, 7, und BMP-2/6- und 2/7-Heterodimer zu 10 ng/ml resultierte in dramatischen morphologischen Veränderungen im Aussehen, begleitet von der Expression von GFAP. Die Zellen setzten viele cytoplasmatische Fortsätze an, die typisch sind für primäre Astrocyten in Kultur. Insgesamt war die Intensität der GFAP-Färbung, die mit den BMPs und Kälberserum beobachtet wurde, viel größer als diejenige, die mit TGF- $\beta$  beobachtet wurde. BMP-2 und BMP-2/7-Heterodimer induzierten einen Zelltyp mit der größeren Morphologie, ähnlich dem, was mit Kälberserum gesehen wurde, wohingegen BMP-7 eine Morphologie induzierte, die von ihrer Natur her eher fibrös war. Es ist möglich, daß diese Morphologien entweder phänotypische Unterschiede beim induzierten Zelltyp (Astrocyten vom Typ 1 vs. Typ 2) oder variierende Niveaus an GFAP oder anderen Cytoskelettproteinen reflektieren. Kontrollzellen haben ein fibroblasten-ähnliches Aussehen und färben sich nicht auf GFAP.

**[0038]** Um das Niveau an GFAP-Expression, das von BMP induziert wurde, akkurat zu messen, ebenso um die Aktivität mit der von TGF- $\beta$  zu vergleichen, wurde ein quantitativer Test mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung etabliert. Die Zellen wurden mit je 10 ng/ml von BMP, TGF- $\beta$ 1 und Activin und 10%-igem Kälberserum behandelt. Die Daten wurden durch die Population in Prozent, die reagierte, und die mittlere Fluoreszenzintensität analysiert.

**[0039]** Der Prozentsatz der Population, der reagierte, reflektiert die Zahl an Zellen, die GFAP exprimieren, unabhängig vom Niveau der Expression. BMP-2, 4, 5, 6, 7, 2/6-Heterodimer und 2/7-Heterodimer, TGF- $\beta$  und Kälberserum induzieren im Vergleich mit der Kontrolle die Expression von GFAP signifikant. Activin, ein anderes Mitglied der TGF- $\beta$ -Superfamilie, hat auch keine Wirkung. Die BMP-2/6- und 2/7-Heterodimere sind bei diesem Parameter am wirksamsten, was in etwa 65 bis 72 reagierenden Zellen resultiert. Behandlungen mit BMP-2, TGF- $\beta$ 1 und fötalem Kälberserum resultieren in etwa 53 bis 58% reagierenden Zellen; Behandlungen mit BMP-5, 6, und 7 resultieren in etwa 30 bis 40% reagierenden Zellen.

**[0040]** Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist ein Indiz für das Niveau der Expression an GFAP; je höher die mittlere Fluoreszenz, desto höher ist das Niveau an exprimiertem GFAP. Mit BMP-2/6- und 2/7-Heterodimer induzierte Zellen haben eine mittlere Fluoreszenz, die etwa 8-fach höher ist als diejenige von mit TGF- $\beta$ 1 induzierten Zellen. Mit BMP-2, 4, 5, 6 und 7 induzierte Zellen haben eine mittlere Fluoreszenz, die etwa 2- bis 4-fach höher ist als diejenige von Kälberserum. TGF- $\beta$  und Kälberserum ergeben alle Werte, die signifikant höher sind als die Kontrolle.

**[0041]** Um die Fähigkeit von BMPs und TGF- $\beta$ 1 zur Induktion von GFAP zu vergleichen, wurden BMP-2, BMP-6, BMP-2/6-Heterodimer und TGF- $\beta$ 1 über einen Konzentrationsbereich von 0–10 ng/ml getestet und der FACS-Test wurde für die Quantifizierung der GFAP-Expression verwendet. Die Konzentration, bei der jeder Faktor einen mittleren GFAP-Fluoreszenzwert von 5 (10-fach über der Kontrolle von 0,5) ergab, wurde verwendet, um die relativen Aktivitäten zu vergleichen. Bezüglich der relativen Aktivität im Vergleich mit TGF- $\beta$ 1 war das BMP-2/6-Heterodimer etwa 18-fach aktiver und BMP-2 und BMP-6 waren etwa 3–4-fach aktiver. BMP-2 und BMP-2/6 induzierten nachweisbare Niveaus von GFAP im Bereich von 0–0,08 ng/ml, während die erste nachweisbare Erhöhung an GFAP mit TGF- $\beta$ 1 im Bereich von 0,4–2 ng/ml ist.

**[0042]** Die Western-Analyse bestätigte auch die höheren Niveaus an GFAP, die von den SFME-Zellen nach Begegnung mit BMPs produziert wurden. Bei mit BMP oder TGF- $\beta$ 1 behandelten zellulären Extrakten erkennt der polyclonale GFAP-Antikörper, der für den Nachweis verwendet wurde, spezifisch ein Protein im Bereich 40–50 kD, der leicht unterhalb des Standards von 52 kD für Rinder-GFAP liegt. Der beobachtete breite Molekulargewichtsbereich ist wahrscheinlich das Ergebnis von Proteolyse. Es gab eine dosisabhängige Erhöhung der Proteinniveaus bei der Behandlung mit BMP-2 und BMP-6 von 1–100 ng/ml. GFAP, das durch die Behandlung mit TGF- $\beta$  induziert wurde, war maximal bei einer Dosis von 10 ng/ml und ist etwa gleich zu demjenigen, das bei nur 1 ng/ml BMP-2 gesehen wird. Dieses Niveau konnte auch mit der Dosis von 100 ng/ml nicht erhöht werden. Die BMPs induzierten höhere Niveaus an GFAP als TGF- $\beta$ 1.

**[0043]** Die Behandlung von SFME-Zellen mit BMPs resultiert in einer Umwandlung der "Fibroblasten-ähnlichen Zellen" in zwei unterschiedliche GFAP-positive Morphologien. Ein großer, flacher Zelltyp mit wenig Fortsätzen erinnert an einen protoplasmischen Astrocytentyp; ein anderer mit sehr langen cytoplasmischen Fortsätzen ist charakteristisch für einen fibrösen Astrocyten.

**[0044]** Diese Zellen wurden durch doppelte immunfluoreszente Antikörperfärbung für A2B5 und GFAP weiter charakterisiert. Bei der BMP-2/6-Population waren beide Astrocytenstammbäume von Typ 1 und Typ 2 vorhanden. Die Mehrzahl der Zellen, die für GFAP anfärbten, aber nicht für A2B5, gehörten zu dem Astrocytenstammbaum von Typ 1, während die Zellen, die für A2B5 und GFAP anfärbten, zu dem Astrocytenstammbaum von Typ 2 gehörten. Die Kontrollzellen färbten sich auf ihrer Oberfläche für A2B5, färbten sich aber nicht für GFAP.

**[0045]** Um die Zellpopulationen zu quantifizieren, die durch die Immunfluoreszenzfärbung gesehen wurden, wandten wir die Doppelfärbungs-FACS-Analyse an. Die Daten in Tabelle 1 sind als Mittelwert von mindestens drei Experimenten  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Kontrollzellen waren zu etwa 37% positiv für A2B5. Die Kontrollzellen färbten sich nicht positiv für die Marker für den Astrocytenstammbaum. Mit BMP-2, 6 und 2/6 behandelte Zellen färbten sich nicht nur für A2B5, sondern bestanden aus zwei Astrocytenstammbaumpopulationen. Mehr als 60% waren positiv für GFAP allein, was andeutet, daß sie vom Stammbaum des Typs 1, waren und etwa 18% waren positiv für A2B5 und GFAP, was andeutet, daß sie vom Stammbaum des Typs 2 waren. Die Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 resultierte ebenfalls in einer Zellpopulation des Typ 2-Stammbaums ähnlicher Größe (etwa 14%), aber nur in etwa 40% positiver Zellpopulation vom Typ 1-Stammbaum. Es verblieb auch eine kleine Population von Zellen (etwa 7%), die sich nur auf A2B5 färbte. Insgesamt resultierte die Behandlung von SFME-Zellen mit entweder BMPs oder TGF- $\beta$ 1 im Verlust der Expression von A2B5, was in der A2B5/GFAP-Population nicht völlig der Grund sein kann.

TABELLE 1: ASTROCYTEN

	TYP 1		TYP 2
	A2B5	GFAP	A2B5/GFAP
Kontrolle	37,13 ± 18,66	0,15 ± 0,19	1,18 ± 0,67
BMP-2	0,39 ± 0,54	60,49 ± 3,71	19,89 ± 3,31
BMP-6	0,25 ± 0,43	59,28 ± 1,28	17,89 ± 3,19
BMP-2/6	0,42 ± 0,38	65,07 ± 7,33	18,37 ± 5,49
TGF-β1	7,05 ± 1,02	39,72 ± 3,02	14,23 ± 3,04

## SFME-Zellüberlebensuntersuchung

**[0046]** Für das Überleben von SFME-Zellen ist EGF erforderlich und andere Faktoren wie FGF und TGF-β können ihn nicht ersetzen. In Abwesenheit von EGF wurden SFME-Zellen mit BMP-2, 7, 2/7-Heterodimer, TGF-β1 und Activin behandelt. Von Activin ist gezeigt worden, daß es für P19-Zellen ein Nervenzellen-Überlebensmolekül ist. Schubert et al., Nature 344: 868–870 (1990). Nach 48 Stunden in Abwesenheit von EGF gab es nur noch etwa 30% überlebende Zellen und insgesamt eine Abnahme bei der Zellzahl. Die Zugabe von EGF resultierte in etwa 95 Zellüberlebensrate, begleitet von einem 5-fachen Anwachsen der Zellzahl. Zellen, die mit BMP-2, BMP-7 und BMP-2/7-Heterodimer behandelt wurden, behielten eine Zellzahl von etwa 70-80% der Aussähdichte. Die Zellen proliferierten jedoch nicht. Mit BMP-2 behandelte Zellen überlebten nicht nur, sondern schienen sich auch differenziert zu haben. Die Überlebensrate war etwa 80–85%. Die Behandlung der Zellen mit TGF-β1 oder Activin resultierte in Überlebensraten von < 10% und einem mindestens 10-fachen Abfallen der Zellzahl. Höhere Konzentrationen von TGF-β1 erhöhten das Überleben nicht.

## BEISPIEL II. REGENERATION VON PERIPHEREM NERV IN SÄUGERN UNTER VERWENDUNG VON BMP-2

## A. Herstellung von Kollagen-Schwamm

**[0047]** Kollagen-Schwämme (Collastat<sup>®</sup>, Vitaphore Wound Healing, Inc.) wurden in Längen von etwa 2 × 2 × 18 mm geschnitten, intensiv in sterilem, Glas-destilliertem Wasser gewaschen, lyophilisiert, mit Ethylenoxid sterilisiert und vor der Zugabe von BMP-2 entgast.

**[0048]** 0,5 µg BMP-2 in 45%-igem Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäure wurden gleichmäßig über die Länge jedes hergestellten Schwammes verteilt. Diese wurden dann in ein Röhrchen gegeben, in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert. Kontrollimplantate wurde auf dieselbe Weise hergestellt, außer mit 45% Acetonitril, 0,1% Trifluoressigsäurepuffer ohne BMP-2.

**[0049]** Nach der Lyophilisierung wurden die mit BMP-2 beladenen und die Kontrollschwämme innerhalb eines sterilen belüfteten Silasticschlauchs von etwa 1,6 × 20 mm Länge platziert. Alle Handhabungen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Überstehender Schlauch an jedem Ende des Implantats wurde vor der Operation im Operationsraum entfernt.

**[0050]** Der Ischiasnerv von 6 Lewis-Ratten wurde durchtrennt. Es wurden belüftete Silasticstents oder biologisch abbaubare Stents mit 1,6 mm Innendurchmesser × 17 mm Länge eingesetzt. Die Stents enthielten einen Kollagenmatrixträger mit oder ohne rhBMP-2. Der Kollagenmatrixträger bestand aus Kollagen-Schwamm (Collastat) (etwa 1,5 mm × 15 mm). Tiere mit durchtrenntem und zur Verhinderung des Wiederanheftung zurückgebundenem Ischiasnerv dienten als positive Kontrollen. Der nicht operierte Hinterlauf diente als mit dem Alter übereinstimmende negative Kontrolle.

**[0051]** Die Stents wurden unter dem Mikroskop angebracht und mit den durchtrennten Enden des Ischias-

nerv durch Anastomose verbunden. Die Nervenenden wurden an jedem Ende 1 mm in den Stent eingeführt, womit eine Unterbrechung von 15 mm verblieb. Die Tiere wurden 6, 8 und 12 Wochen nach der Implantation auf die elektrische Wiederkehr der Funktion getestet. Die Muskel- und Nervensummenpotentiale (CMAP) wurden untersucht, die ein verlässliches, reproduzierbares, transkutanes Verfahren bereitstellten, das ein akkurates Maß zur Bestimmung des Maßes der Rückkehr der Funktion darstellt. Die Amplitude und Latenz sind altersabhängig und direkt proportional der Zahl an reinnervierten Axonen/Motorendplatten.

**[0052]** Die Tiere wurden 12 Wochen nach der Implantation für die pathologische Untersuchung getötet. Die Färbungen umfaßten H&E, Silber, Luxol-Schnellblau und S100. Es wurde eine unbeeinflusste Quantifizierung der proximalen, zentralen und distalen Elemente innerhalb des Stents vorgenommen. Stents, die in subkutanes Gewebe von mehreren Ratten eingebracht worden waren, dienten als Kontrollen für die Färbung.

**[0053]** Die Resultate zeigten nach 12 Wochen bei 4 von 6 Tieren, die mit 0,5 µg BMP-2 pro Vorrichtung, das auf einen Collastat-Schwamm aufgebracht war, eine gute Nervenregeneration über den Nervendefekt von 15 mm hinweg. Die Kontrollen ohne BMP-2 zeigten kein Wachstum über den Nervendefekt von 15 mm hinweg.

### Patentansprüche

1. Verfahren zum Induzieren der Bildung von Astrocyten in vitro, umfassend das Verabreichen eines knochen-morphogenetischen Proteins an geeignete Zellen unter Beimischung eines pharmazeutisch verträglichen Vehikels.

2. Verwendung eines knochen-morphogenetischen Proteins für die Herstellung einer Zusammensetzung zur Induktion des Wachstums oder der Regeneration von Astrocytenzellen.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder Verwendung nach Anspruch 2, wobei das knochen-morphogenetische Protein BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7 oder ein Heterodimer von BMP-2/6 oder BMP-2/7 ist.

4. Vorrichtung zum Induzieren der Regeneration von peripheren Nerven in vivo, umfassend ein künstliches Gefäß, das ein knochen-morphogenetisches Protein enthält, ausgewählt aus BMP-2, BMP-4 oder einem Heterodimer von BMP-2/6 oder BMP-2/7, das an eine Matrix adsorbiert ist, die Kollagen, Fibringewebekleber, Laminin, Hyaluronsäure oder Chondroitinsulfat-Proteoglycane umfasst.

5. Vorrichtung nach Anspruch 4, wobei die Matrix Kollagen in Form eines Schwamms umfasst.

6. Vorrichtung nach Anspruch 4 oder 5, wobei das künstliche Gefäß einen belüfteten Silasticschlauch umfasst.

7. Verwendung eines knochen-morphogenetischen Proteins, ausgewählt aus BMP-2, BMP-4 oder einem Heterodimer von BMP-2/6 oder BMP-2/7, in einem belüfteten Silasticschlauch für die Herstellung einer medizinischen Vorrichtung zum Induzieren der Regeneration von peripheren Nerven in vivo.

8. Verwendung nach Anspruch 7, wobei das knochen-morphogenetische Protein an eine Matrix adsorbiert ist, die Kollagen, Fibringewebekleber, Laminin, Hyaluronsäure oder Chondroitinsulfat-Proteoglycane umfasst, und die in dem belüfteten Silasticschlauch enthalten ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen