



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 35 810 T2** 2007.10.11

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 968 012 B1**

(51) Int Cl.⁸: **A61L 27/00** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 35 810.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/06043**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 913 183.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/041246**

(86) PCT-Anmeldetag: **20.03.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **24.09.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **05.01.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **06.09.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.10.2007**

(30) Unionspriorität:
822186 **20.03.1997** **US**

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

(73) Patentinhaber:
Stryker Corp., Kalamazoo, Mich., US

(72) Erfinder:
**RUEGER, C., David, Southborough, MA 01772, US;
TUCKER, M., Marjorie, Holliston, MA 01746, US;
CHANG, An-Cheng, Westborough, MA 01581, US**

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(54) Bezeichnung: **OSTEOGENE VORRICHTUNGEN UND VERFAHREN ZU IHRER VERWENDUNG ZUR FÖRDERUNG DER KNOCHENHEILUNG**

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

Gebiet der Erfindung

[0001] Die hierin offenbarte Erfindung betrifft Materialien und Verwendungen zum Reparieren von Knochen- und Knorpeldefekten unter Verwendung von osteogenen Proteinen.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Es ist jetzt eine Klasse von Proteinen identifiziert worden, die im Stande sind, als wahre chondrogene Gewebe-Morphogene zu agieren. Das heißt, dass diese Proteine in der Lage sind, die Proliferation und Differenzierung von Vorläufer-Zellen in funktionelles Knochen-, Knorpel-, Sehnen- und/oder Bandgewebe alleine zu induzieren. Diese Proteinklasse, die hierin als „osteogene Proteine“ oder „morphogenetische Proteine“ oder „Morphogene“ bezeichnet wird, umfasst Mitglieder der Familie der morphogenetischen Knochenproteine (BMPs), welche ursprünglich durch ihre Fähigkeit identifiziert wurden, ektopische, endochondrale Knochenmorphogenese zu induzieren. Die osteogenen Proteine werden im Fachgebiet im Allgemeinen als eine Untergruppe der Wachstumsfaktoren der TGF- β -Superfamilie klassifiziert (Hogan (1996) *Genes & Development* 10:1580-1594). Mitglieder der Familie morphogenetischer Proteine umfassen das osteogene Protein-1 aus Säugern (OP-1, auch bekannt als BMP-7, und das Drosophila-Homolog 60A), osteogene Protein-2 (OP-2, auch bekannt als BMP-8), osteogene Protein-3 (OP-3), BMP-2 (auch bekannt als BMP-2A oder CBMP-2A, und das Drosophila-Homolog DPP), BMP-3, BMP-4 (auch bekannt als BMP-2B oder CBMP-2B), BMP-5, BMP-6 und sein murines Homolog Vgr-1, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, GDF3 (auch bekannt als Vgr2), GDF8, GDF9, GDF10, GDF11, GDF12, BMP-13, BMP-14, BMP-15, GDF-5 (auch bekannt als CDMP-1 oder MP52), GDF-6 (auch bekannt als CDMP-2), GDF-7 (auch bekannt als CDMP-3), das Xenopus-Homolog Vgl und NO-DAL, UNIVIN, SCREW, ADMP und NEURAL. Mitglieder dieser Familie codieren abgesonderte Polypeptidketten, die gemeinsame strukturelle Merkmale teilen, einschließlich der Prozessierung von einer Vorläufer "Pro-Form", um eine reife Polypeptidkette zu ergeben, die zur Dimerisierung im Stande ist und eine aktive carboxyterminale Domäne von ungefähr 97-106 Aminosäuren enthält. Alle Mitglieder teilen in dieser Domäne ein konserviertes Muster an Cysteinen und die aktive Form dieser Proteine kann entweder ein Disulfid-gebundenes Homodimer eines einzelnen Familienmitglieds sein oder ein Heterodimer von zwei unterschiedlichen Mitgliedern sein (siehe z.B. Massague (1990) *Annu. Rev. Cell Biol.* 6:597; Sampath, et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:13198). Siehe auch US 5,011,691; U.S. 5,266,683, Ozkaynak et al. (1990) *EMBO J.* 9: 2085-2093, Wharton et al., (1991) *PNAS* 88:9214-9218), (Ozkaynak (1992) *J. Biol. Chem.* 267:25220-25227 und US 5,266,683); (Celeste et al. (1991) *PNAS* 87:9843-9847); (Lyons et al., (1989) *PNAS* 86:4554-4558). Diese Offenbarungen beschreiben die Aminosäure- und DNA-Sequenzen sowie auch die chemischen und physikalischen Eigenschaften dieser osteogenen Proteine. Siehe auch Wozney et al. (1988) *Science* 242:1528-1534); BMP-9 (WO93/00432, veröffentlicht am 7. Januar 1993); DPP (Padgett et al. (1987) *Nature* 325:81-84; und Vg-1 (Weeks (1987) *Cell* 51:861-867).

[0003] Wahre osteogene Proteine, die im Stande sind, die vorstehend beschriebene Kaskade von morphogenetischen Ereignissen zu induzieren, die in endochondraler Knochenbildung resultieren, sind auf diese Weise jetzt identifiziert, isoliert und cloniert worden. Ob natürlich vorkommend oder synthetisch erzeugt, können diese osteogenen Faktoren, wenn sie gemeinsam mit einer Matrix oder einem Substrat, in einen Säuger implantiert werden, die/das Anlagerung, Proliferation und Differenzierung von wandernden Vorläuferzellen ermöglicht, die Rekrutierung von zugänglichen Vorläuferzellen induzieren und ihre Proliferation stimulieren und dadurch die Differenzierung in Chondrocyten und Osteoblasten induzieren und ferner die Differenzierung von Zwischenknorpel, Gefäßneubildung, Knochenbildung, Umbau und schließlich Knochenmarkdifferenzierung induzieren. Darüber hinaus haben zahlreiche Praktiker die Fähigkeit dieser osteogenen Proteine bewiesen, wenn sie entweder mit Matrixmaterialien aus natürlichen Quellen wie zum Beispiel Kollagen oder synthetisch erzeugten polymeren Matrixmaterialien gemischt wurden, Knochenbildung, einschließlich endochondraler Knochenbildung, unter Bedingungen zu induzieren, bei denen wahrer Ersatz des Knochens sonst nicht vorkommen würde. Zum Beispiel wenn diese osteogenen Proteine gemeinsam mit einem Matrixmaterial die Bildung von neuem Knochen in großen segmentalen Knochendefekten, operativen Wirbelsäulenversteifungen und Brüchen induzieren.

[0004] Aus der Natur stammende Matrizen wie zum Beispiel Kollagen können mit inerten Materialien wie zum Beispiel Plastik ersetzt werden, aber Plastik ist kein geeigneter Ersatz, das es nicht resorbiert wird und auf Anwendungen begrenzt ist, die einfache geometrischen Konfigurationen benötigen. Bis heute sind auch biologisch abbaubare Polymere und Co-Polymere als Matrizen vermischt mit osteogenen Proteinen, für die Reparatur von Pseudoarthrose- („non-union“)-Defekten verwendet worden. Während solche Matrizen manche die-

ser vorstehend beschriebenen Mängel überwinden können, erfordert die Verwendung dieser Matrizen die Bestimmung und Kontrolle von Merkmalen wie zum Beispiel Polymerchemie, Partikelgröße, Biokompatibilität und andere Einzelheiten, die für die Funktionsfähigkeit entscheidend sind. Zum Beispiel müssen Poren im Polymer in einer Weise geformt sein, welche die Anlagerung von Protein in die Matrix sowie den Bioabbau der Matrix sicherstellt. Vor der Verwendung der polymeren Matrix ist es daher notwendig, einen zusätzlichen Behandlungsschritt des Polymers zu durchlaufen, um die Bildung von Poren der geeigneten Größe zu induzieren.

[0005] Osteogene Standardvorrichtungen, die entweder Kollagen- oder Polymer-Matrizen in Beimischung mit einem osteogenen Protein umfassen, sind für die Manipulation während der Operation weniger zugänglich. Osteogene Standardvorrichtungen haben oft eine trockene, sandige Konsistenz und können, wann immer die Defekt-Stelle während der Operation gespült wird, und/oder durch Blut und/oder andere Flüssigkeiten, welche die Stelle nach der Operation infiltrieren, gewegewaschen werden. Das Hinzufügen bestimmter Materialien zu diesen Zusammensetzungen kann bei der Bereitstellung einer besser handhabbaren Zusammensetzung für den Umgang während der Operation helfen. Die Patente der Vereinigten Staaten, Nr. 5,385,887; 5,520,923; 5,597,897 und die Internationale Veröffentlichung WO 95/24210 beschreiben Zusammensetzungen, die für einen solchen Zweck eine synthetische polymere Matrix, osteogenes Protein und einen Träger verwenden. Solche Zusammensetzungen sind jedoch aufgrund eines Bestrebens, bestimmte, vermeintliche, nachteilige, immunologische Reaktionen zu überwinden, von welchen angenommen wird, dass sie mit anderen Arten von Matrizen in Zusammenhang stehen, insbesondere mit biologisch-abstammenden Matrizen, einschließlich mancher Arten von Kollagen, auf synthetische Polymermatrizen beschränkt gewesen. Diese Zusammensetzungen leiden daher an den gleichen, vorstehend beschriebenen Durchführbarkeitsbedenken für die Optimierung von Polymerchemie, Partikelgröße, Biokompatibilität usw. WO 94/15653 beschreibt Formulierungen zur Induktion von Knochenwachstum, umfassend TGF- β , TCP und einem Träger wie zum Beispiel Kollagen, CMC und Cellulosederivate. WO 94/20133 beschreibt Gewebe-Abdichtungsmittel, umfassend Fibrinkleber, entmineralisierten Knochen und BMPs. Es verbleiben die Erfordernisse für Zusammensetzungen und Verfahren für die Reparatur von Knochen- und Knorpeldefekten, welche größere Leichtigkeit in der Handhabung während der Operation bereitstellen und die nicht auf synthetische Polymer-Matrizen angewiesen sind. Ferner verbleiben die Erfordernisse für Verfahren und Zusammensetzungen, welche die Geschwindigkeit und Qualität von neuer Knochen- und Knorpelbildung erhöhen.

[0006] Demgemäß ist es ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung, verbesserte osteogene Vorrichtungen und Verfahren der Verwendung davon zur Reparatur von Knochendefekten, Knorpeldefekten und/oder osteochondralen Defekten bereitzustellen, die während der Operation leichter zu manipulieren sind; die Bedenken von Polymerchemie, Partikelgröße und Biokompatibilität umgehen, die mit der Verwendung von synthetischen Polymermatrizen in Zusammenhang stehen; und welche die beschleunigte Knochenbildung und stabilere Knorpelreparatur unter Verwendung von niedrigeren Dosierungen an osteogenem Protein erlauben, als unter Verwendung von im Fachgebiet bekannten Vorrichtungen und Verfahren erreicht werden kann. Es ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung, osteogene Vorrichtungen und Verfahren der Verwendung davon zur Reparatur von nicht-heilenden, Pseudoarthrose-Defekten und zur Förderung von Gelenkknorpelreparatur in chondralen und osteochondralen Defekten bereitzustellen. Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist es, Vorrichtungen und Verwendungen von Vorrichtungen für die Reparatur von Knochen- und Knorpeldefekten ohne operativen Eingriff bereitzustellen. Diese und andere Gegenstände, gemeinsam mit Vorteilen und Merkmalen der hierin offenbarten Erfindung, werden aus der Beschreibung, den Zeichnungen und den Ansprüchen, die folgen, offenkundig sein.

Zusammenfassung der Erfindung

[0007] Die vorliegende Erfindung basiert auf der Entdeckung, dass das Mischen von osteogenem Protein und einer nichtsynthetischen, nichtpolymeren Matrix wie zum Beispiel Kollagen oder β -Tricalciumphosphat (β -TCP) mit einem Bindemittel, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Carboxymethylcellulose und einem Natriumsalz davon, wobei das Bindemittel eine Viskosität von etwa 10-200 cP und einen Substitutionsgrad von 0,65-0,90 hat, eine verbesserte osteogene Vorrichtung, mit erhöhten Knochen- und Knorpel-Reparaturfähigkeiten ergibt. Solche verbesserten Vorrichtungen können nicht nur die Reparaturgeschwindigkeit beschleunigen, diese Vorrichtungen können auch die Bildung von hoch qualitativer, stabiler Gewebereparatur, insbesondere von Knorpelgewebe, fördern. Außerdem können die vorhergehenden Vorteile unter Verwendung von erheblich weniger osteogenem Protein erzielt werden, als bei osteogenen Standardvorrichtungen benötigt wird. Während wir nicht durch Theorie gebunden sein möchten, können die vorstehend erwähnten, unerwarteten Eigenschaften wahrscheinlich auf eine komplementäre oder synergistische Interaktion zwischen der nichtpolymeren Matrix und dem Bindemittel zurückgeführt werden. Im Lichte von bestehenden orthopädischen und rekonstruktiven Technologien sind diese Entdeckungen unerwartet und man war sich ihrer vordem nicht be-

wusst.

[0008] Die Erfindung stellt in einem Aspekt eine neue Vorrichtung zur Induktion von lokaler Knochen- und Knorpelbildung bereit, umfassend ein osteogenes Protein, Matrix, stammend aus nicht-synthetischem, nicht-polymerem Material, und ein Bindemittel, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Carboxymethylcellulose und einem Natriumsalz davon, wobei das Bindemittel eine Viskosität von etwa 10-200 cP und einen Substitutionsgrad von 0,65-0,90 aufweist. Wie hierin in Erwägung gezogen wird, umfasst die Vorrichtung vorzugsweise osteogene Proteine wie zum Beispiel, aber nicht darauf limitiert, OP-1, OP-2, BMP-2, BMP-4, BMP-5 und BMP-6. Ein zurzeit bevorzugtes osteogenes Protein ist OP-1. Wie hierin verwendet, schließen die Begriffe „Morphogen“, „Knochen-Morphogen“, „Knochen-morphogenetisches Protein“, „BMP“, „osteogenes Protein“ und „osteogener Faktor“ die Klasse von Proteinen ein, die durch menschliches osteogenes Protein 1 (hOP-1) verkörpert wird. Nucleotid- und Aminosäuresequenzen für hOP-1 werden in den SEQ ID NOs: 1 bzw. 2 bereitgestellt. Zur Erleichterung der Beschreibung wird hOP-1 hierin nachstehend als ein repräsentatives osteogenes Protein dargestellt. Der Fachmann wird sich jedoch darüber im Klaren sein, dass OP-1 lediglich ein Repräsentant der TGF- β -Unterklasse der wahren Gewebemorphogene ist, die im Stande sind, als osteogene Proteine zu wirken und nicht dazu gedacht sind, die Erfindung zu limitieren. Andere bekannte und nützliche Proteine umfassen BMP-2, BMP-3, BMP-3b, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-15, GDF-1, GDF-2, GDF-3, GDF-5, GDF-6, GDF-7, GDF-8, GDF-9, GDF-10, GDF-11, GDF-12, NODAL, UNIVIN, SCREW, ADMP, NEURAL und osteogen aktive Aminosäurevarianten davon. In einer bevorzugten Ausführungsform schließen die in der Erfindung nützlichen Proteine biologisch aktive Artvarianten aller dieser Proteine ein, einschließlich konservierter Aminosäure-Sequenzvarianten, Proteine, die durch degenerative Nucleotid-Sequenzvarianten codiert werden, und osteogen aktiver Proteine, welche das wie hierin definierte konservierte 7-Cystein-Skelett teilen und durch eine DNA-Sequenz codiert sind, die an eine DNA-Sequenz hybridisieren kann, die ein hierin offenbartes osteogenes Protein codiert, einschließlich, ohne Limitierung, OP-1, BMP-5, BMP-6, BMP-2, BMP-4 oder GDF-5, GDF-6 oder GDF-7. In einer anderen Ausführungsform schließen nützliche osteogene Proteine jene ein, welche die konservierte Sieben-Cystein-Domäne teilen und die eine Aminosäure-Sequenzhomologie (Ähnlichkeit) von mindestens 70% innerhalb der C-terminalen aktiven Domäne aufweisen, wie hierin definiert. In noch einer anderen Ausführungsform können die osteogenen Proteine der Erfindung als osteogen aktive Proteine definiert werden, die eine der hierin definierten generischen Sequenzen aufweisen, einschließlich OPX (SEQ ID NO: 3) und die generischen Sequenzen 7 und 8 oder die generischen Sequenzen 9 und 10.

[0009] OPX enthält die Homologien zwischen verschiedenen Arten der osteogenen OP-1- und OP-2-Proteine und wird durch die hierin nachstehend und in SEQ ID NO: 3 gezeigte Aminosäuresequenz beschrieben. Die generische Sequenz 9 ist eine Sequenz aus 96 Aminosäuren, welche das durch hOP-1 definierte Sechs-Cystein-Skelett (Reste 335-431 von SEQ ID NO: 2) enthält, wobei die verbleibenden Reste die Homologien von OP-1, OP-2, OP-3, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-15, GDF-1, GDF-3, GDF-5, GDF-6, GDF-7, GDF-8, GDF-9, GDF-10, GDF-11, UNIVIN, NODAL, DORSALIN, NURAL, SCREW und ADMP enthalten. Das heißt, dass jeder der nicht-Cysteinreste unabhängig aus dem korrespondierenden Rest in dieser aufgelisteten Proteingruppe ausgewählt wird. Die generische Sequenz 10 ist eine Sequenz aus 102 Aminosäuren, welche eine 5-Aminosäuren-Sequenz umfasst, welche an den N-Terminus der generischen Sequenz 9 hinzugefügt wurde, und das 7-Cystein-Skelett von hOP-1 definiert (330-431 SEQ ID NO: 2). Die generischen Sequenzen 7 und 8 sind Sequenzen aus 96 bzw. 102 Aminosäuren, welche entweder das 6-Cystein-Skelett (generische Sequenz 7) oder das durch hOP-1 definierte 7-Cystein-Skelett (generische Sequenz 8) enthalten, wobei die verbleibenden nicht-Cysteinreste die Homologien von OP-1, OP-2, OP-3, BMP-2, BMP-3, BMP-4, 60A, DPP, Vgl, BMP-5, BMP-6, Vgr-1 und GDF-1 enthalten.

[0010] Wie nachstehend gelehrt wird, sind die bevorzugten Matrizen nicht-synthetische, nicht-polymere Materialien und können aus natürlichen Quellen stammen oder abgeleitet aus biologischen Materialien sein. Beispiele von bevorzugten Matrizen umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, Kollagen, entmineralisierten Knochen und β -TCP. Eine zurzeit bevorzugte Matrix ist Kollagen. Eine andere gegenwärtig bevorzugte Matrix ist β -TCP. Die Vorrichtungen der vorliegenden Erfindung umfassen daher als primäre Komponenten keine synthetischen polymeren Matrizen wie zum Beispiel Homopolymere oder Co-Polymere aus α -Hydroxy-Essigsäure und/oder α -Hydroxy-Propionsäure, einschließlich racemischer Gemische davon.

[0011] Im Hinblick auf Bindemittel umfassen die vorliegenden Vorrichtungen Mittel, die als gelbildende, Viskositäts-steigernde, suspendierende und/oder emulgierende Mittel nützlich sind, wobei dieses Mittel ausgewählt wird aus der Gruppe, bestehend aus Carboxymethylcellulose und einem Natriumsalz davon, wobei das Bindemittel eine Viskosität von etwa 10-200 cP und einen Substitutionsgrad von 0,65-0,90 aufweist. Das Bindemittel ist eine Alkylcellulose, insbesondere Methylcellulosen wie zum Beispiel Carboxymethylcellulose. An-

dere Bindemittel, die hierin beschrieben werden, können andere Cellulosegummis, Natriumalginat, Dextrane und Gelatinepulver sein. Ein anderes, hierin beschriebenes Bindemittel kann Fibrinkleber sein.

[0012] Wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff „Fibrinkleber“ eine Zusammensetzung, umfassend Säuger-Fibrinogen und Thrombin. In bestimmten Ausführungsformen umfasst die verbesserte Vorrichtung der vorliegenden Erfindung weiterhin ein Benetzungsmittel wie zum Beispiel, aber nicht darauf beschränkt, Kochsalz oder andere wässrige physiologische Lösungen.

[0013] Die verbesserten Vorrichtungen der vorliegenden Erfindung können eine Vielzahl an Konfigurationen annehmen. Die Konfiguration wird teilweise von der Art des eingesetzten Bindemittels und Benetzungsmittels abhängen. Wie hierin offenbart, kann eine gegenwärtig bevorzugte Ausführungsform Kittkonsistenz aufweisen. Diese bestimmte Konfiguration ist insbesondere in der Behandlung von offenen Defekten gemäß den Verfahren der vorliegenden Erfindung nützlich. Eine andere zurzeit bevorzugte Ausführungsform der verbesserten osteogenen Vorrichtung kann die Konsistenz einer viskosen Flüssigkeit aufweisen. Diese bestimmte Konfiguration ist besonders bei der Behandlung von geschlossenen Defekten gemäß den hierin offenbarten Verfahren nützlich. Abhängig von der Zusammensetzung der verbesserten Vorrichtung kann die Bereitstellung an die Defekt-Stelle durch eine Vielzahl von Verabreichungsformen erzielt werden. Zum Beispiel kann ein Kitt in und/oder um den Defekt gepackt werden oder als ein Kügelchen aus einem Gerät mit großem Loch herausgedrückt werden. Alternativ kann eine viskose Flüssigkeit in und/oder um den Defekt injiziert werden oder alternativ auf die Oberfläche(n) des Defekts aufgestrichen und/oder aufgepinselt werden. Die Nutzung einer Vielzahl dieser möglichen Ausführungsformen zur Reparatur von Knochen- und Knorpeldefekten wird hierin beispielhaft beschrieben.

[0014] Unter den Eigenschaften des Bindemittels, welches aus der Gruppe ausgewählt wurde, bestehend aus Carboxymethylcellulose und einem Natriumsalz davon, wobei das Bindemittel eine Viskosität von etwa 10-200 cP und einen Substitutionsgrad von 0,65-0,90 aufweist, ist eine Fähigkeit, die Vorrichtung geschmeidig, formbar und/oder anpassungsfähig; injizierbar; anlagerungsfähig an Knochen, Knorpel, Muskel und andere Gewebe; resistent gegen Zerfall nach Waschen und/oder Spülen während der Operation; und resistent gegen Entfernung während der Operation, des Nähens und nach der Operation, zu machen, um nur einige zu nennen. Außerdem kann dieses Bindemittel in bestimmten, bevorzugten Ausführungsformen die vorstehend erwähnten Merkmale und Vorteile erzielen, wenn es in geringen Anteilen vorhanden ist. Zum Beispiel umfasst eine gegenwärtig bevorzugte Vorrichtung ungefähr einen Teil Bindemittel und ungefähr 5 Teile Matrix. Bestimmte andere bevorzugte Ausführungsformen umfassen ungefähr einen Teil Bindemittel und ungefähr 10 Teile Matrix, während noch andere ungefähr einen Teil Bindemittel und ungefähr 25 Teile Matrix umfassen. Eine andere gegenwärtig bevorzugte Vorrichtung umfasst ungefähr 3 Teile Bindemittel zu 5 Teilen Matrix. Bestimmte Bindemittel können relativ zur Matrix in gleichen oder größeren Verhältnissen verwendet werden. Eine andere, gegenwärtig bevorzugte Vorrichtung umfasst 1 Teil Bindemittel und 3 Teile Matrix. Wie hierin beispielhaft dargestellt, können verbesserte Vorrichtungen von weitgehend divergierenden Verhältnissen Knochen- und Knorpelbildung induzieren. Hierin beispielhaft dargestellt sind verbesserte Vorrichtungen, welche Teile von Bindemittel zu Teilen an Matrix aufweisen, die sich zwischen ungefähr 1:1 bis 4:1 sowie auch zwischen ungefähr 1:2 bis 1:5 und 1:10 bis 1:25 sowie auch 1:25 bis 1:50 bewegen. Jedes Verhältnis von Bindemittel zu Matrix kann verwendet werden, um die vorliegende Erfindung auszuüben.

[0015] Darüber hinaus zieht die vorliegende Erfindung in Erwägung, dass eine verbesserte osteogene Vorrichtung mehr als ein Matrixmaterial in Kombination umfassen kann. Die relativen Verhältnisse können variiert werden, um das gewünschte klinische Ergebnis zu erzielen, und können routinemäßig unter Verwendung von normalem Fachwissen bestimmt werden. Eine gegenwärtig bevorzugte Matrix ist Kollagen, insbesondere Rinderkollagen. Eine andere geeignete Matrix ist entmineralisierter Knochen. Noch andere geeignete Matrizen sind Hydroxyapatite (HAp) mit variierenden molaren Verhältnissen an Calcium:Phosphat (Ca/P), Porosität und Kristallinität; bioaktive Keramiken; und Calcium-Phosphat-Keramiken, um nur einige zu nennen. Außerdem werden hierin auch Mischungen der vorstehend erwähnten Komponenten in Erwägung gezogen, in denen HAp/Tricalciumphosphat-Verhältnisse verändert sind. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Matrix β -Tricalcium-Phosphat (β -TCP).

[0016] In einem anderen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung Verwendungen der hierin beschriebenen Vorrichtung zur Induktion von lokaler Knochen- oder Knorpelbildung zur Reparatur von Knochen, Knorpel oder osteochondralen Defekten bereit. Die vorliegenden Verwendungen werden als nützlich in Erwägung gezogen, die Bildung von mindestens endochondralem Knochen, intramembranösem Knochen und Gelenkknorpel zu induzieren. Wie hierin offenbart, schließen die Verwendungen für die Reparatur die Behandlung von sowohl geschlossenen als auch offenen Defekten mit den vorstehend beschriebenen, verbesserten osteogenen Vorrich-

tungen ein. Wie hierin gelehrt wird, können die Verwendungen der vorliegenden Erfindung unter Verwendung der verbesserten Vorrichtungen, welche ein ausreichendes Volumen aufweisen, um die Defekt-Stelle zu füllen, sowie auch unter Verwendung von verbesserten Vorrichtungen, die das nicht tun, ausgeübt werden. Darüber hinaus sind als ein Ergebnis dieser Erfindung die Ausführungsformen zur Förderung der Knochen- und/oder Knorpel-Defektreparatur ohne die Notwendigkeit eines operativen Eingriffs vorhanden. Das Vorhandensein solcher Verwendungen hat Auswirkungen für beeinträchtigte Individuen wie zum Beispiel Diabetiker, Raucher, übergewichtige Personen und andere, deren allgemeine Gesundheit und beeinträchtigte Blutzirkulation zu ihren Extremitäten gefährdet ist, wenn ein operativer Eingriff benötigt wird. Beispiele von Defekten umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt, Defekte von kritischer Größe, Defekte von nicht-kritischer Größe, Pseudoarthrose-Frakturen, Frakturen, ostochondrale Defekte, chondrale Defekte und peridontale Defekte.

[0017] In einem anderen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung einen Kit für die Ausübung der vorstehend beschriebenen Verwendungen bereit. Wie hierin in Erwägung gezogen, umfasst eine Ausführungsform eines Kits zur Induktion von lokaler Knochenbildung oder Knorpelbildung eine verbesserte Vorrichtung, wobei das osteogene Protein und die Matrix im gleichen Behälter verpackt sind. In anderen Ausführungsformen befinden sich das osteogene Protein, die Matrix und das Bindemittel im gleichen Behälter. In noch anderen Ausführungsformen wird auch Benetzungsmittel bereitgestellt und wird getrennt von den anderen Kit-Komponenten verpackt.

[0018] Da die vorliegende Erfindung Praktikern verbesserte Materialien und Verwendungen zur Knochen- und Knorpelreparatur bereitstellt, einschließlich Reparatur von Gelenkknorpel, der in Säugergelenken vorhanden ist, überwindet sie Probleme, die normalerweise bei der Verwendung der Verfahren und Vorrichtungen des Fachgebiets angetroffen werden. Zum Beispiel kann die vorliegende Erfindung an der defekten Stelle eher die Bildung von echtem Hyalinknorpel induzieren als von Faserknorpel. Funktionsfähiger Hyalinknorpel bildet sich an der defekten Stelle an der gelenkbildenden Oberfläche von Knochen und degeneriert nicht mit der Zeit zu Faserknorpel. Im Gegensatz dazu resultieren Verfahren des Stands der Technik im Allgemeinen schlussendlich in der Entwicklung von Faserknorpel an der defekten Stelle. Im Unterschied zu Hyalinknorpel fehlt dem Faserknorpel die physiologische Fähigkeit, gelenkbildende Gelenke zu ihrer vollen Kapazität zurückzuführen. Wenn daher verbesserte osteogene Vorrichtungen gemäß den vorliegenden Verfahren verwendet werden, kann der Praktiker einen osteochondralen oder einen chondralen Defekt in einem funktionsfähigen, gelenkbildenden Gelenk im Wesentlichen wiederherstellen und die unerwünschte Bildung von Faserknorpel vermeiden, wie sie für Verfahren des Stands der Technik typisch sind. Wie hierin in Erwägung gezogen, enthält die Erfindung weiterhin allogene Ersatzmaterialien zur Reparatur von nicht-vaskulärem Gewebe in einem Skelettgelenk, welches in der Bildung von mechanisch und funktionell brauchbaren Ersatzgeweben an einem Gelenk resultiert.

[0019] Zusammenfassend können die Verwendungen, Vorrichtungen und Kits der vorliegenden Erfindung verwendet werden, um endochondrale oder intramembranöse Knochenbildung zur Reparatur von Knochendefekten zu induzieren, die spontan nicht heilen, sowie zur Förderung und Erhöhung der Rate und/oder Qualität der Bildung neuer Knochen, insbesondere der Reparatur von Brüchen und Fusionen, einschließlich operativen Wirbelsäulenversteifungen. Die Verwendungen, Vorrichtungen und Kits können auch die Reparatur von osteochondralen und/oder subchondralen Defekten induzieren, d.h. die Bildung von neuem Knochen und/oder des darüberliegenden Oberflächenknorpels induzieren. Die vorliegende Erfindung ist besonders für die Verwendung in der Reparatur von Defekten geeignet, die aus sich verschlechternden oder degenerativen Erkrankungen resultieren, wie zum Beispiel Osteochondritis dessicans, aber nicht darauf limitiert. Sie ist auch für die Verwendung in Patienten besonders geeignet, die wiederholte rekonstruktive Operationen benötigen, sowie auch für Krebspatienten. Andere Anwendungen umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt, protethische Reparatur, operative Wirbelsäulenversteifung, Skoliose, craniale/faciale Reparatur und massive Reparatur des allogenen Transplantats.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0020] Die vorhergehenden und andere Gegenstände und Merkmale der Erfindung sowie auch die Erfindung selbst werden durch die folgende Beschreibung vollständiger verstanden werden, wenn sie gemeinsam mit den begleitenden graphischen Darstellungen gelesen wird, in welchen:

[0021] [Fig. 1](#) ein Diagramm ist, welches die kohäsiven Eigenschaften von verschiedenen Anteilen (Gew./Gew.) des Bindemittels zu Anteilen (Gew./Gew.) der Standard-OP-Vorrichtung darstellt.

[0022] [Fig. 2](#) ein Diagramm ist, welches die Effekte von unterschiedlichen Volumina an Benetzungsmittel auf

die Integrität einer verbesserten osteogenen Vorrichtung zeigt.

Genaue Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

[0023] Um den Gegenstand der beanspruchten Erfindung klarer und präziser zu beschreiben, sind die folgenden Definitionen dazu gedacht, eine Anleitung für die Bedeutung der spezifischen Begriffe bereitzustellen, die in der folgenden geschriebenen Beschreibung und in den beigefügten Ansprüchen verwendet werden.

[0024] „Knochenbildung“ bedeutet die Bildung von endochondralem Knochen oder die Bildung von intramembranärem Knochen. In Menschen beginnt die Knochenbildung während der ersten 6-8 Wochen der fötalen Entwicklung. Vorläufer-Stammzellen mit mesenchyalem Ursprung wandern zu vorbestimmten Stellen, wo sie entweder: (a) sich verdichten, sich vermehren und in knochenbildende Zellen (Osteoblasten) differenzieren, ein Prozess, der im Schädel beobachtet wird und als „intramembranäre Knochenbildung“ bezeichnet wird, oder (b) sich verdichten, sich vermehren und sich als Zwischenstufe in knorpelbildende Zellen (Chondroblasten) differenzieren, welche anschließend durch knochenbildende Zellen ersetzt werden. Genauer gesagt differenzieren sich mesenchymale Stammzellen in Chondrocyten. Die Chondrocyten verkalken dann, machen Hypertrophie durch und werden durch neu gebildeten Knochen ersetzt, der durch differenzierte Osteoblasten gebildet wird, die jetzt an der Stelle vorhanden sind. Anschließend wird der mineralisierte Knochen weitgehend umgebildet und wird danach durch ein Ossiculum besetzt, welches mit funktionsfähigen Knochenmarkselementen gefüllt ist. Dieser Prozess wird in langen Knochen beobachtet und wird als „endochondrale Knochenbildung“ bezeichnet. Im postfötalen Leben besitzt der Knochen die Fähigkeit, sich nach einer Verletzung selbst zu reparieren, indem der zelluläre Prozess der embryonalen endochondralen Knochenentwicklung nachgeahmt wird. Das heißt, dass mesenchymale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, Periosteum und Muskel zur Migration in die Defekt-Stelle induziert werden können und mit der vorstehend beschriebenen Ereigniskaskade beginnen können. Dort akkumulieren sie, vermehren sich und differenzieren sich in Knorpel, der dann anschließend durch neu gebildeten Knochen ersetzt wird.

[0025] „Knochen“ bezieht sich auf verkalktes (mineralisiertes) Bindegewebe, das hauptsächlich eine Zusammensetzung von abgelagertem Calcium und Phosphat in der Form von Hydroxyapatit, Kollagen (hauptsächlich Typ I-Kollagen) und Knochenzellen wie zum Beispiel Osteoblasten, Osteocyten und Osteoclasten sowie auch Knochenmarksgewebe umfasst, welches das Innere von wahren endochondralen Knochen bildet. Knochengewebe unterscheidet sich wesentlich von anderen Geweben, einschließlich Knorpelgewebe. Genauer gesagt ist Knochengewebe vaskularisiertes Gewebe, zusammengesetzt aus Zellen und einem biphasischen Medium, umfassend eine mineralisierte, anorganische Komponente (hauptsächlich Hydroxyapatit-Kristalle) und eine organische Komponente (hauptsächlich Typ I-Kollagen). Glucosaminoglycane machen weniger als 2% dieser organischen Komponente und weniger als 1% des biphasischen Mediums selbst oder des Knochengewebes an sich aus. Darüber hinaus liegt das im Knochengewebe vorhandene Kollagen, im Vergleich mit Knorpelgewebe, in einer hoch-organisierten, parallelen Anordnung vor. Knochendefekte, ob aus degenerativen, traumatischen oder krebsartigen Krankheitsursachen, stellen eine beachtliche Herausforderung für den wiederherstellenden Chirurgen dar. Besonders schwierig ist die Rekonstruktion oder die Reparatur von Skeletteilen, welche einen Teil eines Multi-Gewebskomplexes darstellen, wie er zum Beispiel in Säugergelenken vorkommt.

[0026] „Knorpelbildung“ bedeutet die Bildung von Bindegewebe, welches Chondrocyten eingebettet in ein extrazelluläres Netzwerk enthält, umfassend Kollagenfasern (hauptsächlich Typ II-Kollagen, gemeinsam mit anderen weniger häufigen Arten wie zum Beispiel die Typen IX und XI), verschiedene Proteoglycane, andere Proteine und Wasser. „Gelenkknorpel“ bezieht sich spezifisch auf Hyalin- oder Gelenkknorpel, ein nicht-vaskuläres, nicht-mineralisiertes Gewebe, welches die gelenkbildenden Oberflächen der Knocheile in Gelenken bildet und die Bewegung der Gelenke ohne direkten Knochen-an-Knochenkontakt ermöglicht und dadurch die Abnutzung und Verletzung von gegenüberliegenden Knochenoberflächen verhindert. Normaler, gesunder Gelenkknorpel wird als „hyalin“ bezeichnet, d.h. er weist eine charakteristische Milchglas-Erscheinung auf. Unter physiologischen Bedingungen ruht Gelenkknorpelgewebe auf der darunter liegenden, mineralisierten Knochenoberfläche, die als subchondraler Knochen bezeichnet wird und die hoch vaskularisierte Ossikel enthält. Dieser Gelenk- oder hyaline Knorpel, der am Ende von artikulären Knochen gefunden wird, ist ein spezialisiertes, histologisch eindeutiges Gewebe und ist für die Verteilung des Belastungswiderstands gegen zusammendrückende Kräfte und das reibungslose Gleiten verantwortlich, das ein Teil der Gelenkfunktion ist. Gelenkknorpel hat wenig oder keine selbst-regenerative Eigenschaften. Wenn der Gelenkknorpel gerissen ist oder seine Dicke verringert ist oder sonst als eine Folge von Zeit, Erkrankung oder Trauma verletzt ist, ist seine Fähigkeit, die darunter liegende Knochenoberfläche zu schützen, somit beeinträchtigt. In normalem Gelenkknorpel besteht ein Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau des vorstehend beschriebenen, extrazellulären Netzwerks. In Gewebe, das jedoch wiederholtem Trauma ausgesetzt ist, zum Beispiel aufgrund von Reibung zwi-

schen schlecht ausgerichteten Knochen, die miteinander in Kontakt stehen, oder oder bei Gelenkerkrankungen, die durch einen Nettoverlust des Gelenkknorpels gekennzeichnet sind, z.B. Osteoarthritis, tritt ein Ungleichgewicht zwischen Synthese und Degeneration auf.

[0027] Andere Arten von Knorpel in Skelettgelenken schließen Faserknorpel und elastischen Knorpel ein. Sekundäre Knorpelgelenke werden durch Scheiben von Faserknorpel gebildet, welche die Wirbel in der Wirbelsäule verbinden. Im Faserknorpel ist das Mucopolysaccharid-Netzwerk mit markanten Kollagenbündeln durchwirkt und die Chondrocyten sind weiter gestreut als im hyalinen Knorpel. Elastischer Knorpel enthält Kollagenfasern, die histologisch ähnlich zu Elastinfasern sind. Dem Knorpelgewebe einschließlich Gelenkknorpel, im Gegensatz zu anderen Bindegeweben, fehlen Blutgefäße, Nerven, Lymphgefäße und Basalmembran. Knorpel ist aus Chondrocyten aufgebaut, die ein reichliches extrazelluläres Milieu synthetisieren, das aus Wasser, Kollagenen, Proteoglycanen und nicht-kollagenösen Proteinen und Lipiden besteht. Kollagen dient dazu, Proteoglycane einzufangen und dem Gewebe Zugfestigkeit zu verleihen. Typ II-Kollagen ist im Knorpelgewebe das vorherrschende Kollagen. Die Proteoglycane setzen sich aus einer variierenden Zahl von Glycosaminoglycanketten, Keratinsulfat, Chondroitinsulfat und/oder Dermatan-sulfat und N-gekoppelte und O-gekoppelte Oligosaccharide zusammen, die kovalent an einen Proteinkern gebunden sind.

[0028] Gelenk- oder Hyalinknorpel können von anderen Knorpelarten sowohl durch ihre Morphologie als auch durch ihre Biochemie unterschieden werden. Bestimmte Kollagene wie zum Beispiel die fibrösen knorpeligen Gewebe, welche in Narbengewebe vorkommen, sind zum Beispiel keloid und typisch für narbenartiges Gewebe, d.h. zusammengesetzt aus Kapillaren und reichlich vorhandenen, irregulären, unorganisierten Bündeln von Typ I- und Typ II-Kollagen. Im Gegensatz dazu ist Gelenkknorpel morphologisch durch oberflächliche im Vergleich zu mittlere im Vergleich zu tiefen Zonen gekennzeichnet, welche eine charakteristische Abstufung der Merkmale von der Gewebeoberfläche zur Basis des Gewebes, angrenzend an den Knochen, zeigen. In der oberflächlichen Zone sind die Chondrocyten zum Beispiel flach gedrückt und liegen parallel zur Oberfläche, eingebettet in ein extrazelluläres Netzwerk, welches tangential angeordnetes Kollagen und einige Proteoglycane aufweist. In der mittleren Zone, sind die Chondrocyten sphärisch und durch ein extrazelluläres Netzwerk umrundet, das reich an Proteoglycanen und schräg organisiertem Kollagenfasern ist. In der tiefen Zone, nahe dem Knochen, sind die Kollagenfasern vertikal orientiert. Die Keratinsulfatreichen Proteoglycane nehmen an Konzentration mit zunehmender Entfernung von der Knorpeloberfläche zu. Für eine genau Beschreibung der Gelenkknorpel-Mikrostruktur siehe zum Beispiel (Aydelotte und Kuettner, (1988), *Conn. Tiss. Res.* 18:205; Zanetti et al., (1985), *J. Cell Biol.* 101:53; und Poole et al., (1984), *J. Anat.* 138:13). Biochemisch kann Gelenkknorpel durch die Anwesenheit von Typ II- und Typ IX-Kollagen identifiziert werden, sowie durch die Anwesenheit von gut charakterisierten Proteoglycanen und die Abwesenheit von Typ X-Kollagen, welches mit der endochondralen Knochenbildung in Zusammenhang steht.

[0029] Zwei Defektarten werden in artikulären Oberflächen erkannt, d.h. Defekte über die gesamte Dicke sowie oberflächliche Defekte. Diese Defekte unterscheiden sich nicht nur im Ausmaß des physikalischen Schaden des Knorpels, sondern auch in der Art der Reparaturreaktion, die jede Art von Läsion hervorrufen kann. Die Defekte über die gesamte Dicke, die hierin auch als „osteochondrale Defekte“ bezeichnet werden, von einer gelenkbildenden Oberfläche schließen Schaden am Hyalinknorpel, der verkalkten Knorpelschicht und dem subchondralen Knochengewebe mit seinen Blutgefäßen und Knochenmark ein. Defekte über die gesamte Dicke können schwere Schmerzen verursachen, da die Knochenplatte sensorische Nervenendigungen enthält. Solche Defekte entstehen im Allgemeinen aus starkem Trauma und/oder während der späten Stadien degenerativer Knorpelerkrankung wie zum Beispiel eine Osteoarthritis. Defekte über die gesamte Dicke können gelegentlich zu Blutungen und der Induktion einer Reparaturreaktion aus dem subchondralen Knochen führen. In solchen Fällen ist das gebildete Reparaturgewebe jedoch eine vaskularisierte, faserartige Knorpelart mit ungenügenden biomechanischen Eigenschaften und bleibt auf einer Langzeit—Basis nicht bestehen. Im Gegensatz dazu sind oberflächliche Defekte im Gelenkknorpelgewebe auf das Knorpelgewebe selbst beschränkt. Solche Defekte werden hierin als „chondrale“ oder „subchondrale Defekte“ bezeichnet und sind berüchtigt, da sie nicht heilen und keine Neigung zu Reparaturreaktionen zeigen. Oberflächliche Defekte können als Fissuren, Risse oder Spalten in der Oberfläche des Knorpels auftreten. Sie enthalten keine blutenden Gefäße (Blutflecken) wie jene, die bei Defekten über die gesamte Dicke beobachtet wurden. Oberflächliche Defekte müssen keinen bekannten Grund haben, sie sind aber oft ein Resultat von mechanischen Störungen, die zu einer Abnutzung des Knorpelgewebes führen. Solche mechanische Störungen können durch ein Gelenktrauma verursacht werden, z.B. eine Verlagerung von gerissenem Meniskusgewebe in das Gelenk, Meniskusentfernung, Laxieren des Gelenks durch ein gerissenes Band, schlechte Ausrichtung der Gelenke oder Knochenfraktur oder durch Erbkrankheiten. Oberflächliche Defekte sind auch für die frühen Stadien von degenerativen Gelenkerkrankungen wie zum Beispiel Osteoarthritis kennzeichnend. Nachdem das Knorpelgewebe nicht innerviert oder vaskularisiert ist, heilen oberflächliche Defekte nicht und degenerieren oft in Defekte über die gesamte

Dicke.

[0030] „Defekt“ oder „Defekt-Stelle“, wie hierin in Erwägung gezogen, kann eine knöchrige, strukturelle Unterbrechung definieren, die Reparatur erfordert. Der Defekt kann ferner einen osteochondralen Defekt definieren, einschließlich einer strukturellen Unterbrechung von sowohl Knochen als auch darüberliegendem Knorpel. Ein Defekt kann die Konfiguration eines „Hohlraums“ annehmen, von welchem klar ist, dass er einen dreidimensionalen Defekt wie zum Beispiel eine Lücke, Höhle, ein Loch oder eine andere wesentliche Unterbrechung in der strukturellen Integrität eines Knochens oder Knorpels darstellt. Ein Defekt kann das Ergebnis eines Unfalls, einer Erkrankung, operativen Manipulation und/oder prothetischem Versagen sein. In gewissen Ausführungsformen ist der Defekt ein Hohlraum, welcher ein Volumen hat, das nicht zu endogener oder spontaner Reparatur im Stande ist. Solche Defekte haben im Allgemeinen den doppelten Durchmesser des betrachteten Knochens und werden auch als Defekte mit „kritischer Größe“ bezeichnet. Zum Beispiel versteht man im Fachgebiet bei Defektmodellen der Ulna von Hunden, dass solche Defekte ungefähr 3-4 cm groß sind, im Allgemeinen mindestens 2,5 cm, eine Lücke, die nicht zu spontaner Reparatur in der Lage ist. Siehe zum Beispiel Schmitz et al., *Clinical Orthopaedics and Related Research* 205:299-308 (1986); und Vukicevic et al., in *Advances in Molecular and Cell Biology*, Bd. 6, Seiten 207-224 (1993)(JAI Press, Inc.).

[0031] In segmentalen Defektmodellen von Kaninchen und Affen ist die Lücke ungefähr 1,5 cm bzw. 2,0 cm. In anderen Ausführungsformen ist der Defekt ein segmentaler Defekt von nicht kritischer Größe. Im Allgemeinen sind diese zu einer etwas spontanen Reparatur in der Lage, wenngleich sie biochemisch minderwertig zu jenen sind, die durch Ausübung der vorliegenden Innovation möglich gemacht werden. In bestimmten anderen Ausführungsformen ist der Defekt ein osteochondraler Defekt wie zum Beispiel ein osteochondraler Pfropfen. Ein solcher Defekt durchquert die Gesamtheit des darüberliegenden Knorpels und tritt, zumindest teilweise, in die darunterliegende knöchige Struktur ein. Im Gegensatz dazu durchquert ein chondraler oder subchondraler Defekt den darüberliegenden Knorpel teilweise bzw. im Ganzen, involviert aber den darunterliegenden Knochen nicht. Andere Defekte, die unter Verwendung der vorliegenden Erfindung für Reparatur empfänglich sind, schließen Pseudoarthrose-Frakturen; Knochenkavitäten; Tumorsektion; frische Frakturen (abgelenkt oder nicht abgelenkt); craniale/faciale Abnormalitäten; periodontale Defekte und Unregelmäßigkeiten; operative Wirbelsäulenversteifung; sowie jene Defekte, die aus Krankheiten wie zum Beispiel Krebs, Arthritis, einschließlich Osteoarthritis, stammen, und andere degenerative Knochenerkrankungen wie zum Beispiel Osteochondritis dessicans ein, sind aber nicht auf sie beschränkt.

[0032] „Reparatur“ soll neue Knochen- und/oder Knorpelbildung bedeuten, die ausreichend ist, um den Hohlraum oder die strukturelle Diskontinuität am Defekt zumindest teilweise zu füllen. Reparatur bedeutet jedoch nicht, oder benötigt andererseits nicht, einen Prozess der vollkommenen Heilung oder eine Behandlung, die in der Wiederherstellung eines Defektes zu dem physiologischen/strukturellen/mechanischen Stadium vor dem Defekt 100% wirksam ist.

[0033] „Matrix“, wie hierin in Erwägung gezogen, bedeutet ein nicht-polymeres, nicht-synthetisches Material, welches als osteokonduktives Substrat dienen kann und eine Gerüststruktur aufweist, auf der sich infiltrierende Zellen anlagern, sich vermehren und an den morphogenetischen Prozessen teilnehmen können, die in der Knochenbildung gipfeln. Wie hierin in Erwägung gezogen, schließt Matrix keine polymeren, synthetischen Materialien wie zum Beispiel polymere Matrizen ein, umfassend Homopolymere oder Co-Polymere von α -Hydroxy-Essigsäure und/oder α -Hydroxy-Propionsäure, einschließlich racemischer Gemische davon. Im Speziellen umfassen hierin in Erwägung gezogene Matrizen keine Homopolymere oder Co-Polymere von Glykolsäure, Milchsäure und Buttersäure, einschließlich Derivaten davon. Zum Beispiel kann die Matrix der vorliegenden Erfindung aus biologischen oder aus der Natur stammenden oder natürlich vorkommenden Materialien abgeleitet sein. Eine geeignete Matrix muss partikulär und porös sein, wobei die Porosität ein kritisches Merkmal für ihre Wirksamkeit zur Induktion von Knochenbildung, insbesondere endochondraler Knochenbildung, ist. Es ist selbstverständlich, dass der Begriff „Matrix“ eine strukturelle Komponente oder ein Substrat bedeutet, welches intrinsisch eine dreidimensionale Form aufweist, auf welcher bestimmte zelluläre Vorkommen stattfinden werden, die an der endochondralen Knochenmorphogenese beteiligt sind; eine Matrix wirkt als temporäre Gerüststruktur für infiltrierende Zellen und weist Zwischenräume zur Anlagerung, Vermehrung und Differenzierung solcher Zellen auf. Die vorliegende Erfindung zieht in Erwägung, dass eine verbesserte osteogene Vorrichtung mehr als ein Matrix-Material in Kombination umfassen kann; die relativen Verhältnisse können variiert werden, um das gewünschte klinische Ergebnis zu erzielen, und können routinemäßig durch einen Fachmann bestimmt werden. Eine gegenwärtig bevorzugte Matrix ist Kollagen, insbesondere Rinderkollagen. Eine andere geeignete Matrix ist entmineralisierter Knochen. Noch weitere geeignete Matrizen sind Hydroxyapatite (HAp) von variierenden/r molaren Verhältnissen an Calcium:Phosphat (Ca/P), Porosität und Kristallinität; bioaktive Keramiken; und Calcium-Phosphat-Keramiken, um nur einige zu nennen. Außerdem werden hierin auch

Mischungen der vorstehend erwähnten Komponenten in Erwägung gezogen, wobei HAp/Tricalciumphosphat-Verhältnisse verändert sind. Diese Matrizen können im Handel in Form von Körnchen, Blöcken und Pulvern erhalten werden. Zum Beispiel ist Pyrost[®] ein HAp-Block, stammend aus Rinderknochen (Osten AG, Schweiz); Collapta[®] ist ein HAp-Schwamm, der Kollagen enthält (Osten AG, Schweiz); Tricalcium-Phosphate (β -TCP) kann von Pharma GmbH (Deutschland) als Cerasob[®] erhalten werden, sowie auch von Clarkson Chromatography Products, Inc. (S. Williamsport, PA) oder Osteonics (Niederlande); TCP/HAp-Körnchen—Gemische können von Osteonics (Niederlande) erhalten werden; und 100% HAp-Pulver oder -Körnchen können von CAM (einem Tochterunternehmen von Osteotech, NJ) erhalten werden. Die Erzeugung und Charakterisierung von bestimmten der vorstehend erwähnten Matrizen sind im Fachgebiet ausführlich beschrieben worden und benötigen nicht mehr als Routineuntersuchungstechniken und durchschnittliches Fachwissen. Siehe zum Beispiel US 4,975,526; US 5,011,691; US 5,171,574; US 5,266,683; US 5,354,557; und US 5,468,845.

[0034] Andere der vorstehend erwähnten Matrizen sind im Fachgebiet auch gut beschrieben worden. Siehe zum Beispiel Biomaterial-Abhandlungen wie zum Beispiel LeGeros und Daculsi in Handbook of Bioactive Ceramics, II Seiten 17-28 (1990, CRC Press); und andere veröffentlichte Beschreibungen wie zum Beispiel Yang Cao, Jie Weng Biomaterials 17, (1996) Seiten 419-424; LeGeros, Adv. Dent. Res. 2, 164 (1988); Johnson et al., J. Orthopaedic Research, 1996, Bd. 14, Seiten 351-369; und Piattelli et al., Biomaterials 1996, Bd. 17, Seiten 1767-1770.

[0035] Gesintertes, hoch gebranntes β -TCP (β -Tricalcium-Phosphat) ist eine gegenwärtig bevorzugte Matrix. Gesintertes β -TCP hat eine höhere Auflösungsrate als gesinterte HAp's und gesintertes, biphasisches Calcium-Phosphat (BCP). Die Fähigkeit von β -TCP, die Knochenbildung zu unterstützen, scheint teilweise auf der Größe der Ca/P-Körnchen in der Matrix zu beruhen. Gesintertes β -TCP, welches eine Partikelgröße von zwischen 212 μ m und etwa 425 μ m aufweist, wird am meisten bevorzugt und kann von Clarkson Chromatography Products, Inc. (S. Williamsport, PA) oder Osteonics (Niederlande) erhalten werden. Nach Implantierung zeigen Vorrichtungen, die Partikel in der Größe innerhalb dieses Bereichs aufweisen, durch Bildgebungsanalyse hohe Resorptionsraten und niedrige entzündliche Reaktionen, wenn sie bei einer subkutanen Stelle bei einer Ratte implantiert werden, wie hierin anderswo beschrieben.

[0036] „Osteogene Vorrichtung“ bedeutet selbstverständlich eine Zusammensetzung, umfassend mindestens ein osteogenes Protein, das in einer Matrix verteilt ist. Wie hierin offenbart, umfasst eine „verbesserte osteogene Vorrichtung“ ein osteogenes Protein, eine Matrix, wie hierin definiert, und ein Bindemittel, wie vorstehend definiert. Im Gegensatz dazu umfasst eine „osteogene Standardvorrichtung“ ein osteogenes Protein und eine Matrix, aber kein Bindemittel; osteogene Standardvorrichtungen können entweder eine synthetische, polymere oder eine wie vorstehend definierte Matrix umfassen. In den Beispielen und Lehren, die nachstehend dargelegt werden, sind osteogene Standardvorrichtungen ferner bezeichnet; Standardvorrichtungen, OP-Vorrichtungen, OP-1-Vorrichtungen oder OP. Verbesserte osteogene Vorrichtungen werden ferner bezeichnet: CMC-enthaltende Vorrichtung, CMC-enthaltende Standardvorrichtung, CMC/OP-1-Vorrichtung, OP-1/CMC/Kollagen, OP-CMC/Kollagen und Fibrinkleber enthaltende, verbesserte Vorrichtung. Wie hierin verwendet, enthält eine „Scheinvorrichtung“ kein osteogenes Protein und ist frei von jedem bekanntem osteoinduktivem Faktor formuliert. Die vorliegende Erfindung zieht, wie hierin definiert, auch verbesserte Vorrichtungen in Betracht, umfassend mindestens zwei unterschiedliche osteogene Proteine und/oder mindestens zwei unterschiedliche Matrizen, wie hierin definiert. Andere Ausführungsformen der verbesserten Vorrichtungen können weiters mindestens zwei unterschiedliche Bindemittel umfassen, wie hierin definiert. In noch anderen Ausführungsformen kann, wie vorstehend definiert, jede einzelne der vorstehend erwähnten, verbesserten Vorrichtungen ferner ein Benetzungsmittel enthalten. Jede der vorstehend erwähnten Ausführungsformen kann auch strahlenundurchlässige Komponenten einschließen, wie zum Beispiel im Handel erhältliche Kontrastmittel. Im Allgemeinen gibt es drei gut bekannte Arten solcher Mittel-Hydroxyapatite, Bariumsulfat und organisches Jodid. Vorrichtungen, die strahlenundurchlässige Komponenten enthalten sind, wie anderswo hierin besprochen wird, für die Verabreichung der Vorrichtung an einer geschlossenen Defekt-Stelle besonders nützlich. Identifizierung einer geeigneten strahlenundurchlässigen Komponente benötigt nur normales Fachwissen und Routineuntersuchungen. Siehe zum Beispiel Radiografie-Abhandlungen einschließlich Ehrlich und McCloskey, Patient Care in Radiography (Mosby Publisher, 1993); Carol, Fuch's Radiographic Exposure, Processing and Quality Control (Charles C. Thomas Herausgeber, 1993); und Snopek, Fundamentals of Special Radiographic Procedures, (W.B. Saunders Company, 1992).

[0037] Bevorzugte Ausführungsformen von verbesserten Vorrichtungen haften am Knochen, Knorpel, Muskel und/oder an anderem Gewebe an. Sie haben verbesserte Handhabungseigenschaften und sind resistent gegen Ablösung während der Spülung während Operation und während des Zunähens. Auf ähnliche Weise sind sie kohäsiv und werden nicht durch Spülung und/der infiltrierende Körperflüssigkeiten wie zum Beispiel Blut

weggewaschen, abgelöst oder verdünnt. Bevorzugte Ausführungsformen bleiben sogar an einem gelenkbildenden Gelenk nach der Operation haften. Von besonderer Bedeutung ist, dass verbesserte Vorrichtungen leicht auf die defekten Stellen beschränkt werden. Die verbesserte osteogene Vorrichtung der vorliegenden Erfindung induziert funktionell beschleunigte Knochen- und/oder Knorpelbildung sowie stabilere Gewebereparatur höherer Qualität und kann diese Vorteile bei Dosierungen von osteogenem Protein erzielen, die niedriger sind als sie mit einer osteogenen Standardvorrichtung benötigt werden. Die Vermischung von osteogenem Protein mit nicht-synthetischer, nicht-polymerer Matrix und einem Bindemittel hat daher unerwartete Eigenschaften, welche der geübte Praktiker jetzt, wie hierin beispielhaft dargestellt, nützen kann. Eine gegenwärtig bevorzugte Ausführungsform umfasst OP-1, Kollagenmatrix und das Bindemittel Carboxymethylcellulose (CMC). Wie nachstehend besprochen wird, ist ein mit dem Bindemittel CMC in Zusammenhang stehender Vorteil seine Effektivität, sogar wenn es in relativ geringen Mengen vorhanden ist. Zum Beispiel kann OP-1 in bestimmten, hierin beispielhaft dargestellten Ausführungsformen in Mengen verwendet werden, die sich zwischen ungefähr 1,25 bis 2,50 mg pro ungefähr 1000 mg Kollagen und pro ungefähr 180 bis 200 mg CMC bewegen.

[0038] Diese Matrizen und das Bindemittel, wie hierin beschrieben, zeigen alle der vorstehend erwähnten, bevorzugten Handhabungseigenschaften, die mit einer verbesserten osteogenen Vorrichtung in Zusammenhang stehen.

[0039] In bestimmten anderen Ausführungsformen können diese Mengen an Protein, Matrix und Bindemittel gemäß den mit der Reparatur des Defekts in Zusammenhang stehenden Bedingungen und Umständen erhöht oder vermindert werden. Ein Benetzungsmittel wie zum Beispiel Salzlösung kann ferner hinzugefügt werden. Wie nachstehend beispielhaft dargestellt, nimmt eine bevorzugte Konfiguration für die Implantation an einer offenen Defektstelle eine Konsistenz von Kitt an. Sie kann durch den Chirurgen vor der Implantation modelliert und geformt werden. Diese Konfiguration wird durch Einstellen der Verhältnisse von Matrix zu Bindemittel zu Benetzungsmittel in einer Weise erzielt, die ähnlich jener ist, die hierin gelehrt wird. Wie weiter nachstehend beispielhaft dargestellt, kann ein geschlossener Defekt mit einer lockereren, flüssigeren Konfiguration der Vorrichtung behandelt werden, welche ähnlich einer viskosen Flüssigkeit ist. Solche Konfigurationen können ohne operativen Eingriff an der defekten Stelle injiziert werden. Abermals kann bloßes Einstellen der Verhältnisse von Matrix zu Bindemittel zu Benetzungsmittel diese Ausführungsform erzielen. Gegenwärtig umfasst eine bevorzugte, verbesserte Vorrichtung ungefähr 1 Teil Bindemittel (Gew./Gew.) zu ungefähr 5 Teilen Matrix (Gew./Gew.). Wie hierin nachstehend beschrieben, können, abhängig von der Natur des Bindemittels und/oder der Matrix, andere Verhältnisse verwendet werden, um verbesserte Vorrichtungen zu erzeugen.

[0040] Natürlich ist es ein wesentliches Merkmal jeder Formulierung der verbesserten osteogenen Vorrichtung, dass sie, sogar wenn transient angewendet, in der Bereitstellung von mindestens einer lokalen Quelle an osteogenem Protein an der defekten Stelle wirkungsvoll sein muss. Wie nachstehend beispielhaft dargestellt, hat der Bindemittelgehalt einer verbesserten osteogenen Vorrichtung keinen Einfluss auf die Proteinfreisetzung-/Rückhaltekinetiken. Das ist im Hinblick auf gegenteilige Beobachtungen überraschend, dass nämlich Polymer-enhaltende Standardvorrichtungen in der Abwesenheit von Komplex bildendem Material (definiert, dass es Cellulosematerialien beinhaltet) keine klinisch signifikanten osteoinduzierenden Wirkungen zeigen konnten, da die Proteindesorption zu groß war (siehe zum Beispiel US 5,597,897). Wie nachstehend beispielhaft dargestellt, wird Protein von der verbesserten Vorrichtung noch immer desorbiert, auch wenn ein wie hierin definiertes Bindemittel vorhanden ist, allerdings sind die osteoinduktiven Effekte leicht ersichtlich. Während wir nicht durch Theorie gebunden sein möchten, scheinen die unerwarteten Merkmale und Vorteile, die mit der vorliegenden Erfindung in Zusammenhang stehen, weniger mit einer Protein-Bindemittel-Interaktion in Beziehung zu stehen, sondern mehr mit einer Bindemittel-Matrix-Interaktion. Speziell scheint das Bindemittel, wie es hierin definiert ist, die durch die vorliegende Erfindung benötigte Matrix zu ergänzen und/oder mit ihr synergistisch zu interagieren. Das ist vordem nicht wahrgenommen worden und diese Kombination wird durch die Lehren des Stands der Technik nicht empfohlen. (Siehe zum Beispiel US 5,520,923; 5,597,897; und WO 95/24210).

[0041] Der Begriff „einheitliche“ Vorrichtung bezieht sich auf eine dem Praktiker als eine einzelne, vorge-mischte Formulierung bereitgestellte, verbesserte osteogene Vorrichtung, umfassend osteogenes Protein, Matrix und Bindemittel. Der Begriff „nicht-einheitliche“ Vorrichtung bezieht sich auf eine dem Praktiker als mindestens zwei getrennte Packungen bereitgestellte, verbesserte osteogene Vorrichtung zum Zusammenmischen vor der Verwendung. Üblicherweise umfasst eine nicht-einheitliche Vorrichtung mindestens ein Bindemittel, das getrennt von dem osteogenen Protein und der Matrix verpackt ist. Der Begriff „Träger“ bezieht sich auf eine Beimischung von Bindemittel und Matrix, so wie jedes hierin definiert ist. Demnach umfasst eine verbesserte osteogene Vorrichtung, wie sie hierin offenbart ist, osteogenes Protein und einen Träger.

[0042] Zusätzlich zu osteogenen Proteinen können verschiedene Wachstumsfaktoren, Hormone, Enzyme, therapeutische Zusammensetzungen, Antibiotika oder andere bioaktive Mittel auch in einer verbesserten osteogenen Vorrichtung enthalten sein. Demnach können verschiedene, bekannte Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel EGF, PDGF, IGF, FGF, TGF- α und TGF- β mit einer verbesserten osteogenen Vorrichtung kombiniert werden und an die Defekt-Stelle verabreicht werden. Eine verbesserte osteogene Vorrichtung kann auch verwendet werden, um chemotherapeutische Mittel, Insulin, Enzyme, Enzyminhibitoren und/oder Chemo-Lockstoffe/chemotaktische Faktoren zu verabreichen.

[0043] Unter „osteogenem Protein“ oder Knochen-morphogenetischem-Protein wird im Allgemeinen ein Protein verstanden, welches die volle Kaskade an morphogenetischen Abläufen induzieren kann, die in endochondraler Knochenbildung gipfeln. Wie anderswo hierin beschrieben wird, ist die Klasse an Proteinen durch menschliches osteogenes Protein (hOP-1) verkörpert. Andere osteogene Proteine, die in der Anwendung der Erfindung nützlich sind, umfassen osteogen aktive Formen von OP-1, OP-2, OP-3, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP9, DPP, Vgl, Vgr, 60A-Protein, GDF-1, GDF-3, GDF-5, 6, 7, BMP10, BMP11, BMP13, BMP15, UNIVIN, NODAL, SCREW, ADMP oder NEURAL und Aminosäuresequenzvarianten davon. In einer gegenwärtig bevorzugten Ausführungsform umfasst ein osteogenes Protein alle von: OP-1, OP-2, OP-3, BMP2, BMP4, BMP5, BMP6, BMP9 und Aminosäuresequenzvarianten und Homologe davon, einschließlich Arthomologe davon. Besonders bevorzugte osteogene Proteine sind jene, welche eine Aminosäuresequenz umfassen, die mindestens 70% Homologie mit den C-terminalen 102-106 Aminosäuren aufweist, welche die konservierte Sieben-Cystein-Domäne von menschlichem OP-1, BMP2 und verwandten Proteinen definieren. Bestimmte bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfassen das osteogene Protein OP-1. Bestimmte andere, bevorzugte Ausführungsformen umfassen das reife OP-1, solubilisiert in einer physiologischen Salzlösung. Wie anderswo hierin weiter beschrieben, können die für die Verwendung mit der Erfindung des Anmelders geeigneten osteogenen Proteine mittels Routineuntersuchungen unter Verwendung eines im Fachgebiet anerkannten Biotests, beschrieben durch Reddi und Sampath, identifiziert werden. Es wird hierin angenommen, dass „Aminosäure-Sequenzhomologie“ Aminosäure-Sequenzähnlichkeit bedeutet. Homologe Sequenzen teilen identische oder ähnliche Aminosäurereste, wobei ähnliche Reste konservative Austausche für, oder erlaubte Punktmutationen von, entsprechenden Aminosäureresten in einer ausgerichteten Referenzsequenz sind. Eine Kandidaten-Polypeptidsequenz, die 70% Aminosäurehomologie mit einer Referenzsequenz teilt, ist daher eine, in welcher irgendwelche 70% der ausgerichteten Reste entweder identisch sind zu, oder konservative Substitutionen sind von, den entsprechenden Resten in einer Referenzsequenz. Beispiele von konservierten Variationen schließen den Austausch von einem hydrophoben Rest wie zum Beispiel Isoleucin, Valin, Leucin oder Methionin ein, in einen anderen oder den Austausch eines polaren Restes in einen anderen, wie zum Beispiel die Substitution von Arginin für Lysin, Glutamin- für Asparaginsäure oder Glutamin für Asparagin und ähnliches, ein. Der Begriff „konservative Variation“ schließt auch die Verwendung einer substituierten Aminosäure anstatt einer nicht-substituierten Eltern-Aminosäure ein, vorausgesetzt dass Antikörper, die gegen das substituierte Polypeptid erzeugt werden, auch mit dem nicht-substituierten Polypeptid immunreagieren.

[0044] Proteine, die in dieser Erfindung nützlich sind, schließen eukaryontische Proteine ein, die als osteogene Proteine identifiziert wurden (siehe US Patent 5,011,691), wie zum Beispiel OP-1, OP-2, OP-3 und CBMP-2-Proteine, sowie Aminosäuresequenz-verwandte Proteine wie zum Beispiel DPP (aus *Drosophila*), Vgl (aus *Xenopus*), Vgr-1 (aus der Maus), GDF-1 (aus Menschen, siehe Lee (1991), PNAS 88:4250-4254), 60A (aus *Drosophila*, siehe Wharton et al. (1991) PNAS 88:9214-9218), Dorsalin-1 (aus Küken, siehe Basler et al. (1993) Cell 73:687-702 und GenBank-Zugangsnummer 112032) und GDF-5 (aus der Maus, siehe Storm et al. (1994) Nature 368:639-643). BMP-3 ist auch bevorzugt. Zusätzliche nützliche Proteine umfassen biosynthetische morphogenetische Konstrukte, offenbart in US-Pat. Nr. 5,011,691, z.B. COP-1, 3-5, 7 und 16 sowie auch andere, im Fachgebiet bekannte Proteine. Noch weitere Proteine umfassen osteogen aktive Formen von BMP-3b (siehe Takao, et al., (1996), Biochem. Biophys. Res. Comm. 219:656-662. BMP-9 (siehe WO95/33830), BMP-15 (siehe WO96/35710), BMP-12 (siehe WO95/16035), CDMP-1 (siehe WO 94/12814), CDMP-2 (siehe WO94/12814), BMP-10 (siehe WO94/26893), GDF-1 (siehe WO92/00382), GDF-10 (siehe WO95/10539), GDF-3 (siehe WO94/15965) und GDF-7 (WO95/01802).

[0045] Noch weitere nützliche Proteine umfassen Proteine, die durch DNAs codiert werden, die im Stande sind, mit einer DNA zu hybridisieren, die ein wie hierin beschriebenes osteogenes Protein codieren, und verwandte Analoge, Homologe, Muteine (biosynthetische Varianten) und ähnliches (siehe nachstehend). Bestimmte Ausführungsformen der verbesserten osteogenen Vorrichtungen, die hierin in Erwägung gezogen werden, umfassen osteogenes Protein, das funktionsfähig und/oder stabil an Matrix gebunden ist.

[0046] „Bindemittel“ wie es hierin verwendet wird, bedeutet jedes physiologischkompatible Material, welches,

wenn es mit osteogenem Protein und Matrix, wie hierin definiert, gemischt wird, Knochen- und/oder Knorpelbildung fördert. Das wie hierin beschriebene, bevorzugte Bindemittel fördert eine solche Reparatur unter Verwendung von weniger osteogenem Protein als in Standard-osteogenen Vorrichtungen. Das bevorzugte Bindemittel kann unter Verwendung der gleichen Menge des osteogenen Proteins wie die Standard-osteogenen Vorrichtungen Reparatur fördern, während manche mehr benötigen, um die Reparatur zu fördern. Wie es hierin gelehrt wird, kann der Fachmann eine wirksame Menge an Protein zur Verwendung mit jedem geeigneten Bindemittel unter Verwendung von Routineuntersuchungen bestimmen. Unter den anderen Eigenschaften des bevorzugten Bindemittels ist die Fähigkeit, die Vorrichtung geschmeidig, formbar und/oder anpassungsfähig; injizierbar; anhaftend an Knochen, Knorpel, Muskel und anderes Gewebe; resistent gegen Zerfall nach Waschen und/oder Spülen während der Operation; und resistent gegen Ablösung während der Operation, des Zunähens und nach der Operation zu machen, um nur wenige zu nennen. Außerdem kann ein Bindemittel in bestimmten bevorzugten Ausführungsformen die vorstehend erwähnten Merkmale und Vorteile erreichen, wenn es in geringen Anteilen vorhanden ist. Zum Beispiel kann eine gegenwärtig bevorzugte, verbesserte Vorrichtung ungefähr 1 Teil Bindemittel und ungefähr 5 Teile Matrix umfassen. Eine andere, gegenwärtig bevorzugte Vorrichtung umfasst ungefähr 3 Teile Bindemittel zu 5 Teilen Matrix. Noch eine weiter bevorzugte Vorrichtung umfasst ungefähr 1 Teil Bindemittel und ungefähr 10 Teile Matrix, während andere ungefähr 1 Teil Bindemittel und ungefähr 25 oder 50 Teile Matrix umfassen. Bestimmte Bindemittel können in gleichen oder größeren Verhältnissen relativ zur Matrix verwendet werden, aber solche Mittel sollten, wie hierin nachstehend gelehrt, getestet werden, um mögliche Matrix-Verdünnungseffekte zu identifizieren.

[0047] Das gemäß der Erfindung verwendete Bindemittel ist Carboxymethylcellulose, einschließlich des Natriumsalzes davon, wobei das Bindemittel eine Viskosität von etwa 10-200 cP und einen Substitutionsgrad von 0,65-0,90 aufweist.

[0048] „Benetzungsmittel“, wie hierin verwendet, bedeutet jede physiologisch verträgliche wässrige Lösung, vorausgesetzt dass sie nicht bei der Knochen- und/oder Knorpelbildung stört. In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird der verbesserten Vorrichtung ein Benetzungsmittel beigemischt, um die Konsistenz zu erzielen, die durch die Art der Defektreparatur benötigt wird. Wie hierin gelehrt, kann das Benetzungsmittel verwendet werden, um eine Kitt-Konfiguration zu erzielen, oder alternativ die Konfiguration einer viskosen Flüssigkeit. Ein gegenwärtig bevorzugtes Benetzungsmittel ist physiologische Salzlösung. Äquivalente können durch den Fachmann unter Verwendung von nicht mehr als Routineuntersuchungen und normales Fachwissen identifiziert werden.

[0049] Die Mittel zur Herstellung und Anwendung der Verwendungen, Implantate und Vorrichtungen der Erfindung sowie auch andere Materialaspekte, welche ihre Art und Nutzbarkeit betreffen, einschließlich wie der beanspruchte Gegenstand hergestellt und wie er verwendet werden soll, werden aus dem Folgenden weiter verstanden werden, das die beste, gegenwärtig in Erwägung gezogene Art der Anwendung der Erfindung darstellt. Es wird klar sein, dass die Erfindung nicht auf solche beispielhafte Arbeit oder auf die spezifischen Details beschränkt ist, die in diesen Beispielen dargelegt werden.

I. PROTEINERWÄGUNGEN

A. Biochemische, strukturelle und funktionelle Eigenschaften von morphogenetischen Knochenproteinen

[0050] Natürliche vorkommende Proteine, die hierin als osteogene oder morphogenetische Knochenproteine identifiziert und/oder bewertet wurden, bilden eine eindeutige Untergruppe innerhalb der lockeren evolutionären Gruppierung von sequenz-verwandten Proteinen, die als die TGF- β -Superfamilie oder -Supergen-Familie bekannt sind. Die natürlich vorkommenden Knochen-Morphogene teilen eine wesentliche Aminosäure-Sequenzhomologie in ihren C-terminalen Bereichen (Domänen). Üblicherweise werden die vorstehend erwähnten, natürlich vorkommenden osteogenen Proteine als ein Vorläufer translatiert, welcher eine N-terminale Signalpeptidsequenz von üblicherweise weniger als etwa 30 Resten aufweist, gefolgt von einer „Pro“-Domäne, welche abgespalten wird, um die reife C-terminale Domäne zu ergeben. Das Signalpeptid wird nach der Translation rasch bei einer Spaltstelle abgespalten, die in einer bestimmten Sequenz unter Verwendung des Verfahrens von Von Heijne (1986) *Nucleic Acids Research* 14:4683-4691 vorhergesagt werden kann. Die Prodomäne ist üblicherweise etwa dreimal größer als die vollkommen prozessierte reife C-terminale Domäne.

[0051] In bevorzugten Ausführungsformen haben die Paare an morphogenetischen Polypeptiden Aminosäuresequenzen, die jede eine Sequenz umfassen, welche eine definierte Beziehung mit einer Aminosäuresequenz eines Referenzmorphogens teilt. Hierin teilen bevorzugte osteogene Polypeptide eine definierte Beziehung mit einer Sequenz, die in osteogen aktivem menschlichem OP-1, SEQ ID NO: 2, vorhanden ist. Es könnte

jedoch jede einzelne oder mehrere der natürlich vorkommenden oder biosynthetischen, hierin offenbarten Sequenzen auf ähnliche Weise wie eine Referenzsequenz verwendet werden. Bevorzugte osteogene Polypeptide teilen eine definierte Beziehung mit mindestens der C-terminalen 6-Cystein-Domäne aus menschlichem OP-1, Reste 335-431 der SEQ ID NO: 2. Vorzugsweise teilen osteogene Polypeptide eine definierte Beziehung mit mindestens der C-terminalen 7-Cystein-Domäne von menschlichem OP-1, Reste 330-431 von SEQ ID NO: 2. Das heißt, dass bevorzugte Polypeptide in einem dimeren Protein mit morphogenetischer Knochenaktivität jeweils eine Sequenz umfassen, die einer Referenzsequenz entspricht oder funktionell dazu äquivalent ist.

[0052] Funktionell äquivalente Sequenzen schließen funktionell äquivalente Anordnungen von Cysteinresten ein, die innerhalb der Referenzsequenz angeordnet sind, einschließlich Aminosäure-Insertionen oder -Deletionen, welche die lineare Anordnung von diesen Cysteinen ändern, aber ihre Beziehung in der gefalteten Struktur des dimeren morphogenetischen Proteins nicht erheblich behindern, einschließlich ihrer Fähigkeit, solche intra- oder inter-Ketten-Disulfidbindungen zu bilden, die für die morphogenetische Aktivität notwendig sein könnten. Funktionell äquivalente Sequenzen schließen ferner jene ein, worin sich ein oder mehrere Aminosäurereste von dem entsprechenden Rest einer Referenzsequenz unterscheiden, z.B. die C-terminale 7 Cystein-Domäne (hierin auch als das konservierte 7-Cystein-Skelett bezeichnet) von menschlichem OP-1, vorausgesetzt dass dieser Unterschied die morphogenetische Knochenaktivität nicht zerstört. Demgemäß werden konservative Substitutionen von entsprechenden Aminosäuren in der Referenzsequenz bevorzugt. Aminosäurereste, die konservative Substitutionen für entsprechende Reste in einer Referenzsequenz sind, sind jene, die physikalisch und funktionell ähnlich zu dem entsprechenden Referenzrest sind, z.B. die ähnliche Größe, Form, elektrische Ladung, chemische Eigenschaften, einschließlich der Fähigkeit aufweisen, kovalente oder Wasserstoffbrücken zu bilden, oder ähnliches. Besonders bevorzugte konservative Substitutionen sind jene, welche die Kriterien erfüllen, die für eine akzeptierte Punktmutation in Dayhoff et al., (1978), 5 Atlas of Protein Sequence and Structure, Erg. 3, Kapitel 22 (Seiten 354-352), Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C. 20007, definiert sind.

[0053] Beispiele konservativer Substitutionen umfassen: konservative Substitutionen, die üblicherweise die Substitutionen von einer Aminosäure für eine andere mit ähnlichen Eigenschaften umfassen, z.B. Substitutionen innerhalb der folgenden Gruppen: Valin, Glycin; Glycin, Alanin; Valin, Isoleucin, Leucin; Asparaginsäure, Glutaminsäure; Asparagin, Glutamin; Serin, Threonin; Lysin, Arginin; und Phenylalanin, Tyrosin. Der Begriff „konservative Variation“ schließt auch die Verwendung von substituierten Aminosäuren anstatt einer unsubstituierten Eltern-Aminosäure ein, vorausgesetzt dass Antikörper, die gegen das substituierte Polypeptid erzeugt wurden, auch mit dem nicht-substituierten Polypeptid immunreaktiv sind.

[0054] Aus der Natur stammendes osteogenes Protein in seiner reifen, nativen Form ist ein glycosyliertes Dimer, welches üblicherweise ein offensichtliches Molekulargewicht von etwa 30-36 kDa aufweist, wie durch SDS-PAGE bestimmt. Wenn es reduziert wird, ergibt das 30-kDa- Protein zwei glycosylierte Peptiduntereinheiten, die offensichtliche Molekulargewichte von etwa 16 kDa und 18 kDa aufweisen. Im reduzierten Zustand weist das Protein keine nachweisbare osteogene Aktivität auf. Das nicht-glycosylierte Protein, welches auch osteogene Aktivität aufweist, hat ein offensichtliches Molekulargewicht von etwa 27 kDa. Wenn es reduziert wird, wird das 27-kDa-Protein zu zwei nicht-glycosylierten Polypeptiden, welche Molekulargewichte von etwa 14 kDa bis 16 kDa aufweisen, die im Stande sind, endochondrale Knochenbildung in Säugern zu induzieren. Wie vorstehend beschrieben, umfassen besonders nützliche Sequenzen jene, welche die C-terminalen 96- oder 102-Aminosäure-Sequenzen von DPP (aus *Drosophila*), Vgl (aus *Xenopus*), Vgr-1 (aus der Maus), der OP-1 und OP-2-Proteine, Proteine (siehe US-Pat. Nr. 5,011,691 und Oppermann et al.,) sowie der Proteine, welche als BMP2, BMP3, BMP4 (siehe WO88/00205, US-Patentnr. 5,013,649 und WO91/18098), BMP5 und BMP6 (siehe WO90/11366, PCT/US90/01630), BMP8 und BMP9 bezeichnet werden, umfassen.

[0055] Andere morphogenetische Proteine, die in der Anwendung der Erfindung nützlich sind, umfassen morphogenetisch aktive Formen von OP-1, OP-2, OP-3, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP9, GDF-5, GDF-6, GDF-7, DPP, Vgl, Vgr, 60A-Protein, GDF-1, GDF-3, GDF-5, GDF-6, GDF-7, BMP10, BMP11, BMP13, BMP15, UNIVIN, NODAL, SCREW, ADMP, NEURAL und Aminosäure-Sequenzvarianten davon. In einer gegenwärtig bevorzugten Ausführungsform umfassen osteogene Proteine irgendeines von: OP-1, OP-2, OP-3, BMP2, BMP4, BMP5, BMP6, BMP9 und Aminosäure-Sequenzvarianten und Homologe davon, einschließlich Arthomologe davon.

[0056] Veröffentlichung, die diese Sequenzen sowie ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften offenbaren, umfassen:

OP-1 und OP-2: U.S. 5,011,691, U.S. 5,266,683, Ozkaynak et al. (1990) EMBO J. 9: 2085-2093; OP-3; WO94/10203 (PCT US93/10520); BMP2, BMP3, MBP4; WO88/00205, Wozney et al. (1988) Science 242;

1528-1534); BMP5 und BMP6: Celeste et al. (1991) PNAS 87: 9843-9847; Vgr-1: Lyons et al. (1989) PNAS 86: 4554-4558; DPP: Padgett et al. (1987) Nature 325: 81-84; Vg-1 Weeks (1987) Cell 51: 861-867; BMP-9: WO95/33830 (PCT/US95/07084); BMP10: WO94/26893 (PCT/US94/05290); BMP-11: WO94/26892 (PCT/US94/05288); BMP12: WO95/16035 (PCT/US94/14030); BMP-13: WO95/16035 (PCT/US94/14030); GDF-1: WO92/00382 (PCT/US91/04096) und Lee et al (1991) PNAS 88: 4250-4254; GDF-8: WO94/21681 (PCT/US94/03019); GDF-9: WO94/15966 (PCT/US94/00685); GDF-10: WO95/10539 (PCT/US94/11440); GDF-11: WO96/01845 (PCT/US95/08543); BMP-15: WO96/36710 (PCT/US96/06540); MP121: WO96/01316 (PCT/EP95/02552); GDF-5 (CDMP-1, MP52); WO94/15949 (PCT/US94/00657) und WO96/14335 (PCT/US94/12814) und WO93/16099 (PCT/EP93/00350); GDF-6 (CDMP-2, BMP13): WO95/01801 (PCT/US94/07762) und WO96/14335 und WO95/10635 (PCT/US94/14030); GDF-7 (CDMP-3, BMP12); WO95/10802 (PCT/US94/07799) und WO95/10635 (PCT/US94/14030).

[0057] In einer anderen Ausführungsform umfassen nützliche Proteine biologisch aktive, biosynthetische Konstrukte, einschließlich neuer, biosynthetischer, morphogenetischer Proteine und chimärer Proteine, die unter Verwendung von Sequenzen aus zwei oder mehreren bekannten Morphogenen entworfen wurden.

[0058] Siehe auch die biosynthetischen Konstrukte, die in US-Patentnr. 5,011,691 offenbart werden (z.B. COP-1, COP-3, COP-4, COP-5, COP-7 und COP-16).

[0059] In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen schließen die hierin nützlichen morphogenetischen Knochenproteine jene ein, in welchen die Aminosäuresequenzen eine Sequenz umfassen, welche mindestens 70% Aminosäure-Sequenzhomologie oder „Ähnlichkeit“ und vorzugsweise 80% Homologie oder Ähnlichkeit mit einem morphogenetischen Referenzprotein teilt, das aus den vorhergehenden natürlich vorkommenden Proteinen ausgewählt ist. Vorzugsweise ist das Referenzprotein menschliches OP-1 und die Referenzsequenz davon ist die C-terminale 7-Cystein-Domäne, die in osteogen aktiven Formen des menschlichen OP-1 vorhanden ist, Reste 330-431 von SEQ ID NO: 2. In bestimmten Ausführungsformen wird ein Polypeptid, von dem vermutet wird, dass es funktionell äquivalent zu einem morphogenetischen Referenzpolypeptid ist, daran unter Verwendung des Verfahrens von Needleman et al., (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453 ausgerichtet, was bequem durch Computerprogramme wie zum Beispiel dem Align-Programm (DNASTAR, Inc.) umgesetzt wird. Wie vorstehend erwähnt, werden interne Lücken und Aminosäure-Insertionen in der Kandidatensequenz zum Zwecke der Berechnung der definierten Beziehung ignoriert und herkömmlich als ein Grad an Aminosäure-Sequenzhomologie oder -Identität zwischen den Kandidaten und Referenzsequenzen ausgedrückt. „Aminosäure-Sequenzhomologie“ wird hierin so verstanden, dass es sowohl Aminosäure-Sequenzidentität als auch -Ähnlichkeit einschließt. Homologe Sequenzen teilen idente und/oder ähnliche Aminosäurereste, wobei ähnliche Reste konservative Substitutionen für, oder „erlaubte Punktmutationen“ von, entsprechenden Aminosäureresten in einer ausgerichteten Referenzsequenz sind. Eine Kandidaten- Polypeptidsequenz, die 70% Aminosäurehomologie mit einer Referenzsequenz teilt, ist eine, in welcher irgendwelche 70% der ausgerichteten Reste entweder identisch sind zu, oder konservative Substitutionen sind von, den entsprechenden Resten in einer Referenzsequenz. In einer gegenwärtig bevorzugten Ausführungsform ist die Referenzsequenz OP-1. Die hierin nützlichen morphogenetischen Knochenproteine schließen demgemäß alle, phylogenetische Gegenstücke und andere Varianten der bevorzugten Referenzsequenz ein, egal ob natürlich vorkommend oder biosynthetisch erzeugt (z.B. einschließlich „Muteine“ oder „mutierte Proteine“), sowie neue Mitglieder der allgemein morphogenetischen Familie von Proteinen, einschließlich jenen die vorstehend dargelegt und identifiziert wurden. Bestimmte, besonders bevorzugte morphogenetische Polypeptide teilen mindestens 60% Aminosäure-Identität mit der bevorzugten Referenzsequenz von menschlichem OP-1, noch mehr bevorzugt mindestens 65% Aminosäure-Identität damit.

[0060] In anderen bevorzugten Ausführungsformen wird die Familie der morphogenetischen Knochenpolypeptide, die in der vorliegenden Erfindung nützlich sind, und Mitglieder davon durch eine generische Aminosäuresequenz definiert. Zum Beispiel beinhalten die nachstehend offenbarte generische Sequenz 7 (SEQ ID NO: 4) und generische Sequenz 8 (SEQ ID NO: 5) die unter den bevorzugten, bis jetzt identifizierten Protein-Familienmitgliedern geteilten Homologien, einschließlich mindestens OP-1, OP-2, OP-3, CBMP-2A, CBMP-2B, BMP-3, 60A, DPP, Vgl, BMP-5, BMP-6, Vgr-1 und GDF-1. Die Aminosäuresequenzen für diese Proteine werden, wie vorstehend zusammengefasst, hierin und/oder im Fachgebiet beschrieben. Die generischen Sequenzen umfassen sowohl die durch diese Sequenzen geteilte Aminosäure-Identität in der C-terminalen Domäne, definiert durch die 6- und 7-Cystein-Skelette (generische Sequenzen 7 bzw. 8), sowie alternative Reste für die variablen Positionen innerhalb der Sequenz. Die generischen Sequenzen stellen ein geeignetes Cystein-Skelett bereit, wobei sich inter- oder intramolekulare Disulfidbrücken bilden können, und sie enthalten bestimmte kritische Aminosäuren, welche die tertiäre Struktur der gefalteten Proteine wahrscheinlich beeinflussen. Außerdem ermöglichen die generischen Sequenzen ein zusätzliches Cystein an Position 36 (generi-

sche Sequenz 7) oder Position 41 (generische Sequenz 8) und schließen damit die morphogenetisch aktiven Sequenzen von OP-2 und OP-3 ein.

Generische Sequenz 7

			Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Phe	Xaa	Xaa
			1				5		
Xaa	Gly	Trp	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Pro
		10					15		
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Ala	Xaa	Tyr	Cys	Xaa	Gly
		20					25		
Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
		30					35		
Xaa	Xaa	Xaa	Asn	His	Ala	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
		40					45		
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
		50					55		
Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Cys	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa
		60					65		
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
		70					75		
Xaa	Xaa	Xaa	Val	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
		80					85		
Xaa	Met	Xaa	Val	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Cys	Xaa
		90					95		

wobei jedes Xaa unabhängig ausgewählt wird aus einer Gruppe von einer oder mehreren spezifizierten Aminosäuren, definiert wie folgt: „R“ bedeutet „Rest“ und

Xaa bei R2 = (Tyr or Lys); Xaa bei R3 = Val or Ile); Xaa bei R4 = (Ser, Asp or Glu); Xaa bei R6 = (Arg, Gln, Ser, Lys or Ala); Xaa bei R7 = (Asp or Glu); Xaa bei R8 = (Leu, Val or Ile); Xaa bei R11 = (Gln, Leu, Asp, His, Asn or Ser); Xaa bei R12 = (Asp, Arg, Asn od.Glu); Xaa bei R13 = (Trp od.Ser); Xaa bei R14 = (Ile oder Val); Xaa bei R15 = (Ile od.Val); Xaa bei R16 (Ala od. Ser); Xaa bei R18 = (Glu, Gln, Leu, Lys, Pro od.Arg); Xaa bei R19 = (Gly od.Ser); Xaa bei R20 = (Tyr od.Phe); Xaa bei R21 = (Ala, Ser, Asp, Met, His, Gln, Leu od.Gly); Xaa bei R23 = (Tyr, Asn od.Phe); Xaa bei R26 = (Glu., His, Tyr, Asp, Gln, Ala od.Ser); Xaa bei R28 = (Glu, Lys, Asp, Gln od.Ala); Xaa bei R30 = (Ala, Ser, Pro, Gln, Ile od.Asn); Xaa bei R31 = (Phe, Leu od. Tyr); Xaa bei R33 = (Leu, Val od. Met); Xaa bei R34 = (Asn, Asp, Ala, Thr od.Pro); Xaa bei R35 = (Ser, Asp, Glu, Leu, Ala od. Lys); Xaa bei R36 = (Tyr, Cys, His, Ser od. Ile); Xaa bei R37 = (Met, Phe, Gly od.Leu); Xaa bei R38 = (Asn, Ser od. Lys); Xaa bei R39 = (Ala, Ser, Gly od. Pro); Xaa bei R40 = (Thr, Leu od.Ser); Xaa bei R44 = (Ile Valod. Thr); Xaa bei R45 = (Val, Leu, Met od.Ile); Xaa bei R46 = (Gln od.Arg); Xaa bei R47 = (Thr, Ala od.Ser); Xaa bei R48 = (Leu od.Ile); Xaa bei R49 = (Val od.Met); Xaa bei R50 = (His, Asn od.Arg); Xaa bei R51 = (Phe, Leu, Asn, Ser, Ala od. Val); Xaa bei R52 = (Ile, Met, Asn, Ala, Val, Gly od. Leu); Xaa bei R 53 = (Asn, Lys, Ala, Glu, Gly od. Phe), Xaa bei R54 = (Pro, Ser od.Val), Xaa bei R55 = (Glu, Asp, Asn, Gly, Val, Pro od. Lys); Xaa bei R56 = (Thr, Ala Val, Lys, Asp, Tyr, Ser, Gly, Ile od.His); Xaa bei R57 = (Val, Ala od.Ile); Xaa bei R58 = (Pro od.Asp); Xaa bei R.59 = (Lys, Leu od.Glu); Xaa bei R60 = (Pro, Val od.Ala); Xaa bei R63 = (Ala od.Val); Xaa bei R65 = (Thr, Ala od.Glu); Xaa bei R66 = (Gln, Lys, Arg oder Glu); Xaa bei R67 = (Leu, Met od.Val); Xaa bei R68 = (Asn, Ser, Asp od.Gly); Xaa bei R69 = (Ala, Pro od. Ser); Xaa bei R70 = (Ile, Thr, Val od.Leu); Xaa bei R71 = (Ser, Ala od.Pro); Xaa bei R72 = (Val Leu, Met od. Ile); Xaa bei R74 = (Tyr od.Phe); Xaa bei R75 = (Phe, Tyr, Leu oder His); Xaa bei R76 = (Asp, Asn od.Leu); Xaa bei R77 = (Asp, Glu, Asn, Arg od. Ser); Xaa bei R78 = (Ser, Gln, Asn, Tyr od.Asp); Xaa bei R79 = (Ser, Asn, Asp, Glu od.Lys); Xaa bei R80 = (Asn, Thr od.Lys), Xaa bei R82 = (Ile, Val. od.Asn); Xaa bei R84 = (Lys od.Arg); Xaa bei R85 = (Lys, Asn, Gln, His, Arg od.Val); Xaa bei R86 = (Tyr, Glu od.His); Xaa bei R87 = (Arg, Gln, Glu od.Pro); Xaa bei R88 = (Asn, Glu, Trpod. Asp); Xaa bei R90 = (Val, Thr, Ala od.Ile); Xaa bei R92 = (Arg, Lys, Val, Asp, Gln od.Glu); Xaa bei R93 = (Ala, Gly, Glu od. Ser); Xaa bei R95 = (Gly od.Ala); Xaa bei R97 = (His od.Arg).

[0061] Die generische Sequenz 8 (SEQ ID NO: 5) schließt die gesamte generische Sequenz 7 ein und umfasst zusätzlich die folgende Sequenz (SEQ ID NO: 8) an ihrem N-Terminus:

Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5

[0062] Beginnend mit Rest 7 ist demgemäß jedes „Xaa“ in der generischen Sequenz 8 eine festgelegte Aminosäure, definiert wie für die generische Sequenz 7, mit dem Unterschied, dass jede Nummer eines Restes, die für die generische Sequenz 7 beschrieben ist, in der generischen Sequenz 8 um fünf verschoben ist. Daher bezieht sich „Xaa bei R 2 = (Tyr oder Lys) in der generischen Sequenz 7 auf Xaa bei R 7 in der generischen Sequenz 8. Xaa bei R 2 = (Lys, Arg, Ala oder Gln); Xaa bei R 3 = (Lys, Arg oder Met); Xaa bei R 4 = (His, Arg oder Gln) und Xaa bei R 5 = (Glu, Ser, His, Gly, Arg, Pro, Thr oder Tyr) in der generischen Sequenz 8.

[0063] In einer anderen Ausführungsform schließen nützliche osteogene Proteine jene ein, die durch die generischen Sequenzen 9 und 10 definiert sind, definiert wie folgt.

[0064] Genau gesagt sind die generischen Sequenzen 9 und 10 zusammengesetzte Aminosäuresequenzen der folgenden Proteine: menschliches OP-1, menschliches OP-2, menschliches OP-3, menschliches BMP-2, menschliches BMP-3, menschliches BMP-4, menschliches BMP-5, menschliches BMP-6, menschliches BMP-8, menschliches BMP-9, menschliches BMP-10, menschliches BMP-11, Drosophila-60A, Xenopus-Vg-1, Seeigel-UNIVIN, menschliches CDMP-1 (Maus-GDF-5), menschliches CDMP-2 (Maus-GDF-6, menschliches BMP-13), menschliches CDMP-3 (Maus-GDF-7, menschliches BMP-12), Maus-GDF-3, menschliches GDF-1, Maus-GDF-1, Huhn-DORSALIN, dpp, Drosophila-SCREW, Maus-NODAL, Maus-GDF-8, menschliches GDF-8, Maus-GDF-9, Maus-GDF-10, menschliches GDF-11, Maus-GDF-11, menschliches BMP-15, und Ratten-BMP3b. Wie die generische Sequenz 7 beherbergt die generische Sequenz 9 das C-terminale 6-Cystein-Skelett und wie die generische Sequenz 8 beherbergt die generische Sequenz 10 das 7-Cystein-Skelett.

Generische Sequenz 9 (SEQ ID NO: 6)

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5					10
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa
				15					20
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Gly	Xaa	Cys	Xaa
				25					30
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				35					40
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				45					50
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				55					60
Xaa	Cys	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				65					70
Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				75					80
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				85					90
Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Cys	Xaa			
				95					

wobei jedes Xaa unabhängig von einer Gruppe von einer oder mehreren festgelegten Aminosäuren ausgewählt wird, definiert wie folgt: „R“ bedeutet „Rest“ und

Xaa bei R1 (Phe, Leu od.Glu); Xaa bei R2 = (Typ, Phe, His, Arg, Thr, Lys, Gln, Val od.Glu); Xaa bei R3 = (Val, Ile, Leu od.Asp); Xaa bei R4 = (Ser, Asp, Glu, Asn od.Phe); Xaa bei R 5 = (Phe od.Glu); Xaa bei R 6 = (Arg, Gln, Lys, Ser, Glu, Ala od.Asn), Xaa bei R 7 = (Asp, Glu, Leu, Ala od.Gln); Xaa bei R 8 = (Leu, Val, Met, Ile od.Phe); Xaa bei R 9 = (Gly, His od.Lys); Xaa bei R 10 = (Trp od.Met); Xaa bei R 11 = (Gln, Leu, His, Glu, Asn, Asp, Ser od. Gly); Xaa bei R 12 = (Asp, Asn, Ser, Lys, Arg, Glu oder His); Xaa bei R 13 = (Trp od. Ser), Xaa bei R 14 = (Ile od. Val); Xaa bei R 15 = (Ile od.Val); Xaa bei R 16 = (Ala, Ser, Tyr od.Trp); Xaa bei R 18 = (Glu, Lys, Gln, Met, Pro, Leu, Arg, His od. Lys); Xaa bei R 19 = (Gly, Glu, Asp, Lys, Ser, Gln, Arg od. Phe); Xaa bei R 20 = (Tyr oder Phe); Xaa bei R 21 = (Ala, Ser, Gly, Met, Gln, His, Glu, Asp, Leu, Asn, Lys od.Thr); Xaa bei R 22 = (Ala od.Pro); Xaa bei R 23 = (Tyr, Phe, Asn, Ala od.Agr); Xaa bei R 24 = (Tyr, His, Glu, Phe od.Arg); Xaa bei R 26 = (Glu, Asp, Ala, Ser, Tyr, His, Lys, Arg, Gln od. Gly); Xaa bei R 28 = (Glu, Asp, Leu, Val, Lys, Gly, Thr, Ala od.Gln); Xaa bei R 30 = (Ala, Ser, Ile, Asn, Pro, Glu, Asp, Phe, Gln od. Leu); Xaa bei R 31 = (Phe, Tyr, Leu, Asn, Gly od.Arg); Xaa bei R 32 = (Pro, Ser, Ala od.Val); Xaa bei R 33 = (Leu, Met, Glu, Phe od. Val); Xaa bei R 34 = (Asn, Asp, Thr, Gly, Ala, Arg, Leu od. Pro); Xaa bei R 35 = (Ser, Ala, Glu, Asp, Thr, Leu, Lys, Gln od. His); Xaa bei R 36 = (Tyr, His, Cys, Ile, Arg, Asp, Asn, Lys, Ser, Glu od.Gly); Xaa bei R 37 = Met, Leu, Phe, Val, Gly od. Tyr); Xaa bei R 38 = (Asn, Glu, Thr, Pro, Lys, His, Gly, Met, Val od.Arg); Xaa bei R 39 = (Ala, Ser, Gly, Pro od.Phe); Xaa bei R 40 = (Thr, Ser, Leu, Pro, His od.Met); Xaa bei R 41 = (Asn, Lys, Val, Thr od. Gln); Xaa bei R 42 = (His, Tyr od.Lys); Xaa bei R 43 = (Ala, Thr, Leu od.Tyr); Xaa bei R 44 = (Ile, Thr, Val, Phe, Tyr, Met od.Pro); Xaa bei R45 = (Val, Leu, Met, Ile od. His), Xaa bei R 46 = (Gln, Arg. od.Thr); Xaa bei R 47 (Thr, Ser, Ala, Asn od.His); Xaa bei R 48 = (Leu, Asn od.Ile); Xaa bei R 49 = (Val, Met, Leu, Pro od.Ile); Xaa bei R 50 = (His, Asn, Arg, Lys, Tyr od. Gln); Xaa bei R 51 = (Phe, Leu, Ser, Asn, Met, Ala, Arg, Glu, Gly od. Gln); Xaa bei R52 = (Ile, Met, Leu, Val, Lys, Gln, Ala od. Tyr); Xaa bei R 53 = (Asn, Phe, Lys, Glu, Asp, Ala, Gln, Gly, Leu od.Val); Xaa bei R 54 = (Pro, Asn, Ser, Val od.Asp); Xaa bei R 55 = (Glu, Asp, Asn, Lys, Arg, Ser, Gly Thr, Gln, Pro od. His); Xaa bei R 56 = (Thr.His, Tyr, Ala, Ile, Lys, Asp, Ser, Gly od.Arg); Xaa bei R 57 = (Val, Ile, Thr, Ala, Leuod. Ser); Xaa bei R 58 = (Pro, Gly, Ser, Asp od.Ala); Xaa bei R 59 = (Lys, Leu, Pro, Ala, Ser, Glu, Arg od.Gly); Xaa bei R 60 = (Pro, Ala, Val, Thr od. Ser); Xaa bei R 61 = (Cys, Val od. Ser), Xaa bei R 63 = (Ala, Val od.Thr); Xaa bei R 65 = (Thr, Ala, Glu, Val, Gly, Asp oder Tyr); Xaa bei R 66 = (Gln, Lys, Glu, Arg od.Val); Xaa bei R 67 (Leu, Met, Thr od. Tyr); Xaa bei R 68 = (Asn, Ser. Gly, Thr, Asp, Glu, Lys od.Val); Xaa bei R 69 = (Ala, Pro, Gly od. Ser); Xaa bei R 70 = (Ile, Thr, Leu od.Val); Xaa bei R 71 = (Ser, Pro, Ala, Thr, Asn od.Gly); Xaa bei R 72 = (Val, Ile, Leu od.Met); Xaa bei R 74 = (Tyr, Phe, Arg, Thr, Tyr od.Met), Xaa bei R 75 = (Phe, Tyr, His, Leu, Ile, Lys, Gln od.Val); Xaa bei R 76 = (Asp, Leu, Asn od.Glu); Xaa bei R 77 = (Asp, Ser, Arg, Asn, Glu, Ala, Lys, (Gly od. Pro); Xaa bei R 78 = (Ser, Asn, Asp, Tyr, Ala, Gly, Gln, Met, Glu, Asn od.Lys); Xaa bei R 79 = (Ser, Asn, Gln, Asp, Val, Lys, Gly, Gln od. Arg); Xaa bei R 80 = (Asn, Lys, Thr; Pro, Val, Ile, Arg, Ser od.Gln); Xaa bei R 81 = (Val, Ile, Thr od.Ala); Xaa bei R 82 = (Ile; Asn, Val, Leu, Tyr, Asp od.Ala); Xaa bei R 83 = (Leu, Tyr, Lys od.Ile); Xaa bei R 84 = (Lys, Arg, Asn, Tyr, Phe, Thr, Glu od.Gly); Xaa bei R 85 = (Lys, Arg, His, Gln, Asn, Glu od. Val); Xaa bei R 86 = (Tyr, His, Glu od.Ile); Xaa bei R 87 = (Arg, Glu, Gln, Pro od. Lys); Xaa bei R 88 = (Asn, Asp, Ala, Glu, Gly od.Lys); Xaa bei R 89 = (Met od. Ala); Xaa bei R 90 = (Val, Ile, Ala, Thr, Ser od. Lys); Xaa bei R 91 = (Val od. Ala); Xaa bei R 92 = (Arg, Lys, Gln, Asp, Glu, Val, Ala, Ser od. Thr); Xaa bei R 93 = (Ala, Ser, Glu, Gly, Arg oder Thr); Xaa bei R 95 = (Gly, Ala od.Thr); Xaa bei R 97 = (His, Arg, Gly, Leu od.Ser).

[0065] Nach Rest 53 in rBMP3b und mGDF-10 befindet sich ferner ein Ile; nach Rest 54 in GDF-1 ist ein T; nach Rest 54 in BMP3 ist ein V; nach Rest 78 in BMP-8 und Dorsalin ist ein G; nach Rest 37 in hGDF-1 ist ein Pro, Gly, Gly, Pro.

[0066] Die generische Sequenz 10 (SEQ ID NO: 7) schließt die gesamte generische Sequenz 9 (SEQ ID NO: 6) ein und umfasst zusätzlich die folgende Sequenz (SEQ ID NO: 9) an ihrem N-Terminus:

SEQ ID NO: 9				
Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5

[0067] Beginnend mit Rest 6 ist demgemäß jedes „Xaa“ in der generischen Sequenz 10 eine festgelegte Aminosäure, definiert wie für die generische Sequenz 9, mit der Ausnahme, dass jede Nummer eines Restes, die für die generische Sequenz 9 beschrieben wird, in der generischen Sequenz 10 um fünf verschoben ist. Daher bezieht sich „Xaa bei R 1 = (Tyr, Phe, His, Arg, Thr, Lys, Gln, Val oder Glu)“ in der generischen Sequenz 9 auf Xaa bei R 6, in der generischen Sequenz 10. Xaa bei R 2 = (Lys, Arg, Gln, Ser, His, Glu, Ala oder Cys); Xaa bei R3 = (Lys, Arg, Met, Lys, Thr, Leu, Tyr oder Ala); Xaa bei R 4 = (His, Gln, Arg, Lys, Thr, Leu, Val, Pro oder Tyr); und Xaa bei R 5 = (Gln, Thr, His, Arg, Pro, Ser, Ala, Gln, Asn, Tyr, Lys, Asp oder Leu) in der generischen Sequenz 10.

[0068] Wie vorstehend erwähnt, weisen bestimmte, gegenwärtig bevorzugte morphogenetische Knochen-Polypeptidsequenzen, die in dieser Erfindung nützlich sind, mehr als 60% Identität auf, vorzugsweise mehr als 65% Identität, mit der Aminosäuresequenz, welche die bevorzugte Referenzsequenz von hOP-1 definiert. Diese besonders bevorzugten Sequenzen umfassen allelische und phylogenetische Gegenstück-Varianten der OP-1- und OP-2-Proteine, einschließlich des Drosophila-60A-Proteins. Demgemäß schließen in bestimmten, besonders bevorzugten Ausführungsformen nützliche morphogenetische Proteine aktive Proteine ein, umfassend Paare von Polypeptidketten innerhalb der generischen Aminosäuresequenz, die hierin als „OPX“ (SEQ ID NO: 3) bezeichnet wird, welche das 7-Cystein-Skelett definiert und die Homologien zwischen mehreren identifizierten Varianten von OP-1 und OP-2 beherbergt. Wie darin beschrieben, wird jedes Xaa an einer bestimmten Position unabhängig von den Resten ausgewählt, die an der entsprechenden Position in der C-terminalen Sequenz der Maus oder des menschlichen OP-1 oder OP-2 vorkommt.

```

Cys Xaa Xaa His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Xaa Asp Leu Gly Trp Xaa Asp Trp
 1           5           10          15
Xaa Ile Ala Pro Xaa Gly Tyr Xaa Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Xaa Phe Pro
 20          25          30          35
Leu Xaa Ser Xaa Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Xaa Gln Xaa Leu Val His Xaa
 40          45          50          55
Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Val Pro Lys Xaa Cys Cys Ala Pro Thr Xaa Leu Xaa Ala
 60          65          70
Xaa Ser Val Leu Tyr Xaa Asp Xaa Ser Xaa Asn Val Ile Leu Xaa Lys Xaa Arg
 75          80          85          90

Asn Met Val Val Xaa Ala Cys Gly Cys His
 95          100

```

wobei Xaa bei R2 = (Lys od.Arg); Xaa bei R3 = (Lys od.Arg); Xaa bei R11 = (Arg od.Gln); Xaa bei R16 = (Gln od.Leu); Xaa bei R19 = (Ile od.Val); Xaa bei R23 = (Glu od.Gln); Xaa bei R26 = (Ala od.Ser); Xaa bei R35 = (Ala od.Ser); Xaa bei R39 = (Asn od.Asp); Xaa bei R41 = (Tyr od.Cys); Xaa bei R50 = (Val od.Leu); Xaa bei R52 = (Ser od.Thr); Xaa bei R56 = (Phe od.Leu); Xaa bei R57 = (Ile od.Met); Xaa bei R58 = (Asn od.Lys); Xaa bei R60 = (Glu, Asp od. Asn); Xaa bei R61 = (Thr, Ala od.Val); Xaa bei R65 = (Pro od.Ala); Xaa bei R71 = (Gln od. Lys); Xaa bei R73 = (Asn od.Ser); Xaa bei R75 = (Ile od.Thr); Xaa bei R80 = (Phe oder Tyr); Xaa bei R82 = (Asp od. Ser); Xaa bei R84 = (Ser od. Asn); Xaa bei R89 = (Lys od. Agr); Xaa bei R91 = (Tyr od.His); und Xaa bei R97 = (Arg od. Lys).

[0069] In noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weisen nützliche, osteogen aktive Proteine Polypeptidketten mit Aminosäuresequenzen auf, die eine durch eine Nucleinsäure codierte Sequenz umfassen, welche unter niedrig, mittel oder hoch stringenten Hybridisierungsbedingungen an DNA oder RNA hybridisiert, die morphogenetische Referenzsequenzen codiert, z.B. C-terminale Sequenzen, welche die konservierten 7-Cystein-Domänen von OP-1, OP-2, BMP2, 4, 5, 6, 60A, GDF3, GDF6, GDF7 und ähnlichen codieren. Wie hierin verwendet, sind hochstringente Hybridisierungsbedingungen definiert als Hybridisierung gemäß bekannten Techniken in 40% Formamid, 5 X SSPE, 5 X Denhard-Lösung und 0,1% SDS bei 37°C über Nacht und Waschen in 0,1 X SSPE, 0,1% SDS bei 50°C. Stringente Standardbedingungen sind in im Handel erhältlichen, molekularen Cloningstexten Standard gut charakterisiert. Siehe zum Beispiel Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2. Aufl., hrsg. durch Sambrook, Fritsch und Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Bände I und II (D.N. Glover Hrsg. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, Hrsg. 1984); Nucleic Acid Hybridization (B.D.

[0070] Hames & S.J. Higgins Hrsg. 1984); und B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984).

[0071] Wie vorstehend erwähnt, sind in der vorliegenden Erfindung nützliche Proteine im Allgemeinen dimere Proteine, umfassend ein gefaltetes Paar der vorstehenden Polypeptide. Solche morphogenetischen Proteine sind inaktiv, wenn sie reduziert sind, aber sind als oxidierte Homodimere aktiv und wenn sie in Kombination mit anderen dieser Erfindung oxidiert werden, um Heterodimere zu bilden. Die Mitglieder eines gefalteten Paares an morphogenetischen Polypeptiden in einem morphogenetisch aktiven Protein können unabhängig aus jedem der vorstehend erwähnten, spezifischen Polypeptide ausgewählt werden.

[0072] Die morphogenetischen Knochenproteine, die in den Materialien und Verfahren der Erfindung nützlich sind, schließen Proteine ein, die jede der vorstehend beschriebenen Polypeptidketten umfassen, egal ob sie aus natürlich vorkommenden Quellen isoliert werden oder durch rekombinante DNA oder andere synthetische

Techniken isoliert werden, und umfassen allelische und phylogenetische Gegenstück-Varianten dieser Proteine sowie auch Muteine davon und verschiedene verkürzte und Fusionskonstrukte. Von Deletions- und Additionsmutanten wird auch angenommen, dass sie aktiv sind, einschließlich jener, welche die konservierte C-terminale 6- oder 7-Cystein-Domäne verändern können, vorausgesetzt dass diese Änderung die Beziehung dieser Cysteine in der gefalteten Struktur nicht funktionell stört. Demgemäß werden solche aktiven Formen als die Äquivalente der spezifisch beschriebenen, hierin offenbarten Konstrukte angesehen. Die Proteine können Formen, welche unterschiedliche Glycosylierungsmuster aufweisen, verschiedene N-Termini, eine Familie von verwandten Proteinen, die Bereiche von Aminosäure-Sequenzhomologie aufweisen, und aktive verkürzte oder mutierte Formen von nativen oder biosynthetischen Proteinen, erzeugt durch Expression von rekombinanter DNA in Wirtszellen, einschließen.

[0073] Die hierin in Erwägung gezogenen morphogenetischen Knochenproteine können aus intakter oder verkürzter cDNA oder aus synthetischen DNAs in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen exprimiert und gereinigt, gespalten, wieder gefaltet und dimerisiert werden, um morphogenetisch aktive Zusammensetzungen zu erzeugen. Gegenwärtig bevorzugte Wirtszellen umfassen, ohne Limitierung, Prokaryonten einschließlich *E. coli* oder Eukaryonten einschließlich Hefe oder Säugerzellen wie zum Beispiel CHO-, COS- oder BSC-Zellen. Einem Fachmann wird klar sein, dass andere Wirtszellen vorteilhaft verwendet werden können. Genaue Beschreibungen der morphogenetischen Knochenproteine, die bei der Anwendung dieser Erfindung nützlich sind, einschließlich wie sie für osteogene Aktivität erzeugt, verwendet und getestet werden, sind in zahlreichen Veröffentlichungen offenbart, einschließlich US-Patentnr. 5,266,683 und 5,011,691.

[0074] Im Lichte dieser Offenbarung und des im Fachgebiet vorliegenden Wissens können Gentechnikfachleute daher Gene aus cDNA- oder genomischen Genbanken von verschiedenen, unterschiedlichen, biologischen Arten welche die geeigneten Aminosäuresequenzen codieren, oder von Oligonucleotiden isolieren, und können sie dann in verschiedenen Arten von Wirtszellen, einschließlich sowohl Prokaryonten als auch Eukaryonten, exprimieren, um große Mengen an aktiven Proteinen zu erzeugen, die im Stande sind, endochondrale Knochenmorphogenese in Säugern zu stimulieren.

II. BINDEMittel-ERWÄGUNGEN

[0075] Wie schon erklärt, bedeutet „Bindemittel“, wie es hierin verwendet wird, jedes physiologisch verträgliche Material, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Carboxymethylcellulose und einem Natriumsalz davon, wobei das Bindemittel eine Viskosität von etwa 10-200 cP und einen Substitutionsgrad von 0.65-0.90 aufweist, wobei es, wenn es mit dem osteogenen Protein und der Matrix, wie hierin definiert, gemischt wird, Knochen- und/oder Knorpelbildung fördert. In gewissen, gegenwärtig bevorzugten Ausführungsformen fördert das Bindemittel eine solche Reparatur unter Verwendung von weniger osteogenem Protein als in osteogenen Standard-Vorrichtungen. Unter den anderen Eigenschaften des bevorzugten Bindemittels, wie es hierin beschrieben wird, ist die Fähigkeit die Vorrichtung:

geschmeidig, formbar und/oder anpassungsfähig; injizierbar; anlagerungsfähig an Knochen, Knorpel, Muskel und andere Gewebe; resistent gegen Zerfall nach Waschen und/oder Spülen während der Operation und resistent gegen Entfernung während der Operation, dem Zunähen und nach der Operation, zu machen, um nur einige zu nennen. Außerdem kann das Bindemittel in einer gegenwärtig bevorzugten Ausführungsform die vorstehend erwähnten Merkmale und Vorteile erzielen, wenn es in relativ geringen Verhältnissen vorhanden ist. Zum Beispiel umfasst eine gegenwärtig bevorzugte, verbesserte Vorrichtung ungefähr 1 Teil Bindemittel und ungefähr 5 Teile Matrix. Eine andere, gegenwärtig bevorzugte Ausführungsform umfasst 1 Teil Bindemittel und 3 Teile Matrix. Wie hierin beispielhaft dargestellt, können verbesserte Vorrichtungen von sehr divergenten Verhältnissen Knochen- und Knorpelbildung induzieren. Hierin beispielhaft dargestellt sind verbesserte Vorrichtungen, welche Teile von Bindemittel zu Teilen an Matrix aufweisen, die sich zwischen ungefähr 1:1 bis 4:1 bis zu und einschließlich mindestens 1:10 bewegen, sowie auch von ungefähr 1:2 bis 1:5 bis zu und einschließlich mindestens 1:10 und ferner einschließlich 1:25 bis 1:50. Jedes Verhältnis von Bindemittel zu Matrix kann verwendet werden, um die vorliegende Erfindung auszuüben. Alle was benötigt wird, ist Vermischen des Bindemittels mit der Matrix und dem osteogenen Protein, um auf diese Weise Knochen- und Knorpelbildung zu erzielen. Wie nachstehend besprochen, kann das Bindemittel in gleichen oder größeren Verhältnissen relativ zur Matrix verwendet werden, aber solche Mittel sollten, wie hierin gelehrt, überprüft werden, um jedwede Matrix-Verdünnungseffekte zu messen.

[0076] Jene Bindemittel, die hierin als nützlich in Erwägung gezogen werden, werden aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus Carboxymethylcellulose und einem Natriumsalz davon, wobei, wie nachstehend beispielhaft dargestellt und beschrieben, das Bindemittel eine Viskosität von etwa 10-200 cP und einen Substitutionsgrad von 0,65-0,90 aufweist, andere Bindemittel schließen Dextran, Mannit, weißes Petrolatum, Sesamöl

und Beimischungen davon ein, sind aber nicht auf sie beschränkt.

[0077] Schließlich ist ein anderes, hierin beschriebenes Bindemittel Fibrinkleber, welcher ein Gemisch aus Säugerfibrinogen und Thrombin enthält. Wie nachstehend hierin beispielhaft dargestellt, kann der Fibrinkleber weite Variationsbreiten an Fibrinogen und Thrombin umfassen, zum Beispiel 1 Teil Fibrinkleber und 25 Teile β -TCP-Matrix, der Thrombingehalt kann von etwa 2.0 E bis 25 E, 5E bis 10 E und etwa 2,5 E bis 5 E reichen.

[0078] Der Fibrinogengehalt kann zum Beispiel von etwa 40 mg pro 1000 mg β -TCP reichen. In einer Kollagen-enthaltenden, verbesserten Vorrichtung kann der Fibrinogengehalt zum Beispiel von etwa 20 mg pro 1000 mg Kollagen bis etwa 180 mg pro 1000 mg Kollagen reichen.

[0079] Im Hinblick auf die hierin dargelegten Lehren kann der Fachmann, lediglich durch Routineuntersuchungen und normales Fachwissen, geeignete Äquivalente der vorstehend identifizierten Bindemittel identifizieren. Geeignete Bindemittelkandidaten können, wie nachstehend dargelegt, identifiziert, charakterisiert, getestet und dann in osteogenen Vorrichtungen verwendet werden.

[0080] Der Fachmann kann daher demgemäß Bindemittelkandidaten identifizieren und kann auf ähnliche Weise Äquivalente der bevorzugten Bindemittel, die hierin spezifisch identifiziert wurden, nur unter Verwendung von normalem Fachwissen und Routineuntersuchungen erkennen. Nach Identifizierung von (einem) geeigneten Kandidaten kann der Fachmann die nachstehend dargelegten Richtlinien befolgen, um zu einer endgültigen Auswahl eines bevorzugten Bindemittels zu gelangen.

[0081] Basierend auf Studien, ähnlich jenen, die hierin beschrieben werden, sind Beispiele geeigneter Bindemittel, aber nicht auf sie limitiert: Mannit/Dextran-Kombination; Dextran alleine, Kombination aus Mannit/weißem Petrolatum; und Sesamöl. Eine Mannit/Dextran-enthaltende, verbesserte Vorrichtung wurde wie folgt formuliert: Ein Teil Dextran 40, 3 Teile Mannit, 1 Teil OP-Vorrichtung. Solche verbesserte Vorrichtungen wurden mit 2,5 mg osteogenem Protein pro g Kollagen oder pro 0,5 g Kollagen formuliert, dadurch wurde die Dosis an osteogenem Protein variiert. Zur Verwendung in dem vorliegenden Verfahren wurde die Rezeptur mit ungefähr 0,8 ml Salzlösung pro 2,5 g Mannit/Dextran-enthaltender Vorrichtung benetzt. Als nächstes wurde eine Vorrichtung, die Dextran alleine enthielt, aus entweder 4 Teilen Dextran oder 1 Teil Dextran zu 1 Teil OP-Vorrichtung formuliert und mit ungefähr 0,8 ml Salzlösung pro 2,0 g Vorrichtung benetzt. Dextran kann innerhalb eines MG von 3.000 bis 40.000 variieren. Als Nächstes wurde eine Mannitol/weißes Petrolatum-Vorrichtung aus 1,5 Teilen Mannitol, 1,5 Teilen Petrolatum und 1 Teil OP-Vorrichtung formuliert. Diese Formulierung benötigt keine Benetzung. Schließlich wurde eine Sesamöl-enthaltende, verbesserte Vorrichtung aus 1 Teil 01 und 1 Teil OP-Vorrichtung gestaltet. Diese Rezeptur benötigt keine Benetzung. Die vorstehend beschriebenen, verbesserten Vorrichtungen verdeutlichen die Auswahl an: spezifischen Bindemitteln, Verhältnissen in verbesserten Vorrichtungen und Volumina an Benetzungsmittel, die in den verbesserten Vorrichtungen der vorliegenden Erfindung verwendet werden können. Die Chemie, Verhältnisse und Benetzungsanforderungen werden variiert, sind jedoch alle innerhalb des Fachkönnens des Stands der Technik. Jede der vorstehend erwähnten, verbesserten Vorrichtungen induzierte Knochenbildung (wie durch Calciumgehalt und % Knochen gemessen), wenn sie in dem hierin beschriebenen subkutanem Rattentest gemessen wurde.

A. CMC als ein Bindemittel

[0082] Wie hierin gelehrt, ist Carboxymethylcellulose (CMC) das bevorzugte Bindemittel. CMC ist im Handel von Lieferanten wie: Hercules Inc., Aqualon[®] Division, Delaware; FMC Corporation, Pennsylvania; Britisch Celanese, Ltd., Vereinigtes Königreich; und Henkel KGaA, Vereinigtes Königreich, erhältlich, aber nicht auf sie beschränkt. Carboxymethylcellulose-Natrium ist das Natriumsalz eines Polycarboxymethylethers von Cellulose mit einem typischen Molekulargewicht, das von 90.000-700.000 reicht. CMC wurde teilweise aufgrund der folgenden Punkte als ein Kandidaten-Bindemittel identifiziert: CMC wird in oralen und topischen pharmazeutischen Formulierungen häufig als ein Viskositäts-erhöhendes Mittel verwendet. CMC wird auch in Kosmetika, Toilettenartikel und Nahrungsmittel als ein emulgierendes Mittel (0,25-1,0%), Gel-bildendes Mittel (4,0-6,0%), injizierbares Mittel (0,05%-0,75%) und als Tablettenbinder (1,0-6,0%) verwendet.

[0083] Während die vorhergehenden Eigenschaften auf die Eignung als ein Bindemittel hindeuten, bestätigen die nachstehenden Experimente, dass CMC zur Verwendung in den hierin offenbarten, verbesserten osteogenen Vorrichtungen geeignet war. Solche bestätigenden Experimente waren nötig, da keine der vorstehend erwähnten Anwendungen ähnlich der Reparatur von Knochen oder Knorpel sind, wofür die hierin offenbarten, verbesserten osteogenen Vorrichtungen nützlich sind. Zum Beispiel benötigt keine der vorstehend erwähnten Anwendungen über 6% CMC, eine gegenwärtig bevorzugte, implantierbare, verbesserte Vorrichtung der vor-

liegenden Erfindung umfasst jedoch mehr als ungefähr 6% (Gew./Gew.) CMC und vorzugsweise mindestens ungefähr 10%, stärker bevorzugt ungefähr 12-20%, wobei ungefähr etwa 16% (Gew./Gew.) oder 1 Teil CMC zu 5 Teilen osteogener Standard-Vorrichtung unter den gegenwärtig am meisten bevorzugten Mischungen für eine implantierbare Vorrichtung ist. Diese ungefähren Prozentanteile begründen sich auf Berechnungen des Gesamtgewichts von Matrix, vermischt mit Bindemittel, ausschließlich osteogenem Protein und Benetzungsmittel.

[0084] Wesentlich, um die vorliegende Erfindung auszuüben, ist die Tatsache, dass verschiedene Güteklassen an Carboxymethylcellulose-Natrium im Handel erhältlich sind, welche unterschiedliche Viskositäten aufweisen. Die Viskositäten der unterschiedlichen Gütegrade an Carboxymethylcellulose-Natrium werden angegeben und nachstehend in Tabelle 1 gezeigt (siehe Handbook of Pharmaceutical Excipients (2. Auflage), American Pharmaceutical Association & Royal Pharmaceutical Society of Great Britain).

Tabelle 1: Standard Viskositätsgrade von Carboxymethylcellulose

Gütegrad	Konzentration (% Gew./Vol.)	Viskosität (cP)
Niedrige Viskosität	4	50-200
Mittlere Viskosität	2	400-800
Hohe Viskosität	1	1500-3000

[0085] Etliche Gütegrade an Carboxymethylcellulose sind im Handel erhältlich, der am häufigsten benützte Gütegrad weist einen Substitutionsgrad (DS) von 0,7 auf. Der DS wird definiert als die durchschnittliche Zahl an Hydroxylgruppen, die pro Anhydroglucoseeinheit ausgetauscht sind. Es ist dieser DS, welcher die wässrige Löslichkeit des Polymers bestimmt. Der Substitutionsgrad und die Standardviskosität einer wässrigen Lösung von bestimmter Konzentration werden auf jedem Carboxymethylcellulose-Natrium-Etikett angegeben. CMC mit niedriger Viskosität (Aqualon® Division, Hercules Inc., Wilmington, DE) wird gegenwärtig bevorzugt. Die gegenwärtig bevorzugten Substitutionsgrade reichen von 0,65-0,90 (DS = 0,7, Aqualon® Typ 7L).

[0086] Wie vorstehend beschrieben, ist CMC in mehreren Gütegraden, niedrige, mittlere und hohe Viskosität, erhältlich. In diesem Zusammenhang wurde bestimmt, dass die Viskosität der Carboxymethylcellulose (CMC), die verwendet wurde, um eine verbesserte osteogene Vorrichtung zu gestalten, entscheidend für die Knochenbildung war. Im Gegensatz zu den Lehren im Fachgebiet wurde jetzt herausgefunden, dass CMC mit hoher Viskosität nachteilige Effekte auf die Knochenbildung hat, wenn sie in einer verbesserten osteogenen Vorrichtung verwendet wird, umfassend eine wie hierin definierte Matrix. US-Patentnr. 5,587,897 („das '897-Patent“) lehrt, dass die Verwendung von CMC mit hoher Viskosität (2480 cP) (siehe Tabelle 1 vorstehend) die Knochenbildung induziert. Die Vorrichtungen im '897-Patent benötigen jedoch eher eine synthetische Polymermatrix als eine biologische Matrix wie Kollagen. Wenn ein biologisches Material wie zum Beispiel Kollagen als Matrix verwendet wird, muss die verbesserte Vorrichtung unerwartet mit CMC mit niedriger Viskosität (ungefähr 10-50 cP, oder 50-200) formuliert werden, um, wie hierin gelehrt wird, Knochen- und/oder Knorpelbildung zu induzieren.

Toxizitätsstudie unter Verwendung einer CMC-Vorrichtung

[0087] Eine Toxizitätsstudie wurde durchgeführt, welche eine verbesserte Vorrichtung, die CMC enthielt, mit einer Standardvorrichtung verglich. Die Standardvorrichtung wurde mit 2,5 mg OP-1/Gramm Kollagenmatrix erzeugt. Die CMC-enthaltende, verbesserte Vorrichtung wurde durch Hinzufügen von CMC mit niedriger Viskosität (Aqualon®) zu einer Standardvorrichtung bei einem Verhältnis von 1:5 erzeugt, gefolgt von Bestrahlung. 25 mg-Aliquote einer Standardvorrichtung oder Scheinvorrichtung (d.h. kein osteogenes Protein) und 30 mg-Aliquote von CMC, das verbesserte Vorrichtung oder CMC-Scheinvorrichtung enthielt, wurden, wie anderswo hierin beschrieben, in eine subkutane Stelle bei der Ratte implantiert (ein Implantat pro Tier). Drei Implantate aus jeder Rezeptur wurden nach 7 Tagen, 14 Tagen, 21 Tagen und 28 Tagen nach der Implantation entfernt und histologisch auf Knochen- und Knorpelbildung und auf lokale Gewebereaktion bewertet. Es wurden keine nachteiligen zellulären Reaktionen beobachtet und es gab keinen Hinweis, der irgendeinen nachteiligen Effekt von CMC andeutete, wie durch Bewertung von Entzündung und Faserbildung bestimmt wurde. Das

histologische Profil der CMC-enhaltenen, verbesserten Vorrichtung war im Allgemeinen ähnlich dem der Standard OP-Vorrichtung. Serumcalcium und alkalische Phosphatase-mengen, die unter Verwendung von Standardlehren gemessen wurden, folgten auch dem der osteogenen Standard-Vorrichtung. Schließlich wurden unter Verwendung von Standard-Toxizitätsanalysen auf nicht reifen und reifen Ratten keine signifikanten Läsionen nachgewiesen.

Bioaktivitätsstudie mit verbesserten Vorrichtungen

[0088] Basierend auf einer Reihe von nachstehend beschriebenen Routinestudien wurde die Bioaktivität einer osteogenen Standardvorrichtung durch die Beimischung von CMC nicht nachteilig beeinflusst. Stattdessen ist die Bioaktivität für beide Vorrichtungskonfigurationen mindestens vergleichbar, aber die Fähigkeit, die Vorrichtung intraoperativ zu verändern und die Vorrichtung während der Operation und Wundschließung an der defekten Stelle beizubehalten, wird durch CMC verstärkt. Für diese Studien wurde bestrahlte CMC vor der Implantation zu der Standardvorrichtung hinzugefügt.

[0089] Kurz gesagt wurden zwei Studien durchgeführt, in welchen die in vivo-Freisetzung von OP-1 aus einer Standardvorrichtung +/- CMC gemessen wurde. In einem Experiment wurden, wie hierin beschrieben, 75 mg an bestrahlter Vorrichtung +/- 15 mg an bestrahlter CMC in eine subkutane Stelle in Ratten implantiert. Die implantierten Vorrichtungen wurden 1 Stunde, 1 Tag, 3 Tage und 6 Tage nach der Implantation entfernt, gefolgt durch Extraktion mit 8 M Harnstoffpuffer; der OP-1-Gehalt wurde durch Routine-ELISA und Western-Blot-Analyse analysiert. Die OP-1-Vorrichtung (nicht in die Tiere implantiert) wurde mit 8 M Harnstoffpuffer extrahiert und als der interne Standard verwendet. Im Allgemeinen waren die Kinetiken der in vivo-Freisetzung von OP-1 aus der OP-Standardvorrichtung und der CMC-enhaltenen, verbesserten Vorrichtung ähnlich. Die Beobachtung, dass es keinen Unterschied in der OP-1-Sequestrierung oder -Retention durch eine Standardvorrichtung im Vergleich mit einer verbesserten Vorrichtung gab, die eine Kombination aus Kollagenmatrix und CMC enthielt, war ein unerwartetes Ergebnis. Es ist berichtet worden, dass CMC, wenn sie mit nicht-biologischen polymeren Matrizen kombiniert wird, dazu dient osteogenes Protein zu sequestrieren. (Siehe zum Beispiel US 5,597,897).

[0090] Auch in vitro-Studien wurden durchgeführt. In diesen Studien wurde freigesetztes OP-1 im Gegensatz zu den vorstehend beschriebenen in vivo-Studien gemessen, in welchen OP-1 gemessen wurde, welches in der Vorrichtung verbleibt. In einer Studie wurden 25 mg der OP-Vorrichtung oder CMC-Vorrichtung mit Salzlösung benetzt. 1 ml an Rinderserum wurde dann zu jeder Vorrichtung hinzugefügt und die Vorrichtungen wurden bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und nach 1 und 3 Stunden mit frischem Serum ersetzt. Nach 6 Stunden wurde 8 M Harnstoff hinzugefügt, um alles noch mit der Vorrichtung assoziierte OP-1 zu extrahieren. OP-1 Konzentrationen in den Überständen wurden durch Routine-ELISA- und Western-Blot-Techniken analysiert. Sowohl die OP-Standardvorrichtung als auch die CMC-enhaltende, verbesserte Vorrichtung hatten ähnliche Protein-Freisetzungskinetiken für die sechs untersuchten Stunden. Diese Ergebnisse waren im Hinblick auf frühere Berichte, dass CMC zur Sequestrierung des osteogenen Proteins wirkt und dadurch seine Freisetzung von Beimischungen mit synthetischen, polymeren Matrizen verzögert und/oder verhindert, wieder unerwartet. (Siehe zum Beispiel US 5,597,897).

[0091] Zusammenfassend gesagt hemmt CMC die Retention oder Freisetzung von OP-1 aus einer Kollagen-Matrix-enhaltenden osteogenen Vorrichtung in vivo oder in vitro nicht wesentlich.

Stabilitätsstudien

[0092] Eine Studie (siehe Tabelle 2) wurde durchgeführt, welche die Stabilität der OP-Standardvorrichtung mit einer Standardvorrichtung verglich, die CMC enthielt. Basierend sowohl auf in vitro-Analysen und einem Knochenbildungs-Biotest (anderswo hierin beschrieben) wurde beobachtet, dass die CMC-enhaltende, verbesserte Vorrichtung mindestens so stabil war wie die Standardvorrichtung, wenn sie für ein Jahr bei 30 Grad gelagert wurde. Die Daten deuten auch darauf hin, dass CMC mit der OP-Standardvorrichtung vorgemischt werden kann und schlussendlich für eine einheitliche Produktkonfiguration sterilisiert werden kann. Ein solches einheitliches Produkt ist, wie nachstehend beispielhaft dargestellt, für die Reparatur von lokalen Knochen- und Knorpeldefekten nützlich.

TABELLE 2: Stabilität von unterschiedlichen osteogenen Vorrichtungformulierungen

Formulierung	Vor- Bestrahlung OP-1 Wiederfindung*	Nach- Bestrahlung OP-1 Wiederfindung	OP-1 Wiederfindung nach 4 Wochen	OP-1 Wiederfindung nach 3 Monaten	OP-1 Wiederfindung nach 6 Monaten	OP-1 Wiederfindung nach 12 Monaten
Standard- Vorrichtung	91%	63%	66%	58%	47,4%	37,4%
CMC- Vorrichtung	77%	57%	53%	50%	43,5%	34,8%

* Basierend auf einem theoretischen OP-1-Gehalt von 2,5 mg/Gramm

[0093] Während der Formulierung einer CMC-enthaltenden Standardvorrichtung können CMC und osteogene Proteine getrennt sterilisiert werden, zum Beispiel durch Inkontaktbringen mit Gammastrahlung und dann Vereinigung der sterilisierten Komponenten, um die Standardvorrichtung zu erzeugen, die CMC enthält. Darüber hinaus kann CMC mit der OP-Standardvorrichtung vorher zusammengemischt und die resultierende Formulierung sterilisiert werden, zum Beispiel durch Inkontaktbringen mit Gammastrahlung. Der spätere Prozess wird im Fachgebiet als terminale Sterilisierung bezeichnet und ist verwendet worden, um andere osteogene Vorrichtungen zu sterilisieren. Siehe zum Beispiel PCT/US96/10377, veröffentlicht als WO 96/40297, am 19. Dezember 1996 und US 5,674,292, erteilt am 7. Oktober 1997. Wie hierin verwendet beziehen sich die Begriffe „Sterilisierung“ und „sterilisiert“ auf einen Prozess unter Verwendung von entweder physikalischen oder chemischen Mitteln zur Eliminierung von im Wesentlichen allen lebensfähigen Organismen, insbesondere Mikroorganismen, Viren und anderen Pathogenen, die mit der Vorrichtung der Erfindung in Verbindung stehen. Die sterilisierten Vorrichtungen der Erfindung weisen vorzugsweise, wie durch Federal Drug Administration (FDA)-Standards bestimmt, einen Sterilisierungs-Gewissheitsgrad von 10^{-6} auf. Im Falle der Gamma-bestrahlten Vorrichtungen können die geeigneten Bestrahlungsdosierungen, die für die Sterilisierung einer bestimmten Vorrichtung notwendig sind, zum Beispiel leicht durch Nachschlagen im Text des Dokuments „Associate for the Advancement of Medical Instrumentation Guidelines,“ veröffentlicht 1992, bestimmt werden. Darin werden Richtlinien für die Bestimmung der Bestrahlungsdosis bereitgestellt, die notwendig ist, um einen bestimmten Sterilisierungs-Gewissheitsgrad für eine bestimmte biologische Belastung der Vorrichtung zu erzielen. Dosierungen für die Sterilisierung der Vorrichtungen der Erfindung liegen vorzugsweise innerhalb des Bereichs von 0,5 bis etwa 4.0 Megarad und am meisten bevorzugt liegen sie innerhalb des Bereichs von 2.0 und etwa 3.5 Megarad.

[0094] Außerdem wurde eine Studie durchgeführt, um die Kurzzeitstabilität einer osteogenen Vorrichtung zu bewerten, zu welcher CMC und Salzlösung hinzugefügt worden sind. Die Studie verwendete eine Standardvorrichtung, zu welcher 200 mg an getrennt verpackter, bestrahlter CMC hinzugefügt wurde. Die Proben von CMC-enthaltender, verbesserter Vorrichtung wurden entfernt und mit Salzlösung benetzt. Bei 0, 1, 3, 6 und 22 Stunden wurde das OP-1 mit 8 M Harnstoffpuffer extrahiert und durch Umkehrphasen-HPLC unter reduzierenden Bedingungen analysiert. Die Extrakte wurden mit einem auf Zellen basierenden Standardtest zur Messung von alkalischer Phosphatase auch auf 1-biologische OP-Aktivität untersucht. Die Daten deuteten darauf hin, dass OP-1 die biologische Aktivität unter diesen Bedingungen beibehält. Diese Daten deuteten auch darauf hin, dass die Konfiguration der CMC-enthaltenden, verbesserten Vorrichtung aus der Beimischung dieser Komponententeile (osteogene Standardvorrichtung/CMC/Salzlösung) resultieren und für mehrere Stunden, nachdem sie erzeugt worden ist, verwendbar ist, was für den Praktiker signifikante intraoperative Zeit bereitstellt, während welcher das Produkt wirksam bleibt.

Testen der Integrität und anderen Eigenschaften des Bindemittels

[0095] Im Fachgebiet anerkannte USP-Verfahren wurden zur Identifizierung und Charakterisierung von voluminösen Bindemitteln wie zum Beispiel CMC verwendet. Untersuchungen schlossen Tests auf chemische Identität, Viskosität, pH-Wert, Verlust bei Trocknung und Schwermetallen ein. Materialien wurden vor der Sterilisierung auch auf die biologische Belastung sowie auf Endotoxine, pH-Wert, Aussehen und Sterilität nach der Bestrahlung untersucht. Eine Stabilitätsstudie wurde durchgeführt, um die Viskosität, das Aussehen und den pH-Wert des bestrahlten Materials zu kontrollieren. Alle Grade und Eigenschaften waren annehmbar, wie unter Verwendung von Standardverfahren und -Techniken bestimmt wurde.

[0096] Zum Beispiel wurde CMC (Aqualon®-niedrige Viskosität) auf biologische Belastung und Endotoxinge-

halt untersucht: Aqualon® CMC, Charge FP10 12342 wurde unter Verwendung des Kinetic Chromogenic LAL-Tests von BioWhittaker (Walkersville, MD, 21793) auf die Anwesenheit von Endotoxinen (LAL) untersucht.

[0097] Die „biologische Belastung“ kann wie folgt gemessen werden. Zum Beispiel wurden 200 mg Proben von CMC in 100 ml Phosphat-gepuffertem Wasser solubilisiert und durch 0,45-µm-Filter filtriert. Die Filter wurden auf eine TSA-Platte gelegt und für 48 Stunden inkubiert. Zwei Proben von solubilisierter CMC wurden mit 10-100 KbE von *Bacillus subtilis* inkubiert, um als Wachstumskontrollen verwendet zu werden. Die Daten deuten darauf hin, dass die biologische Belastung der CMC niedrig ist und dass CMC nicht mit der Analyse durch die Tötung der Bakterien oder die Hemmung des Zellwachstums interferiert.

CMC-Charakterisierung nach der Bestrahlung

[0098] Eine Studie wurde durchgeführt, in welcher die Viskosität von CMC vor und nach der Bestrahlung verglichen wurde (Gamma-Bestrahlung, 2,5-3,0 Mrad). Die Daten deuten darauf hin, dass, wie im Fachgebiet berichtet, die Viskosität nach der Bestrahlung abnimmt. Während das die Bioaktivität oder ihre allgemeine Nützlichkeit als ein Bindemittel nicht beeinflusste (siehe Studien, die hierin dargelegt sind), sollte der Fachmann dieses Merkmal bedenken, wenn er die Viskositäts- oder Fluiditätsmerkmale einer verbesserten osteogenen Vorrichtung bewertet. Es wurde auch eine Studie durchgeführt, um die Stabilität von bestrahlter CMC zu bewerten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass bestrahlte CMC sowohl bei 4 als auch bei 30°C für mindestens sechs Monate stabil war. Die Viskosität wurde als der Parameter an Stabilität gemessen. Ähnliche Analysen und Bewertungen können für andere Bindemittel oder Vorrichtungsmaterialien durchgeführt werden, die in einer gewünschten Formulierung verwendet werden.

B. Fibrinkleber als Bindemittel

[0099] Wie hierin beschrieben, ist „Fibrinkleber“ ein anderes Bindemittel. Fibrinkleber umfasst ein Gemisch aus Säugerfibrinogen und Thrombin. Menschliches Fibrinogen ist im Handel in Produkten wie zum Beispiel: Tissucol® (ImmunoAG, Wien, Österreich), Beriplast® (Beringwerke, Marburg, Deutschland), Biocoll® (Centre de Transfusion Sanguine de Lille (Pours, Frankreich) und Transglutine® (CNTS Fractionation Centre, Straßburg, Frankreich) erhältlich, ist aber nicht darauf beschränkt. Menschliches Thrombin ist im Handel durch Immuno-AG, Wien, Österreich erhältlich. Fibrinkleber kann auch aus Fibrinogen und Thrombin aus anderen Säugern, wie zum Beispiel Rinder- oder murinen Quellen, hergestellt werden.

[0100] Fibrinkleber wurde basierend auf seinen Gel-ähnlichen Eigenschaften und seinen verbesserten Handhabungseigenschaften, wenn er mit einem Matrixmaterial wie zum Beispiel Kollagen oder β -TCP gemischt wurde, als ein Kandidaten-Bindemittel ausgewählt. Es wurde gezeigt, dass Fibrinkleber eine schwache entzündliche Reaktion (siehe nachstehend) hervorrief und die Knochenbildung förderte.

Toxizitätsstudien unter Verwendung einer Fibrinklebervorrichtung

[0101] Eine Toxizitätsstudie wurde durchgeführt, welche eine verbesserte Vorrichtung, die Fibrinkleber enthielt, mit einer Standardvorrichtung verglich. Die Standardvorrichtung wurde durch Mischen von 10 µg OP-1 in 47,5% Ethanol/0,01% TFA und 25 mg Kollagen und Lyophilisieren der Mischung über Nacht erzeugt. Die Standardvorrichtung wurde vor der Implantation mit 100 µl Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) benetzt. Die verbesserte Vorrichtung, die Fibrinkleber enthielt, wurde durch Hinzufügen von 50 µl Rinder-Fibrinogen (Sigma F8630, 10 mg/ml) und 50 µl Rinderthrombin (50 E/ml) zu der Standardvorrichtung, die wie vorstehend erzeugt wurde, unverzüglich vor der Implantation erzeugt. Die Standardvorrichtung und die verbesserte Vorrichtung, die Fibrinkleber enthielt, wurden dann, wie anderswo hierin beschrieben, in eine subkutane Stelle in der Ratte implantiert. Die Implantate wurden histologisch auf Knochen- und Knorpelbildung hin bewertet und auf lokale Gewebereaktion untersucht. Die verbesserte Vorrichtung, die Fibrinkleber enthielt, rief eine schwache entzündliche Reaktion und schwache Faserbildung hervor. Das histologische Profil der verbesserten Vorrichtung, die Fibrinkleber enthielt, war im Allgemeinen ähnlich jenem der Standardvorrichtung. Es schien keine Korrelation zwischen entzündlicher Reaktion und der Fähigkeit der Fibrinkleberenthaltenden, verbesserten Vorrichtung zu bestehen, die Knochenbildung zu fördern.

Bioaktivitätsstudien der verbesserten Vorrichtung

[0102] Eine Studie wurde durchgeführt, um in vitro bei unterschiedlichen Thrombinkonzentrationen die Freisetzungskinetik von OP-1 aus einer verbesserten Vorrichtung zu bewerten, die Fibrinkleber enthielt. Freisetzungskinetiken wurden durch Hinzufügen von großen Mengen an Thrombin verbessert. Für diese Studie wur-

den 12,5 µl OP-1 in einer 5% Lactoselösung mit 50 mg β-TCP, 25 µl menschlichem Fibrinogen und entweder 25 E/ml an menschlichem Thrombin oder 50 E/ml menschlichem Thrombin gemischt. Die Gemische wurden in ein Glasröhrchen transferiert und 1 ml Kälberserum wurde zu jedem hinzugefügt. Den Proben wurden dann ermöglicht, bei 37°C/60 UpM zu inkubieren. Serumproben wurden entnommen und durch Routine-ELISA bei 0-1 Stunde, 1-3 Stunden, 3-5 Stunden und 5-24 Stunden analysiert. Die Ergebnisse werden in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

TABELLE 2A

Thrombin-Konzentration	% OP-1 Freisetzung bei 0-1 Stunde	% OP-1 Freisetzung bei 1-3 Stunden	% OP-1 Freisetzung bei 3-5 Stunden	% OP-1 Freisetzung bei 5-24 Stunden	Gesamt % OP-1 Freisetzung
25 E/ml	6.4 +/- 0.7	5.2 +/- 0.4	3.0 +/- 0.6	13.0 +/- 0.6	27.5 +/- 2.2
50 E/ml	9.9 +/- 2.1	5.8 +/- 0.7	3.3 +/- 0.5	15.1 +/- 1.7	34.1 +/- 4.8

III. FORMULIERUNG UND VERABREICHUNGSERWÄGUNGEN

Allgemeine Erwägungen

[0103] Die Vorrichtungen der Erfindung können unter Verwendung von Routineverfahren formuliert werden. Es wird einzig die Bestimmung der erwünschten Endkonzentration von osteogenem Protein pro Vorrichtung benötigt, indem man bedenkt, dass das Verabreichungsvolumen der Vorrichtung weniger als das Volumen der defekten Stelle sein kann, aber nicht nötigerweise weniger sein muss. Die gewünschte Endkonzentration des Proteins wird von der spezifischen Aktivität des Proteins abhängen, sowie von der Art, dem Volumen und/oder der anatomischen Lage des Defekts. Außerdem kann die gewünschte Endkonzentration des Proteins von Alter, Geschlecht und/oder allgemeiner Gesundheit des Empfängers abhängen. Üblicherweise wurde für einen segmentalen Defekt von kritischer Größe, der ungefähr mindestens 2,5 cm lang ist, beobachtet, dass 0,5-1,75 mg osteogenes Protein von unter Verwendung einer Standardvorrichtung die Knochenbildung ausreichend zu induzieren kann, um die Lücke zu reparieren. Im Falle eines Defekts von nicht kritischer Größe oder eines frischen Bruchs wurden unter Verwendung der osteogenen Standardvorrichtung beobachtet, dass ungefähr 0,1-0,5 mg Protein den Defekt reparieren. Im Allgemeinen können sich die Proteinkonzentrationen zur Verwendung mit den hierin beschriebenen, bevorzugten Matrizen von etwa 0,4 mg bis zu etwa 3,0 mg pro Vorrichtung bewegen. Die Optimierung von Dosierungen benötigt nicht mehr als Routineuntersuchungen und liegt innerhalb des Fachkönnens eines Fachmanns.

[0104] Wie hierin beispielhaft dargestellt, können das osteogene Protein und ein Bindemittel wie zum Beispiel Carboxymethylcellulose (niedrige Viskosität, Aqualon®) oder ein Fibrinkleber gemischt werden, um einen Kitt zu bilden. In manchen Ausführungsformen wird Salzlösung zum Bindemittel hinzugefügt, um eine Paste oder einen Kitt zu bilden, in welchem ein osteogenes Protein wie zum Beispiel OP-1 verteilt ist. Eine Pastenkonfiguration kann verwendet werden, um die Oberflächen eines Defekts wie zum Beispiel ein Loch auszustreichen. Pasten können verwendet werden, um Frakturdefekte, chondrale oder osteochondrale Defekte, sowie Knorpeldefekte an der protethischen Implantationsstelle auszustreichen. Eine flüssigere Konfiguration kann injiziert oder in oder entlang der Oberfläche eines Defekts herausgedrückt werden, in einer ähnlichen Weise wie das Herausdrücken von Zahnpasta oder Abdichtmaterialien aus einer Tube, sodass ein Wulst der Vorrichtung entlang der Länge der Defekt-Stelle verabreicht wird. Üblicherweise wird der Durchmesser des herausgedrückten Wulsts durch die Art des Defekts sowie durch das Volumen des Leerraumes der defekten Stelle bestimmt.

[0105] Wie vorstehend erwähnt, können andere, wie vorstehend hierin definierte, Bindemittel verwendet werden, um eine Vorrichtung mit einer Konfiguration wie Kitt zu formulieren. Wie für einen Fachmann offensichtlich sein wird, resultiert eine solche Konfiguration aus dem Einstellen der Verhältnisse an Träger im Vergleich zu Benetzungsmitteln, indem weniger Benetzungsmittel eine trockenere Vorrichtung ergibt und mehr eine feuchte-

re Vorrichtung erzeugt. Die genaue Vorrichtungskonfiguration, die zur Reparatur eines Defekts geeignet ist, wird zumindest von der Defektart und der Größe des Defekts abhängen. Für den Fachmann werden diese Variablen klar sein.

A. CMC als ein Bindemittel — Formulierungsstudien

[0106] Basierend auf den folgenden Arten von Studien wurde festgestellt, dass ungefähr 0,2 g CMC zu ungefähr 1,0 g osteogener Standardvorrichtung eine verbesserte Vorrichtung mit den gegenwärtig bevorzugten Handhabungseigenschaften ergibt. Unterschiedliche Verhältnisse von CMC und Kollagen wurden kombiniert und dann mit Salzlösung benetzt. Jedes resultierende Gemisch an CMC und Matrix wurde in einem konischen 15-ml-Zentrifugenröhrchen in Wasser suspendiert und in einen Rotationsschüttler (100 UpM) gestellt. Setzungszeit wurde aufgezeichnet, wenn sich gelockerte oder freigesetzte Kollagenmatrixpartikel an einer vorbestimmten Marke an dem Röhrchen abgesetzt hatten. Die in Tabelle 3 und [Fig. 1](#) zusammengefassten Daten deuten darauf hin, dass ein Bereich von ungefähr 0,15 bis 0,25 g CMC/g Kollagen die Kohäsivität, Integrität und Handhabungseigenschaften maximieren können.

TABELLE 3: Effekt des CMC/Kollagen-Verhältnis auf die Dispersionszeit

g CMC/ g Kollagen	Niederlassungszeit
0 20 g	19 min
0.19	17
0.18	6
0.15	4
0.12	0.5 sec

[0107] Die bevorzugte Menge an Salzlösung zur Benetzung der CMC-Vorrichtung wurde auch untersucht. In dieser Studie wurden ungefähr 0,2 g CMC mit ungefähr 1 g osteogener Standardvorrichtung gemischt. Unterschiedliche Mengen an Salzlösung wurden hinzugefügt und die Konsistenz der daraus resultierenden Vorrichtung wurde festgehalten. Die quantitativen und qualitativen Ergebnisse aus dieser Studie werden in Tabelle 4 bzw. [Fig. 2](#) zusammengefasst. Im Allgemeinen zeigen diese Daten, dass es einen Bereich an Benetzungsmittelvolumina gibt, welcher dem Praktiker entgegenkommt, während er der Vorrichtung ermöglicht ihre Integrität und Kohäsivität beizubehalten. Für ein Bindemittel wie CMC weisen diese Daten darauf hin, dass mehr als ungefähr 1,5 ml, ungefähr 1,8 bis 2,5 ml an Salzlösung gegenwärtig das bevorzugte Benetzungsvolumen darstellen (für ungefähr 1 Gramm an Vorrichtung, die mit ungefähr 200 mg an Bindemittel wie zum Beispiel CMC vermischt ist), um eine implantierbare Vorrichtung mit der gegenwärtig bevorzugten Kitt-Konsistenz zu erzielen. Mengen an Salzlösung im Überschuss davon erzielen eine injizierbare Vorrichtung mit der gegenwärtig bevorzugten Flüssigkeitskonsistenz. Wie anderswo hierin beispielhaft dargestellt wird, ist eine implantierbare Vorrichtungskonfiguration für die Verwendung in einer offenen Defekt-Stelle geeignet, während eine injizierbare Vorrichtungskonfiguration für die Verwendung in einer geschlossenen Defekt-Stelle geeignet ist. Im Hinblick auf Gramm-Äquivalente sind ungefähr 0,5 g bis ungefähr 3,0 g Salzlösung bestimmt worden, um verbesserte Vorrichtungen mit erwünschten Konsistenzen zu ergeben; je höher das Gewicht, desto besser injizierbar ist die Konfiguration.

TABELLE 4: Benetzung der CMC-enthaltenden Vorrichtung

1 Gramm Standard-Vorrichtung plus 200 mg CMC	Menge an hinzugefügter Salzlösung	Beobachtungen
	1,5 ml	Trocken
	1,75	Lässt sich zu Kugeln formen; Paste
	2,0	Gegenwärtig bevorzugte Handhabungskonsistenz; Kitt, rollt sich in Kugeln
	2,5	Akzeptable Handhabungskonsistenz; noch immer wie Kitt.
	2,75	Hinterlässt kleine Partikel von Matrix an der Gefäßwand.
	3,0	Klebrig; weiche Paste.
	3,5	Klebrig; weiche Paste.
	3,75	Lockere Paste.
	4,0	Konsistenz gleich wie oben.
	4,25	Flüssig

[0108] In bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung kann die Erzeugung der eigentlichen, verbesserten osteogenen Vorrichtung unmittelbar vor ihrer Verabreichung an die Defekt-Stelle erfolgen. Wie hierin beispielhaft dargestellt, können CMC-enthaltende, verbesserte Vorrichtungen vor Ort erzeugt werden, die für die Beimischung unmittelbar vor der Operation geeignet sind. In einer Ausführungsform wurde CMC mit niedriger Viskosität (Aqualon®) getrennt vom osteogenen Protein OP-1 und der Kollagenmatrix verpackt und bestrahlt. Das OP-1-Protein in der Kollagenmatrix wurde dann mit dem Bindemittel vermischt. Von Vorrichtungen, die in dieser Art erzeugt wurden, wurde beobachtet, dass sie mindestens biologisch so aktiv sind wie Standardvorrichtungen ohne CMC.

B. Fibrinkleber als ein Bindemittel — Formulierungsstudien

[0109] Basierend auf der folgenden Art von Studien wurde festgestellt, dass ungefähr 500 µl Fibrinogen (80 mg/ml in PBS bei pH-Wert 7,4) und 500 µl Thrombin (50 E/ml oder 25 E/ml in 0,9% NaCl), die zu ungefähr 1 g an β-TCP hinzugefügt wurden, eine verbesserte Vorrichtung mit den gegenwärtig bevorzugten Handhabungseigenschaften ergaben. Angelegenheiten, die mit den Handhabungseigenschaften in Zusammenhang stehen, umfassen Gerinnungszeit des Fibrinklebers und Konsistenz der verbesserten Vorrichtung, die Fibrinkleber enthält. Eine Vorrichtung, welche eine Konsistenz eines formbaren Kitts enthält, wird bevorzugt. Sobald der Kleber gerinnt, wird es schwieriger, die Form des Kitts zu ändern. Eine längere Gerinnungszeit ist daher auch ein bevorzugtes Merkmal der Vorrichtung.

[0110] Die Gerinnungszeit von Rinderfibrinkleber wurde bestimmt durch unaufhörliches Mischen von 20 µl Rinder-Fibrinogenlösung (80 mg/ml in PBS bei pH-Wert 7,4) mit 20 µl Rinderthrombinlösung (500 E/ml oder 25 E/ml in Salzlösung) in einem Gewichtsboot unter Verwendung eines Glaskapillarenstabs bestimmt. Die Gerinnungszeiten wurden auch mit oder ohne Hinzufügen von 0,6% CaCl₂-Lösung bewertet. Die Ergebnisse werden in der folgenden Tabelle gezeigt:

TABELLE 4A

Thrombin (E/ml)	Gerinnungszeit in Sek. m/o CaCl ₂	Gerinnungszeit in Sek. mit 0,6% CaCl ₂
500	23 +/- 2	20 +/- 2
250	40 +/- 5	29 +/- 2
100	61 +/- 2	49 +/- 1
50	90 +/- 2	74 +/- 1
25	---	185 +/- 5

[0111] Die Konsistenz der Vorrichtung, die Fibrinkleber enthält, wurde unter Verwendung einer Vorrichtung bewertet, die β -TCP als eine beispielhafte Matrix enthielt. Unterschiedliche Mengen an Rinder-Fibrinkleber wurden zu 100 mg oder 1000 mg an β -TCP-Körnchen hinzugefügt und die Konsistenz wurde bestimmt. Die Ergebnisse werden in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst:

TABELLE 4B

Menge an β -TCP	Fibrinogen μ l (80 mg/ml in PBS, pH-Wert 7,4)	Thrombin μ l	Konsistenz
100 mg	12,5	12,5 (100 E/ml in Salzlösung m/0,6% CaCl ₂)	β -TCP nicht ganz benetzt
100 mg	25	25 (100 E/ml in Salzlösung m/0,6% CaCl ₂)	Etwas formbar
100 mg	50	50 (100 E/ml in Salzlösung m/0,6% CaCl ₂)	Kitt, formbar bei 1-2 Minuten
100 mg	50	50 (50 E/ml in Salzlösung m/0,6% CaCl ₂)	Formbarer Kitt
100 mg	50	50 (5 E/ml in Salzlösung m/0,6% CaCl ₂)	Sehr langsame Gerinnung, getrennte Partikel
1000 mg	500	500 (100 E/ml in Salzlösung m/0,6% CaCl ₂)	Mischen zu langsam, nicht homogen, getrennte Partikel
1000 mg	500	500 (50 E/ml in Salzlösung)	Kitt, formbar bei 1-2 Minuten
1000 mg	500	500 (25 E/ml in Salzlösung)	Kitt, formbar bei 2-3 Minuten

[0112] Wie durch diese beiden Studien erkannt werden kann, weist eine Vorrichtung, die Fibrinkleber von ungefähr 500 μ l Fibrinogen (80 mg/ml in PBS bei pH-Wert 7,4) und 500 μ l Thrombin (50 E/ml oder 25 E/ml in 0,9% NaCl) enthält und welche zu ungefähr 1 g von β -TCP hinzugefügt wird, eine Gerinnungszeit und Konsistenz auf, die für eine verbesserte osteogene Vorrichtung geeignet ist.

TABELLE 4C: Repäsentative Information betreffend die Zusammensetzung von Fibrinkleber

	Autocolle®	Tissucol®	Beriplast®	Transglutine®	Biocoll®
Fibrinogen (mg/mL)	50-65	70-110	20-140	> 70	116 +/- 2.4
Fibronectin (mg/mL)	4-10	2-9			5.9 +/- 0.51
Factor XIII (PEE)	25-30	10-50	40-60		35 +/- 2.88
Thromboglobulin (µg/mL)	250-400				
PDGF (ng/mL)	350				
TGF (ng/mL)	750				
Plasminogen (µg/mL)		40-120			31
Aprotinin (KIE/ml)		3000			
Albumin (mg/mL)			10		

1. Autocolle® und Biocoll® sind von Centre de Transfusion Sanguine de Lille (Tours, Frankreich)
2. Tissucol® ist von Immuno AG (Wien, Österreich)
3. Beriplast® ist von Behringwerke (Marburg, Deutschland)
4. Transglutine® ist von CNTS Fractionation Centre (Straßburg, Frankreich)

[0113] Basierend auf den vorstehend beschriebenen Studien wurde festgestellt, dass ungefähr 40 mg Fibrinkleber bis ungefähr 1000 mg β -TCP eine hierin in Erwägung gezogene, verbesserte Vorrichtung ergibt. Basierend auf den gleichen Studien wurde festgestellt, dass ungefähr 20 mg Fibrinkleber zu ungefähr 1000 mg Kollagen eine Vorrichtung mit den hierin dargelegten, verbesserten Eigenschaften ergibt. Im Allgemeinen deuten die Daten darauf hin, dass ein Bereich von ungefähr 20-220 mg Fibrinkleber/1000 mg Matrix die Kohäsivität, Integrität und Handhabungseigenschaften abhängig von der genauen Umständen und der vorgesehenen Verwendung maximieren kann.

IV. ANDERE MATERIALERWÄGUNGEN

[0114] In bestimmten Ausführungsformen der Erfindung ist das bevorzugte Matrixmaterial β -TCP. Bevorzugte Eigenschaften eines nicht-synthetischen, nicht-polymeren Materials zur Verwendung als eine Matrix in der beanspruchten Erfindung schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf: eine hohe Resorptionsrate der Matrix durch das umgebende Gewebe und eine geringe entzündliche Reaktion. Wie vorstehend besprochen, ist gesintertes, hoch gebranntes β -TCP, welches eine Partikelgröße im Bereich von etwa 212 µm bis zu etwa 425 µm aufweist, gegenwärtig am meisten bevorzugt, aber andere Partikelgrößen können verwendet werden, um die vorliegende Erfindung zu praktizieren.

Bildanalyseverfahren

[0115] Die Resorptionsrate der β -TCP-Matrix wurde unter Verwendung eines Standard-Bildanalyseverfahrens bestimmt. Die Bildanalyse ist ein Verfahren zur Evaluierung der Partikelgrößenverteilung von Ca/P-Körnchen. Die Partikelgröße von Ca/P-Körnchen wird vor und nach der Implantierung in Ratten verglichen. Die weichen Gewebe der Eplantate werden durch Natrium-Hypochlorit aufgelöst und die verbleibenden Ca/P-Körnchen wurden mehrmals mit Wasser gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Partikel werden mit Glycerin gemischt und auf Glasobjektträger aufgetragen. Die Partikelgröße wird durch Mikroskopie unter Verwendung eines Standard-Bildanalyseverfahrens wie zum Beispiel Bioquant OS/2 bestimmt, welches durch eine Videokamera an das Mikroskop gekoppelt ist. Anordnungen, welche den Bereich und den längsten Durchmesser anzeigen, werden ausgewählt, um die einzelnen Partikeldimensionen auszudrücken. Partikelbilder, welche Grauskalen von 0 bis 88 von einer Serie mit 256 Abstufungen anzeigen, wurden ausgewählt und gemessen.

Die Rohdaten aus einzelnen Partikeln wurden verwendet, um das Mittel und die Standardabweichung zu berechnen. Mindestens 50 Partikel wurden in jedem Datensatz gemessen.

Ratten-Subkutanstudie

[0116] In der nachstehend dargelegten Studie wird β -TCP (Clarkson, #211096, BD = 0,86, 212-425 μm , 9/6/97) in einer CMC/Blutpaste mit oder ohne 10 μg OP-1 formuliert und in subkutane Stellen in Ratten implantiert. Die Implantate werden nach 6 und 12 Wochen in vivo entfernt und unter Verwendung des vorstehend beschriebenen Bildanalyseverfahrens analysiert. Resultate nach sechs Wochen werden nachstehend in Tabelle 4D zusammengefasst. Die Ergebnisse nach sechs Wochen deuten darauf hin, dass sich die Größe von β -TCP von 334 μm auf 184 μm (ohne OP-1) und auf 166 μm (mit OP-1) vermindert. Der Größenunterschied zwischen mit OP-1 behandelten und nicht behandelten Proben ist nicht signifikant. Es besteht jedoch eine etwa 50% Reduktion im Durchmesser des β -TCP nach sechs Wochen.

TABELLE 4D

IN VIVO-RESORPTION VON β -TCP NACH 6 WOCHEN

Proben (n=4)	Zeit in vivo	OP-1 (μg)	Partikelgröße (μm)	Partikelfläche (mm^2)
β -TCP/CMC/Blut	6 Wochen	0	184 +/- 29	0,022 +/- 0,008
β -TCP/CMC/Blut	6 Wochen	10	166 +/- 22	0,016 +/- 0,004
β -TCP alleine (212-425 μm)	0	-	334 +/- 16	0,068 +/- 0,007

TABELLE 4E: Quelle und Zusammensetzung von manchen bevorzugten Matrix-Materialien und bevorzugten Komponenten an Fibrinkleber.

Artikel	Quelle	Zusammensetzung
Ca/P-Partikel	Clarkson Chromatography Products, Inc. (S. Williamsport, PA)	Bereich von 50-2000 μm , zum Beispiel Hydroxyapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) oder β -TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)
Rinder-Fibrinogen	Sigma (F8630) (St. Louis, MO)	75% Protein, 10% Natrium- Citrat, 15% NaCl
Menschliches Thrombin	Immuno AG (Wien, Österreich)	500 E oder 4 E pro Röhrchen, wieder hergestellt in 2 ml 40 mM CaCl_2
β -TCP-Körnchen	Clarkson Chromatography Products Inc. (S. Williamsport, PA)	Bereich von 50-2000 μm , Zusammensetzung ist ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)
Kälberserum	Life Technologies (16170-078)	n.a.

	(Gaithersburg, MD)	
Rinderthrombin	Sigma (T4648) (St. Louis, MO)	50-100 E/mg Protein
Rattenthrombin	Sigma (T5772) (St. Louis, MO)	1000 E/mg Protein
Rattenfibrinogen	Sigma (F6755) (St. Louis, MO)	70% Protein, 12% Natriumcitrat, 18% NaCl

Entzündung

[0117] Im Allgemeinen kann angenommen werden, dass kleine Partikel schneller resorbiert werden als große Partikel. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass ohne OP-1 β -TCP (212-425 μm) eine etwas erhöhte entzündliche Reaktion hervorrief. Die entzündliche Reaktion wurde jedoch vermindert, als die Dosis von OP-1 von 10 μg auf 20 μg anstieg. Frühere Tierstudien haben gezeigt, dass kleine Partikel, weniger als 10 μm , eine stärkere entzündliche Reaktion hervorrufen. Die Verwendung von gesinterten β -TCP (100%)-Partikeln der Größe von 212 bis 425 μm ist daher ein Ausgleich zwischen Resorptionsrate, niedriger Entzündung und der Fähigkeit, die Knochenbildung im subkutanen Modell der Ratte zu unterstützen.

V. BIOTEST

A. Biotest auf osteogene Aktivität: Endochondrale Knochenbildung und ähnliche Eigenschaften

[0118] Das folgende legt beispielhafte Protokolle zur Identifizierung und Charakterisierung von bona fide osteogenen oder morphogenetischen Knochenproteinen, sowie auch osteogenen Vorrichtungen innerhalb des Geltungsbereichs der Erfindung des Anmelders dar.

[0119] Der im Fachgebiet anerkannte Biotest für Knocheninduktion, wie beschrieben durch Sampath und Reddi (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80:6591-6595) und US-Patentnr. 4,968,590, wird verwendet, um die Effizienz des Reinigungsprotokolls zu bewerten. Kurz gesagt besteht dieser Test aus dem Deponieren der Testproben in subkutanen Stellen in allogenen Empfängerratten unter Etheranästhesie. Ein vertikaler Einschnitt (1 cm) wird unter sterilen Bedingungen in der Haut über der Brustregion durchgeführt und durch stumpfe Sektion wird eine Tasche hergestellt. Unter bestimmten Umständen werden ungefähr 25 mg der Testprobe tief in eine Tasche implantiert und der Einschnitt mit einer metallenen Hautklammer verschlossen. Die heterotrope Stelle ermöglicht das Studium der Knocheninduktion ohne die möglichen Ungewissheiten, die aus der Verwendung von orthotropen Stellen resultieren.

[0120] Die sequentiellen zellulären Reaktionen, welche an der heterotropen Stelle vorkommen, sind komplex. Die Mehrschritt-Kaskade der endochondralen Knochenbildung umfasst: Bindung von Fibrin und Fibronectin an die implantierte Matrix, Chemotaxis von Zellen, Proliferation von Fibroblasten, Differenzierung in Chondroblasten, Knorpelbildung, vaskuläre Invasion, Knochenbildung, Umbau und Knochenmarksdifferenzierung.

[0121] In Ratten zeigt dieses Biotestmodell ein kontrolliertes Fortschreiten durch die Stadien von Matrix-induzierter endochondraler Knochenentwicklung, einschließlich: (1) transientser Infiltration durch polymorphnucleäre Leukocyten am ersten Tag; (2) mesenchymaler Zellmigration und -Proliferation an den Tagen zwei und drei; (3) Erscheinen von Chondocyten an den Tagen fünf und sechs; (4) Knorpel-Matrixbildung am siebten Tag; (5) Knorpelverknöcherung am achten Tag; (6) vaskuläre Invasion, Erscheinen von Osteoblasten und Bildung von neuem Knochen an den Tagen neun und zehn; (7) Erscheinen von osteoblastischen und Knochenumformungen an den Tagen 12 bis 18; und (8) hämatopoietische Knochenmarks-Differenzierung im Ossicel am Tag 21.

[0122] Herstellung histologischer Schnitte und Färbung werden bevorzugt, um das Ausmaß der Osteogenese in den Implantaten zu bestimmen. Die Färbung mit Toluidinblau oder Hämatoxylin/Eosin zeigt klar die endgültige Entwicklung des endochondralen Knochens. Zwölf Tage Biotests sind ausreichend, um zu bestimmen, ob mit der Testprobe knocheninduzierende Aktivität in Zusammenhang steht.

[0123] Außerdem kann alkalische Phosphataseaktivität als ein Marker für die Osteogenese verwendet werden. Die Enzymaktivität kann spektrophotometrisch nach Homogenisierung des herausgeschnittenen Testmaterials bestimmt werden. Die Aktivitätspeaks an beiden Tagen 9-10 in vivo und danach fallen langsam ab. Proben, die histologisch keine Knochenentwicklung zeigen, sollten unter diesen Testbedingungen keine alkalische Phosphataseaktivität aufweisen. Der Test ist für die Quantifizierung und die sehr schnelle Erlangung einer Ab-

schätzung der Knochenbildung nützlich, nachdem die Testproben aus der Ratte entfernt wurden. Zum Beispiel sind Proben, die osteogenes Protein mit verschiedensten Reinheitsgraden enthielten, getestet worden, um den effektivsten Dosierungs-/Reinheitsgrad zu bestimmen, um eine Formulierung zu finden, die in industriellem Maßstab erzeugt werden kann. Die durch alkalische Phosphatase-Aktivitätsmengen gemessenen Ergebnisse und die histologische Bewertung, können als „Knochenbildungseinheiten“ dargestellt werden. Eine knochenbildende Einheit stellt die Menge an Protein dar, die für halbmaximale Knochenbildungsaktivität an Tag 12 benötigt wurde. Außerdem können Dosierungskurven für die Knocheninduzierende Aktivität in vivo bei jedem Schritt eines Reinigungsschemas durch Testung verschiedener Proteinkonzentrationen erstellt werden. Demgemäß kann der Fachmann nur unter Verwendung von Routineuntersuchungen repräsentative Dosierungskurven erstellen.

B. Knorpelbildung: Immunhistochemie, Histologie und polarisierte Lichtmikroskopie

I. Immunhistochemie und Histologie

[0124] Kurz gesagt ist es im Fachgebiet gut bekannt, dass die Identifizierung von bona fide Gelenkknorpel unter Verwendung von ultrastrukturellen und/oder biochemischen Parametern erreicht werden kann. Zum Beispiel bildet Gelenkknorpel eine durchgehende Schicht an Knorpelgewebe, die identifizierbare Zonen aufweist. Die oberflächliche Zone ist durch Chondrocyten gekennzeichnet, welche eine abgeflachte Morphologie und ein extrazelluläres Netzwerk aufweisen, das sich mit Toluidinblau nicht oder nur schwach anfärben lässt, das weißt auf die relative Abwesenheit von sulfatierten Proteoglycanen hin. Toluidinblau wird herkömmlicherweise zur Färbung von Knochen- und Knorpel verwendet. Es ist ein metachromatischer Farbstoff, der basierend auf der Anwesenheit von dicht gelegenen negativen Ladungen in den Geweben unterschiedliche Farben ergibt, wobei es zu einer Aggregation und Polymerisation des Farbstoffs kommt, wobei sich die Farbe von blau zu violett verändert. Knochen wird blau gefärbt, während der Knorpel mit seinen sauren Mucopolysacchariden dunkel violett gefärbt wird. Chondrocyten in den mittleren und tiefen Zonen weisen ein sphärisches Erscheinungsbild auf und die Matrix enthält reichlich sulfatierte Proteoglycane, wie durch die Färbung mit Toluidinblau bewiesen wird. Kollagenfasern sind diffus in der gesamten Matrix vorhanden. Die Chondrocyten besitzen reichlich rauhes endoplasmatisches Retikulum und sind umgeben von einem extrazellulären Netzwerk. Das perizelluläre Netzwerk enthält zahlreiche, dünne, nicht-bandförmige Kollagenfasern. Das Kollagen im interterritorialen Netzwerk ist weniger gepackt und in elektronendurchlässiges, amorphes Material eingebettet, ähnlich dem Gelenkknorpel. Kollagenfasern in der interterritorialen Region des Netzwerks zeigen die periodischen Bandierungseigenschaften von Kollagenfasern in der interterritorialen Zone von Knorpelgewebe.

[0125] Von Kossa-Färbung zeigt eine dichte, schwarze Färbung des mineralisierten Gewebes. Diese Färbung stellt durch die Ablagerung von Silber auf den Calciumsalzen den bestehenden und neuen regenerierten Knochen klar dar. Üblicherweise ist die Gegenfärbung Safranin O, welches den Knorpel rot-orange färbt. Neuer und bestehender Knochen kann normalerweise leicht morphologisch in entsprechend gefärbten Abschnitten unterschieden werden. Safranin-O/Fast Green ist im Stande, mehrere Merkmale zu unterscheiden als Toluidinblau. Safranin O ist ein alkalischer Farbstoff, der saure Mucopolysaccharide im Gelenkknorpel rot-orange und den darunterliegenden subchondralen Knochen nur leicht färbt. Fast Green ist ein saurer Farbstoff, der das Cytoplasma grau-grün färbt Dieser Farbstoff ist nicht nur in der Lage, den bestehenden und regenerierten Knorpel klar zu identifizieren, sondern kann auch die Unterschiede zwischen zwei Regionen im wiederaufgebauten Reparaturgewebe unterscheiden; das deutet auf Unterschiede im Gehalt von Proteoglycanen hin.

[0126] Hämatoxylin/Eosin-Farbstoffe, die den Knochen als dunkleres Rot und die kohlenhydratreichen Knorpel nur sehr schwach darstellen, können auch verwendet werden. Masson-Trichrom ist im Stande, zwischen Unterschieden im wiederhergestellten Reparaturgewebe zu unterscheiden. Knorpel- und saure, polysaccharidreiche Reparaturgewebe, Muskel und Erythrocyten werden rot gefärbt, das Kollagen des Knochens wird blau gefärbt.

[0127] Histologische Untersuchungen kennen auch eine Bewertung umfassen: des Glycosaminoglycangehalts im reparierten Knorpel; der Knorpel, und Chondrocyten-Morphologie; und der strukturellen Integrität und Morphologie an der defekten Berührungsstelle. Die Morphologie des reparierten Knorpels kann durch die Art an gebildetem Knorpel identifiziert werden: artikulär im Vergleich zu fibrotisch durch Untersuchung des Glycosaminoglycangehalts, Grads an Knorpelablagerung und ähnliches.

[0128] verbleibendem Gelenkknorpel neben dem Defekt zu bewerten. Eine solche Mikroskopie kann unter Verwendung von Safranin O gefärbten Schnitten aus dem Defekt durchgeführt werden. In bestimmten Fällen erlaubt die polarisierte Lichtmikroskopie dem Fachmann einen genaueren Betrachtung des Reparaturvor-

gangs. Zum Beispiel kann unter Verwendung von Lichtmikroskopie das reparierte Gewebe an der Peripherie eines Defekts an den verbleibenden Knorpel als gut angelagert erscheinen. Unter Verwendung von polarisierter Lichtmikroskopie kann jedoch beobachtet werden, dass die Kollagenfasern des reparierten Gewebes und jene des verbleibenden Knorpels nicht gut ineinander integriert. Das Fehlen von Faserkontinuität zwischen repariertem und bestehendem Knorpel ist ein Hinweis auf suboptimale Reparatur. Wenn man daher die Verbindung zwischen repariertem Knorpel und verbleibendem, lebensfähigem Knorpel qualitativ bewertet, wird die Faserkontinuität, wie nachstehend beispielhaft dargestellt, vorzugsweise unter Verwendung von polarisierter Lichtmikroskopie bewertet. (Siehe auch Shapiro et al., Journal of Bone and Joint Surgery 75: 532-553 (1993)).

[0129] Die Ausübung der Erfindung wird durch die folgenden Beispiele noch umfassender verstanden werden, welche hierin nur zur Illustration dargelegt werden und nicht in irgendeiner Art als limitierend verstanden werden sollten.

VI. Tierstudien: Verfahren der Verwendung von verbesserten osteogenen Vorrichtungen

A. Reparatur von segmentalen Defekten kritischer Größe unter Verwendung von verbesserten osteogenen Vorrichtungen, die Carboxymethylcellulose enthalten.

1. Experiment 1: Einheitliche Vorrichtungskonfiguration (Hunde)

[0130] Diese Studie illustriert die Wirksamkeit von OP-1 in Kombination mit Kollagenmatrix und Carboxymethylcellulose bei der Reparatur von segmentalen Defekten kritischer Größe der Ulna, in dem im Fachgebiet anerkannten Hundemodell.

[0131] Kurz gesagt deuten die nachstehend dargelegten Daten auf zumindest vergleichbare röntgenografische Heilung an den Stellen hin, welche die CMC/OP-1-Vorrichtung erhielten, im Vergleich mit segmentalen Defekten, die mit der OP-Beispiel 20 µg/ml für jeden Antikörper, der in 1% BSA („bovine serum albumin“; Rinderserumalbumin) in TEST verdünnt ist. Nach der Inkubation mit Antikörpern werden die Proben mit TEST gespült und in einem Bad gehalten. Ein im Handel erhältlicher Verbindungsantikörper wird dann hinzugefügt. Zum Beispiel können Proben, die mit den Ziege-anti-Mensch-Kollagen Typ I- und II-Antikörpern behandelt wurden, mit Ziege-Verbindungs-Antikörper von BioGenex Laborstories (San Ramon, CA); Katalognummer HK209-5G) für mindestens 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Für diese mit Maus- oder Kaninchenantikörpern inkubierten Proben kann ein Dako-LSAB2-Kit Nummer K0610 von Dako Corporation (Carpinteria, KA), als ein Verbindungsantikörper verwendet werden. Die Proben werden wieder mit TEST gewaschen und verbleiben in einem Bad. Als Nächstes wird den Proben ermöglicht, mit Streptavidin/Alkalischer Phosphatase, die von jeder der vorstehend identifizierten Quellen im Handel erhältlich sind, für mindestens ungefähr 10 Minuten bei Raumtemperatur zu inkubieren. Die Proben werden dann nochmals mit TEST gespült. Die Proben werden dann durch Behandlung mit einer entsprechenden Substratlösung für ungefähr 10 Minuten oder weniger entwickelt. Zum Beispiel werden für den Nachweis von alkalischer Phosphatase ungefähr 100 µl 50 × Lavamesol verwendet. Zur Farbentwicklung wird Fast Red von Dako Corporation verwendet. Nach der Entwicklung werden die Proben durch Waschen mit Harris Hämatoxylin und 1 % Lithium Carbonat für 2 Minuten gegengefärbt. Die Proben werden dann in einem wässrigen Fixiermedium fixiert und die Knorpelbildung wird anschließend ausgewertet.

[0132] Färben für Typ I- und II-Kollagen ist nützlich, um die Grenzen zwischen regeneriertem subchondralem Knochen und Reparaturgewebe zu bestimmen. Im Allgemeinen färbt sich Reparaturgewebe, das fibrös ist, weniger intensiv an. Außerdem kann neu gebildeter subchondraler Knochen durch die Lokalisierung von Typ II-Kollagen in kleinen Nadeln von verbleibendem Knorpel identifiziert werden. Toluidenblau und Safranin O sind auch für die Färbung von sauren Proteoglycanen in einer Knorpelschicht sowie in Reparaturgewebe verwendbar.

2. Lichtmikroskopie mit polarisiertem Licht

[0133] Mikroskopie mit polarisiertem Licht kann verwendet werden, um Faserverzahnung an den Übergängen zwischen Grenzen von Reparaturgewebe und verbleibendem Gelenkknorpel neben dem Defekt zu bewerten. Eine solche Mikroskopie kann unter Verwendung von Safranin O gefärbten Schnitten aus dem Defekt durchgeführt werden. In bestimmten Fällen erlaubt die polarisierte Lichtmikroskopie dem Fachmann einen genaueren Betrachtung des Reparaturvorgangs. Zum Beispiel kann unter Verwendung von Lichtmikroskopie das reparierte Gewebe an der Peripherie eines Defekts an den verbleibenden Knorpel als gut angelagert erscheinen. Unter Verwendung von polarisierter Lichtmikroskopie kann jedoch beobachtet werden, dass die Kollagenfa-

sem des reparierten Gewebes und jene des verbleibenden Knorpels nicht gut ineinander integriert. Das Fehlen von Faserkontinuität zwischen repariertem und bestehendem Knorpel ist ein Hinweis auf sub-optimale Reparatur. Wenn man daher die Verbindung zwischen repariertem Knorpel und verbleibendem, lebensfähigem Knorpel qualitativ bewertet, wird die Faserkontinuität, wie nachstehend beispielhaft dargestellt, vorzugsweise unter Verwendung von polarisierter Lichtmikroskopie bewertet. (Siehe auch Shapiro et al., Journal of Bone and Joint Surgery 75: 532-553 (1993)).

[0134] Die Ausübung der Erfindung wird durch die folgenden Beispiele noch umfassender verstanden werden, welche hierin nur zur Illustration dargelegt werden und nicht in irgendeiner Art als limitierend verstanden werden sollten.

VI. Tierstudien: Verfahren der Verwendung von verbesserten osteogenen Vorrichtungen

A. Reparatur von segmentalen Defekten kritischer Größe unter Verwendung von verbesserten osteogenen Vorrichtungen, die Carboxymethylcellulose enthalten.

1. Experiment 1: Einheitliche Vorrichtungskonfiguration (Hunde)

[0135] Diese Studie illustriert die Wirksamkeit von OP-1 in Kombination mit Kollagenmatrix und Carboxymethylcellulose bei der Reparatur von segmentalen Defekten kritischer Größe der Ulna, in dem im Fachgebiet anerkannten Hundemodell.

[0136] Kurz gesagt deuten die nachstehend dargelegten Daten auf zumindest vergleichbare röntgenografische Heilung an den Stellen hin, welche die CMC/OP-1-Vorrichtung erhielten, im Vergleich mit segmentalen Defekten, die mit der OP-Standardvorrichtung behandelt wurden. Der endgültige röntgenografische Grad (Maximum = 6,0) für die mit CMC/OP-1 behandelten Defekte war $5,33 \pm 0,58$ verglichen mit $4,67 \pm 0,58$ für den Defekt, der OP-1-Standardvorrichtung erhielt. Im Allgemeinen war die neue Knochenbildung in allen Defekten so zeitig wie 2 Wochen nach der Operation in allen Defekten offensichtlich. Der neue Knochen hat sich bis zur Tötung, zwölf Wochen nach der Operation, fortdauernd verdichtet, verfestigt und neu geformt. Die durchschnittliche Belastung bis zum Versagen des mit der CMC/OP-1-Vorrichtung behandelten Defekts war $59,33 \text{ N} \pm 26,77$. Das waren 70% der durchschnittliche Belastung bis zum Versagen der kontralateralen Seiten, welche die OP-1-Standardimplantate erhielten. Histologisch waren das Endvolumen, die Qualität und der Umformungsgrad mindestens äquivalent zu den Defekten, die mit der CMC/OP-1 und Standard OP-1-Vorrichtung behandelt wurden, obwohl eine Variation der endgültigen neuen Knochenbildung und der Umformungsgrad im Vergleich von einem Tier zum anderen vermerkt wurde. Der durchschnittliche histologische Grad für Defekte, die mit der CMC/OP-1-Vorrichtung behandelt wurden, war $12,67 \pm 1,04$ von 16 möglichen Gesamtpunkten. Der durchschnittliche histologische Grad für die mit der OP-1-Standardvorrichtung behandelten Defekte war $11,41 \pm 0,95$ von 16 möglichen Gesamtpunkten.

Beschreibung der Testvorrichtung

[0137] Wie schon beschrieben, bestanden Standardvorrichtungen aus rekombinantem menschlichem osteogenem Protein-1 (rhOP-1) vermischt mit Rinderknochen-Typ I-Kollagenmatrix bei einem Verhältnis von 2,5 mg rhOP-1 pro Gramm an Kollagenmatrix. Die verbesserte Vorrichtung bestand aus rhOP-1 gemischt mit Rinderknochen-Typ I-Kollagenmatrix und Carboxymethylcellulose (CMC). Die einheitlichen Vorrichtungen wurden in sterilen Röhrchen bereitgestellt.

[0138] Wie vorher beschrieben, hat die gegenwärtig bevorzugte CMC-enthaltende Vorrichtung für offene Defekte eine Kitt-Konsistenz. Die einheitlichen CMC/OP-1-Vorrichtung wurde trocken in eine kleine Schüssel gegeben und mit Salzlösung gemischt. Der Praktiker mischte und formte die Vorrichtung unter Verwendung der Finger in die allgemeine Form des Defekts und platzierte die Vorrichtung dann in die Defekt-Stelle. Es wurde berichtet, dass die verbesserte Vorrichtung leichter gehandhabt und geformt werden konnte und nicht an den Operationshandschuhen klebte. Die Vorrichtung behielt ihre Integrität bei, wenn sie während der Spülung und während/nach dem Zunähen in die Defekt-Stelle platziert wurde.

Experimentelle Anordnung

[0139] Männliche ausgewachsene Mischlingshunde wurden aufgrund ihrer gut bekannten Knochenreparatur- und Umformungseigenschaften benützt. Alle Tiere waren mindestens zwei Jahre alt und wogen 40 bis 50 Pfund. Alle Tiere wurden durch Martin Creek Kennels, USDA-Nummer 71-B-108, Willowford, AK bereitgestellt.

Spezielle Aufmerksamkeit wurde der Auswahl von Tieren mit einheitlicher Größe und einheitlichem Gewicht geschenkt, um die Variabilität in Knochengeometrie und -Belastung zu beschränken. Die Tiere wurden vor der Operation röntgenografisch durchmustert, um richtige Größe und Skelettreife sicherzustellen sowie dass keine offensichtlichen ossalen Abnormalitäten vorlagen.

[0140] Insgesamt wurden 3 erwachsene männliche Hunde benützt. Bilaterale, 2,5 cm lange segmentale Ulna-defekte wurden erzeugt. Alle Defekte der rechten Seite erhielten die verbesserte Vorrichtung (CMC/OP-1-Vorrichtung). Alle Defekte der linken Seite erhielten OP-1-Standardvorrichtung. Zweimal pro Woche wurden Röntgenbilder gemacht, um das Fortschreiten der Heilung zu untersuchen und auf einer Skala von 0-6 bewertet. Bei der Tötung wurden alle Ulnae im Ganzen entnommen und jene, die nach händischer Manipulation genügend geheilt waren, wurden mechanisch in der Drehbelastung getestet. Die Segemente wurden durch Histologie auf Gewebereaktion, Knochenarchitektur und -Umbau untersucht und die Qualität und die Menge an neuer Knochenbildung und -Heilung bewertet; die Einteilung wurde auf einer Skala von 0-16 durchgeführt.

Operation

[0141] Unter Verwendung von aseptischen Standardtechniken wurde die Operation unter Halothan-gas-Anästhesie durchgeführt. Ein lateraler Einschnitt von ungefähr 4,0-cm-Länge wurde durchgeführt und die Freilegung der Ulna wurde unter Verwendung von stumpfer und scharfer Zergliederung erhalten. Ein segmentaler osteoperiostealer Defekt von 2,5 cm wurde in der mittleren Ulna unter Verwendung einer oszillierenden Säge erzeugt. Dieser Defekt betrug etwa das 2-2,5-fache des Durchmessers des mittleren Schaftes und stellt einen Defekt von kritischer Größe dar, d.h. der Defekt würde spontan nicht heilen. Intraoperative Messungen wurden von dem entfernten Knochensegment durchgeführt. Der Radius wurde für mechanische Stabilität beibehalten, es wurde aber keine interne oder externe Fixierung verwendet. Die Stelle wurde mit Salzlösung ausgespült, um Knochentrümmer sowie herausgelaufene Markzellen zu entfernen. Nachdem die Stelle getrocknet war und Homöostase erreicht wurde, wurden die Implantate vorsichtig in die Defekte platziert. Die Weichgewebe wurden in Schichten sorgfältig geschlossen, um das Implantat zu beinhalten. Die Prozedur wurde dann auf der kontralateralen Seite wiederholt.

Röntgenaufnahmen

[0142] Röntgenbilder der vorderen Extremitäten wurden zweimal wöchentlich, bis acht Wochen nach Operation erhalten und dann wieder bei zwölf Wochen nach der Operation bei der Tötung. Standardisierte Bestrahlungszeiten und -Intensitäten wurden verwendet und Sandsäcke wurden verwendet, um die Extremitäten in einer einheitlichen Weise zu positionieren. Die Röntgenbilder wurden beurteilt und mit früheren Röntgenbildern verglichen, um die Qualität und Geschwindigkeit der Defektheilung abzuschätzen. Die Einteilung der Röntgenbilder war in Übereinstimmung mit der folgenden Skala:

TABELLE 5

Röntgenografische Einteilungsskala

	<u>Grad:</u>
Keine Veränderung von der unmittelbaren postoperativen Erscheinung	0
Spur an röntgendichtem Material im Defekt	1
Flockige Röntgendichte mit Flecken von Verkalkung	2
Defekt, überbrückt zumindest an einem Punkt mit Material von nicht-einheitlicher Röntgendichte	3
Defekt, überbrückt sowohl auf der medialen als auch der lateralen Seite mit Material von einheitlicher Röntgendichte, die geschnittenen Enden des Kortex bleiben sichtbar	4
Gleich wie Grad 3; mindestens ein Kortex von vier ist mit neuem	5

Knochen verdeckt
Defekt, überbrückt durch einheitlichen neuen Knochen, die geschnittenen
Enden des Kortex sind nicht länger unterscheidbar

Defekt, überbrückt durch einheitlichen neuen Knochen, die geschnittenen	6
---	---

Enden des Kortex sind nicht länger unterscheidbar

Tötung

[0143] Am Ende der Untersuchungszeit wurden die Tiere unter Verwendung einer intravenösen Barbituratüberdosis getötet. Die Ulna und der Radius wurden sofort im Ganzen entnommen und in mit Salzlösung getränkte Windeln platziert. Beide Ulnae wurden Markographiert und Kontaktstrontgen mit Markierungen wurden gemacht. Die Weichgewebe wurden vorsichtig von der defekten Stelle weg präpariert. Eine mit Wasser gekühlte Säge wurde verwendet, um die Ulna in eine einheitliche Länge von 9 cm zu zerschneiden, mit der defekten Stelle in der Mitte der Testprobe zentriert.

Mechanische Untersuchung

[0144] Sofort nach dem Schneiden wurden die Proben unter Verwendung von Routineverfahren auf einer hydraulischen MTS-Testmaschine mit geschlossenem Kreislauf (Minneapolis, MN), die mit Schlagsteuerung bei einer konstanten Verdrängungsrate von 50 mm/min betrieben wurde, auf Versagen in der Drehbelastung getestet, wenn die Verheilung durch manuelle Manipulation als ausreichend erachtet wurde. Kurz gesagt wurde jedes Ende des Knochensegmentes in einer zylindrischen Aluminiummanschette befestigt und mit Methylmethacrylat zementiert. Ein Ende wurde starr fixiert und das andere gegen den Uhrzeigersinn rotiert. Da die Hundelna eine leichte Krümmung aufweist, wurden die Proben befestigt, um die Rotation der Proben coaxial mit dem der Testvorrichtung zu halten. Die Drehkraft wurde mit einem Hebelarm von 6 cm durch ein servo-hydraulisches Material-Testsystem ausgeübt. Gleichzeitige Aufnahmen wurden von Implantatverschiebungen gemacht, wie gemessen durch das Wegsteuergerät der Maschine, während die Belastung aus der Belastungszelle aufgenommen wurde. Kraft-Winklerverschiebungskurven wurden hergestellt, durch welche das Drehmoment und die Winkeldeformation bis zum Versagen erhalten wurden, und die Energieabsorption bis zum Versagen wurde als die Fläche unter der Belastungs-Verschiebungskurve berechnet.

Histologie

[0145] Die einzelnen Proben wurden durch Eintauchen in 10% gepufferter Formalinlösung sofort nach der mechanischen Untersuchung oder in ungetesteten Proben nach der Schnitterzeugung fixiert. Auf einer wassergekühlten Diamantsäge wurden die Proben durch Schnitt entlang der Längsachse der Proben geteilt. Dieser Vorgang resultierte in zwei Teilen von jeder Probe für unterschiedliche histologische Präparationen, einschließlich nicht entkalkten, geschliffenen Schnitten und entkalkten Mikrotomschnitten.

[0146] Nach der Fixierung wurden die Proben, welche für nicht-entkalkte Schnitte vorgesehen waren, in graduierten Ethylalkohollösungen von 70% bis 100% dehydratisiert. Die Proben wurden dann in Methylmethacrylat-Monomer gelegt und die Polymerisierung wurde ermöglicht. Die geschliffenen Schnitte wurden durch Schneiden der Proben auf einer wassergekühlten Mark V CS600-A (Grandby, CT) Hochgeschwindigkeits-Schnittsäge in Schnitte von ungefähr 700 bis 1.000 µm Dicke geschnitten. Die Schnitte wurden auf Acrylobjektträgern befestigt und unter Verwendung eines metallurgischen Schleifrades zu einer Dicke von 100 µm geschliffen, und Mikroröntgenbilder wurden unter Verwendung von standardisierten Techniken hergestellt. Nach den Mikroradiografiebildern wurden die Schnitte weiter auf ungefähr 50 µm geschliffen und mit basischem Fuchsin und Toluidinblau für die histologische Einteilung gefärbt, welche die folgenden Parameter der Reparatur bewertete: Qualität der Vereinigung, Aussehen und Qualität der kortikalen Knochens und der Spongiosa, die Anwesenheit von Knochenmarkselementen, Knochenumformung und Entzündungsreaktion. Die Einteilung der histologischen Parameter erfolgte in Übereinstimmung mit der folgenden Skala:

TABELLE 6

Histologische Graduierungsskala

Qualität der Vereinigung:	Grad:
Kein Zeichen von fasriger oder anderer Vereinigung	0
Fasrige Vereinigung	1
Osteochondrale Vereinigung	2
Knochenvereinigung	3
Knochenvereinigung mit Neuorganisation der Kortexe	4
Kortexentwicklung:	

	Keine im Defekt vorhanden	0
	Verdichtung der Ränder	1
	Erkennbare Bildung	2
	Intakte Kortexe, aber nicht komplett	3
	Komplette Bildung von normalen Kortexen	4
Verbleibendes Implantatmaterial/Interne Architektur:		
	Große Mengen an sichtbarem Implantatmaterial	0
	Mäßige Mengen an verbleibendem Implantatmaterial	1
	Kleine Mengen an verbleibendem Implantatmaterial/unorganisierte Architektur	2
	Kein verbleibendes Implantat/Rückkehr von Knochenmarkshöhle/einige Markelemente	3
	Normale Markelemente und Architektur	4
Entzündungsreaktion:	Schwer	0
	Schwer/mäßig	1
	Mäßige Reaktion	2
	Leicht	3
	Keine Reaktion	4
GESAMTPUNKTE		16

Ergebnisse

Röntgenografische Bewertung

[0147] In dieser Untersuchung gab es keine wesentlichen Unterschiede in den röntgenografischen Knochenheilungseigenschaften der Stellen, welche eine CMC/OP-1-Vorrichtung erhielten, verglichen mit segmentalen Defekten, welche die OP-1-Standardvorrichtung erhielten. Im Allgemeinen war die neue Knochenbildung in allen Defekten so früh wie 2 Wochen nach der Operation offensichtlich. Der neue Knochen verdichtete sich weiter, verfestigte sich und formte sich bis zur Tötung zwölf Wochen nach der Operation um. Neue Kortextentwicklung mit früher medullärer Hohlräumbildung trat zwischen den Bewertungen der 6. und 8. Woche auf. Der endgültige röntgenografische Grad für Defekte, die mit CMC/OP-1-Vorrichtung behandelt wurden, war $5,33 \pm 0,58$. Der endgültige röntgenografische Grad für Defekte, welche Standard-OP-1-Vorrichtung erhielten, war $4,67 \pm 0,58$.

[0148] Als ein Beispiel sind die spezifischen repräsentativen Beobachtungen für eines der Testtiere wie nachstehend dargelegt:

Rechter Defekt (CMC/OP-1-Vorrichtung)

[0149] Zwei Wochen nach der Operation waren Spuren an röntgendichtem Material im rechten Defekt vor-

handen, aber der Defekt war nicht ganz überbrückt oder mit neuem Knochen gefüllt. Vier Wochen nach der Operation war die Menge und Röntgendichte des neuen Knochens erheblich vermehrt. Der Defekt war überspannt, aber der neue Knochen war noch nicht gut eingebunden. Es gab eine geringe Konsolidierung von neuem Knochen entlang der periostalen Ränder. Eine äquivalente Menge an neuem Knochen hatte sich im Vergleich mit dem linken Defekt dieses Tieres gebildet. Sechs Wochen nach der Operation erhöhte sich die Röntgendichte des neuen Knochens und der Defekt war ganz überspannt und mit beträchtlichem neuem Knochen gefüllt. Frühe Umformung war offensichtlich, wobei die Knochenenden des Wirtes begannen, neuen Knochen einzubauen. Acht Wochen nach der Operation wurde neuer Knochen weiter umgebildet und das Volumen des neuen Knochens besser an die Defektgrenzen angenähert. In die Knochenenden des Wirts wurde unter Verdichtung des neuen Knochens entlang der Ränder neuer Knochen eingebaut, was auf neue Kortextbildung hinvies. Es gab keinen röntgenologischen Beweis für irgendein verbleibendes Trägermaterial. Bei der Tötung war eine röntgendurchsichtige Region innerhalb des Zentrums der rechten Defektseite vorhanden, aber Verdichtung der neuen Knochengrenzen deutete auf neue Kortextbildung hin. Der endgültige röntgenologische Grad war 5 von möglichen 6 Punkten.

Linker Defekt (OP-1-Vorrichtung)

[0150] Zwei Wochen nach der Operation waren Spuren von röntgendichtem Material in den Defekten vorhanden, aber die Defekte waren nicht überbrückt oder mit neuem Knochen gefüllt. Vier Wochen nach der Operation hat sich die Menge und Röntgendichte des neuen Knochens wesentlich erhöht und der Defekt war überspannt und mit neuem Knochen gefüllt. Sechs Wochen nach der Operation war die Röntgendichte des neuen Knochens erhöht und der Defekt ganz überspannt und umfassend mit neuem Knochen gefüllt. Frühe Umformung war offensichtlich und das neue Knochenvolumen war besser an die Defektgrenzen angenähert. Der neue Knochen war einheitlich dicht und die Knochenenden des Wirts begannen eingeschlossen zu werden. Acht Wochen nach der Operation wurde neuer Knochen weiter umgeformt und die Knochenenden des Wirts waren eingeschlossen und Verdichtung des neuen Knochens hatte entlang der Defektgrenzen begonnen. Bei der Tötung wies die Verdichtung des neuen Knochens entlang der Defektgrenzen auf frühe Umformung der neuen Kortixes hin. Die Dichte des neuen Knochens innerhalb des Zentrums des Defekts war größer als der neue Knochen, der sich im Defekt der rechten Seite gebildet hatte, obwohl es in der röntgenografischen Erscheinung an den rechten und linken Seiten in diesem Tier keine wesentlichen Unterschiede gab. Der endgültige röntgenografische Grad war 5 von möglichen 6 Punkten.

Grobe Beobachtungen

[0151] Sowohl rechte als auch linke Proben von allen Tieren wiesen ein ähnliches grobes Aussehen auf. In zwei Tieren waren die rechten und linken Defekte fest vereinigt und wiesen ungefähr das gleiche Volumen an neuem Knochen auf. In einem dritten Tier hatten sowohl die rechte als auch die linke Seite ein ähnliches, neues Knochenvolumen, aber die linke Seite war nicht vollkommen vereinigt.

Mechanische Untersuchung

[0152] Die durchschnittliche Belastung bis zum Versagen von Defekten, die mit CMC/OP-1-Vorrichtung behandelt wurden, war $59,33 \text{ N} \pm 26,77$ ($n = 3$). Die durchschnittliche Belastung bis zum Versagen war 79% der durchschnittlichen Belastung bis zum Versagen der kontralateralen Seiten, welche die OP-1-Standardvorrichtungen erhielten. Das stellte 91% der Festigkeit der vorher getesteten, intakten Kontrollen dar. Die durchschnittliche Winkeldeformation war $38,22 \pm 0,69$ Grad. Die durchschnittliche absorbierte Energie bis zum Versagen war $97,47 \pm 47,21$ Nm Grad.

[0153] Die durchschnittliche Belastung bis zum Versagen der mit der OP-1-Standardvorrichtung behandelten Defekte war $75,39 \text{ N} \pm 1,88$ ($n = 2$). Das stellte 115% der Festigkeit von vorher getesteten, intakten Kontrollen dar. Die mittlere Winkeldeformation war $59,06 \pm 27,80$ Grad. Die durchschnittliche absorbierte Energie bis zum Versagen war $93,40 \pm 17,49$ Nm Grade. Wie erwähnt, wurde ein mit der OP-1-Standardvorrichtung behandelter Defekt aufgrund von großer Instabilität nicht untersucht.

Histologie

[0154] Im Allgemeinen wurde normale Knochenbildung, die mit den mit der Standard-rhOP-1-Vorrichtung mit einer Kollagenmatrix behandelten Defekten übereinstimmte, beobachtet. Sowohl Endvolumen als auch Qualität und Umformungsgrad waren im Vergleich von CMC/OP-1-Vorrichtungen und OP-1-Standardvorrichtungen äquivalent. Eine Variation in der endgültigen, neuen Knochenbildung und des Umformungsgrades wurde in

Vergleichen von Tier zu Tier beobachtet. Der durchschnittliche, histologische Grad für Defekte, die mit der CMC/OP-1-Vorrichtung behandelt wurden, war $12,67 \pm 1,04$ aus 16 möglichen Gesamtpunkten. Der mittlere histologische Grad für Defekte, die mit der OP-1-Standardvorrichtung behandelt wurden, war $11,41 \pm 0,95$ aus einer Gesamtzahl von 16 möglichen Punkten.

[0155] Im Allgemeinen waren sowohl die linken als auch die rechten Defekte von einem großen Volumen an neuem Knochen überspannt. Der neue Knochen hatte begonnen, sich neu zu organisieren, und hatte lamellare Eigenschaften. Entlang der Defektgrenzen wurde der neue Knochen dichter, wobei neue Kortixen angedeutet wurden. In bestimmten Fällen war die Umformung auf der linken und rechten Seite nicht einheitlich fortgeschritten. Das Volumen an neuem Knochen war in bestimmten Fällen auf der linken Seite etwas geringer als auf der rechten Seite. In der Mitte aller Defekte war die Wiederkehr von medullaren Komponenten offensichtlich.

[0156] Zusammenfassend wurden verbesserte osteogene Vorrichtungen (einheitliche Konfiguration) verwendet, um segmentale Defekte von kritischer Größe zu reparieren. Die Raten der endochondralen Knochenreparatur, Indizien für mechanische Stärke, röntgenografische Indizien und histologische Indizien deuteten an, dass verbesserte Vorrichtungen in der Reparatur von Defekten resultierte, die zumindest mit osteogenen Standardvorrichtungen vergleichbar sind.

2. Experiment 2: OP-1 Dosierungsreaktion unter Verwendung von nicht einheitlichen Vorrichtungskonfigurationen (Hunde)

[0157] Diese Studie zeigt ferner die Wirksamkeit der osteogenen Standard-Vorrichtung, die mit Carboxymethylcellulose (CMC) gemischt ist unter Verwendung von sowohl Standard als auch niedrigen OP-1-Dosierungsformulierungen, um große segmentale Defekte von kritischer Größe in dem segmentalen Ulna-Defektmodell in Hunden zu heilen.

[0158] Wie nachstehend im Detail beschrieben, wurden in dieser Studie verschiedene Dosierungen von OP-1 angewandt. Kurz gesagt wurden die niedrigen Dosisformulierungen der OP-1-Vorrichtung ohne CMC bei der Induktion der neuen Knochenbildung als wirkungsvoll befunden, aber weniger wirksam als die OP-1-Vorrichtung mit Standarddosierung. Die mit der CMC-enthaltenden Vorrichtung mit der niedrigen Dosierung behandelten Defekte zeigten jedoch unerwartet frühere und größere Volumina an neuer Knochenbildung, verglichen mit der OP-1-Vorrichtung mit niedriger Dosierung ohne CMC. Die Standard- oder OP-1-Vorrichtung mit niedriger Dosis wurde durch Vereinigen von 1 g OP-1-Vorrichtung mit 3,2 ml steriler Salzlösung erzeugt. Die Standard- oder Niedrigdosierungs-OP-1-Vorrichtung, die CMC enthält, wurde durch Vereinigen von 1 g OP-1-Vorrichtung mit 0,2 g CMC und ungefähr 2 ml steriler Salzlösung erzeugt. Die Vorrichtungen wurden intra-operativ erzeugt. Im Röntgenbild hatten die mit OP-1 in Standard-Dosis behandelten Stellen, mit und ohne CMC ähnliches röntgenografisches Aussehen. Die mit OP-1 in Standard-Dosis behandelten Stellen hatten frühere und größere Volumina an neuer Knochenbildung, verglichen mit den Stellen von niedriger Dosierung. Histologische Ergebnisse zeigten weiter fortgeschrittene segmentale Knochendefektheilung an den Stellen, die mit der CMC-enthaltenden Vorrichtung behandelt wurden, verglichen mit der OP-1-Standardvorrichtung. Die Stellen, die mit niedrigen Dosierungen der OP-1-Vorrichtung behandelt wurden, die CMC enthielt, erreichten einen äquivalenten Grad an Umformung und Einbau in den Wirtsknochen im Vergleich mit den Stellen, die mit der Standard-Dosierungs-OP-1-Vorrichtung behandelt wurden, aber das Volumen des neuen induzierten Knochens war geringer. Defekt-Stellen, die mit Standarddosierungsvorrichtung behandelt wurden, die CMC enthielt, erreichten die größte durchschnittliche Drehbelastung bis zum Versagen zwölf Wochen nach der Operation, verglichen mit allen anderen Behandlungsgruppen ($61,91 \pm 35,37$ N, 95% der Drehstärke von intakten Kontrollen). Die Drehstärke der Stellen der CMC-enthaltenden Niedrigdosis-Vorrichtung, war ähnlich der der OP-1-Standardvorrichtung, welche 78% der Stärke von intakten Ulnae und 99% der Stärke von vorher getesteten Stellen aufwies, die mit der Standardvorrichtung behandelt wurden. Im Gegensatz dazu war die Drehstärke von Niedrig-Dosierungs-OP-1-Stellen ohne CMC nur 44% der Drehstärke von intakten Ulnae und 56% von vorher getesteten segmentalen Defekten, die mit der Standard-OP-1-Vorrichtung behandelt wurden.

Testmaterial

[0159] Die Standard-OP-1-Vorrichtung (bezeichnet als OP in Tabelle 11) bestand aus rekombinantem menschlichem osteogenem Protein-1 (rhOP-1), gemischt mit Rinderknochen-Typ I Kollagenmatrix bei einem Verhältnis von 2,5 mg rhOP-1/g Kollagenmatrix. Eine CMC-Vorrichtung (Standarddosis, bezeichnet als OP-1/CMC, OPCMC in Tabelle 11) bestand aus einer OP-1-Vorrichtung, kombiniert mit Carboxymethylcellulose. Die Niedrig-Dosierungs-OP-1-Vorrichtung bestand aus 1,25 mg rhOP-1/g Kollagenmatrix (in Tabelle 10 als LOP bezeichnet). Jede OP-1-Vorrichtung in sowohl Standard als auch Niedrig-Dosierung bestand aus 1 g der

Vorrichtung, die getrennt von CMC verpackt war. CMC war mit 200 mg pro Röhrchen gepackt. Das steht im Gegensatz zu der vorstehend beschriebenen einheitlichen Vorrichtung, worin CMC gemeinsam mit den anderen Komponenten der Kollagenmatrix und des osteogenen Proteins verpackt war.

Versuchsansatz

[0160] Insgesamt wurden 12 ausgewachsene Mischlingshunde verwendet. Bilateral wurden 2,5 cm segmentale Ulna-Defekte von kritischer Größe erzeugt. Die Defekte der rechten Seite von sechs Tieren erhielten die Standard-OP-1-Vorrichtung. Die Defekte der linken Seite dieser Gruppe erhielt die Standard-Dosierungs-OP-1/CMC-Vorrichtungen. Die zweite Gruppe von sechs Tieren erhielt die OP-1-Vorrichtungen mit niedriger Dosierung in die Defekte der rechten Seite und erhielten die OP-1/CMC-Vorrichtungen mit niedriger Dosierung in die Defekte der linken Seite. Zweimal wöchentlich wurden Röntgenbilder gemacht, um das Fortschreiten der Heilung zu untersuchen. Bei der Tötung wurden alle im Ganzen entfernt und mechanisch in der Torsion getestet. Ulnasegmente wurden histologisch auf Gewebereaktion, verbleibendes Implantat und Qualität und Menge der neuen Knochenbildung und- Heilung bewertet.

Tiermodell

[0161] Wie vorstehend beschrieben, wurden ausgewachsene Mischlingshunde aufgrund ihrer anatomischen Größe und bekannten Knochenreparatur- und Umformungseigenschaften verwendet. Alle Tiere waren vom Skelett her ausgewachsen und wogen von 35 bis 50 Pfund.

Operation

[0162] Unter Verwendung von chirurgischen Techniken, ähnlich jenen die vorstehend beschrieben wurden, wurde ein lateraler Einschnitt von ungefähr 4 cm Länge gemacht und die Freilegung der Ulna wurde unter Verwendung von stumpfer und scharfer Präparation erhalten. Ein 2,5 cm segmentaler osteoperiostealer Defekt wurde in der Mitte der Ulna unter Verwendung einer oszillierenden Säge erzeugt. Dieser Defekt betrug etwa das 2-2,5-fache des Durchmessers des mittleren Schaftes und stellte einen Defekt von kritischer Größe dar, d.h. der Defekt würde spontan nicht heilen. Intraoperative Messungen wurden von dem entfernten Knochensegment durchgeführt. Die Länge des Segments, die zwei äußeren Durchmesser und der zentrale Durchmesser des Segments wurden in Millimetern in den chirurgischen Aufzeichnungen festgehalten. Der Radius wurde für mechanische Stabilität beibehalten. Die Stelle wurde mit Salzlösung ausgespült, um Knochenrümpfer sowie herausgelaufene Markzellen zu entfernen. Nachdem die Stelle getrocknet war und Homöostase erreicht war, wurden die Implantate vorsichtig in die Defekte platziert. Die Weichgewebe wurden in Schichten geschlossen, um das Implantat zu enthalten. Der Vorgang wurde dann auf der kontralateralen Seite wiederholt.

Röntgenaufnahmen

[0163] Wie vorstehend beschrieben, wurden Röntgenbilder der Vorderextremitäten zweimal wöchentlich bis acht Wochen nach der Operation erhalten und dann wieder bei der Tötung bei zwölf Wochen nach der Operation.

Tötung

[0164] Vorgehensweisen waren ähnliche jenen, die vorstehend beschrieben wurden. Am Ende der Untersuchungsperiode wurden die Tiere getötet, die Ulna und der Radius sofort im Ganzen entnommen und in Windeln platziert, die mit Salzlösung getränkt waren. Weichgewebe wurden vorsichtig von der Defektstelle wegpräpariert.

[0165] Eine Bandsäge wurde verwendet, um die Ulna in eine einheitliche Länge von 9 cm zu schneiden, mit der Defekt-Stelle in der Mitte der Testprobe gelegen.

Mechanische Untersuchung

[0166] Die Protokolle waren ähnlich jenen die vorstehend beschrieben wurden. Kurz gesagt wurden Proben auf einer hydraulischen MTS-Testmaschine mit geschlossenem Kreislauf (Minneapolis, MN) die mit Schlagkontrolle bei einer konstanten Verdrängungsrate von 50 mm/min betrieben wurde, bis zum Versagen in der Drehbelastung getestet. Die Drehbelastung wurde mit einem Hebelarm von 6 cm durch ein servohydraulisches Material-Testsystem ausgeübt. Gleichzeitige Aufzeichnungen wurden von Implantatverschiebung gemacht,

wie gemessen durch das Wegsteuergerät der Maschine, während die Belastung aus der Belastungszelle aufgezeichnet wurde. Kraft-Winkel-Verschiebungskurven wurden erzeugt, aus welchen das Drehmoment und die Winkeldeformation bis zum Versagen erhalten wurde, und die Energieabsorption bis zum Versagen wurde als die Fläche unter der Belastungs—Verschiebungskurve berechnet.

Histologie

[0167] Wie vorstehend beschrieben, wurden fixierte Proben, die für nicht-entkalkte Schnitte vorgesehen waren, in graduierten Ethylalkohollösungen von 70% bis 100% dehydratiert. Die Proben wurden dann in Methylmethacrylat-Monomer gelegt und die Polymerisierung ermöglicht. Die geschliffenen Schnitte wurden durch Schneiden der Proben auf einer wassergekühlten Hochgeschwindigkeits-Schnittsäge in Schnitte von ungefähr 700 bis 1.000 μm Dicke geschnitten. Diese Schnitte wurden auf Acrylobjektträgern befestigt und auf eine Dicke von 100 μm geschliffen. Nach der Mikroradiografie wurden die Schnitte weiter auf ungefähr 50 μm geschliffen und mit basischem Fuchsin und Toluidinblau für die histologische Einteilung gefärbt, welche die folgenden Parameter der Reparatur bewertete: Qualität der Vereinigung, das Aussehen und die Qualität des kortikalen Knochens und der Spongiosa, die Anwesenheit von Knochenmarkselementen, Knochenumformung und Entzündungsreaktion.

Röntgenografische Bewertung

[0168] Zwölf Wochen nach der Operation (Tötung) erzielten die Standarddosierungs-OP-1/CMC-Stellen die höchsten durchschnittlichen röntgenografischen Grade, 5,17/6,0 Punkte. Der endgültige röntgenografische Grad für die OP-1-Standardvorrichtungen war 5,00/6,0. Die OP-1-Stellen mit niedrigen Dosierungen hatten einen durchschnittlichen endgültigen röntgenografischen Grad von 3,83/6,0. Op-1/CMC-Stellen mit niedriger Dosierung hatten einen durchschnittlichen Grad von 4,67/6,0. Zu allen Zeitpunkten hatten die Standarddosierungs-OP-1/CMC-Stellen höhere röntgenografische Grade als die OP-1-Standardvorrichtung ohne CMC. Zu allen Zeitpunkten hatten die OP-1/CMC-Stellen mit niedriger Dosierung höhere mittlere röntgenografische Grade als die OP-1-Stellen mit niedriger Dosierung ohne CMC.

[0169] Statistische Analyse zeigte einen erheblichen Effekt für den Implantattyp, wenn alle röntgenografische Grade zusammengefasst wurden (Kruskal-Wallis Einweganalyse der Varianz, $p = 0,0049$). Mehrfache Vergleiche zeigten, dass die durchschnittlichen röntgenografische Grade von Standard-OP-1 und OP-1/CMC-Vorrichtungen mit Standard-Dosierung für alle Zeitperioden erheblich höher waren als die Niedrig-Dosierungs-OP-1-Stellen ohne CMC (bei $\alpha = 0,10$ bzw. bei $\alpha = 0,05$). Mehrfache Vergleiche zeigten auch, dass der durchschnittliche röntgenografische Grad der Standarddosierungs-OP-1/CMC-Stellen erheblich höher war als der von Niedrig-Dosierungs-OP-1/CMC-Stellen ($\alpha = 0,10$). Allerdings, und unerwarteterweise, waren die durchschnittlichen röntgenografischen Grade der Standard-Dosierungs-OP-1-Vorrichtungen nicht erheblich höher als die durchschnittlichen röntgenografischen Grade für die Niedrig-Dosierungs-OP-1/CMC-Stellen.

Niedrig-Dosierungs-OP-1-Stellen ohne CMC

[0170] Zwei Wochen nach der Operation war neue Knochenbildung in einem der sechs Defekte offensichtlich, die mit Niedrig-Dosierungs-OP-1 behandelt wurden. Spuren an röntgendichtem Material war um den Defekt vorhanden, aber neuer Knochen überbrückte oder überspannte den Defekt nicht. Der durchschnittliche röntgenografische Grad zwei Wochen nach der Operation war 0,17/6,0 Punkte. Vier Wochen nach der Operation zeigte die gleiche Stelle, die nach zwei Wochen neue Knochenbildung zeigte, eine Erhöhung an neuem Knochenvolumen. Vier Defekte waren überspannt und ein Defekt war bei vier Wochen mit neuem Knochen gefüllt. Zwei Stellen zeigten vier Wochen nach der Operation wenig Aktivität. Der durchschnittliche röntgenografische Grad bei vier Wochen war 1,83/6,0. Sechs Wochen nach der Operation waren zwei Stellen, die mit Niedrig-Dosierungs-OP-1 behandelt waren, mit neuem Knochen überspannt und gefüllt. Zwei Seiten waren überspannt, aber nicht ganz mit neuem Knochen gefüllt. Ein Tier zeigte eine etwas zeitige neue Knochenbildung. Ein Tier hat keine neue Knochenbildung gezeigt. Der durchschnittliche röntgenografische Grad nach sechs Wochen war 2,83/6,0. Von sechs bis acht Wochen war keine zusätzliche, neue Knochenbildung offensichtlich, aber eine geringe Verdichtung des neuen Knochens war offensichtlich und eine geringe frühe Umformung hatte stattgefunden. Der durchschnittliche röntgenografische Grad bei acht Wochen war 3,17/6,0. Bei der Tötung zwölf Wochen nach der Operation zeigten alle Defekte etwas gut enthaltenen neuen Knochen, aber die Dichte war erheblich geringer als die der umgebende Wirtsknochen. Gelegentlich waren Strahlendurchlässigkeiten bei den Übergängen von Wirtsknochen/neuen Knochen vorhanden. Der durchschnittliche röntgenografische Grad bei zwölf Wochen war 3,83/6,0.

Niedrig-Dosierung OP-1/CMC-Stellen

[0171] Zwei Wochen nach der Operation war in drei von sechs Defekten, die mit Niedrig-Dosierungs-OP-1/CMC behandelt wurden, frühe, neue Knochenbildung offensichtlich. Neuer Knochen überspannte oder füllte die Defekte nicht, war aber innerhalb der chirurgischen Stellen gut enthalten. Der durchschnittliche röntgenografische Grad bei zwei Wochen war 0,83/6,0. Vier Wochen nach der Operation war neue Knochenbildung in fünf von sechs Defekten vorhanden, welche die Defekte überspannte und fast füllte. Der durchschnittliche röntgenografische Grad bei vier Wochen war 2,33/6,0. Bei sechs Wochen erhöhte sich die Dichte des neuen, in den Defekten vorhandenen Knochens. Frühe Inkorporation in dem Wirtsknochen waren in drei der sechs Defekte offensichtlich. Ein Tier zeigte bilateral bei sechs Wochen keine neue Knochenbildung. Der durchschnittliche röntgenografische Grad zu dieser Zeit war 3,00/6,0. Von sechs bis acht Wochen fand keine neue Knochenbildung statt. Frühe Umbildung und Inkorporation in den Wirtsknochen waren offensichtlich. Ein Tier zeigte keine Veränderungen der Erscheinung. Der durchschnittliche röntgenografische Grad bei acht Wochen war 3,33/6,0. Unerwartet zeigten die OP-1/CMC-Stellen mit niedriger Dosierung umfangreichere neue Knochenbildung und -Umformung als die OP-1-Stellen mit niedriger Dosierung ohne CMC. In Stellen, in welchen der Defekt mit neuem Knochen komplett gefüllt war, war die Dichte des neuen Knochens geringer als die des umgebenden Wirtsknochens. Der durchschnittliche röntgenografische Grad bei zwölf Wochen (Tötung) war 4,67/6,0.

Standard OP-1-Vorrichtungsstellen

[0172] Die Ergebnisse in dieser Studie stimmten mit allen früheren Studien der Standard-OP-1-Vorrichtung überein. Zwei Wochen nach der Operation zeigten vier von sechs mit der OP-1-Vorrichtung behandelten Defekte frühe, neue Knochenbildung. In zwei Defekten überspannte umfangreicher neuer Knochen die Defekte, aber neuer Knochen füllte die Defekte nicht aus. Insgesamt war der neue Knochen nicht gut enthalten. Der durchschnittliche röntgenografische Grad bei 2 Wochen war 1,50/6,0. Vier Wochen nach der Operation fand in allen sechs Defekten eine Erhöhung in der Menge und Dichte von neuem Knochen statt. Neuer Knochen überspannte alle Defekte. In vier der sechs Stellen schien der Defekt vollständig mit neuem Knochen gefüllt zu sein. Der durchschnittliche röntgenografische Grad bei vier Wochen war 3,00/6,0. Sechs Wochen nach der Operation war die Dichte des neuen Knochens erhöht. Der neue Knochen war nicht gut in dem verbleibenden Defekt enthalten. Im Allgemeinen wurde frühe Inkorporation an den Wirtsknochenenden in drei der sechs Stellen beobachtet. Der durchschnittliche röntgenografische Grad nach sechs Wochen war 3,67/6,0. Von sechs bis acht Wochen war in drei der sechs Stellen fast vollständige Inkorporation in den Wirtsknochen offensichtlich, obwohl in allen Defekten Umformung in Richtung der Ulna-Umrise stattgefunden hatte. Der durchschnittliche röntgenografische Grad bei acht Wochen war 4,50/6,0. Zwölf Wochen nach der Operation (Tötung) hatte erhebliche Umformung stattgefunden, obwohl das neue Knochenvolumen noch nicht den Ulna-Umrissen entsprach. Neuer Knochen dehnte sich oft in das umgebende Gewebe aus, obwohl eine geringe Neubildung von Kortexen in allen Defekten offensichtlich war, die mit Standard-OP-1-Vorrichtung behandelt wurden. Der durchschnittliche röntgenografische Grad bei zwölf Wochen war 5,00/6,0.

Standard-Dosis-OP-1/CMC-Stellen

[0173] Zwei Wochen nach der Operation war frühe, neue Knochenbildung in vier der sechs mit der OP-1/CMC-Vorrichtung behandelten Defekte offensichtlich. Neuer Knochen war nur in einem der vier Defekte gut enthalten. Neuer Knochen schien zwei der sechs Defekte zu überspannen und zu füllen. Der durchschnittliche röntgenografische Grad bei zwei Wochen war 1,67/6,0. Vier Wochen nach der Operation war erheblicher neuer Knochen in allen sechs Defekten entstanden. Der neue Knochen war nicht gut enthalten, aber frühe Inkorporation in den Wirtsknochen wurde an zwei Stellen beobachtet. Der durchschnittliche röntgenografische Grad bei vier Wochen war 1,67/6,0. Von vier bis sechs Wochen fand in allen Defekten erhebliche Umbildung und Inkorporation in den Wirtsknochen statt. Neuer Knochen war nicht gut enthalten, aber neuer Knochen im Weichgewebe begann zu resorbieren. Der durchschnittliche röntgenografische Grad bei sechs Wochen war 4,33/6,0. Bei acht Wochen wurde in zwei Stellen komplette Inkorporation in den Wirtsknochen wahrgenommen und frühe neue Kortexbildung war an mindestens einer Stelle offensichtlich. Der durchschnittliche röntgenografische Grad bei acht Wochen war 4,67/6,0. Bei zwölf Wochen nach der Operation (Tötung) wiesen drei von sechs Defekten erhebliche Inkorporation in die Wirtsknochenenden auf. Neuer Knochen war noch immer außerhalb des Defekts vorhanden, obwohl beträchtliche Umformung stattgefunden hatte. Der durchschnittliche röntgenografische Grad bei zwölf Wochen war 5,17/6,0.

Grobe Beobachtungen

[0174] Stellen, die mit Implantaten mit niedriger Dosierung mit und ohne CMC behandelt wurden, zeigten weniger neues Knochenvolumen, verglichen mit den OP-1-Stellen mit hoher Dosierung mit und ohne CMC. Alle Hochdosierungsstellen waren grob gesehen fest vereinigt, aber drei der zwölf Stellen, die mit Niedrig-Dosierungs-OP-1 behandelt wurden, waren bei der Tötung noch nicht fest vereinigt.

Niedrig-Dosierungs-OP-1-Stellen ohne CMC

[0175] In allen Fällen hat die Menge an neuem, gebildetem Knochen das ursprüngliche Defektvolumen nicht überstiegen. Die neue Knochenbildung war gut enthalten, obwohl der Knochen in zwei von sechs Segmenten nicht ganz vereinigt war.

Niedrig-Dosierungs-OP-1/CMC-Stellen

[0176] Ähnlich zu den Defekten, die mit Niedrig-Dosierungs OP-1 behandelt wurden, war die neue Knochenbildung gut enthalten. Eine von sechs mit Niedrig-Dosierungs OP-1/CMC behandelten Stellen war nicht ganz vereinigt. Üblicherweise war das neue Knochenvolumen geringer als das ursprüngliche Defektvolumen.

Standard-OP-1-Vorrichtungstellen

[0177] Ähnlich zu früheren Studien war das neue Knochenvolumen, in Stellen, die mit der Standard-OP-1-Vorrichtung behandelt wurden, zwei- bis dreimal größer als das ursprüngliche Defektvolumen. Alle Defekte waren fest vereinigt. In fünf von sechs Defekten dehnte sich beträchtlicher, neuer Knochen in das Weichgewebe aus und war mit dem Radius verbunden. In einem Defekt war das Volumen des neuen, gebildeten Knochens geringer als an den anderen Stellen.

Standard-Dosierungs-OP-1/CMC-Stellen

[0178] Neues Knochenvolumen in fünf von sechs mit OP-1/CMC behandelten Defekten überschritt das ursprüngliche Wirtsknochenvolumen und dehnte sich in das Weichgewebe aus. Das neue Knochenvolumen war zwei- bis dreimal größer als das Volumen des ursprünglichen Defekts. Wie vorstehend erwähnt, wurde in einem Tier bilateral vermindertes Knochenvolumen beobachtet.

Mechanische Untersuchungen

[0179] Zusammenfassungen der mechanischen Untersuchungen scheinen in Tabellen 7 und 8.

[0180] Unerwartet erhielten zwölf Wochen nach der Operation die mit der Standard-Dosierungs-OP-1/CMC-Vorrichtung behandelten Defektstellen die größte durchschnittliche Drehbelastung bis zum Versagen, verglichen mit allen anderen Behandlungsgruppen, einschließlich der Standardvorrichtungsgruppe. Die durchschnittliche Belastung bis zum Versagen war $61,91 \pm 35,37$ N ($n = 6$). Das stellt 95% der Drehfestigkeit von früher getesteten, intakten Ulnae dar und 121% der Stärke von früher getesteten segmentalen Defekten, die mit der OP-1-Standardvorrichtung behandelt wurden. Die mit der OP-1-Standardvorrichtung behandelten Stellen hatten eine durchschnittliche Drehfestigkeit von $55,84 \pm 37,26$ N ($n = 6$), 86% der vorher getesteten intakten Kontroll-Ulnae und 110% der vorher getesteten segmentalen Defekte, die mit der OP-1-Vorrichtung behandelt wurden. Die durchschnittliche Belastung bis zum Versagen für die Niedrig-Dosierungs-OP-1/CMC-Stellen war $50,66 \pm 31,68$ N ($n = 5$) oder 78% der Festigkeit der intakten Kontroll-Ulnae und 99% der Festigkeit von früher getesteten segmentalen Defekten, die mit der OP-1-Standardvorrichtung behandelt wurden. Die durchschnittliche Belastung bis zum Versagen für die Niedrig-Dosierungs-OP-1-Stellen war $28,72 \pm 14,71$ N ($n = 4$). Das stellte 44% der Drehfestigkeit von früher getesteten, intakten Kontroll-Ulnae dar und 56% der früher getesteten segmentalen Defekte, die mit der OP-1-Standardvorrichtung behandelt wurden.

[0181] Unerwartet zeigten gepaarte t-Test der Belastung bis zum Versagen innerhalb der Tiere eine erhebliche Wirkung für Implantatarten, wenn die Niedrig-Dosierungs-OP-1-Standardvorrichtungen mit Niedrig-Dosierungs-OP-1/CMC-Vorrichtungen ($p = 0,0597$) verglichen wurden. Die gepaarte durchschnittliche Belastung für Niedrig-Dosierungs-OP-1-Stellen war $28,72 \pm 14,71$ (4). Die gepaarte durchschnittliche Belastung bis zum Versagen für die Niedrig-Dosierungs-OP-1/CMC-Stellen war $62,89 \pm 18,47$ (4). Es wurde in gepaarten t-Tests kein erheblicher Unterschied der durchschnittlichen Belastung bis zum Versagen in Standard-OP-1-Vorrichtungen, verglichen mit der durchschnittlichen Belastung bis zum Versagen in Standard-Dosierungs-OP-1/CMC-Vor-

richtungen gefunden.

TABELLE 7

Ergebnisse der mechanischen Untersuchung							
Tierzahl	Seite	Implantattyp	Belastung bis Versagen	Dreh-Moment (Nm)	% Intakte Kontrollen (%)	Winkel-messung (Grade)	augen. Energie bis Versagen (Nm Grade)
H19	Rechts	LOP	35.17	2.11	53.88	36.74	53.93
H21	Rechts	LOP	9.76	0.99	14.95	66.64	16.96
H24	Rechts	LOP	25.75	1.55	39.45	41.33	44.42
H30	Rechts	LOP	44.18	2.65	67.69	25.35	41.51
H34	Rechts	LOP	28.72	1.72	43.99	42.52	39.21
	DURCHSCHNITT- STANDARDABWEICH		16.71	0.88	22.53	17.43	15.75
	PROBENGROSSE		4	4	4	4	
H19	Links	LOPCMC	39.76	2.39	60.92	37.13	55.84
H21	Links	LOPCMC	57.51	3.45	88.11	52.97	59.97
H24	Links	LOPCMC	1.74	0.10	2.67	5.54	0.34
H26	Links	LOPCMC	82.33	4.94	126.14	37.85	120.98
H30	Links	LOPCMC	71.94	4.31	110.22	42.47	127.67
H34	Links	LOPCMC	50.66	3.04	77.61	33.09	72.78
	DURCHSCHNITT- STANDARDABWEICH		31.68	1.90	48.54	17.82	52.46
	PROBENGROSSE		5	5	5	5	5

* Probe wurde nicht untersucht

TABELLE 8

Tierzahl	Seite	Implantattyp	Ergebnisse der mechanischen Untersuchung			Winkel- messung (Grade)	Aufgen. Energie bis Versagen (Nm-Grad)
			Belastung bis Versagen	Dreh- moment (Nm)	% intakter Kontrollen (%)		
H22	Rechts	OP	65,44	3,93	100,26	52,95	139,25
H23	Rechts	OP	2,73	0,16	4,16	15,90	0,91
H25	Rechts	OP	32,70	3,17	80,89	31,36	70,65
H28	Rechts	OP	27,23	1,63	61,73	53,04	49,45
H32	Rechts	OP	79,68	4,76	122,08	19,33	57,82
H33	Rechts	OP	107,14	6,43	164,15	79,3	98,59
		DURCHSCHNITT- STANDARDABWEICH.	55,04	3,35	85,51	33,65	70,79
		PROBENGRÖSSE	37,26	2,24	57,00	16,09	44,52
			6	6	6	6	6
H22	Links	OP/CMC	76,52	4,59	117,24	44,86	130,85
H23	Links	OP/CMC	6,53	0,39	10,10	60,10	10,66
H25	Links	OP/CMC	50,22	3,01	76,94	43,94	69,4E
H28	Links	OP/CMC	100,44	6,03	153,88	40,2	177,13
H32	Links	OP/CMC	49,02	2,69	67,14	40,9	70,56
H33	Links	OP/CMC	93,93	5,64	143,91	43,96	156,03
		DURCHSCHNITT- STANDARDABWEICH.	61,91	3,71	94,83	46,99	105,80
		PROBENGRÖSSE	35,37	2,12	54,19	10,51	65,21
			6	6	6	5	6

Histologie

[0182] Unerwartet erzielten die mit der Standard-Dosierungs-OP-1/CMC-Vorrichtung behandelten Stellen die höchste durchschnittliche histologische Punktezah, 12,08/16,0 Punkte. Die Niedrig-Dosierungs-OP-1/CMC-Stellen erzielten eine Punktezah von 11,07/15,0, etwas höher als die durchschnittliche histologische Punktezah für die Standard-OP-1-Vorrichtungsstellen, 10,88/16,00. Der durchschnittliche histologische Grad für die Niedrig-Dosierungs-OP-1-Stellen war 9,58/16,0 Punkte.

[0183] Die statistische Analyse der durchschnittlichen histologischen Grade durch die Behandlungsgruppe zeigte einen signifikanten Effekt für den Implantattyp (Kruskal-Wallis-Einwegsanalyse der Varianz, $p = 0,0282$). Mehrfache Vergleiche der Gruppendurchschnitte zeigten, dass der durchschnittliche Gesamtgrad für die Standard-Dosierungs-OP-1/CMC-Stellen erheblich höher war als für die Stellen mit Niedrig-Dosierungs-OP-1 ohne CMC (bei $\alpha = 0,05$).

[0184] Statistische Analyse des Qualitätsgrads der Vereinigung zeigte auch einen signifikanten Effekt für den Implantattyp. Unerwartet war der durchschnittliche Qualitätsgrad der Vereinigung für die Standard-Dosierungs-OP-1 CMC-Stellen (3,5/4,0) wieder erheblich höher als für die Niedrig-Dosierungs-OP-1-Stellen (2,0/4,0 bei $\alpha = 0,05$). Es wurden für den Implantattyp keine signifikanten Unterschiede gefunden, wenn die durch-

schnittlichen Grade für die Kortextentwicklung, verbleibendes Implantat und entzündliche Reaktion verglichen wurden.

Niedrig-Dosierungs-OP-1-Stellen ohne CMC

[0185] Neue Knochenbildung war in allen, mit dem Niedrig-Dosierungs OP-1 behandelten Defekten offensichtlich, aber die Menge an neuem Knochen innerhalb des Defekts hat den Defekt oft nicht ausgefüllt und war mit den Knochenenden des Wirts nicht durchgehend. In einer Stelle war der Defekt histologisch ganz vereinigt. Neuer Knochen war in den frühen Stadien der Organisation und der Umformung. Manche Gebiete von neuem, mineralisiertem Knochen waren auch offensichtlich.

Niedrig-Dosierungs-OP-1/CMC-Stellen

[0186] Die Niedrig-Dosierungs OP-1/CMC-Stellen hatten ein ähnliches histologisches Erscheinungsbild verglichen mit den Niedrig-Dosierungs-OP-1-Stellen. Allerdings und unerwartet war der neue Knochen häufiger durchgehend mit dem Wirtsknochen in den Niedrig-Dosierungs-OP-1/CMC-Stellen, verglichen mit den Niedrig-Dosierungs-OP-1-Stellen. In Fällen, in denen der Knochen durchgehend mit dem Wirtsknochen war, war frühe Umformung und Verdichtung der neuen Knochengrenzen offensichtlich. In Fällen, in denen neue Knochenheilung nicht vollständig war, waren Gebiete von neu mineralisiertem Knochen offensichtlich, sowie auch Gebiete von fibrösem Geweben innerhalb des Defekts. Im Allgemeinen war der neue Knochen gut enthalten. Einige Bereiche fortgeschrittener Umformung entlang der Defektgrenzen wurden beobachtet.

Standard-OP-1-Vorrichtungstellen

[0187] Umfangreiche, neue Knochenbildung überbrückte alle Defekte. Frühe Verdichtung der neuen Knochengrenzen hatte stattgefunden. In manchen Fällen verbanden sich Bereiche von neu mineralisiertem Knochen mit Bereichen von reifem Knochen. In der Mitte der Defekte waren gelegentlich kleine Bereiche von verbleibendem Trägermaterial vorhanden. Keine entzündliche Reaktion wurde beobachtet. Neuer Knochen breitete sich oft in die Weichgewebe aus. Umformung war an den Grenzen von Defekt/neuem Knochen am fortgeschrittensten. Der Knochen hatte sich in diesen Bereichen zu einer lamellaren Struktur umgeformt.

Standard-Dosierungs-OP-1/CMC-Stellen

[0188] Es gab keine merklichen Unterschiede in der histologischen Erscheinung zwischen den Standard-OP-1-Stellen und den Standard-Dosierungs-OP-1/CMC-Stellen. Beträchtlicher, neuer Knochen überspannte und füllte die Defekte. Die erheblichste Umformung fand an den neuen Knochen/Wirtsknochengrenzen statt. Der umgeformte Knochen hatte in diesen Bereichen eine lamellare Struktur. Verdichtung von neuen Kortexten war offensichtlich, aber noch nicht vollständig. Gelegentlich wurden kleine Mengen an eingeschlossenem verbleibendem Trägermaterial beobachtet, das durch neue Knochenbildung umgeben war. Es gab keine damit in Zusammenhang stehende entzündliche Reaktion.

Ergebnis

[0189] Verbesserte osteogene Vorrichtungen induzierten unerwartet frühere und größere Volumina an neuer Knochenbildung bei niedrigeren Dosierungen von OP-1, als sie durch Standardvorrichtungen bei niedrigen Dosierungen von OP-1 induziert wurden. Darüber hinaus und unerwartet erzielten Defektstellen, die mit verbesserten osteogenen Vorrichtungen behandelt wurden, die höchste Drehbelastung bis zum Versagen zwölf Wochen nach der Operation. Histologisch erzielten die verbesserten Vorrichtungen unerwartet die höchste durchschnittliche Punktezahl und zeigten häufiger durchgehenden neuen Knochen mit dem Wirtsknochen.

B. Reparatur von segmentalen Defekten mit nicht kritischer Größe unter Verwendung von osteogenen Vorrichtungen, welche Carboxymethylcellulose enthalten

1. Experiment 1: Zeitverlauf der Reparatur von geschlossenen Defekten, die mit einer einheitlichen Vorrichtung behandelt wurden (Hunde)

[0190] Diese Studie an einer Lücke von nicht kritischer Größe wurde durchgeführt, um injizierbare Konfigurationen der verbesserten osteogenen Verbindungen zu untersuchen. Dieser Untersuchungsaufbau verwendete die 3-mm-Lücke beim 4-Wochen-Modell. Diese Studie untersuchte die Heilung des Defekts nach der Injektion von OP-1/CMC/Kollagenmatrixkonfiguration. Der kontralaterale Vorderlauf von jedem Tier war eine Kontrolle.

Außerdem wurde ein Zeitverlauf der Heilung für einen unbehandelten Defekt bei 4, 8 und 12 Wochen bewertet.

[0191] Die Details des verwendeten Protokolls werden nachstehend zusammengefasst.

Testsystem

[0192] Ausgewachsene Mischlingshunde (18), die für den Zweck gezüchtet wurden, wurden in dieser Studie aufgrund ihrer anatomischen Größe und bekannten Knochenreparatur- und -Umformungscharakteristika benutzt. Die Tiere waren zu Beginn der Studie ungefähr 2 bis 4 Jahre alt und wogen 20 bis 30 kg (ungefähr). Die Tiere wurden röntgenografisch durchmustert, um die richtige Größe und Reife des Skeletts sicherzustellen, sowie, dass keine offensichtlichen ossalen Abnormalitäten bestanden.

Testmaterialbeschreibung

[0193] Verbesserte osteogene Vorrichtung-Formulierungen, die rekombinantes menschliches osteogenes Protein-1 (rhOP-1) in einer Kollagenmatrix, vermischt mit CMC, enthielten, wurden untersucht. Kontrollen bestanden aus der Scheinvorrichtung alleine.

Formulierung 1: 0,350 mg rhOP-1 in 100 µl CMC-Gel (7%) m/o Kollagenmatrix

Formulierung 2: 0,350 mg rhOP-1 in 100 µl Acetat/Lactosepuffer

Formulierung 3: 0,350 mg rhOP-1 in 170 mg Kollagen-CMC-Matrix, befeuchtet mit Salzlösung

Kontrolle 1: 0 mg rhOP-1 in 100 µl Gel

Kontrolle 2: 0 mg rhOP-1 in 100 µl Acetat/Lactosepuffer

Kontrolle 3: 0 mg rhOP-1 in 170 mg Kollagen-CMC-Matrix, befeuchtet mit Salzlösung

Versuchsansatz

[0194] Bilateral wurden segmentale 3-mm Ulnadefekte in allen Tieren erzeugt. Neun Tiere erhielten eine der drei experimentellen Testformulierungen im Defekt der rechten Seite, sodass drei Stellen von jeder Art untersucht werden konnten. In den linken Defekt wurde eine Scheinvorrichtung implantiert. Diese Tiere wurden vier Wochen nach der Operation getötet. Die verbleibenden neun Tiere erhielten bilateral Defekte ohne Implantat und wurden nach Perioden von 4, 8 und 12 Wochen getötet (drei zu jedem Zeitpunkt). Wie vorstehend besprochen, wurden Röntgenbilder gemacht, um den Fortschritt der Heilung zu untersuchen. Eine endgültige Bestimmung der Tötungsdaten der neun Tiere, die rhOP-1-Formulierungen erhielten, basierte auf den wöchentlichen Röntgenbildern. Bei der Tötung wurden alle Ulnae im Ganzen entnommen und mechanisch auf Drehbelastung untersucht. Die Segmente wurden, wie vorstehend beschrieben, durch histologisch auf Gewebereaktion und die Qualität und Menge an neuer Knochenbildung und Ausmaß an Heilung bewertet.

[0195] Unter Verwendung von chirurgischen Standard-Techniken wurde ein lateraler Einschnitt von ungefähr zwei Zentimetern Länge gemacht und die Freilegung der Ulna wurde unter Verwendung von stumpfer und scharfer Zergliederung erhalten. Der 3-mm-Defekt wurde in der rechten mittleren Ulna unter Verwendung einer oszillierenden Säge erzeugt. Der Radius wurde für mechanische Stabilität beibehalten, aber es wurde keine interne oder externe Fixierung verwendet. Die Weichgewebe wurden sorgfältig in Schichten um den Defekt verschlossen. Die rhOP-1-Probe oder Scheinvorrichtung wurde dann entsprechend des Behandlungsplans in die Stelle injiziert. Der Vorgang wurde dann auf der kontralateralen Seite mit der entsprechenden Probe wiederholt.

[0196] Röntgenaufnahmen der Vorderextremitäten wurden wöchentlich bis sechs Wochen nach der Operation und dann zweimal wöchentlich bis 12 Wochen von überlebenden Tieren erhalten. Eine zusätzliche Röntgenaufnahme wurde von den verbleibenden Tieren bei der Tötung zwölf Wochen nach der Operation erhalten. Die Röntgenbilder wurden durch den Forscher auf einer Einteilungsskala von 0-6 eingestuft und mit früheren Röntgenbildern verglichen, um die Qualität und Geschwindigkeit der Defektheilung abzuschätzen.

Untersuchungsverfahren

[0197] Wie vorstehend besprochen, wurden die Tiere zu den vorgesehenen Zeiten getötet und die Ulna und der Radius wurden sofort im Ganzen geerntet. Beide Ulnae wurden makrophotographiert und es wurden Kontaktröntgenbilder gemacht. Weichgewebe wurden sorgfältig von der Defektstelle wegpräpariert. Eine wassergekühlte Säge wurde verwendet, um die Ulna in eine einheitliche Länge von 9 cm zu schneiden, mit der Defektstelle in der Mitte der Testprobe zentriert. Sofort nach dem Schneiden wurden die Proben auf einer hydraulischen MTS-Testmaschine mit geschlossenem Kreislauf (Minneapolis, MN), wie vorstehend beschrieben, auf

Drehbelastung bis zum Versagen getestet.

[0198] Sowohl getestete als auch nicht-getestete Proben wurden, wie schon vorstehend beschrieben, für histologische Bewertung hergestellt. Nach Mikro-Röntgenografie wurden die Schnitte weiter auf ungefähr 50 µm geschliffen und mit basischem Fuchsin und Toluidinblau für histologische Untersuchung der Parameter der Reparatur gefärbt, einschließlich: der Qualität der Vereinigung, dem Aussehen und der Qualität des kortikalen Knochens und der Spongiosa und der entzündlichen Reaktion.

[0199] Beschreibende Statistiken von mechanischer Testung, röntgenografischer Einteilung und Histologie wurden bewertet, um die Heilung zu charakterisieren.

Ergebnisse

[0200] Die folgenden Beobachtungen und repräsentativen Daten wurden bis jetzt gesammelt (4 Wochen nach der Operation):

Zusammenfassungen der mechanischen Untersuchungen erscheinen in den Tabellen 9, 10 und 11. Tabelle 11 ist eine Zusammenfassung der Kontrollindividuen in früheren, nicht in Beziehung stehenden Experimenten. Im Allgemeinen und insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Studie darauf hin, dass Tiere, die mit OP-1 behandelt wurden, beschleunigte Heilung zeigen. Die mit OP-1 behandelten Defekte heilten in einem Drittel bis zur Hälfte der Zeit von nicht behandelten Kontrollen. Außerdem und unerwartet resultierte die CMC/OP-1/Kollagenformulierung in besserer Knocheneingrenzung als es in der Abwesenheit von CMC beobachtet wurde. Diese Beobachtungen wurden mechanisch, röntgenografisch sowie histologisch bestätigt.

Schlussfolgerung

[0201] CMC-enthaltende osteogene Vorrichtungen (injizierbare Konfiguration) können zur Reparatur von segmentalen 3-mm Ulnadefekten von nicht kritischer Größe an einer geschlossenen Defektstelle verwendet werden.

TABELLE 9

Bewertung von verbesserten Vorrichtungszepaturen von rhOP-1 für die Reparatur von Defekten von nicht kritischer Größe

ERGEBNISSE MECHANISCHER UNTERSUCHUNGEN

Tierzahl	Seite	Zeiddauer	Implantat	Maximale Belastung bis zum Versagen (N)	Drehmoment (Nm)	Prozent intakte Kontrolle (%)	Winkelmessung	aufgen. Energie bis Versagen (Nm-Grade)
18750	rechts	4 Wochen	REZEPTUR 1	49.37	2.96	75.65	35.72	63.57
18643	rechts	4 Wochen	REZEPTUR 1	16.56	0.99	25.37	14.04	6.78
18043	rechts	4 Wochen	REZEPTUR 1	33.32	2.00	51.05	43.62	54.56
			MITTLERE STANDARD ABWEICHUNG PROBENGRÖSSE	33.08 16.41 3 3	1.99 0.98 3	50.69 25.14 3	31.13 15.32 3	41.64 30.52 3
17884°	rechts	4 Wochen	REZEPTUR 2	32.47	1.95	49.75	50.11	55.91
18473	rechts	4 Wochen	REZEPTUR 2	43.83	2.63	67.15	37.53	51.77
	rechts	4 Wochen	REZEPTUR 2	10.79	0.65	16	20.78	5.94
			MITTLERE STANDARD ABWEICHUNG PROBENGRÖSSE	20.03 16.79 3 3	1.74 1.01 3	44.48 25.72 3	36.14 14.71 3	37.87 27.73 3
18772	rechts	4 Wochen	REZEPTUR 3	42.64	2.56	65.33	55.06	55.74
18640	rechts	4 Wochen	REZEPTUR 3	20.95	1.26	32.10	24.77	14.62
18508	rechts	4 Wochen	REZEPTUR 3	7.24	0.43	11.09	17.08	3.04
			MITTLERE STANDARD ABWEICHUNG PROBENGRÖSSE	23.61 17.85 3 3	1.42 1.07 3	36.17 27.35 3	32.30 20.08 3	24.47 27.70 3

* Berechnungen basierend auf Rohdaten von mechanischen Testausdrucken

TABELLE 10

Bewertung von verbesserten Vorrichtungszepaturen von rhOP-1 zur Reparatur von Defekten mit nicht kritischer Größe

MECHANISCHE UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

Tierzahl	Seite	Zeiddauer	Implantat	Maximale Belastung bis zum Versagen (N)	Drehmoment (Nm)	Prozent intakte Kontrolle (%)	Winkelmessung	aufgen. Energie bis Versagen (Nm-Grade)
18750	links	4 Wochen	KONTROLLE 1	12,91	0,77	19,63	33,26	14,06
18643	links	4 Wochen	KONTROLLE 1	11,09	8,00	16,85	59,35	16,83
18043	links	4 Wochen	KONTROLLE 1	4,14	0,25	6,34	7,46	0,70
			MITTLERE STANDARD ABWEICHUNG	9,32	3,01	14,27	33,36	10,53
			PROBENGRÖSSE	4,57	4,33	7,01	25,95	8,62
				3	3	3	3	3
17884*	links	4 Wochen	KONTROLLE 2	4,82	0,29	7,38	11,12	0,73
18473	links	4 Wochen	KONTROLLE 2	4,53	0,27	6,94	30,63	2,50
	links	4 Wochen	KONTROLLE 2	7,52	0,45	11,52	33,29	8,59
			MITTLERE STANDARD ABWEICHUNG	5,62	0,34	8,62	24,91	3,94
			PROBENGRÖSSE	1,65	0,10	2,53	12,03	4,12
				3	3	3	3	3
18772	links	4 Wochen	KONTROLLE 3	15,41	0,92	23,61	49,91	15,40
18640	links	4 Wochen	KONTROLLE 3	10,28	0,62	15,75	40,50	11,23
18508	links	4 Wochen	KONTROLLE 3	4,32	0,26	6,62	4,89	0,41
			MITTLERE STANDARD ABWEICHUNG	10,00	0,60	15,33	31,77	9,01
			PROBENGRÖSSE	5,55	0,33	8,50	23,75	7,74
				3	3	3	3	3

*Berechnungen basierend auf Rohdaten aus mechanischen Testausdrucken

TABELLE 11

Bewertung von verbesserten Vorrichtungszepaturen von rhOP-1 zur Reparatur von Defekten mit nicht-kritischer Größe - andere Kontrollen

MECHANISCHE UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

Tierzahl	Seite	Zeiddauer	Implantat	Maximale Belastung bis zum Versagen (N)	Drehmoment (Nm)	Prozent intakte Kontrolle (%)	Winkel-messung	augen. Energie bis Versagen (Nm-Grade)
17932	rechts	8 Wochen	andere Kontrolle	35.40	---	54.24	61.58	34.63
18926	rechts	8 Wochen	andere Kontrolle	6.20	0.37	9.50	59.65	6.96
18754	rechts	8 Wochen	andere Kontrolle	25.68	1.54	39.34	33.53	27.87
17932	links	8 Wochen	andere Kontrolle	29.14	1.54	39.34	33.53	27.87
18926	links	8 Wochen	andere Kontrolle	5.67	0.34	8.69	47.20	6.20
18754	links	8 Wochen	andere Kontrolle	12.23	0.73	18.74	39.43	15.10
			MITTLERE	19.05	1.14	29.19	44.64	18.43
			STANDARD	12.68	0.76	19.42	14.14	11.36
			ABWEICHUNG					
			PROBENGRÖSSE	6	6	6	6	6

2. Experiment 2: Beschleunigte Reparatur einer geschlossenen Frakturdefekts, behandelt mit einer einheitlichen Vorrichtung (Hunde)

[0202] Das Folgende ist eine vergleichende experimentelle Studie der Wirksamkeit von injizierbaren,

CMC-enthaltenden rhOP-1-formulierungen zur Beschleunigung der Frakturheilung in Hunden.

Testsystem

[0203] Ausgewachsene, männliche, für diesen Zweck gezüchtete Mischlingshunde wurden in dieser Studie benützt. Besondere Aufmerksamkeit wurde der Auswahl von Tieren mit einheitlicher Größe und einheitlichem Gewicht geschenkt, um die Variabilität in Knochengeometrie und -Belastung einzuschränken. Die Tiere wurden klinisch und röntgenografisch durchmustert, um akute und chronische medizinische Zustände während einer zweiwöchigen Quarantänezeit auszuschließen.

[0204] Die Operation wurde unter Verwendung von aseptischen Standard-Techniken unter Isofluran-gas-Anästhesie durchgeführt und wurde über Monitore für Elektrokardiogramm und Herzfrequenz überwacht. Voroperative Medikamente wurden ungefähr 20-30 Minuten vor der Anästhesieinduktion verabreicht. Die voroperativen Medikamente bestanden aus Atropin (Dosierung 0,02 mg/Pfd. Körpergewicht) und Acepromizin (Dosierung 0,1 mg/Pfd. Körpergewicht). Anästhesie wurde durch intravenöse Injektion von Natriumpentothal bei einer Dosierung von 5,0 mg/Pfd. Körpergewicht verabreicht. Nach der Induktion wurde eine endotracheale Röhre gesetzt und die Anästhesie wurde durch Isofluraninhaltung aufrechterhalten. Beide Vorderextremitäten wurden präpariert und in steriler Weise abgedeckt. Es wurde ein lateraler Einschnitt von ungefähr zwei Zentimeter Länge gemacht und die Freilegung der Ulna wurde unter Verwendung von stumpfer und scharfer Präparation erhalten. Der 3,0-mm-Defekt von nicht kritischer Größe wurde in der mittleren Ulna unter Verwendung einer oszillierenden Säge gemacht. Der Radius wurde für mechanische Stabilität beibehalten und keine interne oder externe Fixierung wurde verwendet. Die Stelle wurde mit Salzlösung ausgespült und die Weichgewebe wurden in Lagen sorgfältig um den Defekt geschlossen. Die entsprechende Implantatvorrichtung wurde gemäß dem Behandlungsplan in die Defektstelle injiziert.

[0205] Der Vorgang wurde dann auf der kontralateralen Seite mit dem entsprechenden Implantat wiederholt.

[0206] Acepromizin (0.75cc/50Pfd. Körpergewicht) und Butorphanol-Tartrat (0,025mg/Pfd. Körpergewicht) wurde wie benötigt postoperativ verabreicht. Antibiotika wurden für vier Tage nach der Operation intramuskulär an die Tiere verabreicht und anteriore-posteriore Routine Röntgenaufnahmen wurden sofort nach der Operation gemacht, um die ordentliche operative Platzierung sicherzustellen. Die Tiere wurden in 3 × 4-Fuß Aufwachkäfigen gehalten, bis sie ihr Gewicht tragen konnten, danach wurden sie in Ausläufe transferiert, wo ihnen uneingeschränkte Bewegung ermöglicht wurde.

[0207] Röntgenbilder der Vorderextremitäten wurden unter Verwendung von standardisierten Belichtungszeiten und -Intensitäten wöchentlich bis vier Wochen und dann in überlebenden Tieren zweimal in der Woche bis 16 Wochen erhalten. Die Röntgenbilder wurden ausgewertet und mit früheren Röntgenbildern verglichen, um Qualität und Schnelligkeit der Defektheilung abzuschätzen. Die Veränderungen in der röntgenografischen Erscheinung wurden basierend auf Anwesenheit und Dichte der neuen Knochenbildung, Ausmaß von Defektüberbrückung und Inkorporation in die Wirtsknochen-Kortexes bewertet.

Testmaterial-Beschreibung

[0208] Die Implantatmaterialien bestanden aus rekombinantem menschlichem osteogenem Protein-1 (rhOP-1) in einer Acetatpufferformulierung und rhOP-1 in CMC-Kollagen. Die rhOP-1-Formulierungen wurden mit Kontrollen verglichen, die nur Träger enthielten. Die Acetatpuffer-rhOP-1-Formulierungen bestanden aus 3,5 mg/ml OP-1 in einem Lactose/Acetatpuffer, verabreicht in einem 100- μ l-Volumen. Die Trägerkontrolle bestand aus einem 100- μ l-Volumen von Lactose/Acetatpuffer. Die rhOP-1/CMC-Kollagen-Formulierungen bestanden aus 0,35 mg rhOP-1 in 170 mg CMC-Kollagenmatrix, benetzt mit ungefähr 0,43 ml Salzlösung, und hatte die Konsistenz einer Paste. Das Kontroll-CMC-Kollagen bestand aus 170 mg CMC-Kollagenmatrix, benetzt mit ungefähr 0,43 ml Salzlösung, und wurde auch in 100 μ l injizierbarem Volumen verabreicht.

Versuchsaufbau

[0209] Insgesamt wurden 36 ausgewachsene Mischlingshunde benützt. Bilaterale segmentale Ulnadefekte, 3,0 mm in Länge, wurden in allen Tieren erzeugt. 14 Tiere erhielten eine Injektion von 0,35 mg rhOP-1/Acetatpufferformulierung in einem Defekt und den Acetatpuffer ohne rhOP-1 in den kontralateralen Defekt. 9 Tiere erhielten eine Injektion von 0,35 mg rhOP-1/CMC-Kollagenformulierung in einen Defekt und CMC-Kollagen alleine in den kontralateralen Defekt. Die 23 Tiere wurden nach der Dauer von 4, 8 und 12 Wochen nach der Operation getötet. 13 Hunde erhielten bilaterale Defekte ohne Implantat (Defekt alleine) und wurden nach der

Dauer von 4, 8, 12 und 16 Wochen nach der Operation bewertet.

Untersuchungsverfahren

[0210] Am Ende der Untersuchungsdauer wurden die Tiere unter Verwendung einer intravenösen Barbituratüberdosis getötet. Die Ulna und der Radius wurden sofort im Ganzen entnommen und in mit Salzlösung getränkte Windeln gelegt. Beide Ulnae wurden markrophotographiert und Kontaktröntgenaufnahmen wurden gemacht, bevor die Weichgewebe vorsichtig von der Defektstelle wegpräpariert wurden. Eine wassergekühlte Säge wurde dann verwendet, um die Ulna für biomechanische Testbewertung in eine gleichmäßige Länge von 9 cm zu schneiden, mit dem Defekt in der Mitte der Testprobe zentriert.

[0211] Wenn die Defektheilung basierend auf der manuellen Manipulation ausreichend war, wurden die Proben in der Drehbelastung bis zum Versagen auf einer hydraulischen MTS-Testmaschine mit geschlossenem Kreislauf (Minneapolis, MN) getestet, die mit Wegsteuerung bei einer konstanten Verdrängungsrate von 50 mm/min betrieben wurde. Jedes Ende des Knochensegments wurde in einer zylindrischen Aluminiummanschette befestigt und mit Methylmethacrylat zementiert. Ein Ende wurde fest fixiert und das andere wurde gegen den Uhrzeigersinn gedreht. Da die Hundeulna eine leichte Krümmung aufweist, wurden die Proben außermittig befestigt, um die Rotation der Proben koaxial mit der Testvorrichtung zu belassen. Die Drehkraft wurde mit einem Hebelarm von 6 cm ausgeübt. Kraft-Winkelverschiebungskurven wurden hergestellt, aus welchen das Drehmoment und die Winkeldeformation bis zum Versagen erhalten wurde, und die Energieabsorption bis zum Versagen wurde als die Fläche unter der Belastungs—Verschiebungskurve berechnet wurde.

[0212] Sowohl getestete als auch nicht-getestete Proben wurden für die histologische Bewertung vorbereitet. Die einzelnen Proben wurden durch Untertauchen in 10% gepufferter Formalinlösung sofort nach der mechanischen Untersuchung oder nach dem Zerschneiden von nicht getesteten Proben fixiert. Die Proben wurden auf einer wassergekühlten Diamantsäge durch Zerschneiden entlang ihrer Längsachse geteilt. Dieser Vorgang resultierte in zwei Teilen von jeder Probe für histologische Präparation, einschließlich nicht entkalkten, geschliffenen Schnitten und nicht entkalkten Mikrotomschnitten. Die histologischen Schnitte wurden auf die Qualität der Vereinigung, das Aussehen und die Qualität der kortikalen Knochen und der Spongiosa und auf Knochenumformung bewertet.

Ergebnisse

Grobe Beobachtungen

[0213] Alle mit rhOP-1 behandelten Defekte zeigten so früh wie 4 Wochen nach der Operation neue Knochenbildung. Alle behandelten Defekte waren manuell stabil und mit festem neuem Knochen überbrückt, der sich zwischen 8 und 12 Wochen nach der Operation umzuformen begann. In manchen Defekten dehnte sich der neue Knochen über die Defektenden und in die darüberliegenden Weichgewebe, welche die Defekte umgaben, hinaus aus.

[0214] Die meisten Kontrolldefekte waren nach der manuellen Manipulation 4 Wochen nach der Operation nicht ganz stabil, obwohl die meisten mechanisch getestet wurden. Fasriges Gewebe war oft vorhanden und die Defektenden blieben mit manchen Zeichen für neuen Knochen sichtbar. 12 Wochen nach der Operation waren die meisten Kontrolldefekte stabil, mit nur gelegentlicher leichter Bewegung der Defektenden.

Röntgenografische Bewertung

[0215] In den mit rhOP-1 behandelten Defekten wurden zwei Wochen nach der Operation Spuren von neuem Knochen in und um die Defektstellen beobachtet. Die Menge und Dichte des neuen Knochens erhöhte sich von 2 bis 4 Wochen, wobei die Kortexes des Wirtsknochen begannen, verdeckt zu werden. Zwischen 4 und 8 Wochen nach der Operation wiesen mit rhOP-1 behandelte Defekte an den Defektenden erhebliche Mengen an röntgendichtem, neuem Knochen sowie lateral eine Überbrückung der Defekte auf. Bei 12 Wochen waren die Wirtskortexe von röntgendichten überbrückenden Verbindungen verdeckt.

[0216] Die röntgenografische Erscheinung der behandelten und unbehandelten Kontrolldefekte unterschied sich erheblich von der Erscheinung der mit rhOP-1 behandelten Defekte. Zwischen 2 und 3 Wochen nach der Operation gab es in der röntgenografische Erscheinung im Vergleich zur postoperativen Erscheinung keine wesentlichen Veränderungen. Nach 4 Wochen waren in der Röntgendichte der Defektenden des Wirtsknochens leichte Veränderungen sichtbar. Von 8 bis 12 Wochen weitete sich etwas neuer Knochen aus den en-

dostealen Regionen und Wirtsknochenenden aus, obwohl die Überbrückung nicht komplett war. 16 Wochen nach der Operation zeigte nur eine Hälfte der unbehandelten Kontrollen röntgenografische Zeichen von vollständiger Knochendefektheilung.

Mechanische Untersuchung

[0217] Die durchschnittlichen mechanischen Untersuchungsergebnisse durch Behandlungsgruppe und Zeitdauer werden in den Tabellen 11A und 11B zusammengefasst. Die Drehfestigkeit der mit rhOP-1 behandelten Defekte waren wesentlich höher als die von nicht-behandelten Kontrollen und nur Vehikelkontrollen und näherten sich an die Festigkeit von vorher getesteten intakten Ulnae an. Die mechanische Festigkeit der rhOP-1/Acetatpuffer-Formulierungsdefekte war 4 Wochen nach der Operation 59% der Festigkeit von intakter Ulna, 77% 8 Wochen nach der Operation und 98% 12 Wochen nach der Operation. Die mechanische Festigkeit der rhOP-1/CMC-Kollagendefekte war 36%, 53% und 66% der intakten Festigkeit bei 4 Wochen, 8 Wochen bzw. 12 Wochen.

[0218] Mechanisch hatten die Kontroll-Defektstellen bei frühen Zeitperioden wenig mechanische Stabilität, obwohl sich die Defektfestigkeit mit der Zeit verbesserte. Die mechanische Festigkeit der Defekte, welche die Kontroll-Acetatpufferlösung erhielten, lag bei äquivalenter Zeitdauer zwischen 23% und 30% der mit rhOP-1/Acetatpuffer behandelten Defekte. Die Kontrolldefekte hatten eine mechanische Festigkeit, die 4 Wochen nach der Operation äquivalent zu 16% der Stärke von intakter Ulna war, 18% bei 8 Wochen und 29% bei 12 Wochen. Die Defekte mit nur CMC-Kollagen waren in der mechanischen Festigkeit ähnlich zu den Kontroll-Acetatpufferdefekten. Die mechanische Festigkeit der unbehandelten Defekte erhöhte sich nach der Operation von 9% bei 4 Wochen auf 70% bei 12 Wochen. Die durchschnittliche mechanische Festigkeit bei 16 Wochen nach der Operation verminderte sich auf 28%, was ähnlich zu der 8-Wochen-Festigkeit von 29% war.

TABELLE 11A

Ergebnisse mechanischer Untersuchungen, durchschnittliche \pm Standardabweichung(en)

Implantat	Wochen	Max.Belastung bis zum Versagen (N)	Dreh- moment (Nm)	Prozent intakte Kontrolle (%)	Winkel- messung (Grade)	aufgen. Energie bis Versagen (Nm-Grade)
rhOP-1/ Acetatpuffer	4 Wochen	38.46 \pm 17.3 (8)	2.31 \pm 1.0 (8)	58.92 \pm 26.5 (8)	25.18 \pm 16.2 (8)	35.71 \pm 39.3 (8)
rhOP-1/ Acetatpuffer	8 Wochen	50.57 \pm 23.0 (3)	3.03 \pm 1.4 (3)	77.48 \pm 35.3 (3)	39.36 \pm 14.6 (3)	70.51 \pm 38.0 (3)
rhOP-1/ Acetatpuffer	12 Wochen	63.70 \pm 22.1 (3)	3.82 \pm 1.3 (3)	97.60 \pm 33.8 (3)	18.79 \pm 2.4 (3)	40.40 \pm 7.2 (3)
nur Acetatpuffer	4 Wochen	10.72 \pm 6.4 (8)	0.64 \pm 0.4 (8)	16.42 \pm 9.7 (8)	23.85 \pm 22.3 (8)	5.46 \pm 7.9 (8)
nur Acetatpuffer	8 Wochen	11.47 \pm 9.4 (3)	0.69 \pm 0.6 (3)	17.57 \pm 14.5 (3)	39.38 \pm 32.4 (3)	11.83 \pm 10.2 (3)
nur Acetatpuffer	12 Wochen	18.91 \pm 29.9 (3)	1.13 \pm 1.8 (3)	28.97 \pm 45.9 (3)	35.72 \pm 11.4 (3)	43.69 \pm 72.7 (3)
rhOP-1 CMC-Kollagen	4 Wochen	23.61 \pm 17.9 (3)	1.42 \pm 1.1 (3)	36.17 \pm 27.4 (3)	32.30 \pm 20.1 (3)	24.47 \pm 27.7 (3)
rhOP-1/ CMC-Kollagen	8 Wochen	34.33 \pm 22.6 (3)	2.06 \pm 1.4 (3)	52.89 \pm 34.6 (3)	42.76 \pm 20.2 (3)	37.08 \pm 14.4 (3)
rhOP-1/ CMC-Kollagen	12 Wochen	43.39 \pm 22.3 (3)	2.60 \pm 1.5 (3)	66.47 \pm 34.2 (3)	32.07 \pm 10.1 (3)	47.65 \pm 21.8 (3)
nur CMC-Kollagen	4 Wochen	10.00 \pm 5.55 (3)	0.60 \pm 0.3 (3)	15.33 \pm 8.5 (3)	31.77 \pm 23.8 (3)	9.01 \pm 7.7 (3)
nur CMC-Kollagen	8 Wochen	4.45 \pm 4.0 (3)	0.27 \pm 0.2 (3)	6.81 \pm 6.2 (3)	31.90 \pm 25.6 (3)	5.09 \pm 6.3 (3)
nur CMC-Kollagen	12 Wochen	18.82 \pm 8.6 (3)	1.13 \pm 0.5 (3)	28.84 \pm 13.2 (3)	43.87 \pm 11.0 (3)	23.55 \pm 16.4 (3)
unbehandelt (5/8 getestet)	4 Wochen	6.04 \pm 1.8 (5)	0.36 \pm 0.1 (5)	9.25 \pm 2.8 (5)	43.71 \pm 12.3 (5)	6.00 \pm 1.8 (5)
unbehandelt	8 Wochen	19.05 \pm 12.7 (6)	1.14 \pm 0.8 (6)	29.19 \pm 19.4 (6)	44.64 \pm 14.1 (6)	18.43 \pm 11.4 (6)
unbehandelt	12 Wochen	45.91 \pm 40.6 (6)	2.75 \pm 2.4 (6)	70.34 \pm 62.1 (6)	38.04 \pm 17.8 (6)	38.26 \pm 21.4 (6)
unbehandelt (5/6 getestet)	16 Wochen	18.55 \pm 9.3 (5)	1.11 \pm 0.56 (5)	28.43 \pm 14.2 (5)	39.15 \pm 8.3 (5)	20.19 \pm 9.8 (5)

TABELLE 11B

Ergebnisse mechanischer Testung in Form von Prozent von Stärke von intakter Ulna durchschnittliche \pm Standardabweichung(en)

Implantat	4 Wochen	8 Wochen	12 Wochen	16 Wochen
rhOP-1 Acetatpuffer	39 \pm 26 (8)	77 \pm 35 (3)	98 \pm 34 (3)	—
nur Acetatpuffer	16 \pm 10 (8)	18 \pm 15 (3)	29 \pm 46 (3)	—
rhOP-1 CMC-Kollagen	36 \pm 27 (3)	53 \pm 35 (3)	66 \pm 34 (3)	—
nur CMC-Kollagen	13 \pm 9 (3)	7 \pm 6 (3)	29 \pm 13 (3)	—
unbehandelt	9 \pm 3 (5)	29 \pm 19 (6)	70 \pm 62 (6)	28 \pm 14 (5)

Histologische Bewertung

[0219] Die Histologie der rhOP-1- und Kontrolldefekte korrelierte gut mit den groben, radiografischen und mechanischen Testergebnissen. In den rhOP-1 behandelten Defekten wurde proliferative, neue Knochenbildung beobachtet, welche die Defekte überspannte und sich in manchen Fällen in das subkutane Gewebe ausdehnte. Neuer Knochen bildete sich aus den endostalen Ulna-Regionen und aus dem Periosteum nahe den defekten Kortexen. Die Überbrückung mit neuem Knochen war im Allgemeinen 8 Wochen nach der Operation abgeschlossen, obwohl Bereiche von mineralisiertem Knorpel vorhanden waren. Die Defekte waren mit dicht gewobenem Knochen überbrückt und gefüllt und die Neuorganisation der Wirtsknochenkortexe wurde bei 12 Wochen beobachtet.

[0220] Behandelte und unbehandelte Kontrolldefekte zeigten nur Zeichen von faseriger Gewebevereinigung mit kleinen Mengen an neuem Knochen, der sich entlang dem lateralen Ulna-Periosteum und von der endostalen Region 4 Wochen nach der Operation gebildet hatte. Bei 8 Wochen füllte Fasernorpel die Kontrolldefekte, wobei Bereiche von mineralisiertem Knorpel zwischen dem neuen Knochenwachstum vorhanden war. Erhebliche Mengen an neuem Knochen bildeten die Wirtsknochenkortexe und dehnten sich in die Defekte aus. Defektkortexe wurden mit dichter neuer Knochenbildung verdeckt und endochondrale Heilung war fortgeschritten, obwohl die Vereinigung nicht vollständig war. Bei 16 Wochen waren die Kontrolldefekte mit neuem Knochen überbrückt, wobei einige Lücken von mineralisierendem Knorpel vorhanden waren. Neuer Knochen dehnte sich von den Wirtskortexe und benachbarten periostalen Gewebeschichten über den Defekt aus.

Schlussfolgerung

[0221] Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass osteogene Proteine, die in Defekte von nicht-kritischer Größe injiziert werden, die Knochenheilung beschleunigen. Die lokale perkutane Injektion von rhOP-1 in den Defekt von nicht kritischer Größe in der Hundeulna resultierte, verglichen mit nicht behandelten und nur mit Träger behandelten Kontrolldefekten, in einer proliferativen periostalen und endostalen neuen Knochenbildung. Röntgenograf resultierte die rhOP-1-Injektion in diffusen Verkalkungen von neuem Knochen und früher Fraktur-Kallusbildung, so zeitig wie 2 bis 3 Wochen nach der Operation, mit erheblicher Knochenüberbrückung und Inkorporation der Wirtskortexe bei 8 bis 12 Wochen nach der Operation. Die mechanische Festigkeit von Defekten mit nicht kritischer Größe, die mit rhOP-1 behandelt wurden, näherten sich bei 12 Wochen an die Festigkeit von intakter Ulna an und war zwei- bis dreimal so groß wie jene, die bei der Heilung der Kontrolldefekte beobachtet wurde.

C. Reparatur von Frakturdefekten unter Verwendung von verbesserten osteogenen Vorrichtungen, die Carboxymethylcellulose enthalten

1. Experiment 1: Ziegen-Frakturstudie unter Verwendung von unterschiedlichen Dosierungen an OP-1 (geschlossene Defektstelle)

[0222] Das Folgende ist eine vergleichende, randomisierte experimentelle Studie von frischen, verschlossenen Frakturdefekten des mittleren Schafts der Tibia (abgelenkt auf 5 mm) in Ziegen.

Wahl der Versuchstiere

[0223] Es ist im Fachgebiet allgemein anerkannt, dass Ziegen eine mit Menschen vergleichbare Knochenheilungsrate aufweisen. Die Ergebnisse dieser Studie können daher auf einen klinischen Rahmen extrapoliert werden. Es wird dem Fachmann darüber hinaus klar sein, dass die Knochen von Ziegen bezüglich Größe, Form und mechanischer Belastung eine Ähnlichkeit zu jenen von Menschen zeigen.

[0224] Wie hierin offenbart und beschrieben, ist ein Tiermodell für eine geschlossene diaphyseale Fraktur entwickelt worden. Dieses Modell fördert die Studie von natürlicher und beschleunigter Frakturheilung, mit oder ohne einer internen Frakturfixierungsvorrichtung, indem es die Bildung einer reproduzierbaren Standardfraktur der Hinterextremität erlaubt. Kurz gesagt wird mit Hilfe einer Dreipunkt-Biegungsvorrichtung in völlig anästhesierten Ziegen eine geschlossene Fraktur des mittleren Schafts der Tibia erzeugt. Nach geschlossener Reduktion und Ablenkung der Fraktur auf 5 mm wurde ein äußerer Gipsverband angelegt. Aufgrund der Verminderung des Anschwellens der Hinterextremität wurde der Gips zweimal wöchentlich ersetzt, um Stabilität beizubehalten. Nach 2 Wochen können die Tiere die gebrochene Extremität vollständig belasten und nach 4-6 Wochen ist die Fraktur klinisch und röntgenografisch geheilt. Der Gips wird nach 6 Wochen entfernt.

[0225] Die Tiere werden von Ruiter, einem Ziegenzüchter-Spezialist (Holland), gekauft. Zufällig gezüchtete weibliche Milchziegen werden verwendet werden. Um den Einfluss eines sich entwickelnden Skeletts auf die Ergebnisse zu umgehen, werden ausgewachsene Tiere verwendet werden. Die Tiere sind vom Skelett her ausgewachsen, 1 bis 2 Jahre alt und wiegen ungefähr 50 kg.

Versuchsablauf

[0226] Als Prämedikation werden Ketamin 10 mg/kg i.m. und Atropin 1,5 mg i.m. (oder im Fachgebiet anerkannte Äquivalente der vorhergehenden Medikamente) etwa 15 Minuten vor der vollständigen Anästhesie der Tiere verabreicht. Letztere wird mit Etomidaten (oder im Fachgebiet anerkannten Äquivalenten davon), 0,3 mg/kg i.v., erzielt. Nach Intubation wird die Anästhesie mit einer O₂/N₂O-Mischung (1:1, Vol./Vol.) beibehalten, die mit 1 bis 2% Isoflurane (oder im Fachgebiet anerkannten Äquivalenten davon) ergänzt ist.

[0227] Mit einer Dreipunkt-Biegungsvorrichtung wird auf der linken Tibia ein Varustrauma appliziert, bis eine geschlossene Fraktur des mittleren Schaftes erhalten wird. Die Fraktur wird dann manuell reduziert und die Haut über Fraktur wird rasiert. Die gesamte Hinterextremität wird für die geschlossene Verabreichung der osteogenen Vorrichtung durch Injektion mit einer Alkohol-enthaltenden Desinfektionslösung jodiert, sowie um die Haut für anschließende Immobilisierung durch den Gipsverband zu trocknen. Die osteogene Vorrichtung wird bei der Frakturstelle in die Nähe der Frakturlücke injiziert, um den Kontakt mit der medullaren Kavität zu maximieren. Zum Beispiel wird eine osteogene Vorrichtung intramedullär mit einer dicken Knochenmarks-Aspirationsnadel injiziert. Nach der Injektion wurde zur Immobilisierung ein Gipsverband angelegt.

Studienaufbau

[0228] Die Tiere wurden gemäß der Behandlung in 5 Gruppen (I-V) von 3 Tieren und 1 Gruppe (VI) von 9 Tieren geteilt: 0,5 mg OP-1 in einer injizierbaren Konfiguration der osteogenen Vorrichtung, enthaltend mindestens OP-1, Kollagenmatrix und Bindemittel wie zum Beispiel CMC, formuliert, wie vorstehend beschrieben (direkt nach der Erzeugung der Fraktur)(Gruppe I), 1,0 mg OP-1 in einer injizierbaren Vorrichtung, die mindestens OP-1, Kollagen und Bindemittel wie zum Beispiel CMC enthält, (direkt nach der Erzeugung der Fraktur) (Gruppe IV), 1,0 mg OP-1 in einer Standardkonfiguration der OP-1-Vorrichtung (entsprechend 0,4 Gramm OP-1-Vorrichtung), injiziert direkt nach der Bildung der Fraktur (Gruppe V) und keine Behandlung mit OP-1 (Gruppe VI, Kontrollen). Die Behandlungsgruppen werden wie folgt zusammengefasst.

Gruppe	Zeit der Injektion (Tage)	Vorrichtung	Menge an OP-1 (mg)	Ungefähre Zahl der Tiere
I	0	Injizierbar	0,5	3
II	0	Injizierbar	1,0	3
III	3	Injizierbar	1,0	3
IV	0	Injizierbar	1,0	3
V	0	Standardvorrichtung	1,0	3
VI	Keine	Keine	0	9

[0229] Die Tiere wurden 2, 4 und 6 Wochen nach der Erzeugung der Fraktur getötet. In den Gruppen I bis V wurde zu jedem Zeitintervall ein Tier getötet und in Gruppe VI wurden 3 Tiere zu jedem Zeitintervall getötet. Durch Vergleich der behandelten Gruppen mit den Kontrollen kann der beschleunigende Effekt der Behandlung auf die Frakturheilung bestimmt werden. Information über den OP-1-Dosierungseffekt und die Zeit der Injektion kann durch Vergleich der Gruppe I mit Gruppe II bzw. Gruppe II mit Gruppe III erhalten werden. Unterschiede in der Wirksamkeit zwischen unterschiedlichen Konfigurationen werden durch Bewertung der Ergebnisse der Gruppen II, IV und V ausgewertet.

[0230] In anderen ähnlichen Experimenten werden sich Dosierungen von osteogenem Protein wie zum Beispiel OP-1 von ungefähr 0,125 bis 10,0 mg erstrecken. Bestimmte andere Konfigurationen von verbesserten osteogenen Vorrichtungen werden unterschiedliche Mengen an Bindemittel wie zum Beispiel CMC enthalten, die sich von unter 200 mg CMC/1000 mg Kollagenmatrix bis über 200 mg CMC/1000 mg Kollagenmatrix bewegen. Benetzungsmittelvolumina werden, wie vorstehend beschrieben, variiert werden, um die gewünschte Konsistenz/Konfiguration an osteogener Vorrichtung zu erzielen. In noch anderen ähnlichen Experimenten werden andere Bindemittel wie zum Beispiel Fibrinkleber und/oder andere Matrizen wie zum Beispiel β -TCP verwendet werden.

Bewertung der Defektreparatur

Radiografie

[0231] Röntgenaufnahmen werden in Anlehnung an ein standardisiertes Verfahren gemacht und stellen die Frakturstelle in zwei Richtungen dar, antero-posterior und mediolateral. Die ersten Röntgenbilder werden sofort nach der Erzeugung der Fraktur gemacht und danach zweimal wöchentlich bis zur Tötung der Tiere. Die Röntgenaufnahmen zur Zeit der Tötung werden nach der Entfernung des Gipsverbandmaterials gemacht; alle anderen werden mit dem Gipsverbandmaterial in situ gemacht. Sie werden blind durch zwei Radiologen oder Chirurgen qualitativ beurteilt und wenn möglich wird die folgende Einteilungsskala für die Bewertung des Heilungsvorgangs angewandt:

Grad 0: Kein Unterschied verglichen mit dem Zustand sofort nach der Erzeugung der Fraktur

Grad 1: Kleine Mengen von Kallus

Grad 2: Mäßige Mengen von Kallus

Grad 3: Große Mengen von Kallus

Grad 4: Schwenden der Fraktarenden

[0232] Spezielle Aufmerksamkeit wird der Art der Fraktur und der Ausrichtung gezollt.

Computertomography

[0233] Nach Entfernung der linken Hinterextremität und des Gipsverbandmaterials und nach Aufnahme der Röntgenbilder wurde ein CT-Scan vom Frakturgebiet gemacht. Die Weichgewebe sollten für eine bessere Qualität der Scans in situ verbleiben. Reste der Frakturlücken und von Kallus können auf diese Weise sichtbar gemacht werden. Darüber hinaus konnte die Menge von Kallus berechnet werden. Genauere Information über

den Fortschritt des Heilungsprozesses kann, anstatt mit einfachen Röntgenbildern, mit CT-Scans erhalten werden.

Biomechanische Untersuchungen

[0234] Nach CT-Scannen und anschließender Entfernung aller Weichgewebe von der Tibia werden biomechanischen Untersuchungen durchgeführt. Ein Verfahren für fortgeschrittene mechanische Untersuchungen des Knochens wird wie folgt entwickelt: Die Biegesteife in 24 Richtungen bei Winkelzunahme von 15° wird gemessen und als ein Vektor in einem X-Y-Koordinatensystem dargestellt, wobei eine Ellipse erhalten wird. Die Ellipse wird mit der einer kontralateralen, intakten Tibia verglichen. Parameter können von diesem Vergleich abgeleitet werden, die als Maße der Heilungseffizienz dienen. Schließlich wird ein Dreh-Test bis zum Versagen durchgeführt und die Drehfestigkeit, Drehsteife, Winkelverschiebung und aufgenommene Energie bis zum Versagen werden als der Prozentsatz der kontralateralen gesunden Tibia ausgedrückt. Dieser Vergleich mit der kontralateralen Tibia wird ausgeführt, um die interindividuelle Variation zu verringern.

Histologie

[0235] Nach der biomechanischen Untersuchung werden die Knochenfragmente mit speziellen Ringen für die histologische Untersuchung zusammengehalten. Standardfixierung, Einbettungs- und Färbetechniken für Knochen und Knorpel werden verwendet. Spezielle Aufmerksamkeit wird den Zeichen für fasrige-, osteochondrale- oder knochige Vereinigung gezollt. Ein histologisches Punktesystem wird dann angewandt, um die Menge an Fasergewebe, Knorpel, neu gebildetem Knochen und Knochenmark in der Frakturlücke zu quantifizieren.

Untersuchungsergebnisse

[0236] Es wird erwartet, dass mechanische, röntgenografische, tomographische und histologische Daten darauf hindeuten werden, dass injizierbare Konfigurationen von verbesserten osteogenen Vorrichtungen beschleunigte Reparatur von geschlossenen Frakturdefekten induzieren können.

Schlussfolgerung

[0237] Verbesserte osteogene Vorrichtungen (injizierbare Konfiguration) können verwendet werden, um die Reparatur von frischen Frakturdefekten des mittleren Schafts der Tibia (abgelenkt auf 5 mm) an einer geschlossenen Defektstelle zu reparieren.

2. Experiment 2: Ziegen-Frakturstudien unter Verwendung von unterschiedlichen Dosierungen an OP-1 bei unterschiedlichen Zeiten (geschlossene Defektstelle)

[0238] Diese unabhängige Studie verwendet auch Ziegen als das Tiermodell zur Untersuchung der Reparatur der Frakturdefekte unter Verwendung der verbesserten osteogenen Vorrichtungen. Unter Verwendung von Techniken, die ähnlich zu jenen der vorstehend beschriebenen waren, wurden frische, geschlossene diaphyseale Frakturen (hauptsächlich transvers oder einfach schief) mit Reduktion mit externer Fixierung und Ablenkung auf 5 mm unter Verwendung der CMC-enhaltenden osteogenen Vorrichtungen behandelt.

[0239] Der Studienaufbau ist wie folgt:

<u>Gruppe</u>	<u>Behandlung</u>	<u>Ziegenanzahl</u>
I	Keine Injektion	10
II	CMC + Kollagen allein über Injektion	10
III	CMC + Kollagen + OP-1 (2,5 mg OP-1/1000mg Kollagen) über Injektion	10
IV	CMC + Kollagen + OP-1 (halbmaximale Dosierung von 1,25 mg OP-1/1000 mg Kollagen) über Injektion	10

[0240] Fünf Ziegen werden in jeder Gruppe 2 Wochen nach der Behandlung getötet und fünf Ziegen in jeder Gruppe werden 4 Wochen nach der Behandlung getötet.

[0241] Andere ähnliche Studien untersuchen die Reparatur von Frakturdefekten zu Zeitpunkten, die mehr als 4 Wochen betragen und untersuchen sowohl niedrigere als auch höhere Dosierungen von OP-1. Außerdem wird die Reparatur von Frakturdefekten unter Verwendung von unterschiedlichen Gesamtmengen (mg) der CMC-enhaltenden OP-1-Vorrichtung, verabreicht an die Defektstelle, untersucht. Eine Untersuchung nützt eine Vorrichtung von 400 mg Gesamtgewicht, verabreicht an die Defekt-Stelle. Noch eine andere ähnliche Studie wird jedes der vorstehend erwähnten Bindemittel wie zum Beispiel Fibrinkleber und/oder irgendeine der vorstehend erwähnten Matrizen wie zum Beispiel β -TCP nützen.

[0242] Die Defektreparatur wird, wie es vorstehend genauer beschrieben ist, unter Verwendung einer Vielzahl von klinischen Routineprotokollen, einschließlich Radiografie, CT-Scan, biomechanische Untersuchung und Histologie bewertet.

Untersuchungsergebnisse

[0243] Es wird erwartet, dass mechanische, röntgenografische, tomographische, histologische Daten darauf hindeuten, dass injizierbare Konfigurationen von verbesserten osteogenen Vorrichtungen die beschleunigte Reparatur von Frakturen an einer geschlossenen Defektstelle induzieren können. Es wird auch erwartet, dass in bestimmten, bevorzugten Ausführungsformen niedrige Dosierungen des osteogenen Proteins bei der Induktion der Reparatur effektiv sein werden, besonders in verbesserten osteogenen Vorrichtungen.

Schlussfolgerung

[0244] Verbesserte osteogene Vorrichtungen (injizierbare Konfiguration) können verwendet werden, um frische, geschlossene diaphyseale Frakturen (abgelenkt auf 5 mm) an einer geschlossenen Defektstelle zu reparieren.

D. Reparatur von osteochondralen Defekten unter Verwendung von verbesserten Osteogenen Vorrichtungen, die Carboxymethylcellulose enthalten

I. Experiment 1: Osteochondralen Defekte über die gesamte Dicke (Hunde)

[0245] Eine Studie wurde unter Verwendung des osteochondralen Propfen („plug“)-Defektmodells bei Hunden durchgeführt, um die Wirksamkeit der verbesserten osteogenen Vorrichtungen bei der Reparatur von osteochondralen/chondralen Defekten zu zeigen. Vier Formulierungen von Implantaten wurden bewertet, einschließlich (1) osteogene Standard-Vorrichtung, einschließlich rhOP-1 und Kollagenmatrix, (2) verbesserte osteogene Vorrichtung, einschließlich rhOP-1, Kollagenmatrix und Carboxymethylcellulose (CMC)-Bindemittel, (3) nur Kollagenmatrix oder (4) Kollagenmatrix und CMC-Bindemittel.

[0246] Kurz gesagt wurden Defekte über die gesamte Dicke mit 5 mm im Durchmesser, die sich 6 mm in den subchondralen Knochen ausdehnten, bilateral auf dem medialen Oberschenkelcondylus von 4 ausgewachsenen Mischlingshunden erzeugt. Ausgewachsene männliche Mischlingshunde wurden aufgrund ihrer anatomischen Größe und Knochenreparatur- und Umformungseigenschaften ausgewählt. Besondere Aufmerksamkeit wurde der Auswahl von Tieren mit einheitlicher Größe und einheitlichem Gewicht gezollt, um die Variabilität in Knochengeometrie und Gelenkbelastung zu vermindern. Die Tiere wurden vor der Operation röntgenografisch durchmustert, um die richtige Größe und Skelettreife sicherzustellen, sowie dass keine offensichtlichen ossalen Abnormalitäten bestanden. Die Defekte der linken Seite erhielten osteogene Standard-Vorrichtung in zwei Tieren und die verbesserte osteogene Vorrichtung in den anderen beiden Tieren. Die Defekte der rechten Seite erhielten Matrix alleine in einem Tier, ein Matrix/Bindemittelgemisch in einem Tier und wurden in den verbleibenden zwei Tieren nicht behandelt.

Beschreibung der Testvorrichtung

[0247] Die osteogene Standard-Vorrichtung bestand aus rhOP-1, gemischt mit Rinder-Typ I-Knochenkollagenmatrix (2,5 mg rhOP-1/g Matrix). Die verbesserte osteogene Vorrichtung bestand aus 100 mg der OP-1/Kollagenmatrix- osteogenen Standard-Vorrichtung, kombiniert mit 20 mg CMC (gesamt 120 mg). Die Kontrollen bestanden aus Rinder-Typ I-Knochenkollagenmatrix alleine und der Kollagenmatrix mit CMC. Beide wurden in 100-mg-Mengen bereitgestellt.

Studienaufbau

[0248] Der Studienaufbau wird in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Reparatur von osteochondralen Defekten in Hunden unter Verwendung von OP-1

Tier Nummer	Linkes Implantat	Rechtes Implantat
H122	OP-1	Matrix
H130	OP-1	Keines
H125	OP-1/CMC	Keines
H132	OP-1/CMC	Keines
OP-1:	100 mg OP-1/Kollagenvorr. (osteogene Standard-Vorrichtung)	
OP-1/CMC:	120 mg OP-1/CMC/Kollagenvorr. (verbess. osteogene Vorricht.)	
Matrix:	100 mg Kollagen	
CMC/Matrix:	100 mg CMC/Kollagen.	
Vorrichtungen und Kontrollen wurden mit Salzlösung benetzt (ungefähr 0,21 bis 0,26 ml), um vor der Implantation eine Kittkonsistenz zu erzielen.		

Operation

[0249] Unter Verwendung von aseptischen Techniken wurde die Operation unter Isoflurangas Anästhesie durchgeführt. Anästhesie wurde durch intravenöse Injektion von Natrium-Pentothal bei einer Dosierung von 5,0 mg/Pfd. Körpergewicht verabreicht. Ein medialer parapatellarer Einschnitt von ungefähr vier Zentimeter Länge wurde gemacht. Die Patella wurde lateral zurückgezogen, um den Oberschenkelcondylus freizulegen. Eine 5-mm-Bohrspitze mit einer speziell entworfenen Manschette, um Bohren des Defekts über eine Tiefe (6 mm) zu verhindern wurde verwendet, um den endgültigen Defekt zu erzeugen. Sterile Salzlösung wurde zu der verbesserten osteogenen Vorrichtung hinzugefügt und genau vor der Implantation gemischt. Nach der Spülung des Defekts mit Salzlösung zur Entfernung von Knochenrümern und ausgelaufenen Markzellen wurde die entsprechende Vorrichtung unter Verwendung einer stumpfen Sonde in die Defekt-Stelle gepackt. Genug Vorrichtung wurde in den Defekt platziert, sodass er bündig mit der gelenkbildenden Oberfläche war. Die Gelenkkapsel und die Weichgewebe wurden dann in Schichten geschlossen. Der Vorgang wurde auf der kontralateralen Seite mit dem entsprechenden Implantat wiederholt.

Bewertung und abschließende Verfahren

[0250] Osteochondrales Verheilen wurde, wie nachstehend beschrieben, grob und histologisch unter Verwendung von Routineverfahren bewertet. Die Röntgenbilder wurden benützt, um die Heilung zu bewerten.

[0251] Zwölf Wochen nach der Operation wurde jedes Tier durch intravenöse Barbituratüberdosis getötet. Sowohl rechte als auch linke distale Oberschenkel wurden im Ganzen entfernt und in kalter Salzlösung bis zur groben Einteilung beibehalten und die Mikrophotographie wurden abgeschlossen. Die Proben wurden dann in 4% Paraformaldehyd-Fixierung platziert, mit allen nötigen Identifizierungen beschriftet und bei 4°C bis zum Versand ungefähr 10 Tage nach der Tötung gelagert. Erst vor dem Versand wurden die Proben mit dem artikulären Defekt in der Mitte, in kleine Blöcke zugeschnitten.

Grobe Analyse

[0252] Jeder entnommene Defekt wurde hinsichtlich seines groben Erscheinungsbildes eingeteilt. Diese Analyse-Zuteilungspunkte basierten auf der Bildung von intra-artikulären Adhäsionen, Wiederherstellung der artikulären Oberfläche, Erosion und Aussehen des Knorpels. Insgesamt waren 8 Punkte möglich. Die grobe Einteilungsskala wird in Tabelle 13 dargelegt.

Tabelle 13: Grobe Einteilungsskala

Intra-artikuläre Adhäsionen	Grade
Keine =	2
Minimal/feines loses Fasergewebe =	1
Viel/dichtes Fasergewebe =	0
Wiederaufbau der artikulären Oberfläche	
Vollständig =	2
Teilweise =	1
Keiner =	0
Erosion von Knorpel	
Keiner =	2
Defektstelle/Stellengrenze =	1
Defektstelle und benachbarter normaler Knorpel =	0
Aussehen des Knorpels	
Durchsichtig =	2
Milchig =	1
Verfärbt oder irregulär =	0
GESAMTPUNKTE	8 mögliche Punkte

Histologie

[0253] Alle Proben wurden für die histologische Bewertung präpariert. Die einzelnen Proben wurden durch Eintauchen in 4% Paraformaldehydlösung fixiert. Außerdem wurden, wie hierin anderswo beschrieben, unter Verwendung von Routineverfahren Gewebetypisierungsanalysen durchgeführt, um die Kollagenart und die Prozent an Gewebezusammensetzung zu charakterisieren. Nicht entkalkte Schnitte, einer von jeder Probe, gefärbt mit Safranin O und Fastgrün-Farbstoffen (um den Glycosaminoglycangehalt in der Matrix anzuzeigen), wurden für die Bewertung zurückbehalten.

[0254] Histologische Schnitte basierten auf der Natur des reparierten Knorpels, den strukturellen Eigenschaften und zellulären Veränderungen. Die histologische Einteilungsskala wird in Tabelle 14 dargelegt.

Tabelle 14 Histologische Graduierungsskala		
Art des überwiegenden Gewebes:		
Zelluläre Morphologie		
	Hyalin-artikulärer Knorpel =	4
	nicht komplett differenziert =	2
	fasriges Gewebe oder Knochen =	0
Safranin-O-Färbung der Matrix		
	Normal/fast normal =	3
	Mäßig =	2
	Wenig =	1
	Keine =	0
STRUKTURELLE EIGENSCHAFTEN:		
Regelmäßigkeit der Oberfläche		
	Glatt/intakt =	3
	oberflächl. horizontale Laminierung	2
	Fissuren 25-100% der Dicke	0
	Starke Spaltung, Fibrillation	0
Strukturelle Integrität		
	Normal =	2
	Leichte Spaltung, einschließl. Zysten=	1
	Schwere Disintegration =	0
Dicke		
	100% normaler Knorpeldichte =	2
	50-100% =	1
	0-50%=	0
Bindung an benachbarten Knorpel		
	An beiden Enden des Defekts verbunden =	2
	An einem Ende verbunden oder teilw. an beiden Enden verbunden =	1
	Nicht verbunden =	0
FREI VON ZELLULAREN VERÄNDERUNGEN DER DEGENERATION.		
Hypozellularität		
	Keine=	3
	Wenig =	2
	Mäßig =	1
	Stark =	0
Chondrocyten Clusterbildung		
	Keine=	2
	<25% der Zellen =	1
	>25% der Zellen =	0
Frei von degenerativen Veränderungen im benachbarten Knorpel		
	Norm. Zellularität, keine Cluster, keine Färb. =	3
	Norm. Zellularität, leichte Cluster, wenig Färbung =	2
	Wenig od. mäßige Hypozellularität, leichte Färb.+	1
	Starke Hypozellularität, wenig oder keine Färb.+	0
GESAMT		24 mögl. Punkte

ERGEBNISSE

[0255] Alle Operationen verliefen ohne postoperative Komplikationen. Im Allgemeinen wurde in allen vier Tieren etwas Schwellung am medialen Knie am vierten Tag nach der Operation bilateral beobachtet und sie hatte sich am Tag 10 nach der Operation wiedergelegt. Kein Tier erlebte irgendwelche nachteiligen Reaktionen bezüglich des implantierten Materials oder der Untersuchungsvorgänge.

Grobe Bewertung

[0256] Eine Zusammenfassung der durchschnittlichen, groben Bewertungsgrade scheint in Tabelle 15 auf.

Tabelle 15: Durchschnittliche, grobe Bewertungsgrade \pm Standardabweichung(en)

	Standard Osteogene Vorrichtung	Verbesserte Osteogene Vorrichtung	nur Kollagen Matrix	Kollagen Matrix/CMC	Keine Behandlung
Intra- Artikulär	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0
Wiederaufb. der Oberfl.	1.5 ± 0.6	1.5 ± 0.6	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.6	2.0 ± 0.0
Erosin	1.8 ± 0.5	1.23 ± 0.5	1.5 ± 0.7	1.0 ± 1.4	1.8 ± 0.5
Aussehen	0.8 ± 0.5	1.0 ± 0.8	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.5 ± 0.6
Gesamt (von 8 möglichen Punkten)	6.0 ± 1.4 (2)	5.8 ± 1.7 (2)	3.5 ± 0.7 (1)	4.5 ± 0.7 (1)	7.3 ± 0.5 (2)

Histologische Bewertung

[0257] Die nicht behandelten Defekte und mit verbesserter osteogener Vorrichtung von OP-1, Kollagenmatrix und CMC behandelten Defekte erhielten die höchsten, durchschnittlichen, histologischen Grade 15 bzw. 16,5 von 24 möglichen Punkten. In jeder dieser Gruppen schaute jedoch eine Probe merklich besser aus als die anderen. Die mit Kollagenmatrix alleine, mit Kollagenmatrix mit CMC und mit osteogener Standardvorrichtung alleine behandelten Stellen ergaben jedoch etwas gleichbleibendere und niedrigere Bewertungen als die Stellen, welche mit verbesserter osteogener Vorrichtung ($n \leq 2$) behandelt wurden. Eine Zusammenfassung der durchschnittlichen histologischen Grade scheint in Tabelle 16 auf.

Tabelle 16: Durchschnittlicher histologischer Bewertungsgrad \pm Standardabweichung

	Standard Osteogene Vorrichtung	Verbesserte Osteogene Vorrichtung	Nur Kollagen Matix	Kollagen Matix/CMC	Nicht Implantiert
Art des vor- herrschenden Gewebes	3.5 ± 0.7 (2)	4.5 ± 2.1 (2)	1.0 (1)	2.0 (1)	4.0 ± 2.8 (2)
Strukturelle Eigenschaften	1.5 ± 0.1 (2)	5.5 ± 0.6 (2)	7.0 (1)	6.0 (1)	5.0 ± 2.8 (2)
Frei von zellüären Ver- änderungen der Degeneration	4.5 ± 0.7 (2)	6.5 ± 2.1 (2)	3.0 (1)	4.0 (1)	6.0 ± 1.4 (2)
Gesamt (von 24 mögl. Punkten)	12.5 ± 0.7 (2)	16.5 ± 7.8 (2)	11.0 (1)	12.0 (1)	1.5 ± 7.1 (2)

[0258] Unerwartet erzielten die mit verbesserter osteogener Vorrichtung behandelten Stellen die höchste durchschnittliche Punktezah für die Art des neuen, reparierten Gewebes, für die strukturellen Eigenschaften der Reparatur und für die Minimierung der Degeneration des reparierten Knorpels oder des umgebenden, intakten Knorpels. Die verbesserten osteogenen Vorrichtungen erhielten auch die höchsten Gesamtpunkte. Diese Ergebnisse wurden durch die Punktezah von einem Tier gewichtet, in welchem die zelluläre und Gewebemorphologie mit dem Gelenkknorpel übereinstimmte. Der reparierte Knorpel war durchgehend mit intaktem Knorpel und die Dicke der Reparatur war gleich wie im intakten Knorpel. Die subchondrale Knochenschicht war auch ganz wiederhergestellt. Die Heilung war in den anderen Stellen, die mit der OP-1/Kollagenmatrix mit oder ohne CMC behandelt waren, nicht so weit fortgeschritten. Niedrige Punkte waren das Ergebnis von unvollständiger Differenzierung im reparierten Gewebe, unvollständigem Wiederaufbau von subchondralem Knochen und ungleichmäßiger Dicke der Reparatur. Verbleibendes Implantat oder Trägermaterial wurde in keinem Schnitt beobachtet.

[0259] Ein Vergleich unter den Tieren zeigte, dass in drei Tieren die Defekte, welche Vorrichtungen erhielten, die OP-1 mit oder ohne CMC (alle linken Defekte) enthielten, histologische Grade erzielten, die gleich oder größer waren als die kontralateralen Defekte, welche die Kontrollmatrix, oder keine Behandlung erhielten.

[0260] Unerwartet induzierte die OP-1-Vorrichtung ohne CMC Knochen- und Knorpelbildung, aber in einer disorganisierteren Weise, wobei erhebliches, fasriges Gewebe vorhanden war. Unbehandelte Probe oder Proben mit Träger alleine waren durch fasrigen Knorpel und dichtes Bindegewebe gefüllt.

[0261] Diese Daten deuten darauf hin, dass die mit der verbesserten osteogenen Vorrichtung erzielte, unerwartet verbesserte Reparatur mit den Unterschieden in ihrer Konsistenz hinsichtlich der osteogenen Standardvorrichtung ohne Bindemittel in Zusammenhang steht, was wiederum die Eingrenzung der Vorrichtung an der Defektstelle selbst beeinflusst. Es wird erwartet, dass Adhäsion der Formulierung und Disintegrationseigenschaften in artikulären Knochendefekten aufgrund der dynamischen Natur des Gelenks entscheidend sind.

Immunfärbung von Typ I- und Typ II-Kollagen und Mikroskopie mit polarisiertem Licht

[0262] Diese Untersuchung färbte auch Schnitte, um Kollagenreparatur an den Defektstellen zu vergleichen, die behandelt waren mit: keiner Vorrichtung, zwei Arten von nur Matrix-Zusammensetzungen (Matrix und Matrix/Bindemittel) oder beide Matrixzusammensetzungen mit OP-1.

[0263] Im Allgemeinen wurde unter der Verwendung von Kollagen Typ I-Antikörper die Färbung des bestehenden, darunterliegenden subchondralen Knochens sowie des neu gebildeten Knochens beobachtet. Der neu gebildete Knochen unterschied sich, wenn er unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet wurde, durch die Anwesenheit von Bereichen an unorganisierterer Matrix leicht vom bestehenden Knochen. Unter Verwendung von Typ II-Kollagenantikörper färbten sich der bestehende Gelenkknorpel qualitativ sowie das Reparaturgewebe in den Defekten, obwohl die Färbung von neuem Gewebe weniger intensiv war. In mindestens einem Defekt, der mit verbesserter osteogener Vorrichtung behandelt wurde, wurde vollständige Regeneration des subchondralen Knochens beobachtet, wobei sich artikulär-ähnlicher Knorpel entlang der Oberfläche regenerierte. Die zelluläre Matrix von diesem regenerierten Knorpel war nicht identisch zum bestehenden Gelenkknorpel, aber eine sichtbare zelluläre Matrix, zusammengesetzt aus großen, lockeren Bündeln, konnte unter den Phasenkontrast beobachtet werden.

[0264] Defekte, behandelt mit verbesserter osteogener Vorrichtung. In Defekten, die mit verbesserter osteogener Vorrichtung behandelt wurden, zeigte mindestens ein Tier auf makroskopischem Niveau Reparatur des Gelenkknorpels. Der subchondrale Knochen wurde regeneriert und eine neue Knorpelschicht von nahezu normaler Dicke wurde durch histologische Färbung mit Toluidenblau und Safranin O beobachtet. Diese Schichten und Gewebe färbten sich entsprechend, wobei Typ I-Antikörper im subchondralen Knochen lokalisiert war und Typ II-Kollagen in der neuen Knorpel-ähnlichen Schicht vorhanden war. Es gab auch manche Anzeichen für die Regeneration einer Zone an verkalktem Knorpel und eine eindeutige Oberbegrenzung („tide mark“) in dem regenerierten Knorpel.

[0265] Manche Unterschiede wurden jedoch zwischen der neuen und bestehenden Gelenkknorpelschicht beobachtet. Der neue Knorpel wies eine höhere Dichte an Chondrocyten auf und enthielt lockere, unorganisierte Faserbündel, die durch Phasenkontrastmikroskopie oder mit polarisiertem Licht sichtbar waren. Es sollte beachtet werden, dass nur einzelne Zeitpunkte während des Reparaturprozesses hier repräsentiert sind und dass die Ergebnisse von längeren oder kürzeren Perioden nicht bekannt sind.

[0266] Defekte, behandelt mit osteogener Standardvorrichtung. Die mit osteogener Standard-Vorrichtung behandelten Defekte zeigten, dass ungefähr 50% des Knochens in der defekten Stelle mit einwachsendem Gelenkknorpel von den Rändern des Defekts regeneriert wurden. Es schien neben dem neu regenerierten Knochen noch einige zusätzliche Gebiete mit Gelenkknorpelbildung zu geben, wobei der Rest des Defekts mit reparativem Gewebe gefüllt war. Das Reparaturgewebe färbte sich leicht mit Kollagen Typ II- und nicht mit Typ I-Kollagen-Antikörpern. Es waren mehr Chondrocyten vorhanden, wobei große Bündeln an Matrix die Zellen umgaben. Die Behandlung mit der osteogenen Standard-Vorrichtung unterschied sich von der Behandlung der verbesserten osteogenen Vorrichtung, indem der subchondrale Knochen sich nicht zu seinem normalen Niveau regenerierte und dichtes unorganisiertes Fasergewebe oberhalb des neuen Knorpels erschien, welches verursachte, dass der Oberteil des Defekts sich mit einer unregelmäßigen Oberfläche ausbeulte. Dieses fasrige Gewebe schien mehr Fibroblasten-ähnliche Zellen mit Faserbündel aufzuweisen, die parallel zu der artikulären Oberfläche lagen.

[0267] Defekte, behandelt mit Matrix/Bindemittel. Ein Defekt mit nur Matrix/Bindemittel ohne OP-1 zeigte Regeneration von etwa einem Drittel des entfernten subchondralen Knochens, wobei der Rest durch Reparaturgewebe gefüllt war. Dieses regenerierte Gewebe färbte sich mit Typ I-Kollagen-Antikörpern leicht, insbesondere nahe dem Boden des Defekts, und zeigte stärkere Färbung mit Typ II-Kollagen-Antikörper, mit stärkerer Färbung nahe der Oberfläche. Eine dichte, unorganisierte, sichtbare Matrix ist in der oberen Hälfte des Reparaturgewebes offensichtlich und ein organisierteres, horizontales Muster an Fasern erscheint in der unteren Hälfte. Toluidinblau färbte das Reparaturgewebe nicht, wohingegen Safranin O die obere und untere Hälfte differenziell färbte. Die Hälfte neben der artikulären Oberfläche färbte sich mit Safranin O leicht und die untere Hälfte färbte mit Fast-Green. Eine ähnliche Unterscheidung wurde zwischen den beiden Hälften des Reparaturgewebes beobachtet, wenn es mit Masson-Trichrom gefärbt wurde. Obwohl das Reparaturgewebe nicht wie Gelenkknorpel aussah, schien der Bereich nahe der artikulären Oberfläche kein Typ II-Kollagen zu enthalten, eine saure Matrix mit möglicherweise einigen Mucopolysacchariden. Die untere Hälfte hatte mehr Typ I-Kollagen mit weniger Kohlenhydrat und ist vielleicht in der Art ähnlicher wie Bindegewebe.

[0268] Der nur mit Kollagenmatrix behandelte Einzeldefekt zeigte keine Regeneration des subchondralen Knochens. Das Reparaturgewebe, welches den Defekt ausfüllte, färbte sich sowohl mit Kollagen Typ I- und II-Antikörpern leicht. Dieses Gewebe hatte eine vermehrte fasrige Matrix mit Fibroblasten-ähnlichen Zellen und schien in manchen Gebieten ähnlich wie Faserknorpel zu sein. Diese Probe war ähnlich zu der Behandlung mit der CMC/Kollagenmatrix alleine, wobei sowohl Typ I- als auch II-Kollagen in dem Reparaturgewebe vorkamen. Außerdem zeigte die Defektstelle die gleiche differentielle Färbung wie Safranin O/Fast-Green, mit Färbung an der oberen Hälfte des Reparaturgewebes mit Safranin O und am unteren Ende mit Fast-Green.

Zusammenfassung und Schlussfolgerung

[0269] Osteochondrale Defekte, die mit verbesserten osteogenen Vorrichtungen behandelt wurden, zeigten unerwartet eine fortgeschrittenere Knorpelregeneration, einen Chondrocyten- und Knorpelphänotyp, verglichen mit Defekten, die mit osteogener Standardvorrichtung, Kollagenmatrix alleine oder Kollagenmatrix gemischt mit CMC behandelt wurden, von welchen alle weniger organisierten, reparierten Knorpel und geringere subchondrale Knochenbildung aufwiesen. Schwache Reparatur durch Behandlung mit der Kollagenmatrix oder Kollagenmatrix mit CMC deutet darauf hin, dass die Anwesenheit eines Kollagengerüsts alleine nicht ausreichend ist, um Heilung zu induzieren, und den Heilungsfortschritt und die Organisation von Reparaturgewebe tatsächlich behindern kann.

[0270] Osteochondrale Defekte über die gesamte Dicke können unter Verwendung von CMC-enthaltenen osteogenen Vorrichtungen in Übereinstimmung mit den Verfahren der vorliegenden Erfindung repariert werden. Es wird erwartet, dass osteochondrale Defekte über die gesamte Dicke unter Verwendung von verbesserten osteogenen Vorrichtungen repariert werden können, welche irgendeines der vorstehend erwähnten bevorzugten Bindemittel wie zum Beispiel Fibrinkleber und/oder irgendeine der vorstehend erwähnten, bevorzugten Matrizen enthalten.

2. Experiment 2: Langzeit-Bewertung von Reparatur von osteochondralen Defekten über die gesamte Dicke (Hunde)

[0271] Diese Studie wurde durchgeführt, um die Reparatur von osteochondralen/chondralen Defekten durch verbesserte osteogene Vorrichtungen weiter zu bewerten. Bis jetzt hat die Studie die Effekte der verbesserten osteogenen Vorrichtung bei 6 und 12 Wochen untersucht und wird die Effekte bis 26 und 52 Wochen weiter untersuchen. Sie stellt Langzeit-Reparaturstabilitätsdaten bereit. Die Organisation von neuem Knorpel über die

Zeit wurde beobachtet, um zu bestimmen, ob er im Hinblick auf seine Struktur und Funktion annähernd gleich zu normalem Gewebe ist. Zwei Formulierungen von Vorrichtungen wurden in osteochondralen/chondralen Defekten bewertet, einschließlich: 1) verbesserte osteogene Vorrichtung, oder 2) Scheinvorrichtungen, die nur CMC und Kollagenmatrix enthielten.

[0272] Kurz gesagt wurden auf dem medialen Oberschenkelcondylus von 16 ausgewachsenen Mischlingshunden bilateral 5-mm-Defekte im Durchmesser über die gesamte Dicke erzeugt, die sich 6 mm in den subchondralen Knochen ausdehnten. Die ausgewachsenen Mischlingshunde wurden in dieser Studie aufgrund ihrer anatomischen Größe und bekannten Knochenreparatur- und Umformungseigenschaften verwendet. Alle Tiere waren zwischen 1 und 4 Jahre alt und wogen ungefähr 20 bis 30 Kg. Besondere Aufmerksamkeit wurde der Auswahl von Tieren von einheitlicher Größe und einheitlichem Gewicht gezollt, um die Variabilität in der Gelenkbelastung zu limitieren. Die Tiere wurden röntgenografisch durchmustert, um die richtige Größe und Skelettreife zu garantieren und dass keine offensichtlichen ossalen Abnormalitäten existierten. In jeder Gruppe von vier Hunden erhielten die Defekte der linken Seite verbesserte osteogene Vorrichtung. Die Defekte der rechten Seite erhielten in zwei Tieren Matrix/Bindemittel und die verbleibenden zwei Tiere wurden nicht behandelt. Bei der Tötung wurden die distalen Oberschenkelknochen im Ganzen entnommen und die Defektstellen histologisch und grob auf der Grundlage des vorstehend beschriebenen Schemas beurteilt.

[0273] Die verbesserte osteogene Vorrichtung umfasst Standardvorrichtung (2,5 mg rhOP-1/1 g Matrix) gemischt mit CMC. Um die verbesserte Vorrichtung zu formulieren, wurden unmittelbar vor der Implantation (gesamt 120 mg) 100 mg des rhOP-1/Kollagengemisches mit 20 mg CMC gemischt. Die Vorrichtung nur aus Kollagen besteht aus Typ I-Rinderkollagen (100 mg). Dieser Studienaufbau wird in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: Osteochondrale Defektreparatur in Hunden

Gruppe	Hunde (2 Defekte/Tier)	Linkes Implantat	Rechtes Implantat	Dauer
I	4	OP-1/CMC	Keines/Träger	6 Wochen
II	4	OP-1/CMC	Keines/Träger	12 Wochen
III	4	OP-1/CMC	Keines/Träger	26 Wochen
IV	4	OP-1/CMC	Keines/Träger	52 Wochen

**OP-1/CMC: 120 mg OP-1 CMC/Kollagenvorrichtung (verbesserte osteogene Vorrichtung)
Träger: 100 mg CMC/Kollagen**

Operation

[0274] Unter Verwendung von aseptischen Techniken wurde die Operation unter Isofluorangas-Anästhesie durchgeführt. Ein medialer parapatellarer Einschnitt von ungefähr vier Zentimetern Länge wurde gemacht. Die Patella wurde lateral zurückgezogen, um den Oberschenkelcondylus freizulegen. Unter Verwendung einer Bohrspitze von 1/8 Zoll wurde ein Pilotloch in die gewichtstragende Region des medialen Oberschenkelcondylus gemacht. Eine 5-mm-Bohrspitze mit besonders entworfener Manschette, um die zu tiefe Bohrung der Defekttiefe (6 mm) zu verhindern, wurde verwendet, um den endgültigen Defekt zu erzeugen. Nach ausgiebigem Spülen Salzlösung, um die Knochenrümpfer sowie ausgelaufenen Knochenmarkzellen zu entfernen, wurde die entsprechende experimentelle Vorrichtung unter Verwendung einer stumpfen Sonde in die Defektstelle gepackt. Die Gelenkkapsel und Weichgewebe wurden dann sorgfältig in Schichten geschlossen. Das Verfahren wurde auf der kontralateralen Seite mit dem entsprechenden Implantat wiederholt.

Bewertung

[0275] Jeweils vier Tiere wurden 6 und 12 Wochen und vier Tiere 26 und 53 Wochen nach der Operation getötet. Die Tiere wurden unter Verwendung einer intravenösen Barbituratüberdosis getötet. Die Oberschenkelknochen wurden sofort im Ganzen entfernt und in einer mit Salzlösung getränkten Windel gelagert. Hoch auflösende Photographien der Defektstellen wurden gemacht. Weichgewebe wurde sorgfältig von der Defektstelle weg präpariert. Das proximale Ende des Oberschenkelknochens wurde entfernt.

[0276] Das grobe Erscheinungsbild der Defektstellen und des reparierten Gewebes wurden basierend auf den vorstehend beschriebenen Parametern durch zwei unabhängige Beobachter eingeteilt, welche die Behandlungsanweisung nicht kannten. Punkte wurden gemäß dem Vorhandensein von intra-artikulärer Adhäsion, Wiederherstellung der artikulären Oberfläche, Knorpelerosion und Erscheinung zugeteilt.

[0277] Alle Proben wurden für histologische Beurteilung sofort nach der groben Einteilung und Photographie erzeugt. Die einzelnen distalen Oberschenkelknochen wurden durch Eintauchen in 10% gepufferte Formalinlösung oder in 4% Paraformaldehydlösung fixiert. Auf einer wassergekühlten Diamantsäge wurde jede Defektstelle isoliert. Drei Schnitte aus drei Ebenen wurden von jedem Block geschnitten. Ebenen 1 und 3 waren am nächsten zum defekten Umkreis. Ebene 2 lag im Zentrum des Defekts. Drei Schnitte aus jeder Ebene wurden entweder mit Hämatoxylin und Eosin, Goldner-Trichrom, Safranin O oder Fast-Green gefärbt. Die Schnitte wurden dann basierend auf dem vorstehend beschriebenen Schema eingeteilt. Diese Analyse vergab Punkte basierend auf der Art des reparierten Gewebes, der strukturellen Eigenschaften und den zellulären Veränderungen. Insgesamt waren 24 Punkte möglich.

Ergebnisse und Schlussfolgerung

[0278] Nach 6 Wochen wurden bestimmte der vorstehend behandelten Tiere getötet und immunhistochemische Bewertungen wurden, wie hierin anderswo beschrieben, durchgeführt. Die Ergebnisse waren wie folgt: in allen Fällen zeigten die mit OP-1-CMC/Kollagenvorrichtung behandelten Defekte eine überragende Reparatur. Mit der OP-1-CMC/Kollagenvorrichtung gab es unerwartet vollständige oder fast vollständige Überbrückung der Defekte mit Knorpelgewebe. Typ II-Kollagenfärbung wurde im reparativen Knorpel mit wenig oder keiner Typ I-Kollagenfärbung beobachtet. Proteoglycanfärbung folgte der Typ II-Kollagen Lokalisierung mit dunklerer Färbung in Gebieten, die mehr dem reifen Hyalinknorpel ähnelten. Basierend auf Safranin O-Färbung war die Regeneration der Oberflächenschicht des Knorpels 6 Wochen nach der Behandlung noch nicht komplett.

[0279] Nach 12 Wochen war die Heilung in den Defekten, die mit verbesserten Vorrichtungen behandelt waren, erheblich fortgeschritten. In den Kontrollen wurde keine sichtbare Heilung beobachtet. Die mit verbesserten Vorrichtungen beobachtete, durchschnittliche, grobe Einteilungsbewertung nach 12 Wochen war $6,50 \pm 0,89$ ($n = 8$); Kontrolldurchschnitt war $3,69 \pm 0,70$ ($n = 8$). Bei allen verbleibenden Zeitpunkten wird erwartet, dass die Defekte, die mit den verbesserten osteogenen Vorrichtungen behandelt werden, fortgeschrittenere Knorpelregeneration und Chondrocyten- und Knorpelphänotyp in einer beschleunigten Weise im Vergleich mit Defekten zeigen werden, die nur mit Kollagen/CMC behandelt oder unbehandelt belassen wurden. Von den mit verbesserter osteogener Vorrichtung behandelten Defekten wird erwartet, dass sie Knorpel- und subchondrales Knochengewebe zeigen, wohingegen von den mit Kollagen/CMC behandelten oder unbehandelten Defekten erwartet wird, dass sie unorganisierte Knochen- und Knorpelbildung mit beträchtlichem Fasergewebe induzieren.

[0280] Osteochondrale Defekte von gesamter Dicke können unter Verwendung von CMC-enthaltenden osteogenen Vorrichtungen gemäß den Verfahren der vorliegenden Erfindung stabil repariert werden. Es wird erwartet, dass Experimente, die ähnlich jenen vorstehend beschriebenen sind, in welchen andere bevorzugte Bindemittel wie zum Beispiel Fibrinkleber bewertet werden, zeigen werden, dass verbesserte osteogene Vorrichtungen osteochondrale Defekte von gesamter Dicke stabil reparieren können.

E. Reparatur von chondralen Defekten unter Verwendung von verbesserten osteogenen Vorrichtungen, die Carboxymethylcellulose enthalten

1. Experiment 1: Langzeit-Bewertung der Reparatur von chondralen im Vergleich zu osteochondralen Defekten (Schaf)

[0281] Diese Studie bewertet die Reparatur von sowohl chondralen als auch osteochondralen Defekten durch verbesserte osteogene Vorrichtungen unter Verwendung eines Modells mit großen Tieren. Die erhöhte Dicke des artikulären Knorpels und die Ähnlichkeit zum Menschen in Größe und Gewichtstragenden Eigenschaften machen das Schaf zu einem Modell, von welchem menschliche klinische Anwendungen extrapoliert werden können, insbesondere für klinische Anwendung von verbesserte osteogenen Vorrichtungen für die Reparatur von chondralen Defekten. Die Untersuchungsgruppen sind wie folgt:

A-Osteochondrale (gesamte Dicke) Defekte (5 mm Durchmesser);

Gruppe A I: keine Behandlung

Gruppe A II: Carboxymethylcellulose/Kollagen
 Gruppe A III: Carboxymethylcellulose/OP-1/Kollagen
 Gruppe A IV: lyophilisiertes allogenes Transplantat
 Gruppe A V: lyophilisiertes allogenes Transplantat + OP-1

B-Chondrale (teilweise Dicke) Defekte (5 mm Durchmesser);

Gruppe B I: keine Behandlung
 Gruppe B II: Carboxymethylcellulose/Kollagen
 Gruppe B III: Carboxymethylcellulose/OP-1/Kollagen
 Gruppe B IV: Hyaluronsäure + Chondroitinsulfatpaste
 Gruppe B V: Hyaluronsäure + Chondroitinsulfatpaste + OP-1

[0282] Beide Vorderkniegelenke jedes Schafs werden operiert und es werden zwei Defekte pro Gelenk erzeugt (jeweils einer auf dem medialen und dem lateralen Condylus). Eines der Gelenke hat zwei standardisierte chondrale Defekte von teilweiser Dicke (5 mm im Durchmesser), erzeugt auf jedem Condylus, während das andere Gelenk zwei tiefere osteochondrale Defekte mit voller Dicke (etwa 1-2 mm in den subchondralen Knochen) hat. Jede Gruppe hat eine Untergruppe, die früh bei 8 Wochen getötet wurde, und eine andere, die für Langzeitbewertungen für 6-7 Monate behalten wird.

[0283] Es gibt insgesamt 20 Gruppen und 12 Defekte pro Gruppe. Die Gesamtzahl der Defekte ist daher 240 und die Gesamtzahl der Schafe ist 60. Es gibt fünf verschiedene Behandlungsgruppen; drei Kontrollen (keine Behandlung und zwei unterschiedliche Scheinvorrichtungen) und zwei unterschiedliche OP-1-Formulierungen für jeden Defektyp. Verbesserte osteogene Vorrichtungen, die OP-1 in CMC/Kollagen umfassen, werden für osteochondrale Defektreparatur und chondrale Defektreparatur verwendet werden. Die Vorrichtungen werden so zusammengestellt, dass 2,5 mg OP-1/g Kollagen zu jeder Defektstelle hinzugefügt werden, welche diese verbesserte osteogene Vorrichtung erhält. Die Reparatur wird bei 8 Wochen und 6-7 Monaten bewertet. Das Behandlungsprotokoll wird in Tabelle 18 gezeigt.

Tabelle 18: Reparatur von chondralen und osteochondrale Defekten im Schaf unter Verwendung von OP-1

Gruppe	Schaf (4Defekte/Schaf)	Osteochondral (2 Defekte/Schaf)	Chondraler Defekt (2 Defekte/Schaf)	Dauer
I	12	unbehandelte Kontrolle	unbehandelte Kontrolle	8 Wochen (6) >26 Wochen (6)
II	12	CMC/Kollagen Kontrolle	CMC/Kollagen Kontrolle	8 Wochen (6) >24 Wochen (6)
III	12	OP-1 + CMC/Kollagen	OP-1 + CMC/Kollagen	8 Wochen (6) >24 Wochen (6)

[0284] Die Operationen an den beiden Knien werden über zwei Wochen gestaffelt, um die Heilung des ersten Knies vor der Operation am zweiten Knie zu ermöglichen. Die erste Operation wird verwendet, um chondrale Defekte zu erzeugen, die zweite ist für osteochondrale Defekte. Die Operation wird in einem vollständig ausgerüsteten Operationssaal unter Verwendung von Standardtechniken und -Geräten durchgeführt, die bei der Chirurgie am Menschen verwendet werden. Es wird den Schafen ermöglicht, nach der Operation frei auf ihrem Weidegebiet zu wandern. Die gestaffelten Operationen resultieren in 8-Wochen-Heilungszeiten für chondrale Defekte und 6-Wochen-Heilungszeit für osteochondrale Defekte. Bei der Tötung werden die Gelenke durchspült, fixiert und gemäß cytologischen Standard-Protokollen verarbeitet.

[0285] Am Ende der Untersuchungsperioden werden die Tiere getötet und die Gelenke im Ganzen entnommen. Das grobe Erscheinungsbild der Defektstelle und des reparierten Gewebes wird unter Verwendung von Routineverfahren, wie jenen, die vorstehend beschrieben wurden, eingeteilt. Punkte werden gemäß der Anwesenheit von intra-artikulären Adhäsionen, Wiederherstellung der artikulären Oberfläche, Knorpelerosion und dem Aussehen vergeben.

[0286] Unter Verwendung von Verfahren, die jenen vorstehend beschriebenen ähnlich sind, werden Proben für histologische Beurteilung sofort nach der groben Einteilung und Photographie erzeugt.

[0287] Es wird erwartet, dass Defekte, die mit OP-1/CMC/Kollagenvorrichtungen behandelt wurden, eine bessere Reparatur zeigen werden, ähnlich zu jener vorstehend in Experiment D. 2 erwähnten. Es wird ferner erwartet, dass verbesserte osteogene Vorrichtungen, welche irgendwelche der vorstehend erwähnten, bevorzugten Bindemittel enthalten, wie zum Beispiel Fibrinkleber, auch die Reparatur von sowohl chondralen als auch osteochondralen Defekten zeigen werden.

2. Experiment 2: Langzeitbewertung von Reparatur unter Verwendung von unterschiedlichen Dosierungen an OP-1 in subchondralen Defekten (Ziegen)

[0288] Eine Untersuchung unter Verwendung von Milchziegen mit reifem Skelett wird durchgeführt, um die Wirksamkeit von verbesserter osteogener Vorrichtung zur Reparatur von osteochondralen/chondralen Defekten zu zeigen. Formulierungen von verbesserter osteogener Vorrichtung mit unterschiedlichen Konzentrationen an rhOP-1 werden gemeinsam mit Scheinkontrollen oder Kontrollen ohne Vorrichtung verwendet. Die Scheinvorrichtungen bestanden aus Kollagen, gemischt mit Carboxymethylcellulose (CMC). Darüber hinaus werden die Tiergruppen bei 4, 12 und 24 Monaten nach der Operation getötet, um die Rate und Stabilität der Defektreparatur zu vergleichen. Das Folgende fasst die experimentellen Parameter zusammen:

Gruppen

Zeit nach Operation:

	<u>4 Monate</u>	<u>12 Monate</u>	<u>2 Jahre</u>
1. rhOP-1 800 µg/ml	A	B	C
2. rhOP-1 1600 µg/ml	A		
3. rhOP-1 3200 µg/ml	A		
4. Scheinvorrichtung	A	B	
5. keine Vorrichtung	A	B	

[0289] Kurz gesagt werden subchondrale Defekte in den linken Knien von 56 Milchziegen erzeugt, die ein voll entwickeltes Skelett aufwiesen: Die Defekte sind 8 mm im Durchmesser und 3 mm tief. Diese Defektkonfiguration verhindert sehr hohe Scherbeanspruchung im Defekt, was zur Bildung von Typ I-Kollagen führt. Holländische Milchziegen, die etwa 2 Jahre alt sind und ungefähr 50 kg wiegen, werden in diesem Experiment verwendet. Vorrichtungen, die 2,5 mg rhOP-1/Gramm Kollagen entsprechen, werden bereitgestellt. In jedem Fall werden 0,2 Gramm CMC zu der osteogenen Standardvorrichtung hinzugefügt, dann werden ungefähr 2,6 ml Salzlösung hinzugefügt und gemischt. Das ergibt Material von ungefähr 3—4 ml an verbesserter osteogener Vorrichtung. Dieses Material wird dann verwendet, um das Defektvolumen zu füllen.

Operationstechnik

[0290] Anästhesie wird induziert und das linke Knie wird mittels eines medialen parapatellaren Ansatzes geöffnet. Die Patella wird auf die laterale Seite disloziert und der mediale Condylus wird freigelegt. Mit einer scharfen hohlen Röhre werden die Umrisse eines Defekts im vorderen, Gewichts-tragenen Teil des medialen Condylus gemacht. Mit einem quadratisch zugespitzten Handbohrer, der in die Röhre platziert wird, wird ein Defekt bis in den subchondralen Knochen erzeugt. Die proximale Tibia wird dann exponiert und ein periostaler Lappen vom gleichen Durchmesser wie der Defekt in dem medialen Condylus wird entnommen. Der periostale Lappen wird teilweise fixiert, mit seiner Cambiumschicht in Richtung des Defekts, zu den Überresten. Der Defekt wird mit dem entsprechenden Testmaterial gefüllt und unter Verwendung einer resorbierbaren Naht mit dem periostalen Lappen bedeckt. Die CMC-Vorrichtung wird über eine Nadel hinzugefügt, bis der Defekt gefüllt ist, und dann wird der Lappen vollständig angenäht. In Kontrolltieren wird eine Scheinvorrichtung einschließlich nur Kollagen und CMC verwendet. Eine zweite Kontrollgruppe erhielt gar kein Implantat, erhielt aber einen pe-

riostalen Lappen.

Postoperative Behandlung

[0291] Uneingeschränkte, Gewichts-tragende Aktivität wird, soviel nach der Operation toleriert werden kann, erlaubt.

Klinische Durchführung

[0292] Das Muster der Gewichtsbelastung wurde bei 2, 4, 6 und 8 Wochen und danach alle 4 Wochen bestimmt.

Grobe Analyse

[0293] Grobe Bewertungen werden basierend auf dem vorstehend gezeigten Schema gemacht. Nach der Tötung des Tieres wird die Anwesenheit oder Abwesenheit der Kniekontrakturen protokolliert und sowohl Patella als auch Condylen des Oberschenkelknochens werden auf Adhäsion, artikuläre Oberflächenkontur, Aussehen des wiederhergestellten Knorpels und Anwesenheit oder Abwesenheit von Knorpelerosionen bewertet. Jeder dieser Eigenschaften wird eine Bewertung verliehen. Farbaufnahmen werden unter Verwendung eines Makroobjektivs gemacht.

Histologische Analyse

[0294] Um die Sichtbarmachung des regenerierten subchondralen Knochens zu unterstützen und die Grenzen des Defekts während der histologischen Bewertung zu lokalisieren, erhalten die Ziegen vor der Tötung ein doppelt markiertes Tetracyclin. Das ermöglicht die Histomorphometrie der Knochenfüllung des tieferen Teils des Defekts. Die histologischen Proben werden auch durch Einbau von polarisierter Mikroskopie betrachtet, um Information über reguläre strukturelle Merkmale bereitzustellen.

[0295] Zur histologischen Analyse werden die Proben, einschließlich des subchondralen Knochens, in 10% Phosphat-gepuffertem Formalin fixiert und werden nicht entkalkt in Methylmethacrylat (MMA) eingebettet. Mit einem Hochleistungsmikrotom werden 5 µm dicke Schnitte gemacht. Die Schnitte werden mit Toluidinblau gefärbt, um Knorpel zu identifizieren, und mit Goldner-Trichrom, um Knochen zu identifizieren. Gewebe-Hyalinität, Affinität der Matrix für Toluidinblau (Metachromasil), Oberflächen-Irregularität, durch Chondrocyten-Klusterbildung wiederhergestellter subchondraler Knochen, Bindung an den benachbarten Gelenkknorpel, entzündliche Zellinfiltration um das Implantat, und Freiheit von degenerativen Veränderungen im benachbarten Knorpel werden bewertet. Jeder dieser Eigenschaften wird eine Bewertung gegeben.

Biochemische Analyse

[0296] Extraktion von Proteoglycanen: für die biochemische Analyse werden Kontrollknorpel und Gewebe vom Defekt in kalter Phosphat-gepufferter Salzlösung (PUBS) gesammelt. Proteoglycane werden aus lyophilisierten Schnitten durch Behandlung mit 4 M Guanidin-HCl, 0,15 M Kaliumacetat bei pH-Wert 5,8 in der Anwesenheit von Proteinase-Inhibitoren (5 mM Benzamindin, 0,1 M 6-Amino-n-hexansäure, 10 mM EDTA, 5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid und 5 mM n-Ethylmaleimid) bei 4°C für 60 Stunden extrahiert. Der Extrakt und der Rückstand werden getrennt. Der Rückstand wird mit Extraktionspuffer gründlich gespült, welcher zum Extrakt hinzugefügt wird. Die Extrakte werden auf Gehalt an Chondroitinsulfat analysiert und für die Gelextraktion verwendet.

[0297] Gelfiltration: Aliquote der Extrakte werden auf Sepharose C 12 B-Säulen (0,66 × 145 cm) (Pharmacia AB, Uppsala, Schweden) aufgetragen und mit einem Dissoziationspuffer bei pH-Wert 6,1 eluiert, der 4 M Guanidin-HCl, 0,1 Natriumsulfat, 0,05 M Natriumacetat und 0,1% Triton X-100 enthält. Die Durchflussrate ist 1,2 ml/Std. Die Fraktionen werden auf Gehalt an Chondroitinsulfat untersucht. Die Menge an großen, Knorpel-spezifischen Molekülen, wahrscheinlich Aggrecanen, kann berechnet werden.

MRI

[0298] Magnetische Resonanzabbildung (MRI) wird für zwei Zwecke durchgeführt. Erstens, um einen Monat nach der Operation zu überwachen, dass der Lappen und das Implantat am Platz geblieben sind. Zweitens, Gruppe 1 C (2 Jahre oder mehr nach der Operation) wird bei 4 Monaten, 12 Monaten und bei der Tötung durch

MRI longitudinal beobachtet.

Zusammenfassung

[0299] Es wird erwartet, dass die Defekte, welche mit verbesserter osteogener Vorrichtung behandelt wurden, fortgeschrittene Knorpelwiederherstellung, Chondocyten- und Knorpelphänotyp, verglichen mit der Scheinkontrolle oder den Kontrollen ohne Vorrichtung, zeigen werden. Es wird auch erwartet, dass niedrige Dosierungen von OP-1 mindestens Reparatur erzielen werden, die quantitativ und qualitativ ähnlich jenen mit den höheren Dosierungen sind.

F. Reparatur von chondralen Defekten unter Verwendung des osteogenen Proteins

[0300] In dieser Untersuchung wurde die Säuger-Knorpelbildung in subchondralen Läsionen untersucht, die mit rekombinantem menschlichem osteogenem Protein-1 (rhOP-1) (alleine oder in Kombination mit einer Kollagenmatrix) und/oder autologen Perichondrium behandelt wurden.

Material und Verfahren

[0301] Im medialen Oberschenkelcondylus des linken Kniegelenks von 15 Ziegen wurde ein subchondraler Defekt von 9 mm Durchmesser erzeugt. Der Defekt wurde mit einem Implantat gefüllt, bestehend aus frisch koaguliertem Blut, gemischt mit: (a) keinen Partikeln von autologen Ohr-Perichondrium; oder (b) rhOP-1; oder (c) rhOP-1 mit Ohr-Perichondrium. Rh-OP-1 wurde entweder in Kombination mit einer Kollagenmatrix (OP-1-Vorrichtung) oder ohne eine Kollagenmatrix (OP-1 alleine) hinzugefügt. Der Defekt wurde mit einem periostalen Lappen geschlossen, welcher an den Knorpel genäht wurde. Nach Implantationszeiten von 1, 2 und 4 Monaten wurde das Reparaturausmaß von jedem Defekt mit histologischen Standard-Techniken (Metachromasie und Hyalinität) und gut bekannten biochemischen Verfahren (Gelchromatographie von Proteoglycanen) untersucht.

Ergebnisse

[0302] Nach 1 und 2 Monaten in dieser besonderen Studie gab es keine offensichtlichen Unterschiede zwischen Kontrolle (Implantat (a) vorstehend) und den verschiedenen mit OP-1 behandelten Defekten. Nach 4 Monaten jedoch zeigte nur einer von drei Kontrolldefekten nachweisbare Knorpelbildung, während alle vier mit OP-1 behandelten Defekte völlig oder teilweise mit Knorpel gefüllt wären, wie durch die in Tabelle 19 dargestellte histologische und biochemische Analyse angezeigt wird.

Tabelle 19

Implantat	% des Defekts ¹	A biochemische Bewertung	B histologische Bewertung	Knorpel Punktezahl ²	
Kontrolle	86%	0.7	0.0	0.60	
	14%	3.0	4.0	0.98	1.58
OP-1 Vorrichtung	62%	2.0	4.0	3.72	
	38%	3.3	6.0	3.53	7.25
OP-1 Vorrichtung +Perichon	79%	1.2	2.0	2.53	
	21%	5.7	6.0	2.46	7.99
OP-1 alleine	79%	2.0	5.0	5.53	
	21%	2.1	6.0	1.70	4.23
Op-1 +Perichon	78%	1.0	2.0	2.34	
	22%	4.2	5.0	2.02	4.36

1 Der Defekt wurde in homogene Teile geteilt, die % werden angezeigt.

2 Berechnet wie folgt: % × (A + B), z.B. 0,86 × (0,7 + 0,0) = 0,60.

[0303] Tabelle 19 legt die Knorpelbewertung von kondylären Defekten dar, die für 4 Monate ohne OP-1 (Kontrolle) oder mit OP-1 mit oder ohne Perichondrium in der Anwesenheit oder Abwesenheit einer Kollagenmatrix behandelt wurden.

[0304] Der biochemischen Bewertung (A) wurde basierend auf Gelchromatographie ein Wert von 0-5 zugewiesen.

[0305] Die histologische Bewertung (B) basiert auf nicht entkalkten, plastischen Schnitten auf einer Einteilungsskala von 0 bis 6.

Schlussfolgerung

[0306] Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen, dass OP-1 in Ziegen eine Knorpelfördernde Fähigkeit in großen subchondralen Defekten aufweist. Das deutet darauf hin, dass OP-1 in der Behandlung von großen Läsionen des Gelenkknorpels eine klinische Relevanz aufweist und für die chondrale Reparatur von Gewichtstragenden Skeletdefekten, die durch Trauma oder Erkrankung in Säugern hervorgerufen wurden, besonders nützlich ist.

[0307] In ähnlichen Studien wird erwartet, dass die anderen verbesserten osteogenen Vorrichtungen wie zum Beispiel Fibrinkleber enthaltende Vorrichtungen in der Reparatur von großen subchondralen Defekten resultieren werden. Darüber hinaus wird eine solche Reparatur durch die Regeneration von stabilerem, makellosem Gelenkknorpel begleitet sein. Es wird ferner erwartet, dass die Reparatur eines subchondralen Defekts, im Vergleich mit nur mit Kollagen vermischem OP-1, bei einer beschleunigten Rate mit verminderten Mengen an OP-1 stattfinden wird, wenn es mit Kollagenmatrix und einem Bindemittel wie zum Beispiel CMC gemischt wird. Darüber hinaus wird eine solche Reparatur durch die Regeneration von stabilerem, makellosem Gelenkknorpel begleitet sein.

G. Reparatur von segmentalem Defekt (kritische und nicht kritische Größe) unter Verwendung von verbesserten osteogenen Vorrichtungen, welche Apatite und/oder Tricalciumphosphate (TOP) und/oder Kollagematrizen enthalten.

[0308] Verbesserte Vorrichtungen, die eine Vielzahl an Matrizen umfassen, oder Mischungen davon werden bei unterschiedlichen Dosierungen an OP-1 verwendet werden, um segmentale Ulna-Defekte in Kaninchen und Hunden zu reparieren (kritische und nicht kritische Größe). Verbesserte Vorrichtungen werden umfassen: Pyrost®-Matrix (Osten AG, Schweiz), einen HAp-Block, stammend aus Rinderknochen; 100% HAp-Körnchen (ungefähr 300-400 oder 350-450 µ); 100% TCP (ungefähr 400 µ); und 50% HAp/50% TCP (ungefähr 400 µ). Andere Ausführungsformen werden eine oder mehrere der vorher beschriebenen Matrizen von geeigneter Porosität umfassen. Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der verbesserten osteogenen Vorrichtung wird Collapat® Matrix (Osten AG, Schweiz) enthalten, einen Schwamm von HAp und Kollagen. Eine andere besonders bevorzugte Ausführungsform umfasst ungefähr 0,6 g CMC pro HAp-Körnchen oder pro g Körnchen von 75%HAp/25% TCP, insbesondere wenn eine Vorrichtung mit Kittkonsistenz gewünscht wird. Eine andere bevorzugte Ausführungsform, die vorstehend beschrieben wird, enthält β-TCP und Fibrinkleber.

[0309] Es wird erwartet, dass verbesserte Vorrichtungen wie jene, die vorstehend beschrieben wurden, die Reparatur von segmentalen Defekten induzieren werden und bestimmte bevorzugte Ausführungsformen das auch bei niedrigen OP-1-Dosierungen tun werden.

H. Knochenbildung unter Verwendung von Fibrinkleber als ein Bindemittel

[0310] Vier subkutane Studien in Ratten wurden zur Bewertung des Effekts der Fibrinkleber-OP-1-Formulierung auf Knochenbildung fertig gestellt. Die Menge an Knochenbildung bei 10 µg OP-1 unter Verwendung der drei unterschiedlichen Quellen an Fibrinkleber war ähnlich, reichend von 25% bis 40% (siehe Tabellen 19A-19F). Es gab in diesen Studien keine klare Korrelation zwischen Entzündung und Knochenbildung. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Ratten unterschiedlich mit Fibrinkleber aus unterschiedlichen Arten reagierten; zum Beispiel rief menschlicher Fibrinkleber von Tissucol® eine entzündlich Reaktion von 2 bis 2,7 (siehe Tabelle 19A) hervor, Rinderfibrinkleber verursachte eine entzündliche Reaktion von 2 bis 3,5 (siehe Tabellen 19B und 19C) und Ratten-Fibrinkleber hatte die niedrigste entzündliche Reaktion von 1 bis 1,3 (siehe Tabelle 19D) auf einer Skala von 0-4. Üblicherweise wird eine entzündliche Reaktion von 3-4 als schwer definiert und 1-2 wird als leicht bis mittel definiert.

TABELLE 19A: IN VIVO-Daten von Tissucol®/OP-1

Studie	OP-1 µg	Halbes Explantat Gew., mg	Ca ²⁺ , µg/mg	%Knochen/ Histologie	Fibrose (0-4)	Entzündung (0-4)
	n = 4					
Tissucol®	0	n.g.	<1	0	2,3 +/- 0,6	2,7 +/- 1,2
Tissucol®	10	16 +/- 6	15 +/- 23	25 +/- 25	3,3 +/- 1,0	2,5 +/- 0,6

Tissucol®	20	58 +/- 42	39 +/- 9	66 +/- 32	1,8 +/- 0,5	2 +/- 0,8
OP-1	10	29 +/- 21	49 +/- 8	95 +/- 6	0,8 +/- 0,5	0,5 +/- 0,6

20 µl OP-1 (10 µg oder 20 µg in 5% Lactose) wurden vor der subkutanen Implantation mit 50 µl Fibrinogen (70-110 mg/ml) und 50 µl Thrombinlösung (500 E/ml) gemischt.

TABELLE 19B: IN VIVO-Daten von Rinderfibrinkleber

(Implantat)	OP-1 µg	Halbes Explantat Gew., mg	Ca ²⁺ , µg/mg	%Knochen/ Histologie	Fibrose (0-4)	Entzündung (0-4)
	n = 4					
6% Fibrin- kleber	0	n.g.				
6% Fibrin- kleber	10	18 +/- 8	25 +/- 12	40 +/- 43	2,3 +/- 0,6	2 +/- 1
OP-1	10	58 +/- 8	65 +/- 10	100 +/- 0	0,75 +/- 0,5	0 +/- 0

20 µl OP-1 (10 µg in 5% Lactose) wurden vor der subkutanen Implantation mit 50 µl Rinderfibrinogen (60 mg/ml) und 50 µl Rinder-Thrombinlösung (300 E/ml) gemischt.

TABELLE 19C: IN VIVO-Daten von Rinderfibrinkleber

(Formulierung)	OP-1 µg	Halbes Explantat Gew., mg	Ca ²⁺ , µg/mg	%Knochen/ Histologie	Fibrose (0-4)	Entzündung (0-4)
	n = 4					
4% Fibrin- kleber	0	n.g.	<3	<u>0</u>	2,25 +/- 1	3 +/- 1,4
4% Fibrin- kleber	10	15 +/- 7	10 +/- 8	24 +/- 25	2,5 +/- 0,6	3,5 +/- 1
OP-1	10	8 +/- 5	42 +/- 7	88 +/- 10	1 +/- 0	0 +/- 0

20 µl OP-1 (10 µg in 5% Lactose) wurden vor der subkutanen Implantation mit 50 µl Rinderfibrinogen (40 mg/ml) und 50 µl Rinder-Thrombinlösung (200 E/ml) gemischt.

TABELLE 19D: IN VIVO-Daten von Rattenfibrinkleber

	OP-1 µg	Halbes Explantat, mg	Ca ²⁺ , µg/mg	%Knochen/ Histologie	Fibrose (0-4)	Entzündung (0-4)	% Cyst.
	N=4						
Rattenfibrin	10	32 +/- 13	2 +/- 0,6	13 +/- 19	1,3 +/- 0,5	1,0 +/- 0,8	9 +/- 12
Verd. 2	10	38 +/- 23	2 +/- 0,8	23 +/- 21	1,8 +/- 0,5	1,3 +/- 0,5	26 +/- 18

20 µl OP-1 (10 µg in 5% Lactose) wurden vor der subkutanen Implantation mit 50 µl Rinderfibrinogen (40 mg/ml) und 50 µl Rinder-Thrombinlösung (200 E/ml) gemischt.

[0311] Zwei andere in vivo-Studien in Ratten wurden zur Bewertung des Effekts der Vorrichtungen auf die Knochenbildung ausgeführt, die Fibrinkleber und OP-1 enthielten. In der ersten Studie wurden Rinderfibrinogen (50 µl, Sigma F8630, 10 mg/ml) und Rinder-Thrombin (50 µl/ml, 50 E/ml) genau vor der subkutanen Implantation mit OP-1-Vorrichtungen gemischt. Die positiven Kontrollen sind OP-1-Vorrichtungen, die mit 100 µl Phosphat-gepufferter Salzlösung benetzt sind. Die OP-1 Vorrichtungen werden durch Mischen von 10 µg OP-1 in 47,5% Ethanol/0,01% TFA mit 25 mg Kollagen gemischt und über Nacht lyophilisiert. Die Ergebnisse werden in Tabelle 19E gezeigt. Es gab keinen wesentlichen Unterschied in der Knochenbildung zwischen Standard-OP-1-Vorrichtungen und OP-1-Vorrichtungen, die mit Rinder-Fibrinkleber kombiniert waren. Auch wurde eine niedrigere Entzündungsreaktion auf die OP-1-Vorrichtungen/Rinder-Fibrinkleber-Formulierungen beobachtet, verglichen mit der Kombination von flüssigem OP-1-Rinder-Fibrinkleber (siehe TABELLE 19B und 19C).

TABELLE 19E: IN VIVO-Daten von Rinderfibrinkleber mit OP-1-Vorrichtung

(Formulierung)	OP-1 µg	Halbes Explantat, mg	Ca ²⁺ , µg/mg	%Knochen/ Histologie	Fibrose (0-4)	Entzündung (0-4)
	n = 4					
Fibrin + OP-1 Vorrichtung	0	62 +/- 15	20 +/- 7	0 +/- 0	2,0 +/- 0,0	1,0 +/- 0,0
Fibrin + OP-1- Vorrichtung	10	123 +/- 21	43 +/- 11	66 +/- 13	1,5 +/- 0,6	1,3 +/- 0,5
OP-1- Vorrichtung	10	144 +/- 33	54 +/- 5	78 +/- 13	1,0 +/- 0,8	0,5 +/- 0,6

[0312] In einer zweiten Studie wurden unterschiedliche Konzentrationen an Tissucol® mit der OP-1-Standardvorrichtung kombiniert. Das heißt, eine lyophilisierte OP-1-Vorrichtung (25 mg Gesamtgewicht, 10 µg OP-1) wurde mit menschlicher Fibrinogenlösung (50 µl, Fibrinogen 70-110 mg/ml oder 2- oder 4- oder 8-fach in Phosphat-gepufferter Salzlösung verdünnt) und Thrombinlösung (50 µl, 500 E/ml oder 2- oder 4- oder 8-fach in Phosphat-gepufferter Salzlösung verdünnt) sofort vor der Implantation vereinigt. Die positiven Kontrollen sind OP-1-Vorrichtungen, die mit 100 µl Phosphat-gepufferter Salzlösung benetzt sind. Die Ergebnisse werden in TABELLE 19F gezeigt. Es gibt keinen wesentlichen Unterschied in Knochenbildung zwischen Standard-OP-1-Vorrichtungen und OP-1-Vorrichtungen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen an Tissucol® kombiniert sind. Die Konzentration von Fibrinogen hatte auch keinen wesentlichen Effekt auf die Knochenbildung.

TABELLE 19F: IN VIVO-Daten von Tissucol®/mit OP-1-Vorrichtungen

	OP-1, µg	Halbes Explantat, mg	Ca ²⁺ , µg/mg	%Knochen/ Histologie	Fibrose (0-4)	Entzündung (0-4)
97-0137 (#1111)	n = 4					
OP-1+ Tissucol®	10	163 +/-50	37 +/- 7	55 +/- 30	2,0 +/-0,8	1,8 +/- 1,0
OP-1+2- fach verdünntes Tissucol®	10	162 +/-32	34 +/- 8	54 +/- 13	1,8 +/-1,0	1,8 +/- 1,0
OP-1+4- fach verdünntes Tissucol®	10	170 +/-19	41 +/- 6	69 +/- 26	1,5 +/-1,0	1,5 +/- 1,0
OP-1+8- fach verdünntes Tissucol®	10	177 +/-23	40 +/- 8	55 +/- 25	1,8 +/-1,0	1,8 +/- 1,0
OP-1- Vorrichtung	10	137 +/-43	58 +/- 10	84 +/- 8	1,0 +/-0,0	1,0 +/- 0,0

[0313] Zusammenfassend wird die Handhabungseigenschaft der OP-1-Standardvorrichtungen durch die Verwendung von z.B. Fibrinkleber verbessert und die Kollagenpartikel bleiben im Kleber integriert. Die in vivo-Daten deuteten darauf hin, dass OP-1-Vorrichtungen mit Fibrinkleber die Knochenbildung fördern.

I. Defektreparatur unter Verwendung verbesserter osteogener Vorrichtungen, die Fibrinkleber als ein Bindemittel enthalten

[0314] Verbesserte Vorrichtungen, die Fibrinkleber enthalten und eine Vielzahl an Matrizen oder Beimischungen davon umfassen werden bei unterschiedlichen OP-1-Dosierungen in im Fachgebiet anerkannten Tiermodellen zur Reparatur von Knochen, osteochondralen oder chondralen Defekten verwendet werden. Andere Ausführungsformen von bevorzugten Vorrichtungen werden umfassen: Fibrinkleber, Kollagen und OP-1. Andere Ausführungsformen von bevorzugten Vorrichtungen werden umfassen: Fibrinkleber, β -TCP und OP-1. Schließlich wird eine weitere Überprüfung alle der vorstehend erwähnten Matrixmaterialien umfassen, die für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet sind.

[0315] Es wird erwartet, dass verbesserte, Fibrinkleber-enthaltende Vorrichtungen wie jene, die vorstehend beschrieben werden, die Knochenbildung in Defekten mit kritischer und nicht kritischer Größe, Pseudoarthrose-Frakturen und Frakturen fördern und beschleunigen sowie die Reparatur von osteochondralen und chondralen Defekten fördern und beschleunigen.

J. Reparatur von segmentalem Defekt vom (kritischer und nicht-kritischer Größe) unter Verwendung einer verbesserten Vorrichtung die Fibrinkleber enthält

[0316] Das Folgende ist eine vergleichende experimentelle Studie der Wirksamkeit von verbesserten, Fibrinkleber-enthaltenden Vorrichtungen zur Heilung von segmentalen Defekten (von kritischer und nicht-kritischer Größe).

Testsystem

[0317] Wie vorstehend beschrieben, wurden in dieser Studie ausgewachsene Mischlingshunde, die für diesen Zweck gezüchtet wurden, benützt. Spezielle Aufmerksamkeit wurde der Auswahl der Tiere von einheitlicher Größe und einheitlichem Gewicht gezollt, um die Variabilität in der Knochengeometrie und- Belastung zu limitieren.

[0318] Wie auch vorstehend beschrieben, wurde die Operation unter Verwendung von aseptischen Standard-Techniken unter Isofluorangas-Anästhesie durchgeführt. Beide Vorderextremitäten wurden präpariert und auf sterile Weise abgedeckt. Ein lateraler Einschnitt, von ungefähr zwei Zentimeter Länge wird durchgeführt und die Freilegung der Ulna wird unter Verwendung von stumpfer und scharfer Präparation erhalten. Es wird entweder ein Defekt von kritischer oder nicht-kritischer Größe in der mittleren Ulna unter Verwendung einer oszillierenden Säge erzeugt. Der Radius wird für mechanische Stabilität beibehalten und es wird keine interne oder externe Fixierung verwendet. Die Stelle wird mit Salzlösung gespült und die Weichgewebe werden sorgfältig in Schichten um den Defekt geschlossen. Die entsprechende Implantatvorrichtung wird implantiert oder in die Defekt-Stelle injiziert. Der Vorgang wird dann auf der kontralateralen Seite mit dem entsprechenden Implantat wiederholt.

[0319] Den Tieren werden intramuskulär für vier Tage nach der Operation Antibiotika verabreicht und anterior-posterior Routine-Röntgenbilder werden sofort nach der Operation gemacht, um ordentliche chirurgische Platzierung sicherzustellen. Die Tiere werden in 3 × 4-Fuß-Aufwachkäfigen gehalten, bis sie zeigen, dass sie ihr Gewicht tragen können, danach werden sie in Auslaufkäfige überführt und ihnen wird uneingeschränkte Bewegung gestattet.

[0320] Röntgenbilder der Vorderextremitäten werden wöchentlich bis zu vier Wochen erhalten, dann unter Verwendung von standardisierten Belichtungszeiten und- Intensitäten zweimal wöchentlich bis 16 Wochen in den überlebenden Tieren. Röntgenaufnahmen werden bewertet und mit früheren Röntgenbildern verglichen, um die Qualität und Geschwindigkeit der Defektheilung einzuschätzen. Veränderungen in der röntgenografischen Erscheinung werden basierend auf der Anwesenheit und Dichte von neuer Knochenbildung, dem Ausmaß an Defekt-Überbrückung und der Inkorporation der Wirtsknochen-Kortexe bewertet.

Testmaterialbeschreibung

[0321] Die Implantatmaterialien enthalten rekombinantes menschliches osteogenes Protein-1 (rhOP-1) in einer Acetatpufferformulierung und rhOP-1 entweder in Fibrinkleber und Kollagen oder Fibrinkleber und β -TCP. Die rhOP-1-Formulierungen werden mit Kontrollen mit nur Träger verglichen. Die Acetatpuffer-rhOP-1-Formulierungen bestehen aus 3,5 mg/ml OP-1 in einem Lactose/Acetatpuffer, verabreicht in einem 100- μ l-Volumen. Die Trägerkontrolle besteht aus einem 100- μ l-Volumen an Lactose/Acetatpuffer. Testformulierung enthalten rhOP-1/Fibrinkleber-Kollagen oder rhOP-1/Fibrinkleber- β -TCP.

Versuchsordnung

[0322] Bilaterale segmentale Ulnadefekte von kritischer oder nicht-kritischer Größe werden in allen Tieren erzeugt. Eine Gruppe an Tieren erhält eine Injektion von 0,35 mg rhOP-1/Acetatpuffer-Formulierungen in einem Defekt und den Acetatpuffer ohne rhOP-1 in den kontralateralen Defekt. Eine andere Gruppe an Tieren erhielt eine Injektion von rhOP-1/Fibrinkleber-Kollagen oder rhOP-1/Fibrinkleber- β -TCP-Formulierung in einen Defekt und Fibrinkleber- β -TCP oder Kollagen alleine in den kontralateralen Defekt. Die Tiere wurden bei Zeitpunkten von 4, 8 und 12 Wochen nach der Operation getötet. Bestimmte Hunde erhalten bilaterale Defekte ohne Implantat (nur Defekte) und werden bei Zeitpunkten von 4, 8 und 12 Wochen nach der Operation bewertet.

Untersuchungsverfahren

[0323] Am Ende der Untersuchungsperiode werden die Tiere unter Verwendung einer intravenösen Barbitu-

rat-Überdosis getötet. Die Ulna und der Radius werden sofort im Ganzen entnommen und in eine in Salzlösung getränkte Windel gegeben. Beide Ulnae werden makrophotographiert und Kontaktröntgenaufnahmen werden gemacht, bevor die Weichgewebe vorsichtig von der Defekt-Stelle wegpräpariert werden. Eine wassergekühlte Säge wird dann verwendet, um die Ulna in eine einheitliche Länge von 9 cm, mit dem Defekt in der Mitte der Testprobe zentriert, für die biomechanische Untersuchungsbewertung zu schneiden.

[0324] Wenn die Defektheilung, basierend auf der manuellen Manipulation, ausreichend ist, werden die Proben auf Versagen in der Drehung auf einer hydraulischen MTS-Testmaschine mit geschlossenem Kreislauf (Minneapolis, MN) getestet, die mit Wegsteuerung bei einer konstanten Verdrängungsrate von 50 mm/min betrieben wird. Jedes Ende des Knochensegments wird in einer zylindrischen Aluminiummanschette befestigt und mit Methylmethacrylat zementiert. Ein Ende wird fest fixiert und das andere wird gegen den Uhrzeigersinn gedreht. Da die Hundeulna eine leichte Krümmung aufweist, werden die Proben außermittig befestigt, um die Rotation der Proben koaxial mit der der Testvorrichtung zu belassen. Die Drehkraft wurde mit einem Hebelarm von 6 cm ausgeübt. Kraft-Winkel-Verschiebungskurven wurden hergestellt, durch welche das Drehmoment und die Winkeldeformation bis zum Versagen erhalten wurde, und die Energieabsorption bis zum Versagen wird als das Gebiet unter der Belastungs—Verschiebungskurve berechnet.

[0325] Sowohl getestete als auch nicht-getestete Proben werden für eine histologische Bewertung präpariert. Die einzelnen Proben werden durch Eintauchen in eine 10% gepufferte Formalinlösung sofort nach der mechanischen Testung oder nach der Schnitterzeugung in nicht-getesteten Proben fixiert. Auf einer wassergekühlten Diamantsäge werden die Proben geteilt, indem die Proben entlang ihrer Längsachse geteilt werden. Dieses Verfahren resultiert in zwei Teilen von jeder Probe für histologische Präparationen, einschließlich nicht-entkalkter geschliffener Schnitte und nicht-entkalkte Mikrotomschnitte. Die histologischen Schnitte werden auf die Qualität der Vereinigung, das Aussehen und die Qualität des kortikalen Knochens und der Spongiosa und auf Knochen-Umformung bewertet.

Ergebnisse

[0326] Es wird erwartet, dass Fibrinkleber enthaltende, verbesserte Vorrichtungen die mit irgendeiner der vorstehend erwähnten bevorzugten Matrizen wie zum Beispiel Kollagen oder β -TCP die Reparatur von segmentalen Defekten mit sowohl kritischer als auch nicht-kritischer Größe fördern werden.

VII. Menschliche Klinische Studien: Verfahren der Verwendung von verbesserten osteogenen Vorrichtungen

A. Reparatur von Knochendefekten:

1. Test 1: Frische offene Tibiafraktur

[0327] Diese Studie ist eine multizentrische, prospektive, randomisierte Studie von Patienten mit frischen Frakturen der Tibia, die operative Intervention an der Frakturstelle benötigen.

Einführung

[0328] Im Moment gibt es weltweit jährlich ungefähr 26 Millionen Frakturen. Der Hauptteil der Frakturen heilt ohne Komplikationen und wird nicht als ein „Problem“ angesehen. Es gibt jedoch eine „Beeinflussung der Lebensqualität“ bei Patienten, die nicht arbeiten können oder daran gehindert sind, an normaler Aktivität teilzuhaben, nicht in der Lage sind, wieder zu einer Aktivität zurückzukehren, oder, wenn sie das tun, an fortbestehenden Schmerzen leiden. Patienten, besonders in der westlichen Welt, erwarten zu diesen Problemen mehr und mehr Lösungen.

[0329] Die mit Frakturbehandlung verbundenen Kosten sind erstaunlich. 1988 kosteten Frakturen in den Vereinigten Staaten geschätzte \$20 Milliarden. Der größte Teil, ungefähr 44% oder \$7,2 Milliarden, stand im Zusammenhang mit der Behandlung von stationären Patienten. In diesem Jahr wurden fast 900.000 Personen für Frakturen in's Krankenhaus eingewiesen, mit einer durchschnittlichen Aufenthaltsdauer von 8,8 Tagen für eine Gesamtheit von 7,9 Millionen Tagen. Die Kosten für Pflegeheime lagen mit \$2,8 Milliarden an zweiter Stelle und die Betreuung von ambulanten Patienten mit \$1,8 Milliarden an dritter Stelle.

[0330] Wenn die ökonomischen Auswirkungen von Frakturen in Zusammenhang mit der Beeinflussung der Lebensqualität betrachtet werden, gibt es tatsächlich einen Bedarf für die Verbesserung in den Behandlungsmethoden, insbesondere bei Frakturen, die als potentiell problematisch betrachtet werden. Das sind Frakturen, die aufgrund der Art der Verletzung oder um Wirtsprobleme abzuschwächen, zusätzliche chirurgische Inter-

vention benötigen würden, eine verlängerte Zeit zur Heilung brauchen würden und/oder eine völlige, funktionelle Genesung verhindern könnten.

[0331] Die nachstehend beschriebene Studie ist daher geplant, um die verbesserten osteogenen Vorrichtungen als einen Heilungsbeschleuniger für neue Frakturen in Menschen zu studieren, und als ein Mittel, den Bedarf nach einer erforderlichen Intervention bei Heilungsproblemen nach der Operation zu verringern, um den Heilungsprozess zu beschleunigen. Außerdem werden bestimmte Patienten innerhalb dieser Studie mit verbesserten osteogenen Vorrichtungen als einen Knochen-Transplantatersatz behandelt werden, und zwar Patienten, die nach der Verletzung ein Knochentransplantat benötigen, oder in Fällen von verzögerter Heilung.

[0332] Wie hierin in Erwägung gezogen und vorstehend beschrieben, haben gegenwärtig bevorzugte Ausführungsformen der verbesserten osteogenen Vorrichtungen eine Konsistenz, die durch eine Nadel mit großem Gauge-Wert injiziert werden kann oder durch einen offenen Einschnitt so platziert werden können, dass sie im Allgemeinen in einer blutigen Umgebung an ihrem Platz verbleiben. Zusätzlich zu konventionellerer Verpackung können die injizierbaren, verbesserten osteogenen Vorrichtungen in Applikatoren/Spritzen verpackt werden, die sofort verwendbar sind. Eine Vielzahl an Spritzen und Nadeln kann hinzugefügt werden, um die Anwendung zu individualisieren. Andere Ausführungsformen werden auch durch die Zugabe von strahlungs- undurchlässigen Komponenten, wie sie vorher beschrieben wurden, strahlungsdurchlässig gemacht werden.

[0333] Es wird erwartet, dass die verbesserten osteogenen Vorrichtungen der vorliegenden Erfindung (injizierbar und implantierbar) die Häufigkeit von zusätzlichen Interventionen vermindern, die Heilungsrate beschleunigen, die Lebensqualität und die Geschwindigkeit der Rückkehr zu normaler Aktivität verbessern werden. Darüberhinaus wird erwartet, dass die verbesserten osteogenen Vorrichtungen, die hierin offenbart werden, in Frakturen von allen langen Knochen, Schlüsselbein und Schulterblatt verwendet werden, um die Heilung zu beschleunigen und zu einer verminderten Häufigkeit von Intervention (einschließlich nochmaliger Operation), erhöhter Heilungsgeschwindigkeit, erhöhter Rate der Rückkehr zu normaler Aktivität und verminderter Sterblichkeit zu führen. Im Gegensatz zu gegenwärtig vorliegenden Modalitäten der Fraktur-Reparatur gibt es keine biomechanische Anforderung bei den verbesserten Vorrichtungen und Verfahren, die hierin offenbart werden.

Untersuchungsanordnung

[0334] Patienten werden eine chirurgische Behandlung von offenen Frakturen der Tibia benötigen, welche nach einem Trauma erlangt wurde. Die Fraktur muss das Potential haben, an der Frakturstelle ausreichend stabilisiert zu werden, um Heilung zu gestatten. Die Patienten werden röntgenografischen Beweis der Skelettreife zeigen.

Art der Behandlung

Typ #1: Anfängliche Verletzung bei ≤ 7 Tage bei definitivem Verschluss

Typ #2: Bis zu 6 Wochen nach der anfänglichen Verletzung in Patienten, die ein Knochentransplantat benötigen.

[0335] Typ #1-Frakturen sind jene, die keine Knochentransplantation benötigen. Die Patienten werden in einem 1:1-Verhältnis von Standardbehandlung (Wundausschneidung der Frakturstelle, Reduktion und Stabilisierung), welche die Kontrollgruppe sein wird, im Vergleich zu Standardbehandlung mit OP-1-Vorrichtung mit und ohne einem Bindemittel wie zum Beispiel Carboxymethylcellulose (CMC) willkürlich ausgewählt. In bestimmten Patienten werden die Dosierungen von osteogenem Protein OP-1 variieren. Wie vorstehend beschrieben, enthält eine gegenwärtig bevorzugte Formulierung der verbesserten osteogenen Vorrichtung 2,5 mg OP-1/100g Kollagen/200 mg CMC. OP-1-Dosierungen werden von $\frac{1}{2}$ bis maximal $4 \times$ variieren; der CMC-Gehalt wird von 100-300 mg variieren. Wie auch vorstehend beschrieben, werden Variationen von Benetzungsmittelvolumina durch den behandelnden Chirurgen/Arzt untersucht werden, um die gewünschte Konsistenz/Konfiguration der Vorrichtung zu erzielen. Patienten aus der ersten Gruppe, bei denen 6 Monate nach der Behandlung keine Heilung erfolgt ist, werden wieder in einem 1:1 Verhältnis von Knochentransplantation (Kontrolle) im Vergleich zu OP-1 willkürlich ausgewählt.

[0336] Typ #2-Frakturen sind jene, die Knochentransplantation benötigen. Die Patienten werden in einem 1:1-Verhältnis von Knochentransplantation (Kontrolle) im Vergleich zu OP-1 willkürlich ausgewählt. Patienten aus der ersten Gruppe, bei denen nach 6 Monaten nach der Behandlung keine Heilung erfolgt ist, werden von der Knochentransplantation zu OP-1 und von OP-1 zur Knochentransplantation wechseln.

Untersuchungsplan

[0337] Die Patienten werden für ein Minimum von 1 Jahr nach der Behandlung beobachtet, um die Heilung zu bewerten, mit einer Nachuntersuchung nach 24 Monaten, um den Status zu bewerten.

[0338] Nachuntersuchungen werden 2 Wochen, 4 Wochen und alle 4 Wochen bis zu 6 Monaten und bei 8, 10 und 12 Monaten nach der Behandlung durchgeführt. Alle Patienten werden zusätzliche Nachuntersuchungs-Beurteilungen nach 24 Monaten haben, um die Gesamtgesundheit und den Status der Frakturstelle zu bewerten. Die folgenden Bewertungen werden durchgeführt: Veränderungen in physischer Untersuchung; Röntgenbilder; klinische Schmerzbewertung; klinische Bewertung der Fähigkeit ihr Gewicht zu tragen; klinische Funktionsbewertung; Bewertung der Lebensqualität (vor der Entlassung, 6 und 12 Monate); und Dokumentation von allen Interventionen zur Beschleunigung/Förderung der Heilung (chirurgisch und nicht chirurgisch) und Versagen/Ersatz von Hardware.

[0339] Es wird erwartet, dass Frakturen, die mit verbesserten osteogenen Vorrichtungen behandelt wurden, einen Beweis von beschleunigter Heilungsrate zeigen.

[0340] Außerdem wird erwartet, dass die mit den verbesserten osteogenen Vorrichtung behandelten Patienten zumindest die folgenden zusätzlichen Vorteile erfahren werden:

- 1) Möglichkeit für verminderte Heilungszeit mit schnellerer Wiederherstellung der Funktion, der Fähigkeit ihr Gewicht zu tragen und Gehfähigkeit;
- 2) Möglichkeit zur Verhinderung von verzögerter/schlechter/Nicht-Vereinigung;
- 3) Rückkehr zu normalen Aktivitäten früher/weniger Zeitverlust von Arbeit/Schule;
- 4) Mögliche Bewahrung vor weiterer Intervention/weiteren operativen Verfahren zur Beschleunigung der Heilung;
- 5) Weniger Hardwarekomplikationen; und
- 6) In jenen Patienten, die Knochen transplantation benötigen, den Vorteil von keiner Operation an einer zweiten Stelle zur Knochenentnahme mit damit in Zusammenhang stehender Sterblichkeit.

2. Test 2: Frische verschlossene Diaphysenfraktur

[0341] Die Reparatur von frischen verschlossenen Diaphysenfrakturen in menschlichen Testpersonen wird unter Verwendung von verbesserten osteogenen Vorrichtungen bewertet werden. Patienten werden genau gesagt durch Injektion der Vorrichtung in die verschlossenen Defekt-Stellen mit injizierbaren, verbesserten osteogenen Vorrichtungen behandelt werden. Es wird erwartet, dass beschleunigte Reparatur des Defekts im Vergleich zu Patienten beobachtet wird, die nicht mit verbesserten osteogenen Vorrichtungen behandelt werden.

3. Andere Tests an Menschen

[0342] Es wird erwartet, dass die Tests 1 und 2, die vorstehend dargelegt wurden, unter Verwendung von verschiedenen Konfigurationen von verbesserten osteogenen Vorrichtungen wiederholt werden, die Fibrinkleber enthalten. Es wird ferner erwartet, dass solche Vorrichtungen die Knochenbildung fördern werden und in bestimmten Ausführungsformen die Defektreparatur, im Vergleich zu unbehandelten Testpersonen, beschleunigen.

B. Reparatur von osteochondralen Defekten

1. Experiment 1: Osteochondritis Dessicans

[0343] Osteochondrale Defektmodelle unterstützen die klinische Verwendung von rhOP-1, um Osteochondritis Dessicans (OD) und Traumadefekte zu behandeln. OD ist eine Erkrankung, die in lokalisierten Gebieten von osteochondralen Defekten resultiert. Eine Ursache der Erkrankung kann ischämische Verletzung eines lokalisierten Gebiets sein, aber seine genaue Ätiologie ist unbekannt. In Patienten mit OD werden die betroffenen Gebiete nicht-vaskulär, mit anschließenden Veränderungen im darüberliegenden Gelenkknorpel. Patienten, die an OD des Knies leiden, erleben Symptome einschließlich Blockierung des Gelenks, lokalisierten Schmerz, Schwellung und retropatellaren Crepitus. Ein Experiment, das Patienten mit OD des Knies involviert, wird durchgeführt, um die Fähigkeit der verbesserten osteogenen Vorrichtung gegen die der osteogenen Standard-Vorrichtung bei der Reparatur von OD-Defekten zu vergleichen.

[0344] Gegenwärtig im Fachgebiet bekannte Verfahren zu Behandlung von OD schließen die Verwendung

von sehr invasiven chirurgischen Techniken ein. In den meisten Patienten mit reifem Skelett mit OD wird eine Operation benötigt. Chirurgische Techniken benötigen arthroskopische Bohrung der intakten Läsion. Als ein Ergebnis müssen Patienten während der Operation die Verabreichung einer Vollnarkose durchmachen. Nach der Operation müssen die Patienten in der Bewegung ihrer Knie durch eine immobilisierende Schiene ruhig gestellt werden und können, bis die Heilung nachgewiesen ist, nicht ohne die Verwendung von Krücken gehen.

[0345] In dieser Studie werden weniger invasive Techniken zur Behandlung von OD durchgeführt. Die Techniken beinhalten die Verwendung von verbesserten osteogenen Vorrichtungen, die über Injektion an die Defekt-Stelle verabreicht werden. Die Aktivität der verbesserten osteogenen Vorrichtung in der Reparatur von OD wird mit der von osteogener Standard-Vorrichtung verglichen.

[0346] Es wird erwartet, dass Patienten, die mit der verbesserten osteogenen Vorrichtung behandelt werden, die irgendeine der vorstehend erwähnten Matrizen und Bindemittel enthält, eine größere Befreiung von den Symptomen der OD zeigen werden als jene, die mit der osteogenen Standardvorrichtung behandelt werden. Patienten, die mit verbesserter osteogener Vorrichtung behandelt werden, werden zumindest eine größere Verminderung an Schmerzen, Schwellung und Arretieren des Knies erfahren als jene, die mit der osteogenen Standard-Vorrichtung behandelt werden, wobei das alles Indizien der Besserung und/oder Reparatur des Defekts sind.

Äquivalente

[0347] Die Erfindung kann in anderen spezifischen Formen verkörpert sein, ohne von den wesentlichen Eigenschaften davon abzuweichen. Die vorhergehenden Ausführungsformen werden daher in jeder Hinsicht eher als illustrativ als limitierend für die hierin beschriebene Erfindung betrachtet. Der Geltungsbereich der Erfindung wird daher eher durch die beigefügten Ansprüche als durch die vorangehende Beschreibung angegeben und alle Veränderungen, welche in die Bedeutung der Ansprüche fallen, sind daher vorgesehen, dass sie hierin eingeschlossen sind.

SEQUENZPROTOKOLL

- (1) Allgemeine Information:
- (i) Anmelder: Rueger, David C.
Tucker, Marjorie M.
- (ii) Titel der Anmeldung: Verbesserte Osteogene Vorrichtungen und Verfahren zu ihrer Verwendung zur Reparatur von endochondralen Knochen- und osteochondralen Defekten
- (iii) Zahl der Sequenzen: 9
- (iv) Korrespondenzadresse:
- (A) Adresse: Creative Biomolecules, Inc.
(B) Straße: 45 South Street
(C) Stadt: Hopkinton
(D) Staat: MA
(E) Land: USA
(F) PLZ: 01748
- (v) Computerlesbare Form:
- (A) Mediumtyp: Diskette
(B) Computer: IBM PC-kompatibel
(C) Betriebssystem: PC-DOS/MS-DOS
(D) Software: PatentIn Release #1.0, Version # 1.30
- (vi) Daten der vorliegenden Anmeldung:
- (A) Anmeldenummer:
(B) Anmeldedatum:
(C) Klassifizierung:
- (viii) Informationen zum Anwalt/Vertreter:
- (A) Name: Vito, Christine C
(B) Registrierungsnummer: 39.061
(C) Referenz-/Aktenummer: CRP-137
- (ix) Informationen zur Fernmeldeverbindung:
- (A) Telephon: (617) 248 – 7000
(B) Telefax: (617) 248 – 7100
- (2) Information zur SEQ ID NO: 1:
- (i) Sequenzmerkmale:
- (A) Länge: 1822 Basenpaare
(B) Typ: Nucleinsäure
(C) Strangform: Einzelstrang
(D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: cDNA
- (vi) Ursprüngliche Quelle:
- (A) Organismus: Homo sapiens
(F) Gewebeart: Hippocampus
- (ix) Merkmal:
- (A) Name/Schlüssel: CDS
(B) Lage: 49..1341
(C) Identifikationsverfahren: experimentell
(D) Andere Information: /Funktion = „Osteogenes Protein“
/Produkt = „OP1“
/Beweis = EXPERIMENTELL
/Standard-Name = „OP1“
- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 1:

GCATCGGCCC	CGGAGCCCGG	AGCCCGGGTA	GCGCGTAGAG	CCGGCCCG	ATG CAC GTG	57
					Met His Val	
					1	
CGC TCA CTG CGA GCT GCG GCG CCG CAC AGC TTC GTG GCG CTC TGG GCA						105
Arg Ser Leu Arg Ala Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala Leu Trp Ala						
5	10	15				
CCC CTG TTC CTG CTG CCG TCC GCC CTG GCC GAC TTC AGC CTG GAC AAC						153
Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser Leu Asp Asn						
20	25	30				
GAG GTG CAC TCG AGC TTC ATC CAC CCG CGC CTC GCG AGC CAG GAG CCG						201
Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser Gln Glu Arg						

40					45					50						
CCG	CAG	ATG	CAG	CGC	GAG	ATC	CTC	TCC	ATT	TTG	GGC	TTG	CCC	CAC	CGC	249
Arg	Glu	Met	Gln	Arg	Glu	Ile	Leu	Ser	Ile	Leu	Gly	Leu	Pro	His	Arg	
			55					60					65			
CCG	CCG	CCG	CAC	CTC	CAG	GGC	AAG	CAC	AAC	TCC	GCA	CCC	ATG	TTC	ATG	297
Pro	Arg	Pro	His	Leu	Gln	Gly	Lys	His	Asn	Ser	Ala	Pro	Met	Phe	Met	
		70					75					90				
CTC	ERC	CTG	TAC	AAC	GCC	ATG	ECG	GTG	GAG	GAG	GCC	GGC	GGG	CCC	GGC	345
Leu	Asp	Leu	Tyr	Asn	Ala	Met	Ala	Val	Glu	Glu	Gly	Gly	Gly	Pro	Gly	
	85					90					95					
CCG	CAG	GCC	CTC	TCC	TAC	CCC	TAC	AAG	GCC	GTC	TTC	ACT	ACC	CAG	GGC	393
Gly	Gln	Gly	Phe	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Lys	Ala	Val	Phe	Ser	Thr	Gln	Gly	
100					105					110					115	
CCC	CCT	CTG	GCC	AGC	CTG	CAA	GAT	AGC	CAT	TTC	CTC	ACC	GAC	GCC	GAC	441
Pro	Pro	Leu	Ala	Ser	Leu	Gln	Asp	Ser	His	Phe	Leu	Thr	Asp	Ala	Asp	
			120					125						130		
ACG	GTC	ATG	AGC	TTC	GTC	AAC	CTC	GTG	GAA	CAT	GAC	AAG	GAA	TTC	TTC	489
Met	Val	Met	Ser	Phe	Val	Asn	Leu	Val	Glu	His	Asp	Lys	Glu	Phe	Phe	
			135					140					145			
CAC	CCA	CCG	TAC	CAC	CAT	CGA	GAG	CTC	CGG	TTT	GAT	CTT	TCC	AAG	ATC	537
Leu	Pro	Arg	Tyr	His	His	Arg	Phe	Arg	Phe	Asp	Phe	Asp	Leu	Ser	Lys	Ile
		150				155						160				
CCA	GAA	GGG	GAA	GCT	GTC	ACG	GCA	GCC	GAA	TTC	CCG	ATC	TAC	AAG	GAC	585
Pro	Glu	Gly	Glu	Ala	Val	Thr	Ala	Ala	Glu	Phe	Arg	Ile	Tyr	Lys	Asp	
	165					170					175					
CAC	ATC	CGG	GAA	CCC	TTC	GAC	AAT	GAG	AUG	TTC	CGG	ATC	AGC	GTT	TAT	633
Tyr	Ile	Arg	Glu	Arg	Phe	Asp	Asn	Glu	Thr	Phe	Arg	Ile	Ser	Val	Tyr	
180					185					190					195	
CAG	CTG	CTC	CAG	GAG	CAC	TTG	GGC	AGG	GAA	TCC	GAT	CTC	TTC	CTG	CTC	681
Gln	Val	Leu	Gln	Glu	His	Leu	Gly	Arg	Glu	Ser	Asp	Leu	Phe	Leu	Leu	
				200				205						210		
CAC	ACC	CGT	ACC	CTC	TGG	GCC	TCC	CAG	GAG	GGC	TGG	CTG	GTG	TTT	GAC	729
Asp	Ser	Arg	Thr	Leu	Trp	Ala	Ser	Glu	Glu	Gly	Trp	Leu	Val	Phe	Asp	
			215					220					225			
TTC	ATA	GCC	ACC	ACC	AAC	CAC	TGG	GTG	GTC	AAT	CCG	CCG	CAC	AAC	CTG	777
Ile	Thr	Ala	Thr	Ser	Asn	His	Trp	Val	Val	Asn	Pro	Arg	His	Asn	Leu	
		230				235						240				
CCC	CTG	CAG	CTC	TCC	GGC	CAG	ACG	CTG	GAT	GGC	CAG	AGC	ATC	AAC	CCC	825
Gly	Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Glu	Thr	Leu	Asp	Gly	Gln	Ser	Ile	Asn	Pro	
	245					250						255				
ACG	TTG	GGC	GCC	CTG	ATT	GGG	CCG	CAC	GGG	CCC	CAG	AAC	AAG	CAG	CCC	873
Lys	Leu	Ala	Gly	Leu	Ile	Gly	Arg	His	Gly	Pro	Gln	Asn	Lys	Gln	Pro	
	260				265					270					275	
TTC	ACG	GTG	GCT	TTC	TTC	AAG	GCC	ACG	GAG	GTC	CAC	TTC	CCG	AGC	ATC	921
Phe	Met	Val	Ala	Phe	Phe	Lys	Ala	Thr	Glu	Val	His	Phe	Arg	Ser	Ile	
				280				285						290		
TCC	TCC	ACG	GGG	ASC	AAA	CAG	CGC	AGC	CAG	BAC	CGC	TCC	AAG	ACG	CCC	969
Arg	Ser	Thr	Gly	Ser	Lys	Gln	Arg	Ser	Gln	Asn	Arg	Ser	Lys	Thr	Pro	
			295					300					305			
AAG	AAC	CAG	GAA	GCC	CTG	CGG	ATG	GCC	AAC	GTG	GCA	GAG	AAC	AGC	AGC	1017
Lys	Asn	Gln	Glu	Ala	Leu	Arg	Met	Ala	Asn	Val	Ala	Glu	Asn	Ser	Ser	
			310				315						320			
ACC	CAC	CAG	AGG	CAG	GCC	TGT	AAG	AAG	CAC	GAG	CTG	TAT	GTC	AGC	TTC	1065
Ser	Asp	Gln	Arg	Gln	Ala	Cys	Lys	Lys	His	Glu	Leu	Tyr	Val	Ser	Phe	
			325			330						335				
CGA	GAC	CTG	GGC	TGG	CAG	GAC	TGG	ATC	ATC	CCG	CCT	GAA	GGC	TAC	GCC	1113
Arg	Asp	Leu	Gly	Trp	Gln	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Glu	Gly	Tyr	Ala	
			340			345				350					355	
CCC	TAC	TAC	TGT	GAG	GGG	GAG	TGT	GCC	TTC	CCT	CTG	AAC	TCC	TAC	ATG	1161
Ala	Tyr	Tyr	Cys	Glu	Gly	Glu	Cys	Ala	Phe	Pro	Leu	Asn	Ser	Tyr	Met	
				360				365						370		
AAC	GCC	ACC	AAC	CAC	GCC	ATC	GTG	CAG	ACG	CTG	GTC	CAC	TTC	ATC	AAC	1209

Ala Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn
 375 380 385

CCG GAA ACG GTG CCC AAG CCC TCC TGT CCG CCC ACG CAG CTC AAT GCC 1257
 Phe Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala
 390 400

AGC TCC GTC CTC TAC TTC GAT GAC AGC TCC AAC GTC ATC CTG AAG AAA 1305
 Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys
 405 410 415

TTG AEA AAC ATG GTG CTC CCG GCC TGT GGG TCC CAC TACCTCTCC 1351
 Phe Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
 420 425 430

CGCAACATAG ACCCTTTGGG GCCAAGTTTT TCTGGATCCT CCATTGCTCG CCTTGGCCAG 1411

CGACCACTAG ACCCACTGGC TTCTGTGAGA CCTTCCCTCC CCTATCCCCA ACTTTAAGG 1471

CTGTGAGSTA TTAGGAARCA TGAGCACCAT ATGGCTTTTG ATCAGTTTTT CAGTGGCAGC 1531

AGCAATCAA CAAGATCCTA CAAGCTGTGC AGGCABAACC TAGCAGGAAA AAAAAACAAC 1591

CGACAAACAA AAATGGCCGG CCAAGGTCAT TGGCTGGGAA GTCTCAGCCA TGCACGCACT 1651

CGTTTCGAGA CGTAATTATG AGGCTCTACC AGCCAGGSCA CCCAGCCGTG GGAGGAAGGG 1711

CGGTCTGCAA GGGGTGGGCA CATTGTGTCC TGTGGGAAAG GAAAATTGAC CCGGAAGTTC 1771

CGSTRATARA TGTACRATA AAACGATGA ATGAAAAAAA AAAAAAATAA A 1822

(2) Information zur SEQ ID NO: 2:

- (i) Sequenzmerkmale:
 - (A) Länge: 431 Aminosäuren
 - (B) Typ: Aminosäure
 - (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 2:

Met His Val Arg Ser Leu Arg Ala Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala
 1 10 15

Leu Trp Ala Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser
 20 25 30

Leu Asp Asn Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser
 35 40 45

Gln Glu Arg Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu
 50 55 60

Phe His Arg Pro Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser Ala Pro
 65 70 75 80

Met Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Gly Gly
 85 90 95

Gly Pro Gly Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser
 100 105 110

Met Gln Gly Pro Pro Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His Phe Leu Thr
 115 120 125

Asp Ala Asp Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys
 130 135 140

Gln Phe Phe His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu
 145 150 155 160

Ser Lys Ile Pro Glu Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile
 165 170 175

Tyr Lys Asp Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Arg Ile
 180 185 190

Ser Val Tyr Gln Val Leu Gln Glu His Leu Gly Arg Glu Ser Asp Leu
 195 200 205

Phe Leu Leu Asp Ser Arg Thr Leu Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu

210						215						220							
Val	Phe	Asp	Ile	Thr	Ala	Thr	Ser	Asn	His	Trp	Val	Val	Asn	Pro	Arg				
225					230					235					240				
His	Asn	Leu	Gly	Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Glu	Thr	Leu	Asp	Gly	Gln	Ser				
			245						250					255					
Ile	Asn	Pro	Lys	Leu	Ala	Gly	Leu	Ile	Gly	Arg	His	Gly	Pro	Gln	Asn				
			260					265					270						
Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Val	Ala	Phe	Phe	Lys	Ala	Thr	Glu	Val	His	Phe				
		275					280					285							
Asp	Ser	Ile	Arg	Ser	Thr	Gly	Ser	Lys	Gln	Arg	Ser	Gln	Asn	Arg	Ser				
		290				295					300								
Lys	Thr	Pro	Lys	Asn	Gln	Glu	Ala	Leu	Arg	Met	Ala	Asn	Val	Ala	Glu				
				310						315				320					
Asn	Ser	Ser	Ser	Asp	Gln	Arg	Gln	Ala	Cys	Lys	Lys	His	Glu	Leu	Tyr				
				325					330					335					
Val	Ser	Phe	Arg	Asp	Leu	Gly	Trp	Gln	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Glu				
			340					345					350						
Gly	Tyr	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Cys	Glu	Gly	Glu	Cys	Ala	Phe	Pro	Leu	Asn				
		355					360					365							
Ser	Tyr	Met	Asn	Ala	Thr	Asn	His	Ala	Ile	Val	Gln	Thr	Leu	Val	His				
						375					380								
Phe	Ile	Asn	Pro	Glu	Thr	Val	Pro	Lys	Pro	Cys	Cys	Ala	Pro	Thr	Gln				
				390						395				400					
Leu	Asn	Ala	Ile	Ser	Val	Leu	Tyr	Phe	Asp	Asp	Ser	Ser	Asn	Val	Ile				
				405					410				415						
Leu	Lys	Lys	Tyr	Arg	Asn	Met	Val	Val	Arg	Ala	Cys	Gly	Cys	His					
			420				425						430						

(2) Information zur SEQ ID NO: 3:

(i) Sequenzmerkmale:

- (A) Länge: 102 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (C) Strangform: Einzelstrang
- (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Protein

(ix) Merkmal:

- (A) Name/Schlüssel: Protein
- (B) Lage: 1...102
- (D) Andere Information: /Marker = OPX

/Bemerkung= „worin jede Xaa unabhängig aus einer Gruppe von einer oder mehreren spezifizierten Aminosäuren ausgewählt wird, wie definiert in der Beschreibung.“

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 3:

Cys	Xaa	Xaa	His	Glu	Leu	Tyr	Val	Xaa	Phe	Xaa	Asp	Leu	Gly	Trp	Xaa				
?			5					10					15						
Asp	Trp	Xaa	Ile	Ala	Pro	Xaa	Gly	Tyr	Xaa	Ala	Tyr	Tyr	Cys	Glu	Gly				
			20				25						30						
Glu	Cys	Xaa	Phe	Pro	Leu	Xaa	Ser	Xaa	Met	Asn	Ala	Thr	Asn	His	Ala				
			35				40					45							
Ile	Xaa	Gln	Xaa	Leu	Val	His	Xaa	Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Val	Pro	Lys				
			50			55					60								
Xaa	Cys	Cys	Ala	Pro	Thr	Xaa	Leu	Xaa	Ala	Xaa	Ser	Val	Leu	Tyr	Xaa				
			65		70				75					80					
Asp	Xaa	Ser	Xaa	Asn	Val	Xaa	Leu	Xaa	Lys	Xaa	Arg	Asn	Met	Val	Val				
			85						90					95					
Xaa	Ala	Cys	Gly	Cys	His														
			100																

(2) Information zur SEQ ID NO: 4:

(i) Sequenzmerkmale:

- (A) Länge: 97 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (C) Strangform: Einzelstrang
- (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Protein

(ix) Merkmal:

- (A) Name/Schlüssel: Protein
- (B) Lage: 1...97
- (D) Andere Information: /Marker = Generische-Seq-7

/Bemerkung= „worin jede Xaa unabhängig aus einer Gruppe von einer oder mehreren spezifizierten Aminosäuren ausgewählt wird, wie definiert in der Beschreibung.“

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 4:

Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Phe	Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Trp	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5				10						15	
Phe	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Ala	Xaa	Tyr	Cys	Xaa	Gly	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Pro
				20				25						30	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Asn	His	Ala	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				35				40						45	
Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Cys	Xaa	Pro
				50				55						60	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				70				75						80	
Val	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Met	Xaa	Val	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Cys
				85				90						95	

Xaa

(2) Information für SEQ ID NO: 5:

(i) Sequenzmerkmale:

- (A) Länge: 102 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (C) Strangform:
- (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Protein

(ix) Merkmal:

- (A) Name/Schlüssel: Protein
- (B) Lage: 1...102
- (D) Andere Information: /Marker = Generische-Seq-8

/Bemerkung= „worin jede Xaa unabhängig aus einer Gruppe von einer oder mehreren spezifizierten Aminosäuren ausgewählt wird, wie definiert in der Beschreibung.“

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 5:

Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Phe	Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Trp	Xaa
1				5					10					15	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Ala	Xaa	Tyr	Cys	Xaa	Gly
				20				25					30		
Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Asn	His	Ala
				35				40					45		
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				50				55					60		
Xaa	Cys	Cys	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Xaa
				70				75					80		
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Val	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Met	Xaa	Val
				85				90					95		

Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa
100

(2) Information zur SEQ ID NO: 6:

(i) Sequenzmerkmale:

- (A) Länge: 97 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (C) Strangform:
- (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Protein

(ix) Merkmal:

- (A) Name/Schlüssel: Protein
- (B) Lage: 1...97
- (D) Andere Information: /Marker = Generische-Seq-9

/Bemerkung= „worin jede Xaa unabhängig aus einer Gruppe von einer oder mehreren spezifizierten Aminosäuren ausgewählt wird, wie definiert in der Beschreibung.“

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 6:

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5					10						15	
	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Gly	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	
			20					25					30			
	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			35					40					45			
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Pro
			50					55					60			
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
						70				75						80
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Cys
						85				90					95	

Xaa

(2) Information zur SEQ ID NO: 7:

(i) Sequenzmerkmale:

- (A) Länge: 102 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (C) Strangform:
- (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Protein

(ix) Merkmal:

- (A) Name/Schlüssel: Protein
- (B) Lage: 1...102
- (D) Andere Information: /Marker = Generische-Seq-10

/Bemerkung= „worin jede Xaa unabhängig aus einer Gruppe von einer oder mehreren spezifizierten Aminosäuren ausgewählt wird, wie definiert in der Beschreibung.“

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 7:

Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5					10						15	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Gly	
				20				25					30			
Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			35					40					45			
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			50					55					60			
Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Xaa
					70					75						80

```

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
  85                               90                               95
Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa
  100

```

(2) Information zur SEQ ID NO: 8:**(i) Sequenzmerkmale:**

- (A) Länge: 5 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (C) Strangform:
- (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Peptid**(ix) Merkmal:**

- (A) Name/Schlüssel: Protein
- (B) Lage: 1...5
- (D) Andere Information: /Bemerkung= „worin jede Xaa unabhängig aus einer Gruppe von einer oder mehreren spezifizierten Aminosäuren ausgewählt wird, wie definiert in der Beschreibung.“

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 8:

```

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa
  1                               5

```

(2) Information zur SEQ ID NO: 9:**(i) Sequenzmerkmale:**

- (A) Länge: 5 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (C) Strangform:
- (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Peptid**(ix) Merkmal:**

- (A) Name/Schlüssel: Protein
- (B) Lage: 1...5
- (D) Andere Information: /Bemerkung= „worin jede Xaa unabhängig aus einer Gruppe von einer oder mehreren spezifizierten Aminosäuren ausgewählt wird, wie definiert in der Beschreibung.“

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 9:

```

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa
  1                               5

```

Patentansprüche

1. Vorrichtung zum Induzieren lokaler Knochen- oder Knorpelbildung, umfassend:

- (a) ein osteogenes Protein;
- (b) eine Matrix, welche aus einem Material abgeleitet ist, das kein synthetisches Polymer ist; und
- (c) ein Bindemittel, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Carboxymethylcellulose und dem Natriumsalz davon, wobei das Bindemittel eine Viskosität von etwa 10-200 cP und einen Substitutionsgrad von 0,65-0,90 hat.

2. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, wobei das osteogene Protein ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: OP-1, OP-2, OP-3, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP9, BMP10, BMP11, BMP12, BMP15, BMP16, DPP, Vgl, Vgr, Protein 60A, GDF1, GDF3, GDF5, GDF6, GDF7, GDF8, GDF9, GDF10, GDF11 und Aminosäuresequenz-Varianten eines jeden der vorangehenden.

3. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, wobei das osteogene Protein ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: OP-1, OP-2, BMP2, BMP4, BMP5, BMP6 und Aminosäuresequenz-Varianten eines jeden der vorangehenden.

4. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, wobei das osteogene Protein eine Aminosäuresequenz mit mindestens 70% Homologie mit den 102-106 C-terminalen Aminosäuren, einschließlich der konservierten 7-Cystein-Domäne, des menschlichen OP-1 umfasst.

5. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, wobei das osteogene Protein OP-1 ist.

6. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, wobei die Vorrichtung mindestens zwei unterschiedliche osteogene Proteine umfasst.
7. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, wobei die Matrix ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Kollagen, entmineralisiertem Knochen, Apatiten, Hydroxyapatiten, Tricalciumphosphaten und Mischungen davon.
8. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, wobei die Matrix Kollagen ist.
9. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, wobei die Matrix β -Tricalciumphosphat ist.
10. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, wobei die Vorrichtung mindestens zwei verschiedene Matrixmaterialien umfasst.
11. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, ferner ein Benetzungsmittel umfassend.
12. Vorrichtung gemäß Anspruch 11, wobei das Benetzungsmittel Salzlösung ist.
13. Vorrichtung zum Induzieren lokaler Knochen- oder Knorpelbildung, umfassend: ungefähr 1,25 mg OP-1 und mindestens ungefähr 180 mg Carboxymethylcellulose pro 1000 mg Kollagenmatrix, wobei die Carboxymethylcellulose eine Viskosität von etwa 10-200 cP und einen Substitutionsgrad von 0,65-0,90 hat.
14. Vorrichtung gemäß Anspruch 13, umfassend mindestens ungefähr 2,5 mg OP-1 pro 1000 mg Kollagenmatrix.
15. Vorrichtung gemäß Anspruch 13 oder 14, umfassend mindestens ungefähr 200 mg Carboxymethylcellulose pro 1000 mg Kollagenmatrix.
16. Vorrichtung zum Induzieren lokaler Knorpel- oder Knochenbildung, umfassend ein osteogenes Protein und einen Träger, wobei der Träger umfasst:
 - (a) einen Teil (Gew./Gew.) Bindemittel, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Carboxymethylcellulose und dem Natriumsalz davon, wobei das Bindemittel eine Viskosität von etwa 10-200 cP und einen Substitutionsgrad von 0,65-0,90 hat; und
 - (b) 50 oder weniger Teile (Gew./Gew.) Matrix, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Kollagen, entmineralisiertem Knochen, Apatiten, Hydroxyapatiten, Tricalciumphosphaten und Mischungen davon.
17. Vorrichtung gemäß Anspruch 16, wobei der Träger einen Teil (Gew./Gew.) Bindemittel und 25 Teile (Gew./Gew.) Matrix umfasst.
18. Vorrichtung gemäß Anspruch 16, wobei der Träger einen Teil (Gew./Gew.) Bindemittel und 10 Teile (Gew./Gew.) Matrix umfasst.
19. Vorrichtung gemäß Anspruch 16, wobei der Träger einen Teil (Gew./Gew.) Bindemittel und fünf Teile (Gew./Gew.) Matrix umfasst.
20. Vorrichtung gemäß Anspruch 16, wobei der Träger weniger als 5 Teile (Gew./Gew.) Matrix umfasst.
21. Vorrichtung zum Induzieren lokaler Knorpel- oder Knochenbildung, umfassend ein osteogenes Protein und einen Träger, wobei der Träger umfasst:
 - (a) 10 oder weniger Teile (Gew./Gew.) Bindemittel, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Carboxymethylcellulose und dem Natriumsalz davon, wobei das Bindemittel eine Viskosität von etwa 10-200 cP und einen Substitutionsgrad von 0,65-0,90 hat; und
 - (b) ein Teil (Gew./Gew.) Matrix, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Kollagen, entmineralisiertem Knochen, Apatiten, Hydroxyapatiten, Tricalciumphosphaten und Mischungen davon.
22. Vorrichtung gemäß Anspruch 21, wobei der Träger weniger als 10 Teile (Gew./Gew.) Bindemittel umfasst.
23. Vorrichtung gemäß Anspruch 14, 17 oder 22 ferner Salzlösung umfassend.
24. Verwendung eines osteogenen Proteins, einer Matrix, welche aus einem Material abgeleitet ist, das

nicht ein synthetisches Polymer ist, und eines Bindemittels, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Carboxymethylcellulose und dem Natriumsalz davon, wobei das Bindemittel eine Viskosität von etwas 10-200 cP und einen Substitutionsgrad von 0,65-0,90 hat, für die Herstellung einer pharmazeutischen Vorrichtung zum Induzieren lokaler Knochen- oder Knorpelbildung zur Reparatur einer Knochen- oder Knorpel-Defekt-Stelle oder einer osteochondralen Defekt-Stelle.

25. Verwendung gemäß Anspruch 24, wobei die lokale Knochenbildung eine endochondrale Knochenbildung ist.

26. Verwendung gemäß Anspruch 24, wobei die lokale Knorpelbildung Gelenknorpelbildung ist.

27. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 24 bis 26, wobei die Defekt-Stelle ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: Defekt mit kritischer Größe, Defekt mit nicht kritischer Größe, segmentalem Pseudoarthrose-Defekt, Pseudoarthrose-Fraktur, Fraktur, osteochondralem Defekt und subchondralem Defekt.

28. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 24 bis 27, wobei das Volumen des Arzneimittels, welches an die Defekt-Stelle gebracht wird, ausreichend ist, um die Defekt-Stelle zu füllen.

29. Vorrichtung zum Induzieren lokaler Knochen- oder Knorpelbildung, umfassend:

(a) OP-1;

(b) eine Kollagenmatrix; und

(c) Carboxymethylcellulose mit einer Viskosität von ungefähr 10-200 cP und einem Substitutionsgrad von 0,65-0,90.

30. Kit zum Induzieren lokaler Knochen- oder Knorpelbildung unter Verwendung der Vorrichtung gemäß Anspruch 1, wobei der Kit umfasst:

(a) einen ersten Behälter, der angepasst ist, um ein osteogenes Protein und ein Matrixmaterial aufzunehmen; und

(b) einen zweiten Behälter, der angepasst ist, um ein Bindemittel aufzunehmen,

wobei das osteogene Protein und das Matrixmaterial in dem ersten Behälter bereitgestellt werden, und das Bindemittel ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Carboxymethylcellulose und dem Natriumsalz davon, wobei das Bindemittel eine Viskosität von etwa 10-200 cP und einen Substitutionsgrad von etwa 0,65-0,90 hat und in dem zweiten Behälter bereitgestellt wird.

31. Kit gemäß Anspruch 30, ferner umfassend einen dritten Behälter, der angepasst ist, um ein Benetzungsmittel aufzunehmen.

32. Kit gemäß Anspruch 30, wobei der erste Behälter und der zweite Behälter derselbe sind.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

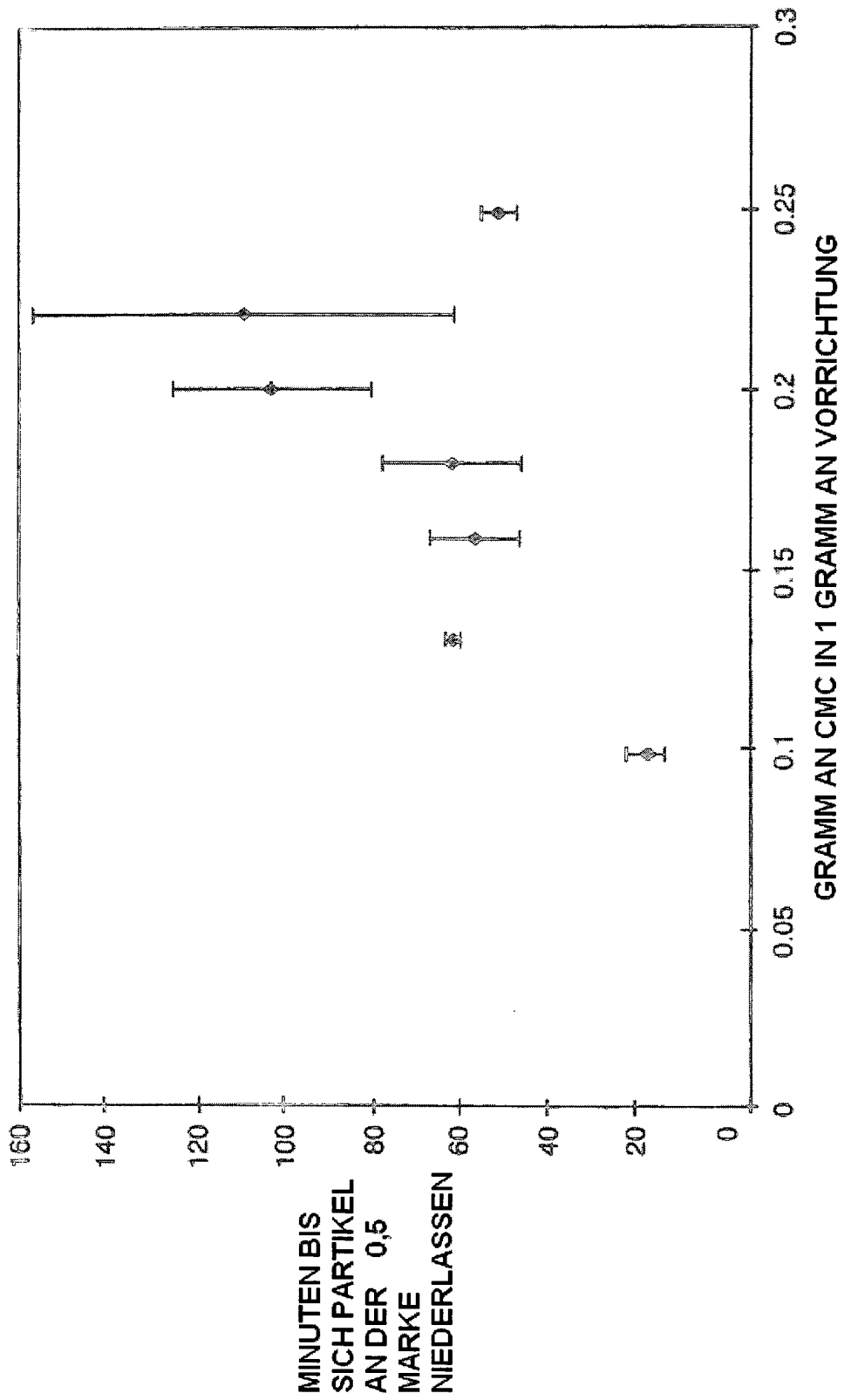


FIG. 1

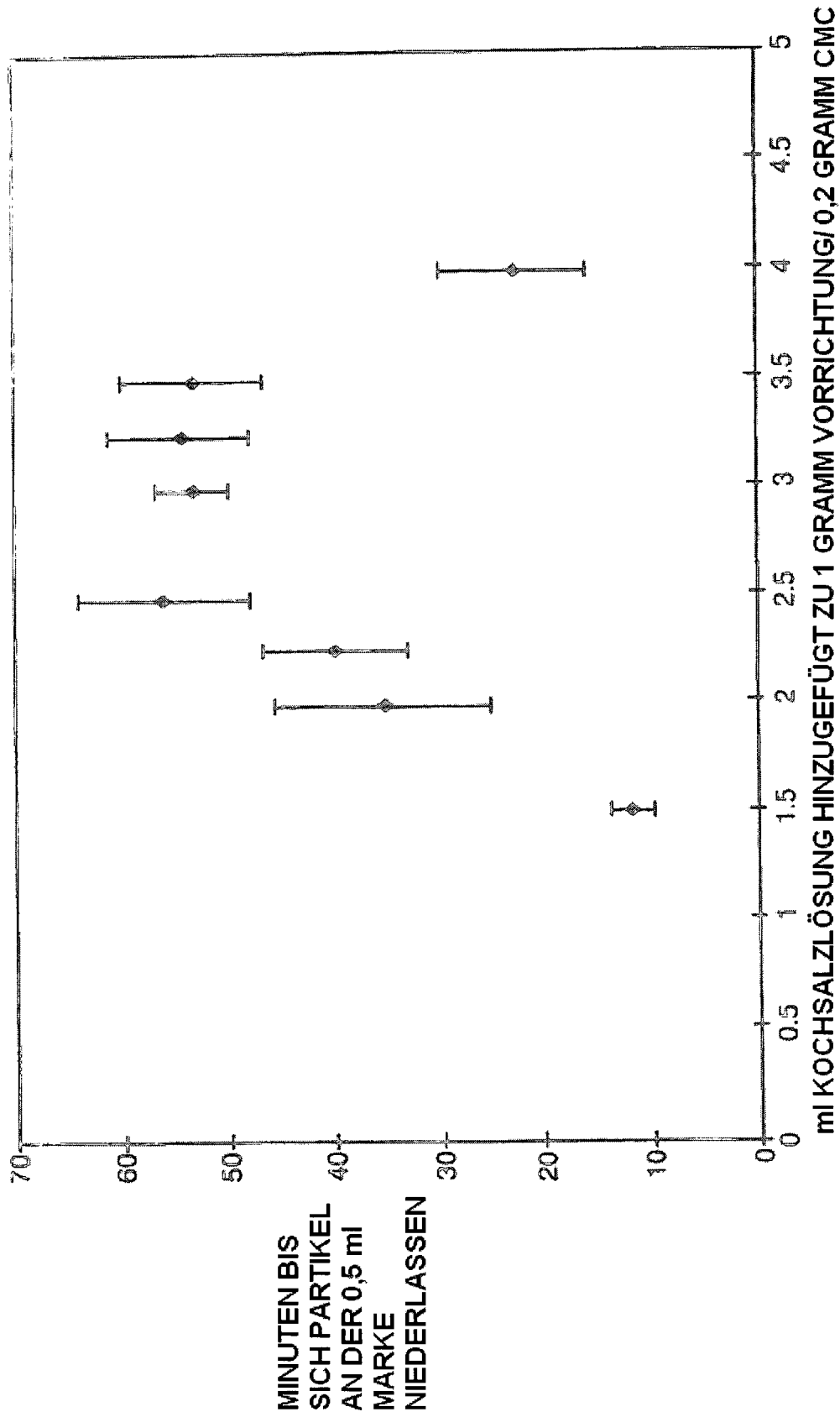


FIG. 2